

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790379

研究課題名(和文) 担癌宿主における樹状細胞サブセットの動態制御と機能不全の分子機序
解明研究課題名(英文) Study of the molecular bases for the dynamics and dysfunction of
dendritic cell subsets in tumor-bearing host

研究代表者

上羽 悟史 (UEHA SATOSHI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00447385

研究成果の概要(和文)：リンパ節への遊走能を持つ腫瘍浸潤樹状細胞サブセットを検索し、貪食能、抗原提示能を持つ CCR7⁺ MHC class II^{hi} 腫瘍浸潤樹状細胞 (TIDCs) を同定した。TIDCs の腫瘍浸潤制御機序を各種ケモカイン受容体欠損マウスならびに混合骨髄キメラマウスを用いて解析し、TIDC の腫瘍浸潤が部分的に CCR2 に依存することを明らかにした。抗がん剤治療時の TIDCs の動態を解析し、TIDCs が抗がん剤に対して比較的抵抗性をもつことを明らかにした。本研究成果は、抗がん剤治療と CCR2 などの TIDC 動態制御因子を標的とした免疫賦活化を組み合わせた、新たながん治療戦略に繋がるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：We examined the tumor-infiltrating DC subsets with the potential to migrate to draining-lymph nodes and identified CCR7⁺ MHC class II^{hi} TIDCs as the precursor of lymph node migratory DCs with antigen uptake and presentation potential. Chemokine receptor KO (CKO) mice and the wild type vs CKO mixed bone marrow chimera mice revealed that CCR2 partially mediates the accumulation of the TIDCs. We also found that the TIDCs were relatively resistant to the anti-cancer drug in vivo. Based on these results, we expect that the combination therapy of anti-cancer drug and CCR2 targeted drug that augment TIDCs would provide a novel anti-cancer immunotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010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・実験病理学

キーワード：腫瘍、樹状細胞、癌、ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

癌は先進国における主要な死因の一つであり、2004年に我が国において癌で死亡した人は30万人以上にも上る。癌の治療は、主に手術、化学療法、放射線療法を柱として実施されているが、3大療法による治療が困難な症例に対して第4の治療法として期待されているのが、ワクチン療法や樹状細胞療法をはじめとする**癌免疫療法**である。これら癌免疫療法は、癌に対する宿主の免疫応答を惹起し、免疫学的な機序による抗腫瘍効果をねらった治療法であるが、現在のところその有効性が確立するまでには至っていない。

近年、臨床試験が精力的に行われているワクチン療法（通常の感染症ワクチンと同様に癌抗原を免疫する方法）の問題点として、**担癌生体内が免疫抑制的な環境**にあるため、感染症ワクチンに比して、**癌抗原特異的なT細胞応答が十分に誘導できない**ことがあげられる。担癌生体内における免疫抑制については、**免疫応答の司令塔である樹状細胞の機能不全（寛容誘導性または抑制性の状態）**も、癌免疫療法を妨げる大きな障害となることが示唆されていた（*Nat. Rev. Cancer*, 2005）。しかしながら、担癌宿主における樹状細胞の機能不全の実態は確立していなかった。

2. 研究の目的

本研究では、正常マウスにおける各樹状細胞サブセットの分類、細胞系列、分化・増殖制御に関する近年の知見と、これまで担癌生体内におけるTreg, MDSCの生体内動態制御を解析してきた研究基盤を生かし、担癌マウスにおける**各樹状細胞サブセットの生体内動態（増殖の場、分化、臓器間移動、細胞死）**を個体レベルで詳細に解析することにより、これまで漠然とした概念であった樹状細胞の機能不全の実態を解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) マウス3LL皮下腫瘍モデルにおいて、腫瘍浸潤樹状細胞を他の腫瘍浸潤細胞と明確に区別可能な特異的マーカーの検索を行い、同定した腫瘍浸潤樹状細胞の機能特性を解析した。
- (2) Thymidine類似体であるBrdUを担癌および正常マウスに投与し、各樹状細胞サブセットにおける増殖細胞の割合を対比検討することにより、担癌宿主内における樹状細胞サブセットの増殖・分化を解析した。また並体結合(parabiosis)実験により、末梢組織における樹状細胞サブセットの維持期間を解析した。
- (3) 遺伝子改変マウスおよび骨髄キメ

