

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790366
 研究課題名（和文）癌特異的キラーT細胞活性化における樹状細胞のクロスプレゼンテーション制御機構解明
 研究課題名（英文）Elucidation of immune-regulation mechanism for cross-presentation by DCs in activation of tumor-specific CTLs
 研究代表者
 北村 秀光 (KITAMURA HIDEMITSU)
 北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授
 研究者番号：40360531

研究成果の概要（和文）：樹状細胞による癌抗原タンパク質の取り込みとクロスプレゼンテーションを介した癌抗原特異的キラーT細胞の活性化能を試験管内実験およびマウス生体モデルを駆使して評価した。その結果、担癌環境下で産生される事が知られている IL-6 存在下では、癌細胞の取り込みは上昇するが、抗原提示能が減弱する一方、TLR リガンドや IFN- γ 刺激下では増強する事を見いだした。今後、樹状細胞を介した癌抗原特異的キラーT細胞の効率的生体内誘導法を開発することで、癌免疫治療への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Uptake of tumor-antigen by dendritic cells (DCs) and generation of tumor-antigen specific killer T cells by the cross-presentation were evaluated in vitro and in vivo. Although IL-6, a major cytokine produced under tumor-bearing state, enhanced the engulfment of tumor cells, it reduced antigen-presenting ability by DCs. On the other hand, the antigen presentation by DCs were increased in the presence of TLR ligands and IFN- γ . In the near future, development of effective generation of tumor-antigen specific T cells by DCs would be a promising strategy for cancer immunotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫監視・腫瘍免疫、樹状細胞、クロスプレゼンテーション、MHC、CTL、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

抗原提示細胞は免疫担当細胞の一つであり、外来由来もしくは内因性の抗原ペプチドを主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラス II およびクラス I 分子に結合し、それぞれヘル

パー(CD4+)T細胞、キラー(CD8+)T細胞に提示する。この抗原ペプチドを介した抗原提示細胞とT細胞との相互作用を起点として、免疫系全体が活性化していく。従って、抗原提示細胞におけるMHC分子の制御は、我々の免

疫システムを介した生体防御機構にとって非常に重要である。

これまで、自己にとって望まれない細胞、例えばウイルスに感染した細胞や癌化した細胞を排除する機構として、これらの細胞を抗原提示細胞が貪食した後で、ウイルス抗原や癌抗原を細胞内で断片化して得られるペプチドをMHCクラスI分子に提示する、いわゆるクロスプレゼンテーションにより、キラーT細胞を活性化することにより生体内から排除する免疫システムが報告されている。このクロスプレゼンテーションは、細胞内でのファゴサイトーシス、リソソームプロテアーゼによる抗原の断片化、細胞内トラフィッキングとMHCクラスI分子との結合、エキソサイトーシスによる細胞表面への発現とCD8+T細胞への提示などの複数の機構から成立している。しかしながら、外来抗原のMHCクラスII分子による提示とCD4+T細胞の活性化機構に比べ、その詳細な制御機構には未知の部分も多く残されている。

樹状細胞は、生体内で発生した癌細胞を貪食し、MHCクラスI分子に断片化した癌抗原ペプチドをCD8+T細胞にクロスプレゼンテーションすることで癌細胞特異的キラーT細胞を活性化し、癌細胞を駆逐する。最近の報告で、担癌生体内にリポソーム含有CpG-癌抗原蛋白質が、樹状細胞に積極的に取り込まれ、癌抗原特異的なCD8+T細胞を誘導すること、さらに著しい癌の退縮効果を持つことが分かっている。またIFN- γ 高産生Th1細胞と癌抗原蛋白質を併用することでも癌抗原特異的なCD8+T細胞を誘導することが報告されている。

従って、本研究の目指す樹状細胞における癌抗原特異的CD8+T細胞の活性化の過程における、TLR刺激やサイトカインシグナルによる癌抗原ペプチドのクロスプレゼンテーション制御に関する詳細な分子メカニズムが明らかになれば、担癌生体内における癌抗原特異的キラーT細胞の効率的な分化誘導が可能になるといえ、今後の癌免疫療法の確立にとっても非常に有用であるといえる。

2. 研究の目的

生体内において癌細胞の駆逐は、いかに効率よく癌細胞特異的キラーT細胞を誘導し、活性化できるかが非常に重要である。一般に癌細胞由来の癌抗原をT細胞に提示する細胞の中で、樹状細胞は大きな役割を占めている。

そこで本研究では、樹状細胞における癌抗原特異的CD8+T細胞の活性化の過程において、特にTLRリガンド刺激やサイトカインシグナルによる癌抗原ペプチドのクロスプレゼンテーション制御に関する分子メカニズムを詳細に明らかにするとともに、担癌生体内における癌抗原特異的キラーT細胞の効率的な

