

機関番号：32653
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591535
 研究課題名（和文） トールライクレセプター発現遺伝子制御による自然免疫細胞機能の個別的解析
 研究課題名（英文） Personalized analysis of an innate immune response by targeting Toll-like receptor signal pathway related gene
 研究代表者
 有賀 淳 (ARUGA ATSUSHI)
 東京女子医科大学・医学部・教授
 研究者番号：40221056

研究成果の概要（和文）：ヒト免疫担当細胞におけるトールライクレセプター(TLR)発現解析にて CD14 陽性細胞にて TLR4 が、獲得免疫誘導に重要な樹状細胞にて TLR9 の発現が確認され、さらに個体間での発現強度に差が認められた。TLRのリガンドである BCG-CWSによる刺激にて CD14 陽性細胞内の MyD88 及び TRAF6 mRNA 発現量の増加が認められ、TLR を介した Type 1 サイトカイン産生増強応答機序が示された。

研究成果の概要（英文）：Expressions of TLRs were examined by flowcytometry on human innate immune cells. CD14 positive cells expressed TLR4 and dendritic cells expressed TLR9 on their surfaces. There were several differences in the expressions of TLRs by individuals. The quantity of MyD88 and TRAF6 mRNA in the CD14 positive cells increased when the TLR ligands, BCG-CWS were added in the culture. These results demonstrated the mechanism of Type 1 cytokine secretion by TLR signal pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：トールライクレセプター、自然免疫、MyD88、TRAF6、遺伝子解析、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト生体における種々の細菌、ウイルスなどの異物や癌細胞などの自己異型細胞に対応する自然免疫応答は主に白血球分画中のマクロファージ、樹状細胞、好中球、NK細胞などが担っていることが知られている。これら自然免疫担当細胞の表面には様々な細菌やウイルスなどに対応するレセプター

としてトールライクレセプター(Toll-like receptor:TLR)が発現していることが近年解明され、現在ヒトでは10種類のTLRが同定されている。それぞれのTLRには特定のリガンド分子が結合することが知られており、TLR1/2にはマイコプラズマ、細菌リポペプチドが、TLR2/6にはグラム陽性細菌細胞壁成分が、TLR3にはウイルスの2本鎖RNAが、TLR9に

は細菌のCpG-DNAが結合する。TLRにリガンドが結合した後の細胞内シグナル伝達経路においてMyD88よりTRAF6を介してType I インターフェロン、TNF \cdot 、IL-6等の炎症性サイトカインの産生が誘導されるメカニズムが現在までに判明している。

(2) 本研究代表者の今までの基礎的研究において、自然免疫担当細胞におけるTLRの発現様式は均一ではなく細胞間差及び個体差が認められることが示唆されている。このTLRの発現個体差がTLRリガンド分子による刺激に応答したType 1サイトカイン産生量の個体差をもたらし、様々な病態における反応の個体差に影響していることが推測される。よって個々の生体におけるTLR発現差異を評価することにより、細菌やウイルスに対する自然免疫担当細胞からのType 1サイトカイン産生能を予測し、種々の細菌感染やウイルス感染に対する生体の免疫応答及び臨床病態を評価することが可能となることが考えられる。また、Type 1サイトカイン産生経路ではTLRの発現差異のみならず、TLRからのシグナル伝達経路において重要な働きをする遺伝子MyD88及びTRAF6の発現量にも個体差が存在する可能性を検討する必要性が考えられる。これらの自然免疫応答を解析することにより、細菌やウイルスに対する免疫応答のみならず、癌細胞等の自己異型細胞に対する腫瘍免疫応答におけるメカニズムをも解析することが可能となると期待される。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、今回、健常人及び癌患者における自然免疫担当細胞のTLRの発現及びTLRを介する一連の細胞内シグナル伝達経路に深く係る遺伝子発現の個体差を解析し、各臨床病態との関連を検討することにより、ヒトにおける自然免疫応答の個体差を評価するシステムを形成し、さらに外科術後の感染症や癌治療における新たな治療戦略の開発を目指して本研究を計画した。健常人ボランティアもしくは癌患者の末梢血中白血球細胞分画中のマクロファージ、樹状細胞、好中球、NK細胞、T細胞のTLR発現をフローサイトメーターとRT-PCRを用いて解析し比較検討することにより、各細胞群におけるTLR発

