慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	悪性リンパ腫におけるがん抗原特異的制御性T細胞誘導機構の解明とその制御法の開発
Sub Title	Analysis of induction mechanisms for tumor antigen-specific regulatory T cells in lymphoma
Author	松下, 麻衣子(Matsushita, Maiko)
Publisher	
Publication year	2010
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2009.)
JaLC DOI	
Abstract	B細胞悪性リンパ腫における制御性T細胞(Treg)の発生機構を解明するため、MHCクラスII結合ペプチドを認識するT細胞受容体(TCR)をもつ5C.C7TCR-Tg/RAG-/-マウスにおいて、Treg発生におけるTCR親和性、抗原量の影響を解析する系を開発した。また、TCRに対するagonist抗原ペプチドの胸腺投与により、末梢リンパ組織において高率にTregが誘導されることを示した。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2008～2009 課題番号：20790681 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20790681seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：２０７９０６８１
研究課題名（和文）　悪性リンパ腫におけるがん抗原特異的制御性 T 細胞誘導機構の解明とその制御法の開発
研究課題名（英文）　Analysis of induction mechanisms for tumor antigen-specific regulatory T cells in lymphoma

研究代表者
松下　麻衣子（MATSUSHITA MAIKO）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：10327520

研究成果の概要（和文）：B 細胞悪性リンパ腫における制御性 T 細胞(Treg)の発生機構を解明するため、MHC クラス II 結合ペプチドを認識する T 細胞受容体(TCR)をもつ 5C.C7 TCR-Tg/RAG$^{-/-}$マウスにおいて、Treg 発生における TCR 親和性、抗原量の影響を解析する系を開発した。また、TCR に対する agonist 抗原ペプチドの胸腺投与により、末梢リンパ組織において高率に Treg が誘導されることを示した。

研究成果の概要（英文）：To analyze the development mechanisms of regulatory T (Treg) cells in B cell lymphoma patients, we established a model system using 5C.C7 TCR-Tg/RAG-/- mice and B cell lymphoma cells expressing antigen peptides with various TCR affinities and expression levels. We showed that intrathymically-injected agonistic antigen peptides could induce Treg cells in peripheral lymphoid tissues with high efficiency.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学
キーワード：悪性リンパ腫、制御性 T 細胞、がん抗原

１．研究開始当初の背景

担がん生体内においては、免疫抑制に働く制御性 T 細胞(regulatory T cells: Treg)が増加することによって抗腫瘍免疫応答が抑制されることが明らかになってきた。がんによる Treg の発生機構、生体内動態、機能を解明することは、がん細胞の免疫回避を克服する上で重要な課題である。担がん生体において増加する Treg はその発生と維持に何らかの抗原認識が必要なのか、また、どのような細胞からどこで発生し、どのように抗腫瘍効果の抑制を起こすかについて、まだ一端が解明されたに過ぎない。悪性黒色腫の腫瘍内から樹立した Treg クローンががんに発現する分子を認識していることが示され、他のがん種でも抗原特異的 Treg ががん組織に浸潤し

ていることが示唆された。この抗原特異的 Treg の発生には T 細胞受容体（TCR）との親和性、抗原量、サイトカイン環境が重要であると考えられている。TCR 親和性に関して、胸腺内においては非常に強く自己ペプチドと結合する TCR をもつ T 細胞はネガティブセレクションを受けるが、それよりは弱いが高い親和性で自己ペプチドを認識する T 細胞が Treg に分化することが知られていた。しかし、末梢のナイーブな T 細胞からも Treg が誘導されることが示され、その発生には弱い TCR 親和性で持続的な抗原刺激が効率的な誘導に働くことが示唆されていた。Treg の TCR の Vα鎖や Vβ鎖の分布もヘルパー T 細胞(Th)同様に多様性に富んでいるが、Treg の TCR レパトアは自己抗原を認識するものに偏っていることからも TCR 親和性の重要性が示唆される。抗原量に関しては、発現量の高い自己抗原に対して Treg が強く誘導される例が報告される一方で、樹状細胞（DC）の完全な活性化を起こさせない非常に低い量の抗原を末梢に投与するとナイーブ $CD4^+$ T 細胞が高率に Treg に変換されることが報告された。また高い TGF-β量や IL-2 欠如といったサイトカイン環境は末梢でのナイーブ $CD4^+$ T 細胞から Treg への変換を一層促進する。また、このような Treg がエフェクター細胞を抑制する機構についても、*in vitro* で Treg とエフェクターとの直接的接触が抑制に必要であることが示された一方で、*in vivo* で IL-10 や TGF-β などの可溶性因子に対する中和抗体投与で Treg 活性の抑制が示され、まだ混沌としている。

B 細胞悪性リンパ腫は MHC クラス II を発現し、それに提示された抗原ペプチドは Th と Treg の両方を活性化できる点で特殊である。Th と Treg の TCR レパトアの違いを考えると、TCR 親和性によって Th と Treg のいずれかが優位になる可能性がある。我々は、Pigeon Cytochrome C (PCC)の MHC クラス II 結合ペプチドを認識する TCR である 5C.C7 TCR の Tg でありかつ RAG を欠損した 5C.C7 TCR-Tg/$RAG^{-/-}$マウスには通常状態で Treg が存在せず、この TCR と様々な親和性で結合するペプチドが存在することから、TCR に対して異なる親和性をもつ抗原が、中枢性あるいは末梢性に Treg を誘導する過程を研究する系として有用であること、B 細胞リンパ腫細胞株 CH12 がこのマウスに生着できることを明らかにしていた。

２．研究の目的

上記の背景のもと以下の点について明らかにすることを目的とした。

(1) <u>異なる親和性のがん抗原をもつリンパ腫モデルの作成と Treg 誘導能の検討</u>

TCR との親和性が異なる様々なモデルがん抗原を B 細胞リンパ腫細胞株に発現させ、これらを 5C.C7 TCR-Tg/$RAG^{-/-}$マウスに移植して Treg 誘導を比較することで、がん抗原-TCR 親和性と Treg 誘導能の関係を明らかにする。さらに発現する抗原量を変化させ、がん抗原量と Treg 誘導能の関係を解析する。

(2) <u>異なる親和性をもつがん抗原によるがん抗原特異的 Treg の発生機構の解明</u>

(1)で Treg が強く誘導された場合、その発生が中枢性に胸腺から分化したのか末梢性にナイーブ T 細胞から分化したのかについて明らかにする。

(3) <u>がん細胞からの TGF-β産生による Treg 誘導への影響の検討</u>

がん細胞が産生する免疫抑制性サイトカイン TGF-β により Treg 誘導量が変化するか、誘導される Treg の性質に変化があるかについて明らかにする。

(4) <u>Treg の生体内動態と免疫抑制活性の検討</u>

Treg の生体内動態を明らかにするため、がん組織、リンパ節、胸腺、脾臓、末梢血について Treg 分布を経時的に解析する。また抗原特異的 $CD4^+$ Th 細胞、抗原特異的 $CD8^+$ CTL、抗原特異的 Treg の生体内動態と機能を解析できるマウスシステムを構築し、*in vivo* で $CD4^+$ Th 細胞、CTL を抑制する活性を比較することにより、TCR 親和性、抗原量、がん細胞産生 TGF-β の効果を明らかにする。

(5) <u>免疫法（アジュバント）や異なる親和性のペプチド免疫による Treg 誘導を抑えた Th 誘導増強と、それによる抗腫瘍免疫応答増強の検討</u>

様々なアジュバントや異なる親和性のペプチドの末梢あるいは胸腺への投与、異なる親和性のペプチドを提示する活性化 DC の投与により、Treg の誘導を抑え、Th の増強や抗腫瘍免疫応答の増強ができるかについて検討し、より有効な免疫制御法を開発する。

３．研究の方法

(1) <u>異なる親和性のがん抗原をもつリンパ腫モデルの作成と Treg 誘導能の検討</u>

TCR との親和性、発現量が異なる様々ながん抗原を B 細胞リンパ腫細胞株に発現させ、がん抗原-TCR 親和性、抗原発現量と Treg 誘導能の関係を明らかにする。5C.C7 TCR は MHC クラス II 上に提示された PCC 蛋白質の C 末端 a.a.88-104 をエピトープとして認識する。インバリアント鎖遺伝子の一部をこのエピトープで置換した発現ベクターを作成し、B 細胞リンパ腫細胞株 CH12 に遺伝子導入すれば、CH12 表面の MHC クラス II 分子にこのエピトープ部分が提示される。これまでに 5C.C7 TCR と様々な親和性で結合するエピトープが知られており、これらを用いて partial agonist、agonist、super agonist、antagonist 発現ベクターを作り、CH12 の恒