ラマウスを用いて、樹状細胞の腫瘍浸潤を制御するケモカイン受容体の同定を試みた。

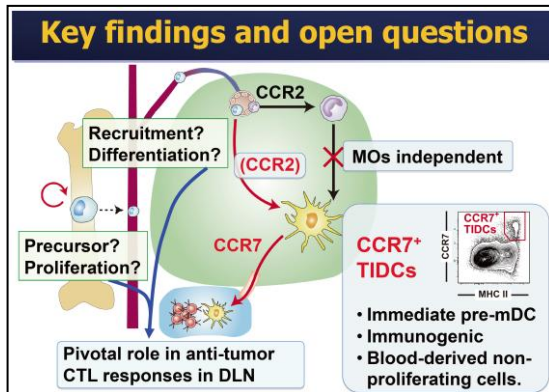
- (4) 抗がん剤(oxaliplatin)治療が、樹状細胞サブセットのバランスに及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

- (1) ケモカイン受容体CCR7およびMHC IIをマーカーに用いることにより、マウス皮下腫瘍モデルにおいて、抗原貪食能、抗原提示能、遊走能を持つ機能的なTIDCs (CCR7⁺TIDCs)を同定できることを明らかにした。CCR7⁺TIDCsの抗原提示能は所属リンパ節migratory DCと同等であり、またCpG DNA刺激によりIL12p40を産生するなど、I型T細胞応答の高い、機能的な樹状細胞であることが明らかになった。また、CCR7⁺TIDCsの腫瘍所属リンパ節への遊走が阻害されるCCR7欠損マウスでは、抗腫瘍T細胞応答が著明に減弱することから、抗腫瘍免疫の誘導に重要な役割を果たしていることが明らかになった。
- (2) コンジュニックマーカーの異なるマウスを外科的に腹部で接合し、血液循環を共有させる並体結合実験と、担癌マウスに持続的にThymidinの類似体であるBrdUを持続投与することにより、増殖細胞を*in vivo*で標識する*in vivo* BrdU標識実験により、CCR7⁺TIDCsは骨髄由来であり、5-10日の間でターンオーバーしていることが明らかになった。
- (3) 野生型またはケモカイン受容体欠損マウス (*Ccr1*^{-/-}, *Ccr2*^{-/-}, *Ccr4*^{-/-}, *Ccr5*^{-/-}, *Lyx2*^{cre/+} x *Cxcr4*^{lox/lox}, *Cxcr3*^{-/-}, *Cxcr5*^{-/-}, *Cxcr6*^{gfp/gfp}, *Cx3cr1*^{gfp/gfp}) に3LLを皮下接種し、TIDCの腫瘍浸潤をフローサイトメトリーで解析したが、いずれのケモカイン受容体欠損マウスにおいても野生型と比較し、有意な変化を認めなかった。次にCD45.1⁺野生型マウスおよびCD45.2⁺各種ケモカイン受容体欠損マウス由来骨髄細胞を1:1で混合した骨髄細胞で再構築した混合骨髄キメラマウスに3LLを皮下接種し、競合的環境下において各ケモカイン受容体欠損マウス由来細胞の生体内分布を解析したところ、TIDCおよびDLN面分において*Ccr2*^{-/-}マウス由来細胞の有意な減少を認めた。これらの結果から、TIDCの腫瘍浸潤が部分的にCCR2に依存することが明らかになった。

- (4) 担癌マウスに Oxaliplatin を投与した際の各樹状細胞サブセットおよび樹状細胞前駆細胞の数的変動をフローサイトメトリーで解析したところ、単球やリンパ節常在型樹状細胞 (rDC) が著減する高用量投与群においても T1DC および DLN mDC は一定数維持されていた。

本研究成果は、抗がん剤治療と CCR2 などの T1DC 動態制御因子を標的とした T1DC の数的



制御による免疫賦活化を組み合わせた、新たながん治療戦略に繋がるものと期待している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

以下論文全て査読有り

- (1) Myeloid cell population dynamics in healthy and tumor-bearing mice. **Ueha S**, Shand FH, Matsushima K. *Int Immunopharmacol.* (2011), 掲載確定 (印刷中) .
- (2) Involvement of CD11b(+) GR-1 (low) cells in autoimmune disorder in MRL-Fas (lpr) mouse. Iwata Y, Furuichi K, Kitagawa K, Hara A, Okumura T, Kokubo S, Shimizu K, Sakai N, Sagara A, Kurokawa Y, **Ueha S**, Matsushima K, Kaneko S, Wada T. *Clin Exp Nephrol.* 14, (2010), 411-417
- (3) Deficiency of chemokine receptor CCR1 causes osteopenia due to impaired functions of osteoclasts and osteoblasts. Hoshino A, Iimura T, **Ueha S**, Hanada S, Maruoka Y, Mayahara M, Suzuki K, Imai T, Ito M, Manome Y, Yasuhara M, Kirino T, Yamaguchi A, Matsushima K, Yamamoto K. *J Biol Chem.* 285, (2010), 28826-28837