現の差異を解析する。さらに、TLR陽性細胞をTLRリガンドにて刺激し、Type I インターフェロン、TNF \cdot 、IL-6等の炎症性サイトカイン産生誘導に深く関連するMyD88及びTRAF6のmRNA発現をrealtime PCRにて定量的に解析し、TLR刺激とType1サイトカイン産生の関連を明確にする。また、TLRリガンド刺激による細胞内シグナルの活性化により各免疫担当細胞、特にプロフェッショナル抗原提示細胞である樹状細胞にて発現する細胞表面分子を解析し、樹状細胞の成熟化との関連を明らかにすることを目標とする。以上により癌患者や外科手術後感染症併発患者における自然免疫応答機能評価をシステム化し、新たな治療戦略の開拓に向けた治療計画を立案することを目指して研究を進める。

3. 研究の方法

(1) 健常人(ボランティア)及び癌患者の末梢血を採取し、Ficoll-Hypaque遠心分離にてバフィーコートを採取して、FITC-CD3, CD11c, CD14, CD16, CD56, $\cdot\cdot$ TCR抗体とPE-TLR1~TLR10抗体を用いた2カラーフローサイトメトリ解析を行い、各細胞群におけるTLR発現の差異を解析する。

(2) 健常人(ボランティア)及び癌患者の末梢血を採取し、Ficoll-Hypaque遠心分離にてバフィーコートを採取し、CD3, CD11c, CD14, CD16, CD56, $\cdot\cdot$ TCR抗体を用いたpositive selectionにより各細胞群を分離し、得られた各細胞群におけるTLR遺伝子発現をRT-PCRにて解析する。

(3) 健常人(ボランティア)及び癌患者の末梢血を採取し、Ficoll-Hypaque遠心分離にてバフィーコートを採取し、CD3, CD11c, CD14, CD16, CD56, $\cdot\cdot$ TCR抗体を用いたpositive selectionにより各細胞群を分離し、得られた各細胞群におけるMyD88遺伝子発現をreal time PCRにて解析する。

(4) 健常人(ボランティア)及び癌患者の末梢血を病期を追って採取し、Ficoll-Hypaque遠心分離にてバフィーコートを採取し、CD3, CD11c, CD14, CD16, CD56, $\cdot\cdot$ TCR抗体を用いたpositive selection

により各細胞群を分離し、得られた各細胞群における TRAF6 遺伝子発現を real time PCR にて解析する。

(5) 2.により分離された各細胞群を TLR 活性化分子である CpG-DNA もしくは BCG-CWS により 48 時間活性化した時の各細胞表面における MICA/MICB の発現をフローサイトメトリー, RT-PCR, ウェスタンブロットにて解析する。

(6) 2.により分離された各細胞群を TLR 活性化分子である CpG-DNA もしくは BCG-CWS により 48 時間活性化した時の MyD88 mRNA の発現を realtime PCR にて定量的に解析する。

(7) 2.により分離された各細胞群を TLR 活性化分子である CpG-DNA もしくは BCG-CWS により 48 時間活性化した時の TRAF6 mRNA の発現を realtime PCR にて定量的に解析する。

(8) ヒト CD14 陽性単球を 1 週間 GM-CSF と IL-4 にて培養し、未熟樹状細胞を誘導する。誘導された未熟樹状細胞を TLR 活性化分子 (BCG-CWS, CpG-DNA) により 48 時間活性化した後の樹状細胞の成熟化及び細胞表面分子発現をフローサイトメーターによる CD11c, CD14, CD80, CD83, CD86, HLA-class I, HLA-class II, MICA/MICB の発現解析にて比較する。

(9) ヒト CD14 陽性細胞を TLR 活性化分子 (BCG-CWS, CpG-DNA) により 48 時間活性化した前後での、MyD88 mRNA の発現量の推移を realtime PCR にて定量的に解析する。

(10) ヒト CD14 陽性細胞を TLR 活性化分子 (BCG-CWS, CpG-DNA) により 48 時間活性化した前後での、TRAF6 mRNA の発現量の推移を realtime PCR にて定量的に解析する。

