

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業  
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) 免疫抑制性樹状細胞に発現する新規免疫チェックポイント分子の機能的同定とこれを標的としたがん免疫治療法の開発  
(英語) Functional identification of a novel immune checkpoint molecule expressed on immune suppressive dendritic cells and the development of cancer immunotherapy targeting this this molecule
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人宮崎大学医学部医学科 教授 佐藤克明  
所属 役職 氏名： (英語) Katsuaki Sato, Professor, Faculty of Medicine, University of Miyazaki
- 実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 免疫抑制性樹状細胞に発現する新規免疫チェックポイント分子の機能的同定とこれを標的としたがん免疫治療法の開発  
開発課題名： (英語) Functional identification of a novel immune checkpoint molecule expressed on immune suppressive dendritic cells and the development of cancer immunotherapy targeting this this molecule
- 研究開発代表者 (日本語) 国立大学法人宮崎大学医学部医学科 教授 佐藤克明  
所属 役職 氏名： (英語) Katsuaki Sato, Professor, Faculty of Medicine, University of Miyazaki
- 分担研究 (日本語) 免疫抑制性 DCs のヒト/マウス分子 X の発現解析および機能解析  
課題名： (英語) Functional characterization of human and murine molecule X expressed on immune suppressive dendritic cells and the development
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人宮崎大学医学部医学科 講師 宇都倫史  
所属 役職 氏名： (英語) Tomofumi Uto, Lecturer, Faculty of Medicine, University of Miyazaki

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### ・ 和文

佐藤克明教授（宮崎大学 医学部医学科）らのグループは、特徴的な免疫抑制抗原提示細胞の性状を示すヒト制御性樹状細胞（DCreg）と癌患者由来樹状細胞（DCs）において分子 X が発現増強していることを見出した。

がん抗原の発見以来、がん免疫療法開発に向けて様々な研究が進行しているが、がん抗原の多くが正常自己抗原であるため免疫原性が弱く、加えて自己抗原に対する免疫応答（自己免疫）を抑制する免疫制御機構が、がん抗原に対する免疫応答をも抑制していることが明らかになりつつある。このような制御機構は「免疫チェックポイント分子」と呼ばれるがん免疫（自己免疫）応答を負に制御している分子により担われており、T 細胞に発現する CTLA-4 や PD-1 が挙げられる。さらに、これら「免疫チェックポイント分子」に対する阻害抗体を用いた免疫療法が最近臨床応用されている。しかしながら、一定の臨床効果が得られてはいるものの、いまだ満足すべき結果ではない。

DCs は炎症状態では自然免疫と適応免疫を繋ぐ最も強力な抗原提示細胞として様々な抗原特異的エフェクター T 細胞の誘導を介して免疫系を賦活する。一方、定常状態では抗原特異的クローン除去・不応答性の誘導や免疫抑制能をもつ種々の制御性 T（Treg）細胞の誘導増幅を介した免疫寛容を誘導する制御細胞として免疫学的恒常性の維持に重要である。

佐藤克明教授らは、先に免疫疾患に対する DCs を用いた新規免疫細胞療法の開発を目的として、ヒトとマウスにおいて特定の培養条件で炎症状態においても比類無い T 細胞制御機能を有する免疫抑制性 DCs の作製に成功し、この細胞を“制御性 DCs（DCreg）”と命名した（Immunity・2003 他 1 報）。さらに、マウス DCreg の生体内への投与により抗原不応答 T 細胞及び抗原特異的 Foxp3+Treg 細胞が誘導され、様々な免疫疾患に対して治療効果を示すことを明らかにした（Immunity. 2003 他 5 報）。

また、佐藤克明教授らは、DCs に特異的に発現する機能抑制分子の探索を目的として、DNA マイクロアレイ解析により C タイプレクチンレセプターファミリーに属する分子 X を同定した。分子 X は T 細胞に発現する「免疫チェックポイント分子」である CTLA-4 や PD-1 と同様に細胞内ドメインに免疫受容体抑制性チロシンモチーフ（ITIM 様配列）を有することから細胞内シグナル伝達を介して DCs の機能を制御することが示唆された。この仮説を検証するために分子 X 欠損マウスを作製して解析した結果、分子 X は DCs の“活性化制御分子”として炎症反応・抗原特異的 T 細胞応答・免疫病態を負に調節することを解明した。

本研究課題の目的では、がん進展での免疫応答抑制に関与する分子 X に着眼し、“がん免疫（自己免疫）応答”を負に制御する新規 DC 発現「免疫チェックポイント分子」の機能的同定を試み、がん免疫応答での役割を明らかにすることを目指す。さらに機能阻害抗体によるこれを標的としたがん免疫治療法の開発を試みる。

本年度では佐藤克明教授らはヒト DCreg、癌患者由来 DCs がヒト健常人 DCs と比較して分子 X のタンパク質・遺伝子発現の増強、MHC 分子と共刺激分子の細胞表面分子の発現の低下、T 細胞増殖誘導能の低下、炎症性サイトカインの産生の減弱と抗炎症性サイトカインの産生の増強を示していることを解明した。従って、ヒト免疫抑制性 DCs の分子 X の発現亢進および免疫増強機能低下が明らかとなり、分子 X がヒト免疫抑制性 DCs に発現する新規免疫チェックポイント分子として機能的同定されることが期待される。

• 英文

A research group of Professor Katsuaki Sato (Faculty of Medicine, University of Miyazaki) has clarified that human regulatory dendritic cells (DCreg) and DCs obtained from cancer patients exhibited a remarkable expression of molecule X as compared with their normal counterparts.

Whereas the development of tumor immunotherapy has progressed in the past decades since the discovery of tumor antigens, it is becoming clear that many tumor antigens has a weak immunogenicity because they are originally derived from normal self-antigens, and the immunological regulatory mechanism that dampen the immune responses against self-antigens (autoimmunity) impair the immune responses toward tumor antigens (tumor immunity). Such immunological regulatory mechanism is carried by immune checkpoint molecules, including CTLA-4 and PD-1. Moreover, tumor immunotherapy with immune checkpoint inhibitors has been recently used for clinical application. Whereas this type of immunotherapy can provide several clinical responses, it has not obtained yet the satisfied results.

DCs are considered to be essential antigen (Ag)-presenting cells (APCs) that play crucial roles in activation and fine-tuning of innate and adaptive immunity to generate effector T cells under inflammatory conditions. Conversely, DCs may be also important for the maintenance of immune homeostasis by promoting immune tolerance via mechanisms including clonal deletion and anergy, as well as active suppression by the production of regulatory T (Treg) cells.

To exploit a novel strategy involving the use of DCs for Ag-specific intervention of T-cell-mediated immune disorders, we have previously developed human and murine DCs that had a prominent capacity to regulate immune responses, and were therefore designated as DCreg. We have shown that immunotherapy with murine DCreg had prominent protective effects through the induction of anergic T cells and Foxp3<sup>+</sup> Treg cells in several murine models of immune disorders.

On the other hand, we have identified the molecule X specifically expressed on DCs that belongs to C-type lectin receptor family by a DNA microarray analysis. We have speculated that intracellular signaling delivered from the molecule X suppresses the cellular activation of DCs because it possesses an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) in the cytoplasmic portion that resemble to CTLA-4 and PD-1. To test this hypothesis, we have created and analyzed the gene-modified mice deficient for the molecule X. As results, we have clarified that the molecule X function can functions as an immunoregulatory molecule for DC function that negatively control inflammation, Ag-specific T-cell responses, and immunopathogenesis.

In this project, we focus on the molecule X, and try to functionally identify a novel immune checkpoint molecule that are specifically expressed on DCs and negatively control tumor immunity (autoimmunity) to address the role for the immune suppression during the tumor progression. Furthermore, we will develop tumor immunotherapy with antagonistic monoclonal antibody targeting the molecule X.

In this physical year, we clarify that human DCreg and DCs obtained from cancer patients exhibit the enhanced expression of molecule X, the reduced expressions of MHC and costimulatory molecules, and the reduced T-cell stimulatory capacity as well as the reduced production of

proinflammatory cytokines and the enhanced secretion of anti-inflammatory cytokine. Therefore, the molecule X prominently expression on human immunosuppressive DCs is expected to be functionally identified as immune checkpoint molecule.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 3 件）

1. Arimura K, Takagi H, Uto T, Fukaya T, Nakamura T, Chojookhuu N, Hishikawa Y, Yamashita Y, Sato K. Crucial role of plasmacytoid dendritic cells in the development of acute colitis through the regulation of intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.*, in press, 2016. doi:10.1038/mi.2016.96
2. Nakamura T, Fukaya T, Uto T, Takagi H, Arimura K, Tono T, Sato K. Selective depletion of basophils ameliorates immunoglobulin E-mediated anaphylaxis. *Biochem. Biophys. Rep.*, 9:29-35, 2017.
3. Sato K. Understanding of the role of plasmacytoid dendritic cells in the control of inflammation and T-cell immunity, *Chronic inflammation: Mechanisms and Regulation*, 357-368, 2016.
4. 佐藤克明. 樹状細胞サブセットと機能. *アレルギー*, 65(1):11-16, 2016.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Clec4A4 is a regulatory receptor for dendritic cells that impairs inflammation and T cell Immunity, 口頭, 宇都倫史, 深谷知宏, 高木秀明, 有村慶一, 中村雄, 小島直也, 佐藤克明, 第45回日本免疫学会総会, 宜野湾市, 2016/12/5, 国内.
2. Clec4A4 is a regulatory receptor for the Toll-like receptor-mediated activation of dendritic cells, ポスター, 深谷知宏, 宇都倫史, 高木秀明, 有村慶一, 中村雄, 小島直也, 佐藤克明, 第45回日本免疫学会総会, 宜野湾市, 2016/12/7, 国内.
3. Plasmacytoid dendritic cells orchestrate TLR7-mediated innate and adaptive immunity for the initiation of autoimmune inflammation, ポスター, 高木秀明, 有村慶一, 宇都倫史, 深谷知宏, 中村雄, 佐藤克明, 第45回日本免疫学会総会, 宜野湾市, 2016/12/5, 国内.
4. Crucial role of plasmacytoid dendritic cells in the development of acute colitis through the regulation of intestinal inflammation, 口頭, 有村慶一, 高木秀明, 宇都倫史, 深谷知宏, 中村雄, 佐藤克明, 第45回日本免疫学会総会, 宜野湾市, 2016/12/5, 国内.
5. Selective depletion of basophils ameliorates immunoglobulin E-mediated anaphylaxis, ポスター, 中村雄, 深谷知宏, 宇都倫史, 高木秀明, 有村慶一, 佐藤克明, 第45回日本免疫学会総会, 宜野湾市, 2016/12/7, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当無し。

(4) 特許出願  
該当無し。