

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790473

研究課題名 (和文)

自己免疫疾患制御分子 PD-1 および AIDA による炎症関連発がん制御機構の解析

研究課題名 (英文)

Roles of PD-1 and AIDA in inflammation-induced tumorigenesis.

研究代表者

岡崎 一美 (Okazaki Il-mi)

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・助教

研究者番号：50452339

研究成果の概要 (和文)：腸炎に伴い腸がんを発症することが報告されている IL-10 欠損マウスを用いて PD-1 欠損の影響を検討したが、腸がん発症の増悪は確認できなかった。PD-1 と AIDA (LAG-3) の機能を解析し、PD-1 と AIDA (LAG-3) が相加的に T 細胞の抗原刺激による活性化を抑制すること、また両分子を欠損する場合でも制御性 T 細胞の機能には大きな異常が認められないことを明らかとした。さらに、両分子を欠損させたマウスでは、Th1 型の免疫応答が増強される傾向にあることを明らかとした。

研究成果の概要 (英文)：The incidence of colon cancer in mice deficient for IL-10 was not increased by PD-1 deficiency. We have found that PD-1 and AIDA (LAG-3) additively suppressed the activation of T cells upon antigen stimulation. We have analyzed mice deficient for both PD-1 and AIDA (LAG-3) and found that regulatory T cells retained the regulatory function and T cells were biased toward Th1 in these mice.

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・免疫学

キーワード：遺伝子・細胞・実験動物・炎症・発がん

1. 研究開始当初の背景

炎症に関連した発がんはヒトのがんの少なくとも 15% 以上を占めており、慢性炎症と発がんの関連は当該分野において極めて重要な課題となっている。リンパ球の活性を制御することにより炎症の悪化や慢性化を防ぐことができれば、炎症関連発がんの予防に

も有効であると考えられるが、通常は一過性である炎症が終息せずに慢性化する仕組みはほとんど解明されていない。

そこで我々は、免疫抑制受容体による慢性炎症の制御が炎症に関連した発がんにどのように関わるか、また慢性炎症から発がんに至る過程で、がん化に必要な遺伝子変異がど

のような分子機構で導入されているか明らかにすることを目標に研究を行っている。

免疫抑制受容体 PD-1 を欠損させたマウスは、自己免疫性の胃炎、腎炎、関節炎等を自然発症することが報告されている。我々は、PD-1 欠損マウスの自己免疫症状を大幅に増悪させる遺伝子変異 *aida* を見出し、その原因が LAG-3 と呼ばれる遺伝子の機能欠失変異であることを近年同定した。この結果から、PD-1 と LAG-3 が協調的に働き、自己および異物に対する免疫応答を制御していると予測されたが、その詳細はほとんど分かっておらず、早期の解明が期待されていた。

AID は、抗体遺伝子のクラススイッチ組換え (CSR) および体細胞突然変異 (SHM) に必須の分子である。AID の発現は本来、活性化成熟 B 細胞に限局しているが、我々は AID を発現させるだけで線維芽細胞においても CSR および SHM を誘導するのに十分であること、AID を恒常的かつ組織非特異的に発現させたマウスが T 細胞リンパ腫、肺癌、胃癌、肝癌、乳癌等を発症すること、C 型肝炎ウイルス (HCV)、*H. pylori* 感染等により AID の発現が誘導されることを見出している。これらのことから、異所性に発現した AID が遺伝子変異を導入することによってヒトの様々ながんの要因となっている可能性が考えられるが、その詳細は不明であり、より詳細な解析が期待されていた。

2. 研究の目的

炎症関連発がんモデルマウスを用いて、PD-1・LAG-3 および AID の役割を解析することにより、PD-1・LAG-3 による炎症制御、および AID による体細胞突然変異導入が炎症関連発がんに与える影響を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) PD-1 欠損マウスは、BALB/c 系統および NOD.H2b 系統において自己免疫性の胃炎および強度の胃炎による胃粘膜の過形成を発症する。そこで、これらの系統において PD-1 欠損マウス、PD-1・AID 二重欠損マウス、PD-1・LAG-3 二重欠損マウスを作製し、胃炎の発症が認められる生後 20~24 週齢において、自己免疫性の炎症および発がんの有無を病理学的に解析した。
- 2) 腸炎に伴い腸がんを発症することが報告されている IL-10 欠損マウスに PD-1 欠損を導入し、腸がんの発症に PD-1 欠損が与える影響を解析した。
- 3) OVA に対する T 細胞受容体を発現する

D011.10 細胞株は、PD-1 を恒常的に発現するが、LAG-3 は発現していない。そこで、レトロウイルスベクターを用いてマウス LAG-3 の cDNA を D011.10 細胞株に導入した (D011.10-LAG-3)。B 細胞系の IIA1.6 細胞株に OVA ペプチドを提示させ、D011.10 細胞株を刺激し、培養上清中に分泌される IL-2 を ELISA 法にて定量した。また、IIA1.6 細胞株は PD-1 のリガンドを発現していないため、レトロウイルスベクターを用いてマウス PD-L1 の cDNA を導入した IIA1.6 細胞株を作製した (IIA1.6-PD-L1)。IIA1.6-PD-L1 細胞株を用いて D011.10 細胞株、あるいは D011.10-LAG-3 細胞株を刺激することにより、PD-1 単独、あるいは PD-1 と LAG-3 の双方より抑制シグナルが伝達される条件が再現された。抗原受容体刺激により分泌される IL-2 の量を比較することにより、PD-1 と LAG-3 の単独、あるいは協調的な抑制効果を比較検討した。

- 4) BALB/c 系統の野生型マウス、PD-1 欠損マウス、LAG-3 欠損マウス、および PD-1・LAG-3 二重欠損マウスから CD4 陽性 CD25 陽性 CD62L 陽性細胞および CD4 陽性 CD25 陰性 CD62L 陽性細胞をフローサイトメーターにより単離した。また、Thy1 陰性細胞を、磁気ビーズを用いたネガティブセレクション法により単離した。CD4 陽性 CD25 陰性 CD62L 陽性細胞を蛍光色素 CFSE により標識した後、CD4 陽性 CD25 陽性 CD62L 陽性細胞および Thy1 陰性細胞と混和し、抗 CD3 抗体を用いて刺激した。後日、CD4 陽性 CD25 陰性 CD62L 陽性細胞の CFSE 濃度をフローサイトメーターにより検出して細胞増殖の程度を評価することにより、PD-1 と LAG-3 の単独あるいは両者の機能不全が制御性 T 細胞の機能あるいは制御性 T 細胞に対する感受性に与える影響を検討した。
- 5) 心筋炎を発症した PD-1・LAG-3 二重欠損マウスより心臓を採取し、コラゲナーゼ処理した後、密度勾配法により心臓浸潤細胞を単離した。心臓浸潤細胞および脾臓より採取した脾細胞を試験管内にて PMA とイオノマイシンを用いて 5 時間刺激した後、細胞内に産生された IFN γ 、IL-4、および IL-17 を抗体により染色し、フローサイトメーターを用いて検出した。また、心筋炎を発症した PD-1・LAG-3 二重欠損マウスの心臓より RNA を採取し、各種サイトカインの mRNA 量をリアルタイム PCR 法にて定量した。

4. 研究成果

- 1) PD-1 欠損マウスが自然発症する胃炎は、PD-1・AID 二重欠損マウスではほとんど認められなかった。このことから、AID による自己抗体の CSR と SHM が PD-1 欠損マウスにおける胃炎の発症に必須であり、胃炎に伴って認められる胃粘膜の過形成に与える AID 欠損の影響は、現在の AID 欠損マウスでは検討不能であり、細胞特異的な AID 欠損マウスの利用が必要であると考えられた。PD-1・LAG-3 二重欠損マウスにおいて、より重度の自己免疫性炎症がいくつかの臓器において認められたが、それに伴うがん化は確認できなかった。今後は、薬剤等により炎症を誘導するような実験モデルを利用することにより、より強度な炎症下での影響を検討する必要があると考えられる。
- 2) IL-10 欠損マウスに PD-1 欠損を導入し、6 ヶ月間観察したが、PD-1 欠損による明らかな増悪は確認できなかった。今後は、他の遺伝子改変モデルや、薬剤による炎症モデル等を用いて解析することが必要と考えられる。
- 3) D011.10 細胞株が抗原刺激により産生する IL-2 の量は、PD-1 と LAG-3 の介在により大幅に減少した。また、両者が介在する条件では、さらなる減少が確認されたため、PD-1 と LAG-3 が T 細胞の抗原刺激による活性化を、相加的に抑制することが明らかとなった。
- 4) 野生型マウス、PD-1 欠損マウス、LAG-3 欠損マウス、および PD-1・LAG-3 二重欠損マウスから単離した制御性 T 細胞は、いずれもほぼ同程度の抑制活性を有していた。また、野生型マウス、PD-1 欠損マウス、LAG-3 欠損マウス、および PD-1・LAG-3 二重欠損マウスから単離したレスポンダー細胞は、制御性 T 細胞によりほぼ同程度に抑制された。以上の結果から、これらの分子が制御性 T 細胞の機能に直接は関与しないことが明らかとなり、自己免疫性炎症発症の直接原因では無いと考えられた。
- 5) 心筋炎を発症した PD-1・LAG-3 二重欠損マウスより単離した心臓浸潤細胞では、Th1 型サイトカインの産生が亢進していた。従って、PD-1 と LAG-3 は、Th1 型の免疫応答の制御において特に重要な役割を果たしていると考えられた。今後、Th1 型の炎症に関連した発がんモデルに注目して解析する必要があると考えられる。

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 5 件)

- ① Okazaki IM, Okawa K, Kobayashi M, Yoshikawa K, Kawamoto S, Nagaoka H, Shinkura R, Kitawaki Y, Taniguchi H, Natsume T, Iemura S, Honjo T. Histone chaperone Spt6 is required for class switch recombination but not somatic hypermutation. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(19):7920-5 (2011). 査読あり
- ② Okazaki T, Okazaki IM Wang J, Sugiura D, Nakaki F, Yoshida T, Kato Y, Fagarasan S, Muramatsu M, Eto T, Hioki K, Honjo T. PD-1 and LAG-3 inhibitory co-receptors act synergistically to prevent autoimmunity in mice. J Exp Med. 208(2):395-407 (2011). 査読あり
- ③ Wang J, Okazaki IM Yoshida T, Chikuma S, Kato Y, Nakaki F, Hiai H, Honjo T, Okazaki T. PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice. Int. Immunol. 22(6):443-452(2010). 査読あり
- ④ Kobayashi M, Aida M, Nagaoka H, Begum NA, Kitawaki Y, Nakata M, Stanlie A, Doi T, Kato L, Okazaki IM Shinkura R, Muramatsu M, Kinoshita K, Honjo T. AID-induced decrease in topoisomerase 1 induces DNA structural alteration and DNA cleavage for class switch recombination. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(52):22375-80(2009). 査読あり
- ⑤ Sabouri Z, Okazaki IM, Shinkura R, Begum N, Nagaoka H, Tsuchimoto D, Nakabeppu Y, Honjo T. Apex2 is required for efficient somatic hypermutation but not for class switch recombination of immunoglobulin genes. Int Immunol. 21(8):947-55 (2009). 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

- ① Okazaki T, Okazaki IM, Sugiura D. *Aida*, a newly established animal model of autoimmunity. 2010 年日本免疫学会シンポジウム (2010 年 12 月 4 日、大阪)
- ② Okazaki T, Sugiura D, Okazaki IM, Honjo

T. Identification of the causal gene of *aida* mouse, a newly established animal model of autoimmunity. The 14th International Congress of Immunology (2010年8月27日、神戸)

- ③ Okazaki IM, Jiang F, Honjo T, Okazaki T. Identification of QTLs that modify peripheral neuropathy in NOD.H2b-PD-1KO mice. The 14th International Congress of Immunology (2010年8月23日、神戸)
- ④ Okazaki T, Sugiura D, Okazaki IM Honjo T. Requirement of isotype-switched and somatically mutated autoantibodies for the development of autoimmune diseases in BALB/c-PD-1KO mice. The 4th International Conference on B cells and Autoimmunity (2010年8月19日、奈良)
- ⑤ 岡崎 拓、岡崎一美。PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice. 第9回四国免疫フォーラム (2010年6月19日、松山)
- ⑥ 梶原 武雄, 杉浦 大祐, 岡崎一美, 岡崎 拓。自己免疫性胃炎モデルマウスにおける自己抗原同定の試み, 第33回徳島県医学検査学会 (2009年12月13日、徳島)
- ⑦ Kobayashi M, Aida M, Nagaoka H, Begum NA, Kitawaki Y, Nakata M, Stanlie A, Doi T, Kato L, Okazaki IM, Shinkura R, Muramatsu M, Kinoshita K, Honjo T. Involvement of Topoisomerase I in class switch recombination 第32回日本分子生物学会年会 (2009年12月12日、横浜)
- ⑧ Kobayashi M, Aida M, Doi T, Nagaoka H, Kitawaki Y, Nakata M, Kato L, Stanlie A, Begum NA, Okazaki IM, Shinkura R, Muramatsu M, Kinoshita K, Honjo T. Involvement of Topoisomerase I in class switch recombination of Immunoglobulin genes. 第82回日本生化学会 (2009年10月23日、神戸)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dir/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎一美 (OKAZAKI IL-MI)

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・助教
研究者番号：50452339

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し