4. 研究成果

(1) ヒト生体における自然免疫応答は主に白血球分画中のマクロファージ、樹状細胞、好中球、NK 細胞、 $\bullet\bullet$ 型 T 細胞などが担っており、これら自然免疫担当細胞における TLR の発現を健康人及び消化器癌患者の末梢白血球細胞を用いた 2 カラーフローサイトメトリーにて解析した結果、CD3 陽性 T 細胞、CD56 陽性 NK 細胞、 $\bullet\bullet$ 型 T 細胞では細胞上に TLR

の発現を認めず、CD14 陽性細胞において TLR4 の発現が確認された。また、この CD14 陽性細胞における TLR4 発現強度には個体差が認められ、TLR リガンド分子による刺激に応答するサイトカイン産生に差異が生じることが推測された。

(2) CD3 陽性 T 細胞を抗 CD3 抗体にて活性化刺激を加えて、TLR の発現の変異を 2 カラーフローサイトメトリーにて解析した。その結果、CD3T 細胞は活性化培養後においても TLR の発現を認めなかった。

(3) CD56 陽性 NK 細胞をインターロイキン 2 にて活性化培養して TLR の発現の変異を 2 カラーフローサイトメトリーにて解析した。その結果、CD56 陽性 NK 細胞は活性化培養後においても TLR の発現を認めなかった。

(4) 末梢血白血球を非ペプチド抗原と IL-2 にて活性化培養して $\bullet\bullet$ 型 T 細胞を誘導し、TLR の発現を 2 カラーフローサイトメトリーにて解析した。その結果、 $\bullet\bullet$ 型 T 細胞では TLR の明らかな発現が確認されなかった。

(5) CD14 陽性細胞をヒト GM-CSF (50ng/ml) 及び IL-4 (50ng/ml) 添加培養液にて 7 日間培養し、未熟樹状細胞を誘導した。樹状細胞の TLR の発現を 2 カラーフローサイトメトリーにて解析した結果、樹状細胞において TLR9 の発現が認められた。この TLR9 の発現には個体差があり、TLR 刺激による Type1 サイトカイン産生能に個人差が生じる要因のひとつと推測された。

(6) 健康人及び癌患者末梢白血球分画より分離した CD3 陽性 T 細胞、CD14 陽性細胞、未熟樹状細胞における MyD88 及び TRAF6 mRNA 遺伝子発現をリアルタイム PCR により解析した。各細胞分画より total RNA を採取し cDNA を作成して、TaqMan Gene Expression Assay (Applied biosystems) のプローベとプライマーを用いてリアルタイム PCR を行った。すべての細胞分画に MyD88 及び TRAF6 の mRNA の存在が確認された。CD14 陽性細胞の MyD88 mRNA 発現量は T 細胞の 1.8 倍と多く、逆に TRAF6 mRNA 発現量は 0.7 倍と少なかった。CD14 陽性細胞と未熟樹状細胞では MyD88 mRNA、TRAF6 mRNA とも発現量に明らかな差異はみとめられなかった。

(7) CD14 陽性細胞における TLR からのシグ

ナル伝達による MyD88 及び TRAF6 の mRNA の増減を解析するため、TLR4 に結合するリガンドである BCG-CWS と TLR9 に結合するリガンドである CpG-DNA を合成してそれぞれの細胞を刺激培養した。同時に CD3 陽性 T 細胞における MyD88 及び TRAF6 の mRNA の発現を解析して比較した。CD14 陽性細胞の MyD88 mRNA 発現量 BCG-CWS 刺激にて 1.8 倍に増加を認めた。また、TRAF6 mRNA 発現量は 1.4 倍に増加が認められた。これに対して、CpG-DNA 刺激では MyD88 及び TRAF6 mRNA の発現量に明らかな変化は認められなかった。以上の結果より CD14 陽性細胞上の TLR4 を介した刺激伝達により MyD88 及び TRAF6 mRNA の発現量が増加することが明らかとなり、Type1 サイトカイン産生増強応答を示すメカニズムが確認された。

