

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23689009

研究課題名(和文) 樹状細胞亜集団特異的抗原デリバリーによる抗腫瘍ワクチンの開発

研究課題名(英文) Targeting dendritic cell subsets with glycosylated antigens for cancer immunotherapy

研究代表者

伝田 香里 (Denda-Nagai, Kaori)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：00313122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：ワクチン接種部位である皮膚の樹状細胞に発現するレクチンをターゲットすることで、樹状細胞に抗原をデリバリーし、抗腫瘍免疫応答を誘導することを試みた。抗原として、真皮樹状細胞亜集団に発現するマウスマクロファージガラクトース型C型レクチン(MGL)に結合性を有する糖鎖を付加したヒトMUC1タンパク質を作製した。この抗原を免疫し、血清中の抗体応答を調べると、糖鎖修飾のない抗原に比べて、糖鎖修飾のある抗原を用いた場合のほうが有意に高い抗体応答が生じた。さらに、MUC1を強制発現させたマウス大腸癌細胞の増殖及び転移の抑制に成功した。本研究の成果は、ヒトへの抗腫瘍ワクチン開発にも応用できる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：MUC1 antigens with glycans having a high affinity to mouse macrophage galactose-type C-type lectins expressed on a dermal dendritic subset were prepared for vaccination. Anti-MUC1 serum antibody response was significantly higher in mice immunized with glycosylated MUC1 as compared with MUC1 without glycosylation. The growth and metastasis of mouse colon carcinoma cells expressing MUC1 were suppressed by vaccination with the glycosylated MUC1. These results are suggested to be applicable in designing a novel cancer vaccine.

研究分野：糖鎖免疫学、腫瘍生物学

キーワード：樹状細胞 レクチン 糖鎖 がんワクチン ターゲティング

## 1. 研究開始当初の背景

癌の治療において、免疫療法は特に転移抑制・再発予防といった点から非常に重要な治療法になると考えられ、臨床的にも用いられはじめているが、その効果はまだ十分とは言えず、新たな免疫療法の開発が望まれている。そこで、免疫応答の制御において中心的な役割を果たす抗原提示細胞である樹状細胞に抗原をターゲットすることでワクチン効果を増強できるという可能性が期待されている。特に、ヒトへのワクチン接種部位としてしばしば用いられる皮膚に存在する樹状細胞へのターゲティングは重要と考えられる。皮膚に存在する樹状細胞には存在部位及びマーカーの発現パターンから、表皮ランゲルハンス細胞、CD11b 陽性真皮樹状細胞、CD103 及び Langerin 陽性真皮樹状細胞などいくつかの亜集団が存在することが知られており、これらの亜集団はそれぞれ異なる免疫応答を制御する可能性が示されているが、その詳細は明らかではない。とりわけ、CD11b 陽性真皮樹状細胞に関しては、他の亜集団と区別可能なマーカーが存在していなかったことから、この細胞集団の役割はほとんど分かっていなかった。申請者等は、ガラクトース (Gal) 型糖鎖を認識する C 型レクチンであるマクロファージガラクトース型 C 型レクチン (Macrophage galactose-type C-type lectin, MGL、マウスでは MGL1 及び MGL2) が、マウスの CD11b 陽性真皮樹状細胞に発現することを明らかにし、皮膚所属リンパ節においては特に MGL2 が特異的なマーカーとして用いることが可能であることを報告していた。つまり、MGL1 または MGL2 をターゲット分子として用いることで、CD11b 陽性真皮樹状細胞特異的に抗原をデリバリーすることが可能であることが予想された。しかしながら、この細胞が接触皮膚炎モデル等から Th2 応答を誘導する細胞であることが示唆されたことから、一般的に抗腫瘍免疫応答の誘導には Th1 型の応答が重要とされることを考えると、この細胞への抗原ターゲティングが適切であるかどうか慎重に吟味する必要があると考えられた。

ヒトの癌抗原として知られる MUC1 は、乳癌、大腸癌、腎癌などの多くの腺癌に発現し、その発現は癌の悪性度と相関することが申請者等を含め多数の研究グループから報告されている。さらに、MUC1 に対して免疫応答がある患者の方がいない患者よりも予後が良いことが知られていることから、ワクチンに用いる抗原として有用であると考えられている。正常組織にも発現が認められ免疫寛容が成立している分子に対してこのような免疫応答が生じる理由として、正常細胞では伸長した  $\alpha$ -結合型糖鎖を持つ MUC1 が発現するのに対して、癌細胞では MUC1 の糖鎖が、癌抗原として知られる Tn 抗原 (GalNAc) や T 抗原 (Gal-GalNAc) などの短い糖鎖に変化する

ためと考えられている。しかしながら、糖鎖修飾の変化が免疫応答にどのようなメカニズムで影響を与えるのかについてはほとんど分かっていない。MGL は、単糖レベルでは Gal または N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) に特異性を有し、樹状細胞に発現する種々の C 型レクチンの中で、Gal 型糖鎖を認識するレクチンは MGL しか見つかっていないため、Tn 抗原を持つ MUC1 あるいは T 抗原を持つ MUC1 に対する免疫応答の制御に MGL が関与する可能性が高いと考えられた。実際、申請者等の研究グループと Univ. Rome Dr. Nuti 等との共同研究により、Tn-MUC1 がヒトの樹状細胞に MGL を介して結合し、取り込まれ、抗原提示に関わる細胞内コンパートメントに局在することを既に明らかにしていた。さらに申請者は、マウス骨髄細胞由来樹状細胞に発現する MGL2 が、GalNAc が付加された抗原の取り込みとその後の T 細胞への抗原提示に必須であることを示していた。以上より、MGL に特異的な糖鎖を抗原に修飾することにより効果的なワクチンが作製できる可能性が示されていた。

## 2. 研究の目的

研究開始当初の背景より、MGL を利用して真皮樹状細胞特異的に抗原を投与することで有効な抗腫瘍ワクチンを開発することを本研究の目的とした。

まず初めに、すでに MGL2 がマーカーとなることを明らかにしていた CD11b 陽性真皮樹状細胞亜集団への抗原ターゲティングが、抗腫瘍ワクチン開発にとって適切であるかを判断するための基礎的な情報を得るため、この細胞の特徴を網羅的遺伝子発現解析により明らかにする。

また、真皮樹状細胞特異的に抗原をデリバリー可能な糖鎖修飾ワクチンをヒトの癌抗原である MUC1 をコアタンパク質として作製し、免疫に用いる。MUC1 に付加された糖鎖修飾が、MGL1 または MGL2 を介し、どのような免疫応答を生じさせるかを解析するとともに、*in vivo* での抗腫瘍効果をマウスモデルにより評価する。

## 3. 研究の方法

マウス：

BALB/c マウス、及び C57BL/6J マウス (日本クレアより購入)、並びに C57BL/6 バックグラウンドの *Mgl1*<sup>-/-</sup>マウス、*Mgl2*<sup>-/-</sup>マウス、及び MUC1. トランスジェニック (Tg) マウスは、SPF 条件下で飼育した。すべての実験は、関係法令を遵守し、所属機関の承認を得て行った。

皮膚所属リンパ節からの真皮樹状細胞サブセットの単離：

ナイーブマウスの皮膚所属リンパ節を取得

し、コラゲナーゼにより消化し、単細胞浮遊液を調製し、AutoMACS を用いて CD11c 陽性細胞を単離した。その後、皮膚から遊走した細胞のマーカーである MHC class II の高発現と MGL2 陽性又は CD103 陽性を指標に、FACS により 90%以上の純度で細胞を単離した。

網羅的トランスクリプトーム解析：

単離した樹状細胞亜集団から total RNA を調製後、SAGE tag library を調製し、SOLiD4 sequencer にてシーケンシングした。データは v1.1 SOLiD™ SAGE™ Analysis Software の the 25\_1 mapping parameter を用いて Refseq に mapping した。mapping 後、各真皮樹状細胞亜集団の総遺伝子数を 3000000 にそろえる事で遺伝子数の標準化を行い、標準化後の遺伝子数は切り上げて整数にした。

MUC1-IgG の調製：

ヒト MUC1 のシグナル配列及び細胞外ドメインのうち 16 回タンデムリピートを含む部分とマウス IgG2a Fc とのキメラ蛋白質を産生する 16TR MUC1-IgG CHO-1d1D 細胞を、King's College London の Joyce Taylor-Papadimitriou 博士より御供与頂いた。細胞は、無血清培地 ProCHO4-CDM にて、三種類の培養条件下 (GalNAc/Gal 非添加、1 mM GalNAc 添加、または 1 mM GalNAc 及び 0.1 mM Gal 添加) で培養し、大量培養には CELLline1000 (INTEGRA) を用い、糖鎖修飾のない N-MUC1-IgG、Tn 抗原が付加した Tn-MUC1-IgG 及び T 抗原が付加した T-MUC1-IgG を得た。糖鎖修飾の異なる MUC1-IgG タンパク質は、培養上清より、Protein A-Sepharose を用いて精製した。精製した MUC1-IgG の純度及び糖鎖修飾は、SDS-PAGE、銀染色及び、抗マウス IgG 抗体又は抗 MUC1 抗体によるウェスタンブロッティング、Tn 抗原又は T 抗原に特異的なレクチンである VVAB4 または PNA 及びリコンビナント MGL1/MGL2 を用いたレクチンブロッティングにより確認した。

MGL1 又は MGL2 を介した樹状細胞による抗原取り込み：

骨髄細胞から GM-CSF を用いて誘導した樹状細胞 (BM-DC) への異なる糖鎖修飾の MUC1-IgG の結合と取り込みを、蛍光標識 MUC1-IgG を用いてフローサイトメトリーにより解析した。

抗原パルス樹状細胞の免疫と抗腫瘍効果の評価：

BM-DC に糖鎖修飾なし、Tn 抗原または T 抗原が付加した糖鎖修飾の MUC1-IgG を取り込ませた後、MUC1. Tg マウスのフットパッドに 1 週間毎に 3 回免疫した。最終免疫の 1 週間後以降に MUC1 強制発現 B16-F10 メラノーマ細胞を尾静注し、2 週間後に肺の転移結節を計数することで抗腫瘍効果を評価した。

MUC1-IgG の免疫と抗腫瘍効果の評価：

糖鎖修飾なし、Tn 抗原または T 抗原が付加した MUC1-IgG をアジュバントとして LPS と共にマウスのフットパッドに 2 週間毎に 3 回免疫した。免疫後 1 週間毎に採血を行い、血清中の抗 MUC1 抗体応答を、抗原として用いた MUC1-IgG、及び糖鎖修飾なしまたは Tn 抗原が付加した MUC1 ペプチドをコートして ELISA 法により検出した。さらに、最終免疫の 1 週間後以降に、MUC1 強制発現マウス大腸がん細胞 colon38-SL4 を脾臓内に投与し、19 日後に安楽死後に脾臓または肝臓を摘出し、脾臓重量及び肝臓重量を計量することで、抗腫瘍効果を評価した。

#### 4. 研究成果

MGL2 陽性真皮樹状細胞の特徴の解析

申請者らは本研究開始以前に、皮膚所属リンパ節における真皮から遊走してきた樹状細胞亜集団 (真皮樹状細胞) のうち、CD11b 陽性真皮樹状細胞のマーカーとして MGL2 が有用であることを明らかにしていた。この MGL2 陽性 CD11b 陽性真皮樹状細胞亜集団の機能は、特異的なマーカーがなかったことから、よく分かっていなかった。そこで、接触皮膚炎モデル、及びラット抗 MGL2 抗体と LPS のフットパッドへの共投与による細胞へのターゲティング実験を行ったところ、IL-4 産生 T 細胞の増加や IgG1 クラスの抗体応答が生じることなどが明らかになり、MGL2 陽性 CD11b 陽性真皮樹状細胞亜集団が Th2 応答を誘導する細胞であることが示唆された。本研究課題では、抗腫瘍免疫応答の誘導を目指しているが、一般に、抗腫瘍免疫応答の誘導には Th1 型の免疫応答の誘導が重要であると考えられている。そこで、この細胞への抗原ターゲティングが抗腫瘍免疫応答の誘導において適切であるかを判断するための基礎的な情報を得ることが必要であると考えられた。そこで、この細胞の遺伝子発現パターンを、既に Th1 応答を誘導するという報告のある CD103 陽性真皮樹状細胞と比較し、網羅的トランスクリプトーム解析により明らかにすることで、MGL2 陽性 CD11b 陽性真皮樹状細胞の特徴を記述することを試みた。その結果、MGL2 陽性真皮樹状細胞は CD103 陽性真皮樹状細胞とは表面マーカー発現パターンばかりでなく、遺伝子発現パターンが顕著に異なることが明らかとなった。Th2 応答の誘導という特徴に着目してデータを解析してみると、IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th1 細胞の誘導及び IL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th2 細胞の抑制に関わるサイトカイン IL-12<sub>p70</sub> のサブユニットを構成する IL-12<sub>p40</sub> をコードする遺伝子 *I112b*、クロスプレゼンテーションに関わる C 型レクチン様受容体 *C1ec9a*、TLR TLR3、ケモカインレセプター *XCR1* をコードする遺伝子 *C1ec9a*、*Tlr3*、*Xcr1* の発現量が顕著に低い事が示された。なお、IL-12 につ

いては、遺伝子発現レベルだけでなく、タンパク質レベルにおいても産生量が顕著に低いことが示された。一方で、これまでに Th2 応答の誘導に関わるとの報告のある OX40L、Jagged-1、Jagged-2 をコードする遺伝子 *Tnfrsf4*、*jag1*、*jag2* の MGL2 陽性真皮樹状細胞における遺伝子発現量は CD103 陽性真皮樹状細胞と同程度であるかもしくは低く、更に、樹状細胞を IL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞誘導型に変えるとされるサイトカインである TSLP の受容体をコードする遺伝子 *Tslpr* の MGL2 陽性真皮樹状細胞における遺伝子発現も CD103 陽性真皮樹状細胞と同程度であった。以上の結果から、MGL2 陽性真皮樹状細胞が Th2 応答を誘導するという性質が、Th1 応答を誘導するための遺伝子発現が低いいためか、あるいは、未知の Th2 応答誘導機構によるものであると考えられた。抗腫瘍免疫応答の誘導には Th1 型の免疫応答の誘導が重要であると考えられているため、今後は Th2 応答を誘導するという性質が、免疫に用いるアジュバント等の刺激により変化するかどうか明らかにすることで、MGL2 陽性真皮樹状細胞への抗原ターゲティングが、抗腫瘍免疫応答誘導にとって適切であるかをさらに検討する必要があると考えている。また、幅広く免疫応答の制御を考える上では、今後 Th2 応答の誘導機構を明らかにすることも重要と考えられる。

#### 糖鎖修飾抗原を用いた樹状細胞ターゲティングによる抗腫瘍免疫応答の誘導

先に述べた MGL2 陽性真皮樹状細胞の特徴を明らかにする研究と並行して、ヒトの癌抗原である MUC1 を用いて、MGL1/MGL2 陽性樹状細胞特異的に抗原を送達可能と考えられる糖鎖修飾ワクチンの作製を行った。糖鎖修飾なし、Tn 抗原または T 抗原が付加した MUC1-IgG の樹状細胞への結合及び取り込みを、骨髄細胞由来樹状細胞を用いて解析した。その結果、骨髄細胞由来樹状細胞は、特に Tn 抗原の付加した MUC1-IgG をよく取り込み、この結合と取り込みには、少なくとも MGL2 が関与することが明らかになった。続いて、糖鎖修飾なし、Tn 抗原または T 抗原が付加した MUC1-IgG を取り込ませた骨髄細胞由来樹状細胞を、MUC1. Tg マウスのフットパッドに 1 週間毎に 3 回免疫し、MUC1 強制発現 B16-F10 メラノーマ細胞を尾静脈へ投与した。2 週間後に肺の転移結節を計数することで、抗腫瘍効果を評価したところ、Tn 抗原を付加した MUC1-IgG の免疫により、有意に転移を抑制することに成功した。MUC1 に対して免疫寛容が成立している MUC1. Tg マウスでがん転移抑制効果が示されたことは、非常に重要な成果である。本研究成果のヒトの樹状細胞ワクチンへの応用が期待される。

さらに、真皮樹状細胞亜集団への *in vivo* でのターゲティングを想定して、作製した糖鎖修飾なし、Tn 抗原または T 抗原が付加した MUC1-IgG タンパク質を LPS と共にマウス

のフットパッドに免疫することで、抗腫瘍効果が得られるかを検討した。ワクチン投与後の免疫応答を評価するため、血清中の抗 MUC1 抗体応答を ELISA により検出した。その結果、糖鎖修飾のない MUC1-IgG に比べて、Tn 抗原又は T 抗原の付加した MUC1-IgG で免疫した場合に、有意に高い IgG1 クラスの抗体応答が検出され、糖鎖修飾が免疫応答を増強することが示された。さらに、*Mg11*<sup>-/-</sup>マウスまたは *Mg12*<sup>-/-</sup>マウスを用いて同様の検討を行うと、初期の抗体応答における糖鎖による抗体応答の増強効果が認められなくなることから、糖鎖による免疫応答の増強が、MGL1/MGL2 を介して生じることを明らかにした。これは、糖鎖修飾が、樹状細胞に発現するレクチンを介して免疫応答を増強することを示した初めての結果である。さらに、MUC1 強制発現マウス大腸がん細胞株の脾臓内投与肝転移モデルにおいて、糖鎖付加 MUC1-IgG で免疫されたマウスでは糖鎖修飾のない MUC1-IgG で免疫されたマウスに比べて、脾臓におけるがん細胞の増殖と肝転移が有意に抑制されることが明らかになった。免疫後に検出された抗体が、マウス大腸がん細胞に強制発現させた MUC1 に結合性を有することから、抗体依存性細胞傷害性を介して、*in vivo* でのがん細胞の増殖と転移の抑制に寄与することが示唆された。今後さらに検討を加え、実際に抗体が抗腫瘍効果に関わるか明らかにしたい。一般に、抗腫瘍免疫応答の誘導には Th1 型の免疫応答が適切であると考えられており、MGL2 陽性真皮樹状細胞が Th2 応答を誘導するという性質を持つことから、この細胞への抗原のターゲティングという戦略が抗腫瘍効果につながるかどうか疑問もあった。しかしながら、実際に糖鎖修飾抗原を作製し、マウスに免疫を行ったところ、抗腫瘍効果が得られることがわかったので、今後は、どのような機構で糖鎖修飾抗原が抗腫瘍効果をもたらすのか、より詳細に検討していきたい。まだ、今後検討する課題は多く残っているが、糖鎖修飾抗原を用いて皮ふの樹状細胞亜集団をターゲットすることで抗腫瘍免疫応答を誘導できることを示した本研究成果は、ヒトへの抗腫瘍ワクチン開発にも応用できる可能性が極めて高い。

#### 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 7 件)

1. Ng WC, Liong S, Tate MD, Irimura T, Denda-Nagai K, Brooks AG, Londrigan SL, Reading PC. The macrophage galactose-type lectin can function as an attachment and entry receptor for influenza virus. *J Virol*.

- 88(3):1659-72, 2014. doi:  
10.1128/JVI.02014-13. 査読有
2. Murakami R, Denda-Nagai K, Hashimoto S, Nagai S, Hattori M, Irimura T. A unique dermal dendritic cell subset that skews the immune response toward Th2. *PLoS One*. 8:e73270, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0073270. 査読有
  3. Sugiura D, Denda-Nagai K, Takashima M, Murakami R, Nagai S, Takeda K, Irimura T. Local Effects of Regulatory T Cells in MUC1 Transgenic Mice Potentiate Growth of MUC1 Expressing Tumor Cells In Vivo. *PLoS One*. 7: e44770, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0044770. 査読有
  4. Tian Y, Denda-Nagai K, Kamata-Sakurai M, Nakamori S, Tsukui T, Itoh Y, Okada K, Yi Y, Irimura T. Mucin 21 in esophageal squamous epithelia and carcinomas: analysis with glycofor-specific monoclonal antibodies. *Glycobiology*. 22:1218-26, 2012. doi: 10.1093/glycob/cws082. 査読有
  5. Usami K, Matsuno K, Igarashi M, Denda-Nagai K, Takada A, Irimura T. Involvement of viral envelope GP2 in Ebola virus entry into cells expressing the macrophage galactose-type C-type lectin. *Biochem Biophys Res Commun*. 407:74-78, 2011. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.02.110. 査読有

[学会発表] (計 20 件)

1. Denda-Nagai K, Irimura T. MUC1 with truncated O-glycans induces humoral immune responses and suppresses the carcinoma growth and metastasis. 第 44 回日本免疫学会学術集会 (2015. 11. 20: 札幌コンベンションセンター・北海道・札幌市)
2. 伝田香里 「マクロファージガラクトース型 C 型レクチン (MGL/CD301) によって制御される免疫応答」 第 34 回日本糖質学会年会 (2015. 7. 31: 東京大学・東京都・文京区)
3. 難波愛理、伝田香里、野地美樹、入村達郎 「糖鎖付加 MUC1 に対する免疫応答による癌の増殖と転移の抑制」第 135 年会日本薬学会 (2015. 3. 27: 兵庫医療大学・兵庫県・神戸市)
4. 伝田香里、入村達郎 「MGL1/CD301 陽性細胞の免疫と炎症の制御における重要性」糖鎖免疫 Glyco-Immunology 2014 (2014. 2. 18: 東京医科歯科大学・東京都・文京区)
5. Denda-Nagai K, Murakami R, Hashimoto

S, Nagai S, Irimura T. “Dermal dendritic cells expressing MGL2 skew the immune response toward Th2 in contact hypersensitivity.” 12<sup>th</sup> International symposium on dendritic cells (2012. 10. 11: EXCO, Daegu, Korea)

[図書] (計 2 件)

1. Denda-Nagai K, Irimura T. MGL/CD301 as a unique C-type lectin expressed on dendritic cells and macrophages. In: C-type lectin receptors in immunity (Yamasaki S eds.), 165-178 (215), 2016, Springer.
2. 入村達郎、伝田香里、村上龍一 訳:「第 13 章 局所免疫: 上皮組織及び免疫特権組織における特別な免疫応答」、『原著第 7 版 分子細胞免疫学 (監訳 松島鋼治、山田幸宏)』、エルゼビア・ジャパン株式会社、349-378、2014年11月20日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伝田 香里 (DENDA-NAGAI, Kaori)  
順天堂大学・医学部・特任助教  
研究者番号: 00313122