分化誘導および活性化の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、まず樹状細胞による癌細胞の取り込みとクロスプレゼンテーションによる癌抗原特異的キラーT細胞の活性化を明確にできる評価系(試験管内培養系およびマウス生体内投与モデル)を確立する。樹状細胞としてC57BL/6マウス骨髄よりGM-CSFを添加した培地を用いて骨髄由来樹状細胞を誘導する。OVAを発現する癌細胞(EG7)を凍結融解することによりネクロシス細胞を、また抗癌剤処理によりアポトーシスを誘導した細胞も調製する。これらの処理をほどこしたEG7を樹状細胞に添加し貪食させる。これらの貪食能についてCFSEラベルした細胞を用いて評価するとともに、癌細胞を貪食した樹状細胞の表面MHCクラスIおよびクラスII分子、副刺激分子等の発現レベルを確認する。さらにTLRリガンド刺激やサイトカイン処理によるサイトカイン産生能も確認する。EG7を貪食した樹状細胞とOVAペプチドを特異的に認識するCD8+T細胞(OT-1)を共培養し、OT-1の反応性を試験管内培養系で評価する。またコントロール実験としてOVA-特異的CD4+T細胞(OT-2)を用いてMHCクラスII分子を介した抗原提示能を比較検討することができる。評価は細胞の分裂をチミジンの取り込み、IFN- γ 等のサイトカイン産生能をELISAもしくは細胞内染色法により行う。

これまでの試験管内培養系で得られた情報をもとに、樹状細胞に取り込ませる癌細胞の最適条件を決定する。マウス生体内にEG7を取り込ませた樹状細胞を投与し、生体内における癌抗原特異的CD8+T細胞の誘導および活性化を評価する。評価はOVA-テトラマー陽性CD8+T細胞の誘導効率やあるいは同時にOT-1を投与した際の分裂を調べることにより行い、最終的に生体内でのクロスプレゼンテーション能を同定する。

次いで、これらの癌抗原特異的CD8+T細胞の活性化に対して、CpG等のTLR刺激やIL-6等のサイトカイン刺激を細胞培養系あるいはマウス生体内に加え、樹状細胞のクロスプレゼンテーション能に及ぼす効果について解析する。これらの刺激存在下で癌抗原特異的CD8+T細胞の細胞分裂やサイトカイン産生能に変化の見られた条件を見いだす。以上の条件下で、MHC分子や癌抗原蛋白質のトラフィッキングについては共焦点レーザー顕微鏡をもちいて動態を観察し、最終的な癌抗原ペプチドの提示についてはOT-1の反応性やOVA-テトラマー陽性CD8+T細胞の誘導によって評価する。

以上の実験で得られた情報により、樹状細胞によるクロスプレゼンテーションを制御している候補エフェクター分子を選定し、レ

トロウイルス感染法による過剰発現などにより OT-1 細胞の反応性や OVA-テトラマー陽性 CD8+T 細胞の誘導能を調べ、クロスプレゼンテーションを制御している最終的な制御分子を同定する。

4. 研究成果

本研究において、まず始めに樹状細胞による癌細胞の取り込みと抗原蛋白質のクロスプレゼンテーションによる癌抗原特異的キラーT細胞の活性化を明確にできる評価系の開発を試みた。C57BL/6 マウス骨髄より GM-CSF を添加した培地を用いて骨髄由来樹状細胞を誘導した。OVA を発現する癌細胞 (EG7) を凍結融解して得たネクロシス細胞を樹状細胞に添加し食食させた。これらの食食能について CFSE ラベルした細胞を用いて共焦点レーザー顕微鏡による観察した結果、実際に樹状細胞に EG7 の取り込みが確認された。また EG7 に発現している OVA 抗原蛋白質量についてウエスタンブロッティング法により解析した所、樹状細胞に食食された EG7 由来の OVA 抗原のシグナルが経時的に減少し、その減少の割合は IL-6 等のサイトカイン環境下の違いにより変化する事が示唆された。次に、樹状細胞のクロスプレゼンテーション能を評価する為、OVA ペプチドを特異的に認識する CD8+T 細胞 (OT-1) を共培養し、OT-1 の反応性を解析し、樹状細胞に取り込ませる EG7 細胞の最適条件を探索した。