(8) CD3 陽性 T 細胞を抗 CD3 抗体にて活性化刺激を加えて培養後の MyD88 及び TRAF6 mRNA の発現量を解析した。CD3 陽性 T 細胞では活性化培養後において MyD88 及び TRAF6 mRNA の著明な発現量の減少が認められた。炎症性反応などが生じたときに活性化された T 細胞では自ら遺伝子発現が減少し、免疫応答がコントロールされていることが示唆される結果であった。

(9) 樹状細胞の成熟化における TLR からのシグナル伝達を解析するために、CD14 陽性細胞を 1 週間 GM-CSF 及び IL-4 にて培養して未熟樹状細胞を誘導した後に BCG-CWS もしくは CpG-DNA を 48 時間添加培養して、樹状細胞の成熟化マーカーの発現を 2 カラーフローサイトメトリーにて解析した。樹状細胞における成熟化のマーカーである CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CCR7, CD11c の発現は BCG-CWS 及び CpG-DNA の刺激培養の前後で明らかな変化を認めず、これらの TLR からの刺激が樹状細胞の成熟化に及ぼす影響は確認されなかった。また、樹状細胞表面上の MICA/B の発現にも変化を認めなかった。以上より、TLR からのシグナル伝達が直接樹状細胞の成熟化や表面分子の発現を変化させる働きは今回の実験系では確認されなかった。

(10) 以上の研究成果により、ヒト免疫担当細胞 CD14 陽性細胞及び樹状細胞における TLR の発現が確認され、TLR リガンド分子による刺激によって Type 1 サイトカイン産生を増

強するシグナルが MyD88 及び TRAF6 遺伝子を介して伝達されることが示された。この TLR 発現には個体差が認められることも明らかとなり、癌や感染症における生体防御作用の個体差をもたらすことが示唆された。今後はこれらの評価系を確立することによる新しい治療戦略に向け、さらなる研究の進展が望まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① 有賀 淳、樹状細胞による癌治療、日本臨床、査読無、2010、68(6)、1107-1110
- ② 有賀 淳、樹状細胞療法理論と現実、Mebio、査読無、2010、27(12)、106-115
- ③ 松下典正、有賀 淳 (他 11 人、2 番目)、治癒切除不能進行大腸癌患者に対する UFT/LV と癌ペプチドワクチン併用療法の第 I 相臨床試験、Biotherapy、査読有、2010、24(5)、394-402
- ④ 谷川啓司、有賀 淳 (他 6 人、7 番目)、臨床的立場からみる免疫療法のあるべき今後の展開、Biotherapy、査読有、2010、24(4)、320-326
- ⑤ H. Komine, A. Aruga (他 2 人、2 番目)、Enhanced Immunotherapy against Lung Cancer Cells, J Tokyo Wom Med Univ、査読有、2009、79(11)、423-433
- ⑥ 有賀 淳、山本雅一、肝内胆管癌に対するワクチン療法、肝胆膵、査読無、2009、59(5)、895-903
- ⑦ 小寺由人、有賀 淳 (他 2 人、3 番目)、肝内胆管癌に対する樹状細胞ワクチン、癌と化学療法、査読有、36(12)、1964-1966, 2009
- ⑧ 片桐聡、有賀 淳 (他 8 人、9 番目)、肝細胞癌治療後の再発抑制補助治療法、J Microwave Surg、査読有、2009、27、39-47
- ⑨ 鈴木隆二、有賀 淳 (他 6 人、6 番目)、多様な抗原性が示唆された高度進行胆嚢癌の 1 経験例、癌と化学療法、査読有、2009、36(12)、1988-1990
- ⑩ 小寺由人、山本雅一、有賀 淳、樹状細胞ワクチン療法による免疫応答と臨床効果の

検討。癌の臨床（査読無）55(11), 779-784, 2009

⑪ 作山隆二、有賀 淳（他6人、2番目）、消化器癌患者におけるCCR4+/CXCR3+細胞比率の解析、癌と化学療法、査読有、2008、35(12)、2259-2261

〔学会発表〕（計20件）

① 松下典正、有賀 淳、標準療法不応進行胃・大腸癌患者に対する新規ペプチドワクチン療法第I相臨床試験の経過報告、第23回日本バイオセラピー学会、2010年12月10日、大阪

② 有賀 淳、胆道癌に対するペプチドワクチン療法の現状と展望、第23回日本バイオセラピー学会、2010年12月9日、大阪

③ 小寺由人、有賀 淳、原発性肝癌に対する樹状細胞ワクチン療法、2010年10月29日、京都

④ 有賀 淳、切除不能進行胆道癌に対するペプチドワクチン療法の第I相臨床試験、第22回日本バイオセラピー学会、2009年11月27日、大阪

⑤ 奥山隆二、有賀 淳、切除不能進行膵癌に対するペプチドワクチン療法の第I相臨床試験、第22回日本バイオセラピー学会、2009年11月27日、大阪

⑥ 松下典正、有賀 淳、治癒切除不能進行大腸癌患者に対するUFT/LVと癌ペプチドワクチン併用療法の第I相臨床試験、第22回日本バイオセラピー学会、2009年11月26日、大阪

⑦ 小林泰信、有賀 淳、超常磁性酸化鉄による単球由来樹状細胞と活性化リンパ球の標識ならびにその体内動態の解析への応用、第22回日本バイオセラピー学会、2009年11月26日、大阪

⑧ 鈴木隆二、有賀 淳、多様な抗原性が示唆された高度進行胆嚢癌の1経験例、第30回癌免疫外科研究会、2009年5月22日、久留米

⑨ 小寺由人、有賀 淳、肝内胆管癌に対する樹状細胞ワクチン、第30回癌免疫外科研究会、2009年5月21日、久留米

⑩ 小寺由人、有賀 淳、癌宿主応答から見た癌治療の最前線、第109回日本外科学会、

2009年4月3日、福岡

⑪ 松下典正、有賀 淳、マウスメラノーマモデルにおける制御性T細胞除去方法の比較検討、第109回日本外科学会、2009年4月3日、福岡

⑫ 清水公一、有賀 淳、Phase II trial of combination therapy of tumor lysate-pulsed dendritic cells and adoptive transfer of anti-CD3 activated T cells (ATVAC) to lower postsurgical recurrence rates of intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC)、第70回日本臨床外科学会、2008年11月29日、東京

⑬ 有賀 淳、消化器外科領域における特異的免疫療法のスタンダードを目指して、第21回日本バイオセラピー学会、2008年11月18日、東京

⑭ 作山隆二、有賀 淳、TP-DCの有効性と特異性を示した1例、第21回日本バイオセラピー学会、2008年11月18日、東京

⑮ 奥山隆二、有賀 淳、末梢血からの活性化リンパ球療法が著効したVv3高度進行肝細胞癌の一例、第46回日本癌治療学会、2008年10月30日、名古屋

⑯ 片桐聡、有賀 淳、最新の肝細胞癌治療後の再発抑制補助療法、第27回Microwave surgery研究会、2008年9月5日、横浜

⑰ 清水公一、有賀 淳、自己腫瘍抽出抗原を用いた特異的免疫細胞療法と外科治療の併用、第29回癌免疫外科研究会、2008年6月19日、東京

⑱ 作山隆二、有賀 淳、消化器癌患者におけるCCR4+/CXCR3+細胞比率の解析、第29回癌免疫外科研究会、2008年6月19日、東京

⑲ 奥山隆二、有賀 淳、局所温熱療法にて骨浸潤・転移の疼痛緩和を得た症例2例、第29回癌免疫外科研究会、2008年6月19日、東京

⑳ 有賀 淳、樹状細胞を用いた癌免疫療法の臨床的研究の現状と将来、第48回日本リンパ網内系学会、2008年6月13日、札幌

〔図書〕（計3件）

① 有賀 淳、篠原出版新社、がん・放射線療法2010、2010、381-388

② 有賀 淳、山本雅一、中山書店、がんペ

プチドワクチン療法、2009、109-118

- ③ 有賀 淳、講談社、ガン免疫療法の最新治療がわかる本、2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有賀 淳 (ARUGA ATSUSHI)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：40221056

(2) 研究協力者

軽部 裕代 (KARUBE HIROYO)
東京女子医科大学・医学部・研究補助員