常発現株を作成する。さらに、親和性に加えて抗原の発現量による影響を調べるため、プロモータ強度の異なる発現ベクター、あるいはエピトープ部分のみにマウスの分泌蛋白質由来のシグナル配列を付加して大量に分泌させる発現ベクターを構築し、CH12に恒常発現させた細胞株を樹立する。これらの細胞株を5C.C7 TCR-Tg/RAG$^{-/-}$マウスに移植した場合に、がん組織、所属リンパ節内に集積するTreg数を比較する。経時的にがん組織、その所属リンパ節、その他のリンパ節、胸腺、脾臓、末梢血についてFoxp3に対する抗体を用いた免疫染色及びFlow cytometryによりTreg分布を詳細に解析し、その生体内動態を明らかにする。また、5C.C7 TCRに対して異なる親和性をもつ抗原ペプチドを静脈注射、胸腺内注射、皮下留置浸透圧ポンプなどの方法で投与し、胸腺や末梢リンパ組織でのTreg誘導について解析する。

(2) 異なる親和性をもつがん抗原によるがん抗原特異的Tregの発生機構の解明

(1)で強いTregの集積が見られた場合について、その発生が中枢性に胸腺から分化したのか末梢性にナイーブT細胞から分化したのかについて、胸腺摘出モデル、コンジェニックマウスモデル、GFP導入モデルを用いて明らかにする。

(3) がん細胞からのTGF-β産生によるTreg誘導への影響の検討

CH12のTGF-βをshRNAで抑制する、あるいはCH12にTGF-β遺伝子を過剰発現させ、5C.C7 TCR-Tg/RAG$^{-/-}$マウスに移植後のTregの生体内動態を解析する。

(4) Tregの生体内動態と免疫抑制活性の検討

抗原特異的CTL、抗原特異的Th、抗原特異的Tregの生体内での動態と機能を解析できるマウスシステムを構築する。抗原特異的CTLとして、メラノーマ抗原gp100に特異的なTCRをもつpmel-1 Tgマウスからの$CD8^+$ T細胞を用い、抗原特異的Th、抗原特異的Tregとして5C.C7 Tgマウスの$CD4^+$ T細胞を用いる。移植するがん細胞として、MHCクラスIを介してgp100特異的CTLに抗原提示し、MHCクラスIIを介して抗原特異的Th及びTregにPCC改変抗原を提示できるがん細胞を作成する。また、pmel-1 TgマウスはC57BL/6由来、5C.C7 TgマウスはB10.A由来であるため、がん細胞を移植するマウスとしてB10.AとC57BL/6を交配し、F1マウスを作成し、抗原特異的CTL、抗原特異的Th、抗原特異的Tregの生体内での動態と機能に対して、がん抗原-TCR親和性、がん抗原量、がん細胞産生TGF-βの与える影響を明らかにする。

(5) 免疫法（アジュバント）や異なる親和性のペプチド免疫によるTreg誘導を抑えたTh誘導増強と、それによる抗腫瘍免疫応答増強の検討

様々なアジュバントや異なる親和性のペプチドの末梢あるいは胸腺への投与、異なる親和性のペプチドを提示する活性化DCの投与により、Tregの集積を少なく、Thの増強やCTLの抗腫瘍免疫応答の増強ができるかについて、抗原特異的IFN-γなどのサイトカイン産生、抗腫瘍活性などの解析から検討し、より有効な免疫制御法を開発する。