これらの検討で得られた情報をもとに、癌抗原特異的 CD8+T 細胞の活性化に対して、OK432 や他の菌体成分、CpG 等の TLR 刺激や IL-6 等のサイトカイン刺激を細胞培養系に加え、樹状細胞のクロスプレゼンテーション能に及ぼす効果についてより詳細に解析した。その結果、IL-6 刺激存在下では、癌細胞の取り込みが上昇するものの、抗原提示能が減弱する事が見いだされた。一方、TLR を介した刺激や IFN- γ を含むタイプ I サイトカイン条件下では CD8+T 細胞のサイトカイン産生が増強する系を見いだした。これらの条件下で下流のシグナル分子あるいはエフェクター分子の制御機序を解明したところ、転写活性化因子 STAT1 を介した神経ペプチドシグナル伝達経路が樹状細胞の機能制御に関与している事が分かった。

次に、マウス生体内評価モデルによるクロスプレゼンテーション解析を行った。その結果、樹状細胞にある種の菌体成分と仮想癌抗原蛋白質 (OVA) を取り込ませたあとで、マウスに複数回投与し、生体内における癌抗原特異的 CD8+T 細胞の誘導および活性化を、OVA テトラマー陽性 CD8+T 細胞のフローサイトメトリーによる解析した所、生体内でのクロスプ

レゼンテーションが有為に増強する事を見いだした。

今後、メカニズムに関する詳細な知見を集め、より効果的な癌抗原特異的 CD8+T 細胞の生体内における誘導システムを確立することで、樹状細胞によるクロスプレゼンテーションを介した癌抗原特異的キラーT細胞の生体内誘導による癌の効率的退縮が期待できる。

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 6 件)

- ① Takeshima Tsuguhide、Kitamura Hidemitsu 他(8人中7番目)、Local Radiation Therapy Inhibits Tumor Growth through the Generation of Tumor-Specific CTL: Its Potentiation by Combination with Th1 Cell Therapy、Cancer Research、査読有、70巻、2010、2697-2706
- ② Chamoto Kenji、Kitamura Hidemitsu 他(7人中6番目)、3-Methylcholanthrene-induced transforming growth factor-beta-producing carcinomas, but not sarcomas, are refractory to regulatory T cell-depletion therapy、Cancer Science、査読有、101巻、2010、855-861
- ③ Wakita Daiko、Kitamura Hidemitsu 他(11人中10番目)、IFN- γ -dependent type 1 immunity is crucial for immunosurveillance against squamous cell carcinoma in a novel mouse carcinogenesis model、Carcinogenesis、査読有、30巻、2009、1408-1415
- ④ Chamoto Kenji、Kitamura Hidemitsu 他(10人中8番目)、Combination immunotherapy with radiation and CpG-based tumor vaccination for the eradication of radio- and immuno-resistant lung carcinoma cells、Cancer Science、査読有、100巻、2009、934-939
- ⑤ Koizumi Shin-ichi、Kitamura Hidemitsu 他(11人中10番目)、Essential role of toll-like receptors for dendritic cell and NK1.1(+) cell-dependent activation of type 1 immunity by Lactobacillus pentosus strain S-PT84、Immunology Letters、査読有、120巻、2009、855-861
- ⑥ 北村秀光、抗原提示機能のサイトカインによる制御、臨床免疫・アレルギー科、査読無、51巻、2009、566-572

[学会発表] (計 5 件)

- ① 北村秀光 他、NK2R-dependent neuropeptide signaling regulates dendritic cell function in type- I immune responses、第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、平成 21 年 12 月 4 日、大阪 (大阪国際会議場)
- ② 北村秀光 他、癌抗原ヘルパーエпитープを用いた Th1 細胞治療に関する多施設共同ヘルパーコンソーシアム、第 22 回日本バイオセラピー学会学術総会、平成 21 年 11 月 27 日、大阪 (スイスホテル南海)
- ③ 小泉真一、北村秀光 他、Extract of Larix Leptolepis is a powerful adjuvant for inducing antigen-specific CTL、第 38 回日本免疫学会学術総会、平成 20 年 12 月 2 日、京都 (国立京都国際会館)
- ④ 成田義規、北村秀光 他、IL-6-mediated immunosuppression through arginase activation of dendritic cells in tumor-bearing state.、第 67 回日本癌学会学術総会、平成 20 年 10 月 29 日、名古屋 (名古屋国際会議場)
- ⑤ 成田義規、北村秀光 他、Involvement of IL-6-induced arginase in tumor-associated dendritic cells for immunosuppressive tumor-escape mechanisms、第 10 回 国際樹状細胞シンポジウム、平成 20 年 10 月 2 日、神戸 (神戸国際会議場)

[その他]

ホームページ URL

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/immreg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 秀光 (KITAMURA HIDEMITSU)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：40360531

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：