

課題番号 56

放射線で生じる腫瘍死細胞が 樹状細胞に取り込まれる機序の解明

[1] 組織

代表者：吉田 純人
(北海道大学大学院医学研究院)
対応者：小笠原 康悦
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：瀬谷 司
(北海道大学大学院医学研究院)
松本 美佐子
(北海道大学大学院医学研究院)

研究費：物件費 10 万円

[2] 研究経過

放射線治療による抗腫瘍性細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) の誘導に関する研究は、近年のがん治療の発展においてその重要性を増している。

我々はこれまでに放射線に対して Toll 様受容体 3 (Toll-like receptor 3; TLR3) のリガンドを併用することで、強力に抗腫瘍性 CTL を誘導できることを、マウスモデルを用いて証明してきた (S. Yoshida *et.al.* *Cancer Sci.* 109, 956-965, 2018)。この治療効果は樹状細胞 (dendritic cell; DC) が機能不全である Batf3 ノックアウトマウスで完全に消失する。Batf3 依存性の DC (CD8 α /CD103⁺ DC) が必須となるのは、抗原提示、すなわち CTL のナイーブ状態からの初期活性化 (プライミング) である。したがって、放射線/TLR3 リガンド併用療法は死細胞抗原を利用した CTL プライミングを誘導する可能性が非常に高い。

そこで本共同研究では、放射線で発生した死細胞が DC に食食される過程に注目して、放射線/TLR3 リガンドの併用がもたらす抗腫瘍応答の解明を試みた。我々はすでに、*in vivo* では腫瘍近傍リンパ節の DC サブセットのうち、CD103⁺ DC のみが腫瘍細胞片を保持することを見出している。そのため本研究では CD103⁺ DC を解析対象とする。

以下、研究活動の概要を記す。CD103⁺ DC による腫瘍死細胞食食には、受け入れ教員である小笠原教授らのチームで研究経験のある TIM-3 依存性経路が関与する可能性が考えられた。そこで、放射線照射後の腫瘍細胞が DC に取り込まれるとき、TLR3 リガンドによる影響と TIM-3 の関与があるか共同研究で解析

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電話およびメールにて随時打ち合わせを行い、研究内容について十分議論を行った上で遂行された。

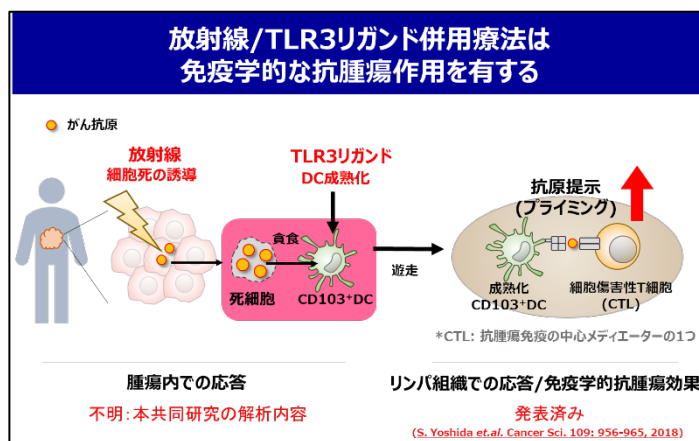


図. 本共同研究のコンセプト

[3] 成果

(3-1) 研究成果

1. TLR3 リガンドが CD103⁺ DC の腫瘍死細胞の食食を、TIM-3 依存性に増強することを発見した。

【方法】 C57BL/6 マウスの脾臓から単離した DC と同系マウスの腫瘍細胞である OVA 発現 Lewis lung carcinoma (LLC-OVA) 細胞を用いて食食能の測定を行った。PBS または TLR3 リガンド (polyI:C, 100 μ g/匹) を腹腔内投与したマウスから脾臓を単離し、コラゲナーゼ処理後に CD11c に対する磁気ビーズを用いて DC を回収した。LLC-OVA に対する細胞死の誘導は X 線照射機器を用いて 80 Gy の照射を行うことで実施した。

生じた腫瘍死細胞を 2 μ g/ml の propidium iodide (PI) によって染色し、その後 CD11c⁺ DC と 1 時間共培養した (比率は DC:腫瘍細胞 = 1:10)。その後 CD103 を抗体染色して DC の PI 陽性率をフローサイトメーターで解析することにより、死細胞食食能の評価を行った。