- (4) Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche following MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. Shono Y, **Ueha S**, Wang Y, Abe J, Kurachi M, Matsuno Y, Sugiyama T, Nagasawa T, Imamura M, Matsushima K. *Blood.* 115, (2010), 5401-5411

- (5) Efficient cross-presentation of soluble exogenous antigens introduced into dendritic cells using a weak-based amphiphilic peptide. Ikeuchi N, Futami J, Hosoi A, Noji S, Kurachi M, **Ueha S**, Fujii S, Yamada H, Matsushima K, Moriyasu F, Kakimi K. *Biochem Biophys Res Commun.* 392, (2010), 217-222

[学会発表] (計 15 件)

- (1) 上羽悟史. 骨髄 GVHD: 同種造血幹細胞移植に伴う骨髄造血ニッチの破壊. The 7th Osteoimmunology Forum Feb 2, 2011. Tokyo University (Tokyo)
- (2) **UEHA Satoshi**, et al. Depletion of allo-CD4 T cells protects hematopoietic niche while preserves graft-versus-tumor effects after allo-HSCT. The 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Sep 22, 2010. Osaka International Convention center (Osaka)
- (3) **UEHA Satoshi**, et al. Dynamics of CCR7+ tumor-infiltrating dendritic cells that regulate anti-tumor immune responses. 14th International Congress of Immunology Aug 26, 2010. Kobe Convention center (Kobe)
- (4) 上羽悟史、他. 抗腫瘍 T 細胞応答を制御する CCR7 陽性腫瘍浸潤樹状細胞の動態. 第 31 回日本炎症・再生医学会 2010 年 8 月 5 日. 京王プラザホテル(東京)
- (5) **UEHA Satoshi**, et al. Depletion of allo-CD4 T cells protects hematopoietic niche while preserves graft-versus-tumor effects after allo-HSCT. 14th Annual Meeting of Japanese Association of Cancer Immunology. Jul 22, 2010. KKR hotel Kumamoto (Kumamoto)

- (6) 上羽悟史, 他. 抗腫瘍 T 細胞応答を制御する CCR7 陽性腫瘍浸潤樹状細胞の動態. 第 19 回日本癌病態治療研究会 2010 年 6 月 30 日. 都市センターホテル, (東京)
- (7) UEHA Satoshi, et al. Destruction of Bone Marrow Osteoblastic Niche for Hematopoiesis Mediated by Donor CD4 T Cells after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 3rd International Conference on Osteoimmunology Jun 20, 2010. Santorini (Greece)
- (8) UEHA Satoshi, et al. Dynamics of CCR7+ tumor-infiltrating dendritic cells that regulate anti-tumor immune responses. 18th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages May 21, 2010. Parea Kumamoto (Kumamoto)
- (9) Satoshi Ueha, et al. Identification of CCR7+MHC class IIhi dendritic cells in mouse tumor. Keystone symposia 2010 年 2 月 10 日. Keystone Resort (USA)
- (10) Satoshi Ueha, et al. Dynamic regulation of tumor-infiltrating myeloid-cells by chemokines. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 2009 年 12 月 2 日. 大阪国際会議場 (大阪)
- (11) Satoshi Ueha, et al. Identification of CCR7+MHC class IIhi dendritic cells in mouse tumor. 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 年 9 月 25 日. パシフィコ横浜 (神奈川)
- (12) Satoshi Ueha, CHEMOKINE-MEDIATED RAPID TURNOVER OF INFLAMMATION-ASSOCIATED MACROPHAGES AND NEUTROPHILS IN TUMOR-BEARING MICE. The 9th World Congress on Inflammation 2009 年 7 月 8 日. 京王プラザホテル (東京)
- (13) Satoshi Ueha, et al. Identification of CCR7+MHC class IIhi dendritic cells in mouse tumor. 第 17 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム. 2009 年 7 月 3 日. 金沢 KKR ホテル (石川)

(14) Satoshi Ueha, et al. Identification of CCR7+MHC class IIhi dendritic cells in mouse tumor. 第 13 回日本がん免疫学会総会 2009 年 6 月 25 日. 北九州国際会議場 (福岡)

(15) 上羽 悟史, 他. マウス皮下腫瘍モデルにおける CCR7+腫瘍浸潤樹状細胞の同定. 第 18 回日本癌病態治療研究会 2009 年 6 月 19 日. コラッセふくしま (福島)

[図書] (計 2 件)

1. 清野宏 編. シナジー. 臨床粘膜免疫. 2010. P445-454
2. 松島綱治 編. 本の泉社. 分子予防環境医学. 2010. P5-20

[その他]

ホームページ :
<http://www.prevent.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上羽 悟史 (UEHA SATOSHI)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号 : 00447385

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし