

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461715

研究課題名(和文)ランゲルハンス細胞活性化による新たな免疫療法の開発

研究課題名(英文)Development of new immunotherapy through activation of Langerhans cells

## 研究代表者

高橋 秀実(Takahashi, Hidemi)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40221361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：樹状細胞(DC)の一種である皮膚や粘膜など体表面に局在するランゲルハンス細胞(LC)は、体表面に局在するための因子であるE-cadherinならびに異物捕捉のレセプターLangerinならびに捕捉した異物抗原をClass I MHC分子を介してCross-PresentするDEC-205陽性細胞である。本研究の結果、NKT細胞活性化能有する多糖体脂質 $\beta$ -galactosylceramide ( $\beta$ -GalCer)は、DEC-205分子を発現している樹状細胞を選択的に活性化しIL-12の産生・放出を介し、キラーT細胞を主体とした細胞性免疫を活性化することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Langerhans cells (LC) belong to dendritic cell lineage, and mainly reside within surface compartment such as skin and mucosa. Similar to keratinocytes (KCs) within the skin, the LCs express E-cadherin, by which LC are tethered within the skin and search external foreign antigenic molecules through their unique receptor, langerin. LCs also express DEC-205 molecules and the DEC-205-positive cells have the capacity to present processed antigenic fragment from external antigens through class I MHC molecules to suitable T cells. Here, we found  $\beta$ -galactosylceramide ( $\beta$ -GalCer), a known stimulant for natural killer T (NKT) cells, efficiently activate the DEC-205-positive DCs/LCs and induce cellular immunity organized by cytotoxic T lymphocytes (CTLs) that eliminate virus-infected cells and cancer cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Langerhans cells Dendritic cells Langerin DC-SIGN DEC-205 cross-presentation  $\beta$ -galactosylceramide

### 1. 研究開始当初の背景

体表面を覆うランゲルハンス細胞 (LC) の重要性は想定されていたが、その実態については不明な点が多く、体表面に発生するのが上皮性悪性腫瘍 (癌) でありウイルスなど異物の侵入部位としての体表面における LC の役割に関してはほとんど分かっていないのが、現状であった。

### 2. 研究の目的

体表面における LC の存在意義を探り、その活性化によるバリアの強化法を開発し、新たな抗腫瘍免疫ならびに体表から進入する様々な病原体の制圧法を探る。

### 3. 研究の方法

皮膚基底膜より内側に存在する DC とそれより外側に局在する LC の差異を観察するため、まずその表面に発現している様々な因子の相違を確認する。対象とするマーカーは、外部抗原の捕捉を担う Langerin と内側抗原の運搬に関わる DC-SIGN の発現を比較するとともに、表皮内の細胞局在に関わるものと推測される E-cadherin (E-cad) の発現を調べ、その発現が LC の活性化に応じてどのように変動するか追跡する。また、Langerin を発現する細胞として注目されている臍帯血由来の CD34 陽性細胞にも着目し、誘導された末梢血由来の LC と臍帯血由来の LC との相違を検討し、それぞれの存在意義を考察する。更に、LC 活性化法を探り、LC 活性化による抗腫瘍、抗感染の方策を考える。

### 4. 研究成果

表皮内に局在する LC を誘導するために、表皮内に局在するケラチノサイト (KC) の表面に発現している E-cad と LC 表面の E-cad とを接触させたところ、LC 上の TLR4 の発現が消失した。また、TLR4 の発現は、E-cad を coating したプレート上で末梢血単核球に GM-CSF+ IL-4+ TGF- $\beta$ 1 を加え E-cad を発現させた細胞を刺激培養した場合にも低下した。また、臍帯血由来の CD34 陽性細胞に GM-CSF と TNF- $\alpha$  を加え誘導した E-cad を発

現した LC-like cells を E-cad を coating したプレート上で培養した場合には、TLR3 の発現が優位に低下したが、TLR4 発現は消失しなかった。こうしたことから、TLR4 の発現を欠損した LC と欠損が認められない LC の 2 種類の LC が体内に棲息していることを示唆している (論文投稿中)。これら LC は DEC-205 陽性の Cross-present 能力を具備しており、糖脂質分子である  $\alpha$ -GalCer によって活性化することが判明した (市川論文)。また、 $\alpha$ -GalCer 担癌マウスにおいて、腫瘍の縮小がみられ、表皮内に移植した腫瘍内に CTL の誘導が確認された (論文投稿中)。本研究の結果、

$\alpha$ -GalCer のような糖脂質分子の反復・頻回投与による活性化 LC を介した抗腫瘍免疫療法の有効性が明らかとなった。さらに、この  $\alpha$ -GalCer の反復・頻回投与が、DEC-205 陽性 LC が放出する IL-12 の量が増加し、マスト増すと細胞からのヒスタミン放出量が著明に抑制されることも明らかとなり、DEC-205 + DC/LC の活性化が、各種アレルギー疾患の新たな治療手段となり得ることをみいだした。

### 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 35 件: 英文原著 16 件; 和文原著及び総説 19 件)

1. Nakagawa, Y., Shimizu, M., Norose, Y., Takahashi, M., and Takahashi, H. Induction of rapid apoptosis for class I MHC molecule-restricted CD8+ HIV-1 gp160-specific murine activated CTLs by free antigenic peptide in vivo. *Int. Immunol.* 25(1):11-24, 2013. 有
2. Mayumi, N., Watanabe, E., Norose, Y., Watari, E., Kawana, S., Geijtenbeek, T.B., and Takahashi, H. E-cadherin interactions are required for Langerhans cell differentiation. *Eur. J. Immunol.*, 43(1): 270-280, 2013. 有
3. Takaku, S., Osono, E., Kuribayashi, H., Takaku, C., Hirama, N., Takahashi, H. : A case of migraine without aura that

- was successfully treated with an herbal medicine. *J. Altern. Complement Med.*, 19(12): 970-972, 2013. 有
4. Tamura, H., Ishibashi, M., Tonosaku, S., Okuyama, N., Kondo, A., Hyodo, H., Shinya, E., Takahashi, H., Dong, H., Tamada, K., Chen, L., Dan, K., and Ogata, K.: Marrow stromal cells induce B7-H1 expression on myeloma cells, generating aggressive characteristics in multiple myeloma. *Leukemia*, 27(2):464-472, 2013. 有
  5. Takaku, S., Nakagawa, Y., Owaki, A., Shimizu, M., Takahashi, M., and Takahashi, H.: Induction of apoptosis-resistant and TGF- $\beta$ -insensitive murine CD8<sup>+</sup> CTLs specific for HIV-1 gp160. *Cell. Immunol.*, 280(2):138-147, 2013. 有
  6. Takahashi, H., Mayumi, N., and Watanabe, E. Requirement of E-cadherin interactions for Langerhans cell differentiation. *J. Nippon Medical School*, 2013 80(2). 有
  7. Takahashi, M., Wolf, A.M., Watari, E., Norose, Y., Ohta, S., and Takahashi, H.: Increased mitochondrial functions in human glioblastoma cells persistently infected with measles virus. *Antiviral Res.*, 99(3) 238-344, 2013. 有
  8. Harimoto, H., Shimizu, M., Nakagawa, Y., Nakatsuka, K., Wakabayashi, A., Sakamoto, C., and Takahashi, H.: Inactivation of tumor-specific CD8<sup>+</sup> CTLs by tumor-infiltrating tolerogenic dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.*, 91(11):545-555, 2013. 有
  9. Matsumura, J., Shimizu, M., Omi, K., Nagata, N., Shinya, E., Oka, S., and Takahashi, H.: A possible origin of emerged HIV-1 after interrupting anti-retroviral therapy. *Biomed. Res.*, 35(1): 1-8, 2014. 有
  10. Omi, K., Shimizu, M., Watanabe, E., Matsumura, J., Takaku, C., Shinya, E., and Takahashi, H.: Inhibition of R5-tropic human immunodeficiency virus type-1 replication in CD4<sup>+</sup> natural killer T cells by gamma-delta T lymphocytes. *Immunology*, 141(4): 596-608, 2014. 有
  11. Matsuhashi, T., Shimizu, M., Negishi, Y., Takeshita, T., and Takahashi, H.: A low, non-toxic dose of paclitaxel can prevent dendritic cell-precursors from becoming tolerogenic dendritic cells with impaired functions. *Biomed. Res.*, 35(6): 369-380, 2014. 有
  12. Takahashi, M., Watari, E., and Takahashi, H.: Dichloroacetate induces cell cycle arrest in human glioblastoma cells persistently infected with measles virus: A way for controlling viral persistent infection. *Antiviral Res.*, 113: 107-110, 2015. 有
  13. Nakagawa, Y., Negishi, Y., Shimizu, M., Takahashi, M., Ichikawa, M., and Takahashi, H.: Effect of extracellular pH and hypoxia on the function and development of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Immunol. Lett.*, 167(2): 72-86, 2015. 有
  14. Shinya, E., Shimizu, M., Owaki, A., Paoletti, S., Mori, L., De Libero, G., and Takahashi, H.: Hemopoietic cell kinase (Hck) and p21-activated kinase 2 (PAK2) are involved in the down-regulation of CD1a lipid antigen presentation by HIV-1 Nef in dendritic cells. *Virology*, 487:285-295, 2016. 有
  15. Murakami, R., Nakagawa, Y., Shimizu, M., Wakabayashi, A., Negishi, Y., Hiroi, T., Okubo, K., and Takahashi, H.: Effects of dendritic cell subset manipulation on airway allergy in a mouse model. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 168(4): 219-232, 2016. 有
  16. Ichikawa, T., Negishi, Y., Shimizu, M., Takeshita, T., and Takahashi, H.:  $\alpha$ -galactosylceramide-activated murine NK1.1<sup>+</sup> invariant-NKT cells in the myometrium induce miscarriages in mice. *Eur. J. Immunol.* 2016 (in press). 有
- (和文総説)
17. 高橋秀実: 丸山ワクチンの新展開. 遙か, 8(1):39-43, 2013.
  18. 高橋秀実: 免疫と漢方: 黄帝内経に啓示された古代人の智慧. 日本東洋医学会雑誌, 64(1):1-9, 2013. 有
  19. 高橋秀実: 脂質制御医学としての東洋医学. 日本医科大学医学会雑誌, 9(4):208-213, 2013. 有
  20. 村上努, 高橋秀実: Progress of the Host restriction Factors for HIV Control. *日本エイズ学会誌*, 16(1): 1-3, 2014. 有

21. 若林あや子、高橋秀実: CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>樹状細胞の機能と DEC-205. **臨床免疫・アレルギー科** 61(2): 124-130, 2014.
22. 若林あや子、高橋秀実: コレラトキシンによる樹状細胞における経口抗原のクロスプレゼンテーション増強効果. **臨床免疫・アレルギー科** 61(3): 322-330, 2014.
23. 高橋秀実: (序) 樹状細胞とランゲルハンス細胞. **炎症と免疫**, 22(3): 151-152, 2014.
24. 高橋秀実: E カドヘリンとランゲルハンス細胞. **炎症と免疫**, 22(3): 153-158, 2014(5月)
25. 若林あや子、高橋秀実: 腸管上皮内リンパ球の細胞傷害性T細胞への分化. **臨床免疫・アレルギー科** 62(1): 17-24, 2014.
26. 新谷英滋、高橋秀実: ヒト免疫不全ウイルス HIV-1 Nef による樹状細胞 CD1 脂質抗原提示機能の低下. **臨床免疫・アレルギー科** 62(3): 239-244, 2014.
27. 高橋秀実: 鼻アレルギー診療におけるエビデンス: 治療法 6) 漢方薬の効果的な使い方. *Prog. Med.*, 34: 1707-1711, 2014.
28. 根岸靖幸、高橋秀実: 樹状細胞による妊娠、分娩の制御. **臨床免疫・アレルギー科** 62(6): 604-608, 2014.
29. 松村次郎、高橋秀実: HIV と悪性腫瘍. **臨床免疫・アレルギー科** 63(1): 21-27, 2015.
30. 高橋秀実: HAART 治療中の粘膜組織に潜伏する HIV とその制御. **日本エイズ学会誌** 17(1):14-18, 2015. 有
31. 高橋秀実: HIV 感染に対する新たな視点と治療法. **臨床免疫・アレルギー科** 63(6): 569-576, 2015.
32. 高橋秀実: 最新の免疫学からみた東洋医学による治療戦略の意義. **アレルギー・免疫** 23(3): 1-9, 2016.
33. 高橋秀実: 未病と自然炎症: 生薬成分による制御の可能性. **日本東洋医学会雑誌** 67(2): 195-203, 2016. 有
34. 高橋秀実: HIV 感染と自然免疫. **アレルギー・免疫** 2016.
35. 高橋秀実: HIV 感染と 型 T 細胞. **炎症と免疫** 24(3): 173-177, 2016.

〔学会発表〕(計 90 件)

1. 国際学会: 15 回
2. 国内特別講演: 15 回
3. 一般講演: 60 回

〔図書〕(計 5 件)

1. 高橋秀実: 後天性免疫不全症候群. 血液症候群(別冊日本臨床), 317-321 (2013年3月20日)(総ページ 623、日本臨床社編).
2. 高橋秀実: その他の二次性免疫不全症候群. 血液症候群(別冊日本臨床), 322-325 (2013年3月20日)(総ページ 623、日本臨床社編).
3. 矢田純一、高橋秀実(監訳): リッピンコットシリーズ・イラストレイテッド免疫学(第2版). 丸善出版, 2013.12.1 発行(総ページ数: 373 ページ)
4. 高橋秀実: 漢方薬の使い方、すぐに使える高齢者総合診療ノート(大庭建三編): 日本医事新報社, 2014年3月15日発行
5. 神谷茂、高橋秀実、林英生、俣野哲朗(監訳): ブラック微生物学(第3版). 丸善出版, 2014年3月26日発行

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: ランゲルハンス細胞の調製方法  
 発明者: 高橋 秀実  
 権利者: 高橋 秀実および住友ベークライト社  
 種類: 特願  
 番号: 特願 2012-118666  
 出願年月日: 平成 24 年 5 月 24 日  
 国内外の別: 国内

取得状況(計 1 件)

名称: ヒト免疫不全ウイルスを認識するキラー T 細胞レセプター  
 発明者: 高橋 秀実  
 権利者: 高橋 秀実  
 種類: US-patent  
 番号: 6511830  
 取得年月日: 2006 年 7 月 25 日  
 国内外の別: 国際特許(米国)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 秀実 (TAKAHASHI HIDE MI)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40221361

(2)研究分担者

なし

研究者番号：

(3)連携研究者

なし

研究者番号：