【結果】CD103⁺ DC による LLC-OVA 死細胞の貪食は TLR3 リガンド投与により飛躍的に高まった。この死細胞貪食の増強は抗 TIM-3 抗体の培地への添加でキャンセルされたことから、TLR3 リガンドの投与により TIM-3 依存性の貪食経路が起動することが示唆された。

2. TLR3 刺激下で、CD103⁺ DC による死細胞抗原を用いた CTL 活性化に TIM-3 が重要であることを発見した。

【方法】 PBS または TLR3 リガンド (polyI:C, 100 µg/匹) を投与したマウスの脾臓から CD3⁻ CD19⁻ NK1.1⁻ CD103⁺ 細胞を回収し、CD103⁺ DC とした (ほとんどの細胞が CD11c 陽性であった)。その後、抗 TIM-3 抗体またはアイソタイプコントロールの存在下で X 線照射 (80 Gy) した LLC-OVA 細胞と CD103⁺ DC を 2 時間共培養した。続いて CD103⁺ DC を CD11c 磁気ビーズで再度精製し、10 倍数の OT-I マウス由来 CD8⁺ T 細胞と 60 時間共培養した。

【結果】 培養上清中を IFN- γ 量を測定することで T 細胞の活性化を評価したところ、死細胞と TLR3 リガンドで刺激した CD103⁺ DC と OT-I CD8⁺ T 細胞を共培養した時にのみ強い IFN- γ の産生を認めた。この応答は CD103⁺ DC を抗 TIM-3 抗体で処置することでほとんど完全にキャンセルされた。したがって、死細胞を用いた抗原提示における TIM-3 依存性貪食経路の重要性が示唆された。

3. 腫瘍細胞における各種 TIM-3 リガンドの発現が、放射線によって変化するか解析した。

【方法】 LLC-OVA に対して 15 Gy または 80 Gy の X 線を照射し、細胞表面の発現が知られる TIM-3 リガンド、すなわち Phosphatidyl serine, Galectin-9, および CEACAM1 の発現量をフローサイトメトリーで解析した。Phosphatidyl serine は Annexin V によって、その他リガンドは抗体を利用して染色した。

【結果】 Phosphatidyl serine は細胞死に伴って細胞表面発現が増強していたが、その他の TIM-3 リガンドは放射線によって発現増加しなかった。

4. TLR3 リガンドが CD103⁺ DC の TIM-3 発現を増加させるのか解析した。

【方法】 マウスに LLC-OVA を移植し、PBS または TLR3 リガンド (polyI:C, 100 µg/匹) を投与した。24 時間後に、腫瘍及び脾臓の細胞を抗 TIM-3 抗体で染色してフローサイトメトリーで発現強度の解析を実施した。

【結果】 腫瘍と脾臓の両方で、polyI:C の投与は CD103⁺ DC の TIM-3 発現を増強しなかった。なぜ TLR3 シグナルが TIM-3 依存性の貪食応答を増強するのかは、今後さらなる解明が必要とされる。

(3-2) 波及効果と発展性など

近年のがん免疫療法の発展により、どうすれば効率的に抗腫瘍性 CTL を誘導できるかが重要な研究課題になっている。そのため次世代シーケンサーを用いたがん抗原の探索や腫瘍死細胞の発生による DC への抗原供給が注目されている。

本研究は死細胞を用いた免疫誘導法に関する研究であり、TLR3 リガンドが DC の死細胞取り込み能を増強することを、鍵となる分子も含めて発見したものである。

我々は過去に放射線と TLR3 リガンドの組み合わせが強力に抗腫瘍性 CTL を誘導することを報告している (S. Yoshida et.al. Cancer Sci. 109, 956-965, 2018)。この試みは既存の治療法に TLR3 リガンドを組み合わせるだけで達成できる簡便なものであり、臨床応用への期待が大きい。本共同研究はそのメカニズムの解明につながるものであり、本手法の将来的な臨床応用に大きな意義を有する。

さらに、抗 TIM-3 抗体は CTL のがん細胞に対する応答性を亢進させる手段として臨床応用が期待されているが、本研究では DC への作用で CTL 活性化に負の側面を有することが明らかになった。この結果はがん免疫療法同士の相性が重要であることを意味しており、今後のがん免疫療法の運用に関して重要な知見をもたらすと考えられる。

[4] 成果資料
なし (投稿準備中)