４．研究成果

(1) 異なる親和性のがん抗原をもつリンパ腫モデルの作成と制御性T細胞(Treg)誘導能の検討

T細胞受容体(TCR)との親和性や発現量が異なる様々なモデルがん抗原を発現したB細胞リンパ腫細胞株CH12を作成した。具体的には、5C.C7 TCRのエピトープであるハトシトクロムCのC末端をもとに、アミノ酸置換によって様々なTCR親和性をもつエピトープ群を作成し、これらをマウスインバリアント鎖遺伝子のCLIP領域に挿入し、βアクチンプロモーターをもつ発現ベクターによって恒常的に発現するCH12クローンを作成した。エピトープとしては、ハトシトクロムC(PCC):KAERADLIAYLKQATAK，モスシトクロムC(MCC):ANERADLIAYLKQATK，MCC/97F:ANERADLIAFLKQATK，MCC/S102:ANERADLIAYLKQASK，MCC/G102:ANERADLIAYLKQAGK，マウスシトクロムC(MoCC):KGERADLIAYLKKATNEの6種類を用いた。得られたクローンについて、定量的PCRにより導入された遺伝子量を解析した結果、様々な発現強度をもつクローンが各エピトープについて得られ、TCR親和性のみでなく抗原発現量の影響を解析することも可能になった。また、抗原の発現量による影響を調べる別の方法としてエピトープ部分にマウスの分泌蛋白質であるIL-7のシグナル配列を付加して大量に分泌させる発現ベクターを構築した。しかし、作成した様々なCH12株の移植によるTreg誘導能の解析に関しては、5C.C7 TCR-Tg/RAG$^{-/-}$マウスの系統維持が不能になってしまったため研究期間内に結論を得ることができなかった。

一方、5C.C7 TCRに対して異なる親和性をもつペプチドを5C.C7 TCR-Tg/RAG$^{-/-}$マウスに投与した後のTreg誘導について、静脈注射、胸腺内注射、皮下留置浸透圧ポンプなどの方法で投与して解析した。Native antigenであるPCCの投与ではTreg誘導はほとんど認められないのに対し、agonist抗原ペプチドMCCやMCC97Fをいずれの方法で投与した場合も胸腺および末梢リンパ組織においてFoxp3陽性$CD4^+$ T細胞が出現することをRT-PCRにより確認した。この中で最も強くFoxp3発現誘導が認められたペプチド胸腺注射において、Foxp3免疫染色を行なったところ、ペプチド投与一

週間後の末梢リンパ組織においてFoxp3陽性細胞の顕著な出現を観察した。この個体由来のT細胞は抗原刺激に対する増殖反応が抑制されていたことから、agonist抗原の胸腺内投与により抗原特異的Tregのpositive selectionが誘導され、末梢においてTregが誘導されたと考えられた。一方、agonistより弱いがTCRから正のシグナルを伝達可能な種々のペプチドを、IFAをアジュバントとして免疫したところ、免疫4-5日後から末梢リンパ組織にFoxp3の発現が認められたが、agonist免疫ではFoxp3陽性細胞の誘導は認められなかったことから、TCRに対する不完全な正の刺激が末梢の$CD4^+$ナイーブT細胞にFoxp3発現を誘導したものと考えられた。

(3) <u>がん細胞からのTGF-β産生によるTreg誘導への影響の検討</u>

CH12株により誘導されるTregの性質がCH12からのTGF-βにより受ける影響を解析するため、CH12からのTGF-β産生量をELISAにより測定したところ産生を認めなかったため、TGF-βを過剰発現するCH12株を樹立したが、マウス移植後の解析に至らなかった。

(4) <u>Tregの生体内動態と免疫抑制活性の検討</u>

抗原特異的 CTL、抗原特異的 Th、抗原特異的 Treg の生体内での動態と機能をマウス個体内で解析するため、MHC クラス I を介して gp100 特異的 CTL に抗原提示し、MHC クラス II を介して抗原特異的 Th 及び Treg に TCR 親和性改変抗原を提示できるがん細胞株を作成したが、マウス移植後の解析に至らなかった。

目的の(2), (5)に関しては、マウス系統維持のトラブルにより研究期間内に結論を得るに至らなかった。

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１件）

①Zhong XS, <u>Matsushita M</u>, Plotkin J, Riviere I, Sadelain M., Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication. Mol Ther. 2009;**18**:413-420.

６．研究組織
(1)研究代表者

松下　麻衣子（MATSUSHITA MAIKO）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：10327520

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし