

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790396

研究課題名（和文） 腫瘍免疫抑制における腫瘍死細胞処理機構の関与

研究課題名（英文） Clearance of Dead Tumor Cells and Tumor Immunity

研究代表者

浅野 謙一（ASANO KENICHI）

東京薬科大学生命科学部・准教授

研究者番号：10513400

研究成果の概要（和文）：

腫瘍細胞は悪性化の過程で癌抗原分子などを発現し、「異常な自己」として免疫系に認識され排除される。しかしながら実際は、多くの腫瘍細胞が免疫監視を逃れ癌化学療法や免疫療法の効果を限定している。放射線やある種の抗がん剤で死を誘導した腫瘍死細胞をマウスに皮下投与するとがん免疫が活性化し、腫瘍の増殖を抑制できることが知られている。この現象はがんワクチンとして実験的に利用されてきたが、死細胞が免疫を活性化する分子的、細胞的機序は分かっていなかった。本研究の目的は、腫瘍細胞死と免疫抑制の関連を明らかにすることである。

申請者は皮下投与された腫瘍死細胞がリンパ流に乗って所属リンパ節に運ばれ、CD169陽性マクロファージに貪食されることを免疫組織学的検査とフローサイトメーターで確認した。リンパ節辺縁洞に局在する CD169 陽性マクロファージは、CD11c 陽性及び陰性サブセットに分類される。OVA 発現死細胞を皮下投与したマウスからセルソーターを用いてリンパ節の食細胞を分取し、*in vitro* で抗原特異的 CD8T 細胞と共培養したところ、死細胞付随抗原は CD11c 陽性 CD169 マクロファージによって選択的にクロスプレゼンテーションされることが証明された。すなわち、がん細胞死に伴うがん免疫活性化には CD11c, CD169 二重陽性マクロファージが重要であることが示された。本研究結果は、がん抗原を CD169 陽性マクロファージ選択的に取り込ませることで、効率的にがん免疫を活性化できる可能性を提示している。またがん抗原を CD169 マクロファージにデリバリーするための媒体として、CD169 分子に対する新規モノクローナル抗体を作成した。今後、同抗体にがん抗原を融合しマウスに投与することで抗原特異的な免疫応答を効率よく活性化することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：

Tumor cells are considered 'altered self' because they accumulate genetic mutations and acquire features that enable them to evade immune surveillance. The generation of tumor-directed cytotoxic T lymphocytes is considered crucial for the induction of anti-tumor immunity. To activate these CD8 T cells, antigen presenting cells (APCs) must initially acquire tumor cell-associated antigens. The major source of tumor antigens is dead tumor cells, but little is known about how APCs in draining lymph nodes acquire and crosspresent these antigens. Here we show that CD169⁺ macrophages phagocytose dead tumor cells transported via lymphatic flow and subsequently crossprime CD8 T cells. Subcutaneous immunization with irradiated tumor cells protects mice from syngenic tumor. However, tumor antigen-specific CD8 T cell activation and subsequent anti-tumor immunity are severely impaired in mice depleted with CD169⁺ macrophages. Neither migratory dendritic cells (DCs) nor lymph node-resident conventional DCs are essential for the crosspresentation of tumor antigens. Thus, we have identified lymph node CD169⁺ macrophages as a novel APC subset dominating early activation of tumor antigen-specific CD8 T cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、リンパ節、CD169、マクロファージ、死細胞、クロスプレゼンテーション

1. 研究開始当初の背景

(1) がんの免疫監視回避機構

がん細胞は本来自己の細胞、組織由来であるが、悪性化の過程でがん抗原分子の発現など正常細胞とは異なる性状を獲得する。そのため多くの場合「異常な自己」として免疫系に認識され、排除される。しかしながら実際には多くのがん細胞が免疫監視を逃れており、これが既存のがん化学療法や放射線療法の効果を限定している一因と考えられているものの、その免疫学機序は未だ完全には解明されていない。

(2) 食細胞による死細胞貪食と免疫寛容

生体で死を誘導された細胞は食細胞によって貪食され、速やかに排除される。放置された死細胞からは炎症誘発物質が流出すると考えられている。我々の研究グループではこれまで、食細胞が死細胞を選択的に認識し貪食する分子機構について研究を行ってきた。そして死細胞貪食を促進する可溶性分子としてMFG-E8を同定し(Nature 2002)、この分子を欠損したマウスでは胚中心での死細胞除去が阻害され自己免疫疾患を発症することを報告した(Science 2004)。またMFG-E8の変異タンパクをマウスに静注すると自己抗体産

生が誘導されることを報告した

(J.Exp.Med. 2004)。これらの結果は、死細胞貪食が自己に対する免疫寛容の維持に強く関与していることを示している。

さらに我々はこの死細胞付随抗原に対する免疫寛容誘導機序を応用し、自己免疫疾患動物モデルの発症を抑制することに成功した(J.Clin.Invest. 2007)。これらの知見はいずれも、食細胞による死細胞貪食が死細胞付随抗原に対する免疫寛容を誘導することを証明している。

2. 研究の目的

これまでの研究成果を踏まえ我々は、マクロファージによるがん死細胞貪食ががん免疫の活性化や抑制に強く関与しているとの仮説に至った。

がんは増殖しながらも一定の割合で細胞死を起こしている。したがって、がん死細胞がマクロファージや樹状細胞に貪食され、がん抗原に対する免疫状態を決定している可能性が考えられる。

以上の仮説を検証するため、本研究では次の2点を目標に掲げる。

- (1) 所属リンパ節におけるがん抗原提示細胞の同定
- (2) もしそのような抗原提示細胞を新たに同

定できたならば、続いてがん抗原特異的免疫反応活性化の具体的な機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) がん死細胞を貪食する食細胞の同定

がん死細胞の生体内における挙動を追跡するため、蛍光標識したがん死細胞を皮下投与し、24時間後の所属リンパ節を蛍光顕微鏡で観察した。

(2) がん死細胞によるがん免疫反応

CFSE 標識した OVA 特異的 CD8T 細胞 (OT-I) を移入したマウスに OVA 発現がん死細胞を皮下投与し、48 時間後のがん所属リンパ節における OT-I 細胞の増殖をフローサイトメトリーで解析した。我々の研究室ではリンパ節辺縁洞に局在する CD169 陽性マクロファージを選択的に消失できる遺伝子改変マウスを製作しているため、マクロファージ消失下で OT-I 細胞の活性化がどう変化するか検討した。

(3) がん抗原をクロスプレゼンテーションする抗原提示細胞の同定

OVA 発現がん死細胞を皮下投与したマウスの所属リンパ節から、抗原提示細胞をセルソーターで分取した。純化した抗原提示細胞と OT-I 細胞を *in vitro* で共培養し 48 時間後の増殖を解析した。

(4) がんの排除における「がん免疫活性化細胞」の役割

放射線照射したがん死細胞を皮下投与したマウスでは、同種のがん増殖が抑制される。CD169 陽性マクロファージ非存在下でがん死細胞を投与した場合のがん抑制効果を検討した。

4. 研究成果

本研究では以下の 4 点を明らかにした。

(1) がん死細胞はリンパ節辺縁洞に局在する CD169 陽性マクロファージによって貪食される。(図 1)

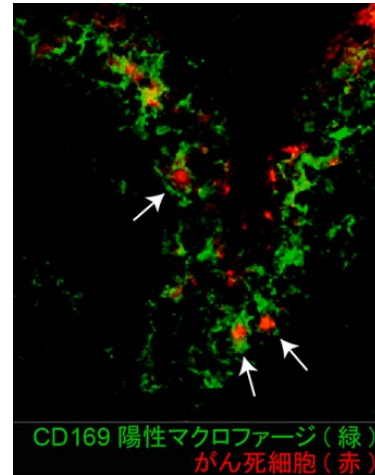


図 1 がん死細胞を貪食する CD169 陽性マクロファージ

(2) 皮下投与したがん死細胞は所属リンパ節において抗原特異的 CD8T 細胞を活性化する。

(3) CD11c, CD169 二重陽性マクロファージは貪食したがん死細胞付随抗原を CD8T 細胞にクロスプレゼンテーションする。

(4) がん死細胞によるがん免疫活性化とがんの抑制には CD169 陽性マクロファージが必須である (図 2)。

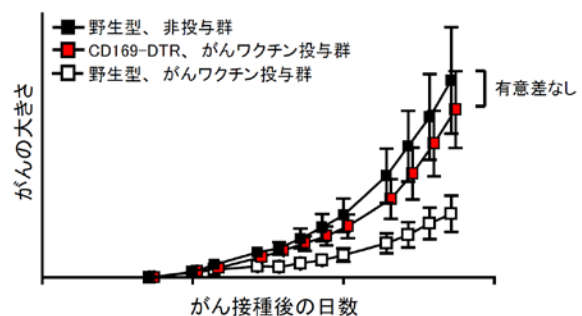


図 2 がん死細胞 (ワクチン) 投与によるがん免疫活性化

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 1 件)

Asano K, Nabeyama A, Miyake Y, et al.
Immunity 2011(34)85-95 (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

1. 'Macrophages Dictate the Direction of Immune response against Dead Cell-associated Antigens'
BIT's 1st Annual World Congress of Immunodiseases and Therapy
May, 15-17, 2010, Beijing, China

2. 'Role of CD169+ Macrophages in the Crosspresentation of Cell-associated Antigens'
14th International Congress of Immunology
Aug., 25, 2010, Kobe, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 謙一 (ASANO KENICHI)
東京薬科大学生命科学部・准教授
研究者番号：10513400

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：