

クロスプレゼンテーションによる抗腫瘍免疫活性化機構の解析

[1] 組織

代表者：竹田 和由

(順天堂大学医学研究科)

対応者：小笠原 康悦

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：中山 勝文

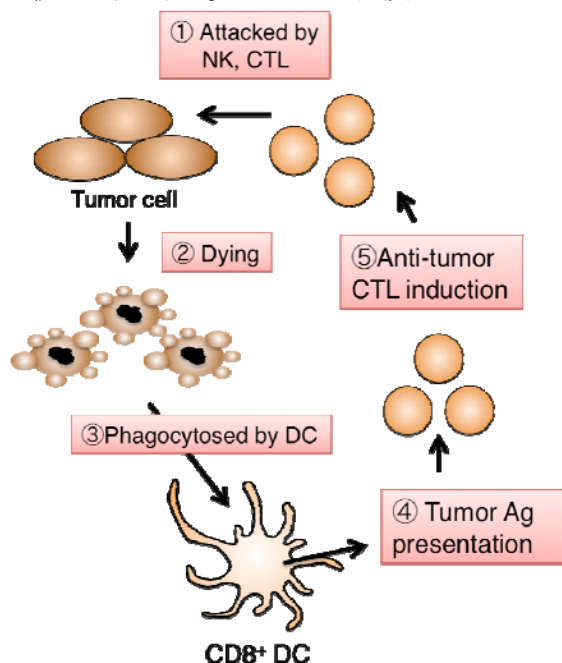
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 196,420 円

旅費 53,580 円

[2] 研究経過 (以下10.5ポイント)

免疫システムによる腫瘍の拒絶は図に示したように一連の過程で説明される。(1) まず初めに NK 細胞を主体とした自然免疫系細胞が腫瘍細胞を認識し攻撃する。(2) 攻撃を受けた腫瘍細胞は細胞死に至る。(3) 死細胞は樹状細胞 (DC) に貪食され、(4) その腫瘍抗原が DC の MHC-class I 上に提示 (クロスプレゼンテーション) される。(5) それによって CD8⁺ エフェクター T 細胞が誘導され、さらに腫瘍細胞の攻撃を続ける。もちろんこの時、腫瘍細胞側も免疫回避機構を獲得することによってさらに増殖し続けようとする。したがって免疫システムをより



効果的に活性化させることが腫瘍の拒絶に重要である。

本共同研究では、死腫瘍細胞由来抗原のクロスプレゼンテーション機構を解明する一環として、DCによる死腫瘍細胞貪食機構を解析した。なお、数種の DC サブセットの中でも、とりわけ CD8 α^+ DC が死細胞の貪食能およびクロスプレゼンテーション能が共に高いので、マウス脾臓 CD8 α^+ DC に焦点を当てて解析した。

なお本共同研究は、加齢医学研究所の対応者である小笠原康悦教授と分担者の中山勝文助教と随時研究打ち合わせを行い、研究内容について十分議論を行った上で遂行された。

[3] 成果 (以下10.5ポイント)

(3-1) 研究成果

我々は前年度までに CD8 α^+ DC 細胞がその細胞表面上に発現する T cell mucin immunoglobulin mucin-3 (Tim-3)レセプターを介してアポトーシス胸腺細胞を効率よく貪食することを見出した。今年度は、特に死腫瘍細胞の貪食過程について解析した。貪食細胞として C57BL/6 マウス脾臓をコラゲナーゼ処理後、比重分離し CD11c-microbeads を用いて分離した CD11c⁺ DC を使用した。死腫瘍細胞には Mouse thymoma EL4 cell line に ovalbumin 遺伝子を導入させた EG7 cell line を carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)で蛍光標識した後、UV照射によりアポトーシスを誘導した。

脾臓 CD11c⁺ DC をアポトーシス EG7 と 1 : 5 の細胞数比率で2時間培養した後、CD8 α^+ CD11c⁺ および CD8 α^+ CD11c⁺ DC の CFSE 陽性率をフローサイトメトリーにより検討した。その結果、CD8 α^+ CD11c⁺ DC はアポトーシス EG7 を効率よく貪食するが、CD8 α^+ CD11c⁺ DC は貪食能が低いこと判明した。この貪食経路に Tim-3 が関与するか否かについて抗マウス Tim-3 中和モノクローナル抗体 RMT3-23 を用いて検討した結果、CD8 α^+ CD11c⁺ DC によるアポトーシス EG7 の貪食は RMT3-23 で有意に抑制された。これらの結果は、CD8 α^+ DC は Tim-3 を介して死腫瘍細胞を貪食することを示唆す

る。

今後、その腫瘍細胞抗原の MHC class I 上の提示への Tim-3 の関与を検討する予定である。つまり、H-2K^b 上に提示された Ovalbumin₂₅₇₋₂₆₄ ペプチドを認識する OTI CD8⁺ T 細胞を用いた in vitro クロスプレゼンテーション実験を行う。さらに CD8 α ⁺ DC の活性化状態が CTL の増殖・分化に与える影響を検討するため、病原体・サイトカイン等で刺激した CD8 α ⁺ DC によるクロスプレゼンテーション実験を行う。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究によって、CD8 α ⁺ DC のアポトーシス細胞貪食およびクロスプレゼンテーションに Tim-3 が関与することが明らかとなった。今後このシステムによる抗腫瘍 CTL の誘導および抗腫瘍免疫活性化機構について解析を進めたい。

[4] 成果資料 (以下 10.5 ポイント)

本共同研究の基盤となる成果について以下に示す。

Takeda K, Kojima Y, Uno T, Hayakawa Y, Teng MW, Yoshizawa H, Yagita H, Gejyo F, Okumura K, and Smyth MJ. Combination therapy of established tumors by antibodies targeting immune activating and suppressing molecules. *J Immunol.* 184, 5493-5501, 2010

Haynes NM, Hawkins ED, Li M, McLaughlin NM, Hämmerling GJ, Schwendener R, Winoto A, Wensky A, Yagita H, Takeda K, Kershaw MH, Darcy

PK, and Smyth MJ. CD11c⁺ dendritic cells and B cells contribute to the tumoricidal activity of anti-DR5 antibody therapy in established tumors. *J Immunol.* 185, 531-841, 2010

Ma J, Usui Y, Takeda K, Harada N, Yagita H, Okumura K, and Akiba H. TIM-1 signaling in B cells regulates antibody production. *Biochem Biophys Res Commun.* 406, 223-228, 2011

Inami K, Abe M, Takeda K, Hagiwara Y, Maeda M, Segawa T, Suyama M, Watanabe S, and Hino O. Antitumor activity of anti-C-ERC/mesothelin monoclonal antibody in vivo. *Cancer Sci.* 101, 969-974, 2010

Muraoka D, Kato T, Wang L, Maeda Y, Noguchi T, Harada N, Takeda K, Yagita H, Guillaume P, Luescher I, Old LJ, Shiku H, and Nishikawa H. Peptide vaccine induces enhanced tumor growth associated with apoptosis induction in CD8⁺ T cells. *J Immunol.* 185, 3768-3776, 2010