



帯広畜産大学

Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

# 免疫寛容因子 Gpnmb (DC-HIL) によるマウス悪性黒色腫に対する腫瘍反応性T細胞の免疫抑制に関する研究

著者	富張 瑞樹
雑誌名	北海道獣医師会雑誌
巻	54
号	9
ページ	534-539
発行年	2010
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1588/00000703/">http://id.nii.ac.jp/1588/00000703/</a>

## 【研究紹介】

免疫寛容因子 Gpnmb (DC-HIL) によるマウス悪性黒色腫に  
対する腫瘍反応性 T 細胞の免疫抑制に関する研究

富 張 瑞 樹

帯広畜産大学臨床獣医学研究部門 (〒080-8555 帯広市稲田町西 2 線11)

## はじめに

腫瘍細胞に対する“免疫反応”は、非常に複雑かつ多岐にわたるネットワークの総合的な output であるが、この中には大きく二つの側面を見ることができる。ひとつは、秩序を乱して勝手に増殖する腫瘍細胞を排除するための、生体防御ともいえる腫瘍攻撃性の免疫反応であり、もうひとつは、免疫反応から巧みに逃れるメカニズムや抗腫瘍免疫活性を抑制する能力を発揮することによって、宿主の免疫寛容状態を導いてしまう反応である。こうした反応の総合的なバランスがどちら側に傾いたかによって、腫瘍の成長、あるいは縮小というマクロな結果が現れることになる。

もう少し深くこれらの反応を考えてみよう。腫瘍を排除する免疫反応に登場する役者としては、Natural Killer 細胞や細胞傷害性 T リンパ球 (Cytotoxic T lymphocyte: CTL) などが代表的である<sup>(1)</sup>。一方、腫瘍が免疫系のサーベイランスならびに破壊から巧みに逃れる機構としては、腫瘍関連抗原 (Tumor-associated antigen: TAA) の発現の極端な減少、抗原提示に関与する主要組織適合抗原 (Major Histocompatibility complex: MHC) 分子の発現低下、免疫抑制系サイトカイン (TGF, IL-10, VEGF など) の放出や T 細胞活性化共因子の消失などが報告されている<sup>(2,3)</sup>。このうち、腫瘍抗原特異的な T 細胞の活性化、ならびに抑制に関する研究は、腫瘍免疫、ワクチン開発などの面で多くの報告を認めている分野でもある。

本来、腫瘍抗原特異的に免疫担当細胞である T 細胞が活性化されるためには、TCR (T cell Receptor: T 細胞受容体)-CD3 複合体を介する抗原特異的なシグナルによる刺激が必要であるが、これと同時に、抗原提示細胞と T 細胞との間には、インテグリンなどを介した抗原非特異的な共刺激 (co-stimulatory) もしくは共抑制 (co-inhibitory) のシグナル伝達がなされている。この

時、前者の TCR を介した刺激だけでは抗原提示シグナルとして不十分であり、後者の共刺激/抑制シグナルが同時に伝わって初めて免疫反応が開始されるのである。

共刺激因子としては、抗原提示細胞上に発現される CD80 や CD86、またこれらに結合する T 細胞側の CD28 などが知られており、これらは TCR を介した T 細胞活性化のシグナルを増強させる<sup>(4)</sup>。一方、共抑制因子としては、抗原提示細胞に発現する PD-1 や BTLA、HVEM、Tim-3 などが、またこれらに結合する T 細胞側の PD-L1 や PD-L2、Tim-3 ligand/Galectin-9 などが報告されている<sup>(5-11)</sup>。こうした共抑制因子は、実際の腫瘍細胞にも多量に発現されており、免疫担当細胞によるサーベイランスから逃れ、腫瘍反応性 CTL の活性化を抑制し、さらには CTL による細胞溶解やアポトーシス誘導の可能性を低減させることを可能とさせている<sup>(12,13)</sup>。

この共抑制因子のひとつに、DC-HIL という蛋白質がある。これは我々のグループが2001年に初めてマウス樹状細胞から発見、報告したものであり<sup>(14)</sup>、高度に糖修飾されたタイプ1膜貫通蛋白質 (95-120kDa) で、多くの抗原提示細胞に発現している。これらは活性化した T 細胞上の Syndecan-4 蛋白質と結合することで、抗原提示後の T 細胞の増殖活性や炎症性サイトカインの産生を抑制する働きを持つ<sup>(16-18)</sup>。この DC-HIL 蛋白質は多くの研究者によって異なる蛋白質名での報告がなされているが、とくにヒト、ならびにマウス悪性黒色腫細胞においては Gpnmb として存在が報告され、腫瘍細胞の転移に関与することが示唆されていたが<sup>(15)</sup>、詳細については明らかにされていなかった。

DC-HIL として我々が発見した免疫抑制に関わる蛋白質が、黒色種細胞にて Gpnmb として、しかも比較的多量に存在している。このことに興味を覚えた我々は、まず Gpnmb のマウス悪性黒色腫細胞株における発現動態を調べるところからスタートした。この結果、マウス黒

色種細胞において、Gpnmbが既知の共抑制因子の中でも群を抜いて豊富に発現していることを確認した。量的な解析に続く疑問は、質的にも同様な役割を果たしているのだろうか？という点である。悪性黒色腫におけるGpnmbも、樹状細胞のDC-HILとして認められたものと同様に、免疫を抑制する機能を有しているのだろうか？この疑問に応えるために、本研究での我々は、Gpnmb発現をノックダウンした細胞、Kd-B16を作成するに至った。

①-1：マウス悪性黒色腫細胞株では Gpnmb (DC-HIL) の発現が最も高い

マウス悪性黒色腫細胞株 B16F10 における Gpnmb (DC-HIL) の mRNA 発現量を、RT-PCR 法を用いて、共抑制因子として既知の PD-L1、PD-L2、HVEM、Tim-3 の 4 種と比較した。この結果、Gpnmb の mRNA 発現量が、他に比較して有意に高かった (図 1 A)。骨髓由来樹状細胞 (Bone marrow derived dendritic cell: BM-DC) を陽性コントロールとしており、さらに IFN- $\gamma$  刺激後も、Gpnmb の mRNA 量の高値は変わらなかった。これらにより Gpnmb は悪性黒色腫細胞 B16-F10 において、既知の共抑制因子の中でも最も高い mRNA 発現量を認めることが明らかとなった。

①-2：Gpnmb 発現をノックダウンした悪性黒色腫細胞は、in vitro における細胞増殖効率に変化を認めない

Gpnmb の機能を検討するために、我々はレンチウイルスを用いた siRNA システム (pSIF1-H1-copGFP shRNA lentivirus system; System Biosciences, Moun-

tain View, CA) により、Gpnmb 発現をノックダウンした B16F10 細胞を作製した。この Gpnmb ノックダウン細胞 (Kd-B16) は、コントロールレンチウイルスベクターを感染させた細胞 (C-B16) と比較して、ほとんど全ての Gpnmb 蛋白質発現の消失を認めた (図 1 B)。UTX-103 はマウス Gpnmb に対する我々が作製したモノクローナル抗体であり、 $\beta$ -actin は内部標準である。

従来の知見の中で、Gpnmb の発現は細胞増殖能に関係する可能性を示唆した報告がある<sup>(15)</sup>。このため、Kd-B16 の in vitro における増殖能を検討するために、MTT-assay (細胞の viability を示す比色法)、ならびに cell-cycle analysis (7-AAD: DNA 総量と BrdU の取り込み能: DNA 合成能とによる細胞周期解析法) とを実施した。この結果、MTT-assay では Kd-B16 と C-B16 との間に顕著な差異を認めず (図 1 C)、cell-cycle analysis においてもその増殖能に有意な差は認められなかった (図 1 D)。この結果は、Gpnmb をほぼ完全にノックダウンした Kd-B16 において、in vitro における細胞増殖能では C-B16 と比較してなんら差異を認めないことを示している。

②：Kd-B16 は in vivo のマウス皮下ではほとんど成長しない。一方で、免疫不全マウスであれば C-B16 と同程度に成長する。

次に我々は、in vivo における腫瘍の成長を検討するため、B16F10 と同種である C57BL/6 マウスの皮下に Kd-B16、C-B16 とを接種した。この結果、C-B16 において接種後 24 日で非常に大きな腫瘍の成長を認めたのに対し、Kd-B16 では著しく小さな腫瘍にしか成長しなかった (図 2 A)。この結果は生存率にも反映され、C-B16 で

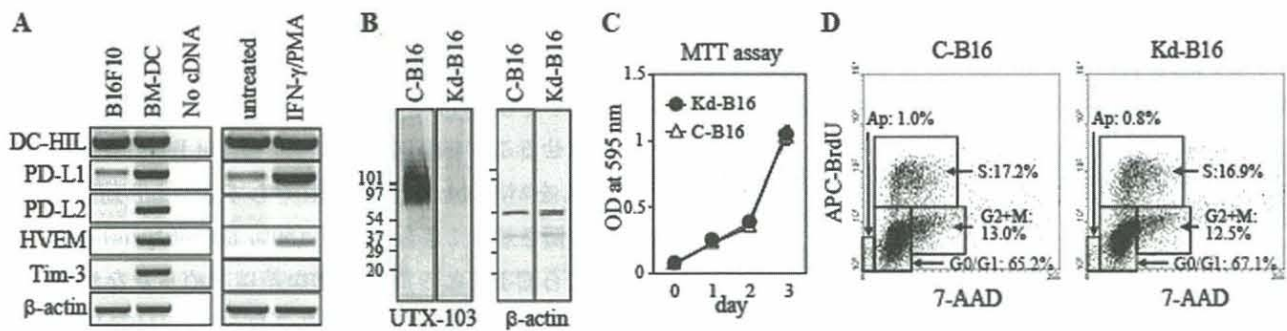


図 1 (A) マウス黒色腫細胞 B16-F10 における Gpnmb ならびに既知の共抑制因子の mRNA 発現量を解析した。右は IFN- $\gamma$  (1000 U/ml)/PMA (10ng/ml) にて 16 時間刺激したもの。(B) Gpnmb ノックダウン B16F10 (Kd-B16) ならびにコントロールウイルスベクターを遺伝子導入した B16F10 (C-B16) に対し、抗 Gpnmb 抗体 (UTX) を用いたウエスタンブロットによる Gpnmb 蛋白質発現量を解析した。(C) in vitro での増殖活性を MTT assay により評価した。(D) 無血清培地 24 時間培養にて飢餓状態とした後、7-AAD (DNA 染色) と BrdU 取り込み能 (DNA 増殖時の BrdU (ウラシル) 取り込み) によるフローサイトメトリー法 (FACS) を用いた細胞周期解析を行った。S: 合成期、G2+M: 分裂準備期+分裂期、G0/G1: 静止期/合成準備期、Ap: アポトーシスした細胞。

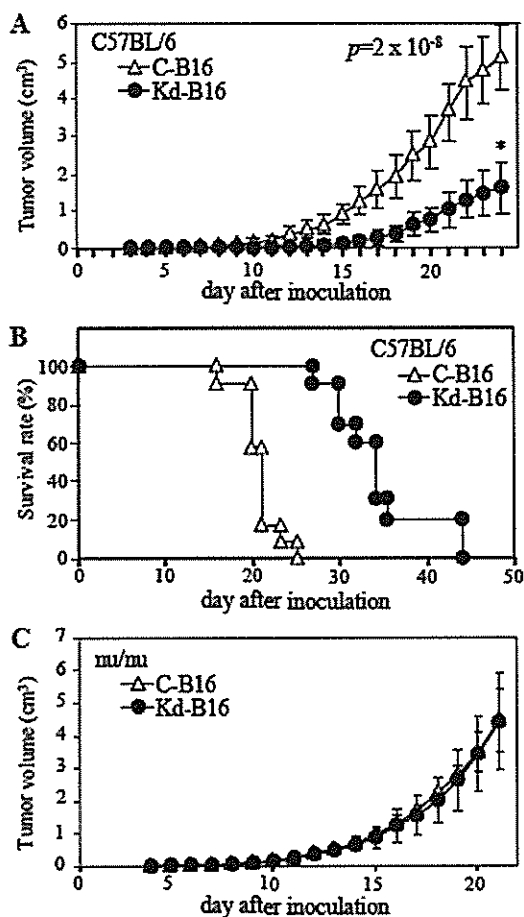


図2 (A) C-B16ならびに Kd-B16 を C57BL/6 マウスの右脇腹に皮下注射し ( $2 \times 10^6$ )、その腫瘍容積 (長径  $\times$  短径<sup>2</sup>) を計測した (n=12)。 (B) 同実験における生存率。 (C) 同様に nu/nu マウス (免疫不全マウス) の右脇腹に皮下注射し、腫瘍容積を計測した (n=5)。

は接種後16日から26日までの間に全てが死亡したのに対し、Kd-B16では接種後27日で最初の死亡を認め、その後最長で43日までの生存延長を認めた (図2B)。さらに重要なことに、免疫不全マウス (B6.Cg-Thy1<sup>a</sup>/CyTg (Tcratcrb) 8 Rest/J: nu/nu) における同様の実験では、Kd-B16と C-B16との間に腫瘍の成長に差異を認めなかった (図2C)。これらの結果より、Gpnmb をノックダウンした Kd-B16 では、*in vivo* のマウス皮下において腫瘍の成長が大幅に減少すること、さらにその原因としては宿主の免疫機構が大きく関与することが示唆された。

### ③: Gpnmb ノックダウンは腫瘍反応性 T 細胞活性化を増強するが、細胞傷害能には強い影響を認めない

抗原提示細胞 (とくに樹状細胞) 上にある DC-HIL/ Gpnmb 蛋白質は、T 細胞上の Syndecan-4 (SD-4) に結合し、その活性化を抑制することが報告されている。今回の *In vivo* における宿主免疫機構への関与もこの機

能によるのではないかと推測した我々は、黒色腫細胞上にある Gpnmb もまた同様の機能を有していると仮定し、さらに詳細な検討を行った。

B16F10の免疫原性を十分に増強するために、我々は OVA (Ovalbumin) を腫瘍関連抗原の代わりとして利用した。まず、Kd-B16ならびに C-B16に対し OVA<sub>257-264</sub> ペプチドを共培養して (パルスして) MHC-class I に抗原提示させた。これに対し OT-I トランスジェニックマウス (OVA<sub>257-264</sub> ペプチドに対し特異的に結合する TCR を遺伝的に保有するマウス) から調整した CD8 + T 細胞を作用させ、培養上清中の IL-2 ならびに IFN- $\gamma$  を測定することで T 細胞の活性化を評価した。この結果、Kd-B16は C-B16に比べて50%以上の高いレベルで両サイトカインを産生しており、有意に強く活性化されていることが示された (図3A)。

次に、上記 OT-1 マウスのリンパ節ならびに脾臓より、OVA 抗原特異的に反応する CD8 + T 細胞 (OVA-CTL) を調整し、*in vitro* で OVA<sub>257-264</sub> ペプチドにより再活性化させて SD-4 の発現を確認したところ、ほぼ全ての CTL で活性化が確認され (CD69: 活性化マーカー陽性)、そのうちの約半数で SD-4 が発現されていた (図3B)。さらにこれら OVA-CTL を (OVA をパルスした) B16F10で再活性化する際に、抗 SD-4 抗体を添加して Gpnmb-SD4 の結合を競合阻害させると、培養上清中の IL-2 産生量が、コントロール抗体を添加した場合に比較して有意に、かつ用量依存的に高値を示した (図3C)。このことは、B16F10により OVA-CTL が活性化される際に、(抗原提示細胞と活性化 T 細胞において認められる免疫抑制と同様に) Gpnmb と SD4 との結合によって T 細胞活性化が抑制されていること、この経路を遮断することで活性化が増強されることを示している。

さらに我々は、この Gpnmb による T 細胞の活性化が CTL の細胞障害能に影響するかどうかを精査した。まず、OVA-CTL が OVA をパルスした C-B16 を細胞溶解させることを確認した (40% target lysis)。同様に、OVA をパルスした Kd-B16 に対しても、より効率的に細胞溶解させることを認めた (50% target lysis)。しかしながら C-B16 との間に有意な差は認められなかった。このことは、Gpnmb ノックダウンは CD8 + T 細胞の活性化を増強させるが、OVA-CTL の細胞傷害能に直接の影響を与えるものではないことを示唆した。



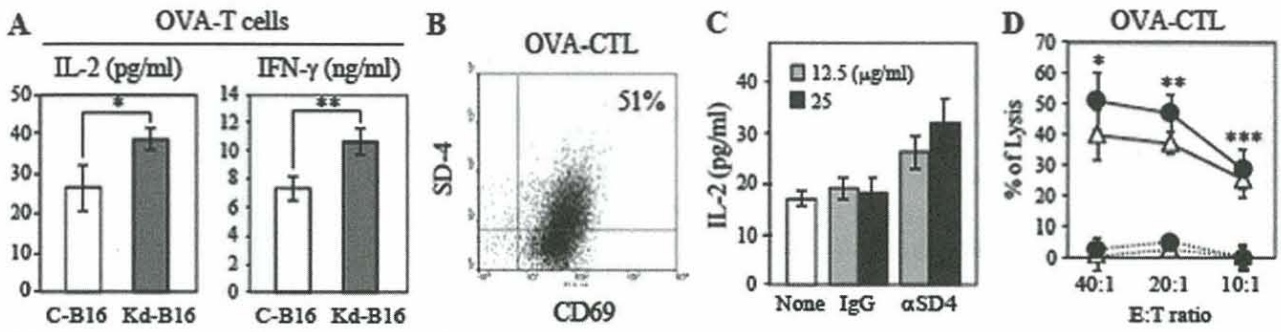


図3 (A) OT-1 マウスより調整した OVA 特異的 CD 8 + T 細胞を、OVA でパルスした Mitomycin-C 処理 B16F10 細胞で刺激し、上清中に産生された IL-2 ならびに IFN- $\gamma$  量を ELISA により測定した。(B) OVA 特異的 CD 8 + T 細胞に対し同様に *in vitro* で再刺激し、SD-4 と CD69 (早期活性化 marker) の発現を FACS により解析した。(C) OVA 特異的 CD 8 + T 細胞を *in vitro* で再刺激する際に、無添加のもの (none)、コントロール IgG 添加 (IgG)、抗 SD-4 抗体添加 ( $\alpha$ SD4) した後、上清中の IL-2 産生量を測定した。(D) 抗 OVA 特異的 CTL 活性を、異なる Effector : Target 比で評価した。この時、OVA でパルスした Kd-B16 (●+実線)、OVA でパルスした C-B16 ( $\Delta$ +実線)、Kd-B16 のみ (●+点線)、C-B16 のみ ( $\Delta$ +点線) で示した。

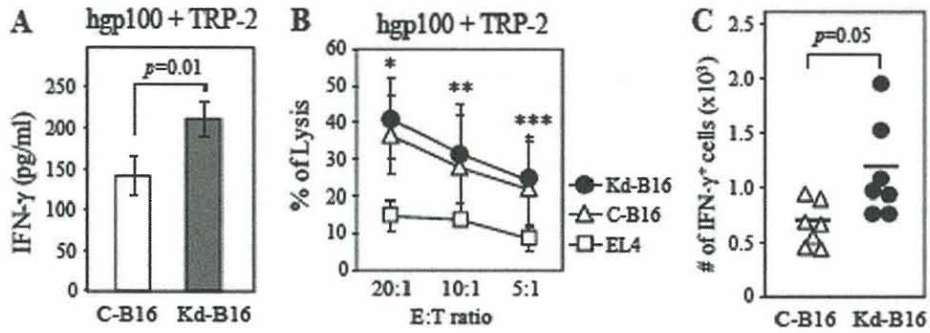


図4 (A) *in vivo* で hgp100 ならびに TRP-2 にて C57BL/6 マウスを免疫した後、CD 8 + T 細胞をリンパ節より調整し、これを *in vitro* で Kd-B16 or C-B16 にて再刺激し、上清中に産生された IFN- $\gamma$  量を測定した。(B) これらの CTL 細胞を  $^{51}\text{Cr}$  でラベルした Kd-B16、C-B16、ならびに陰性コントロールとして EL-4 と共培養し、上清中に放出された  $^{51}\text{Cr}$  から CTL 活性を測定した。(C) Kd-B16 ならびに C-B16 を皮下に接種し、2 週間後に近傍のリンパ節から CD 8 + T 細胞を調整し、hgp100+TRP-2 により *in vitro* で再刺激した後、ELISPOT assay により IFN- $\gamma$  産生細胞数を計測した。

④：悪性黒色腫特異的な腫瘍関連抗原を利用した系においても、Gpnmb ノックダウンによる T 細胞活性化が認められる

Gpnmb ノックダウンによる効果をより詳細に検討するために、OVA-OT1 マウスのシステムに換えて、悪性黒色腫で既に報告のある腫瘍関連抗原 hgp100 ならびに TRP-2 のペプチド抗原を用いて同様の実験を行った。まず wild-type である C57BL/6 マウスを上記の 2 ペプチドで免疫した後、近傍リンパ節からリンパ球を調整し、両抗原でパルスした Kd-B16 もしくは C-B16 と混合させ、上清中の IFN- $\gamma$  産生量、ならびに CTL 活性を測定した。この結果、OVA における結果と同様に、Kd-B16 において有意に高い IFN- $\gamma$  産生を認めたが (図 4A)、CTL 活性においては顕著な差異は認められなかった (図 4B)。一方、C57BL/6 マウスの皮下に Kd-B16 もしくは C-B16 を接種し、2 週間後、近傍リンパ節より CD 8 + T 細胞

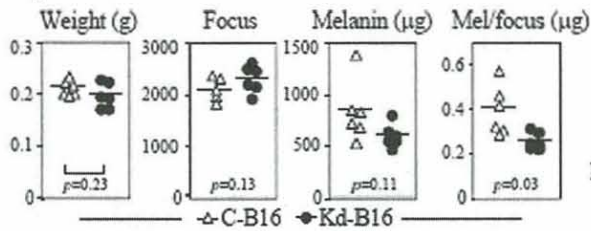
を調整した後、hgp100 ならびに TRP-2 を共培養した脾臓由来抗原提示細胞と混合して再活性化させたものを IFN- $\gamma$  の ELISPOT assay に供した結果、Kd-B16 の IFN- $\gamma$  産生リンパ球数は C-B16 に比較して有意に高値を示した。これらの結果は、*in vitro* ならびに *in vivo* の両方において、Gpnmb ノックダウンにより宿主の CD 8 + T 細胞の活性化が増強されることを示している。

⑤：Gpnmb ノックダウンは腫瘍の転移能を変化させないが、肺においてもその増殖能を著しく低下させる

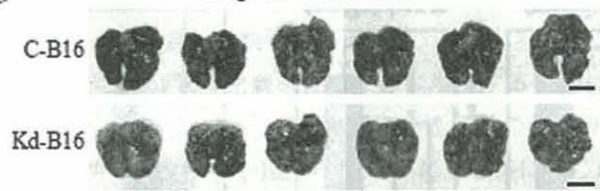
Gpnmb は、ヒトの悪性黒色腫において、その発現量が転移能に関与するという報告がある (15)。これを精査するために、尾静脈から Kd-B16 もしくは C-B16 を C57BL/6 マウスに投与し、2 週間後の肺の重量 (Weight)、転移した黒色スポット数 (Focus)、肺あたりのメラニン量 (Melanin)、スポットあたりのメラニン量 (Mel/



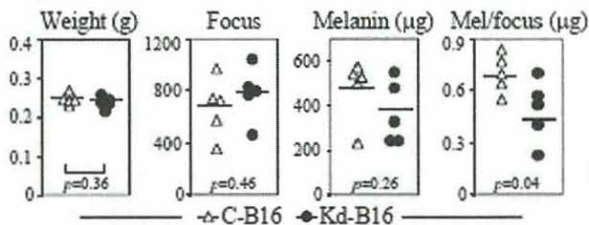
## Exp 1



## Lungs of mice inoculated:



## Exp 2



## Lungs of mice inoculated:

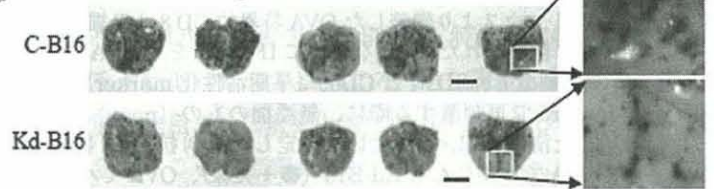


図5 C57BL/6 マウス (Exp 1 は  $n=6$ 、Exp 2 は  $n=5$ ) に Kd-B16or C-B16 を尾静脈より接種し ( $2 \times 10^5$ )、2 週間後の肺を摘出した後、重量 (weight)、転移スポット数 (focus)、肺あたりのメラニン量 (Melanin)、転移スポット数あたりのメラニン量 (Mel/Focus) を計測した。

Focus) について比較を行った。この結果、Kd-B16 を投与したマウスでは、C-B16 に比較して肺の重量は軽く、スポット数は多く、メラニン量は少ない傾向を示した。とくにスポットあたりのメラニン量においては有意な減少を認めた。このことより、Gpnmb ノックダウンは転移能には大きな変化を与えないが、肺においても皮下と同様に腫瘍細胞の増殖能を著しく低下させることが示された。

## 考 察

黒色腫瘍細胞に発現する Gpnmb が、抗原提示細胞上にある DC-HIL と同様の機能を有しているかどうかを検討するために、我々はマウス黒色腫瘍細胞 B16F10 における Gpnmb をノックダウンし、この腫瘍細胞の成長、増殖に関して解析を行った。Gpnmb のノックダウンは、*in vitro* における腫瘍細胞の自発的な増殖になんら影響を与えず、またヌードマウスにおける腫瘍細胞の成長に対しても変化を認めなかった。しかしながら、右脇腹に接種して皮下での成長を観察した場合、ならびに尾静脈から接種して肺での転移スポットを観察した場合のどちらにおいても、Gpnmb のノックダウンにより顕著な腫瘍細胞増殖の低下が認められた。

これら腫瘍の成長が低下した理由として、黒色腫瘍細胞上の Gpnmb が、腫瘍反応性 T 細胞の活性化を抑制していたためであり、Gpnmb ノックダウンによりこの抑制系が外れ、結果として腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞による免疫反応が引き起こされたことが最も大きな要因であると考えられる。このことは、①: Gpnmb ノックダウン細胞株 Kd-B16 は、腫瘍反応性 T 細胞をより強

く刺激、活性化させたこと (図 3、図 4)、②: IFN- $\gamma$  産生 T 細胞は、Kd-B16 接種によってより多く周辺リンパ節に認められたこと (図 4 C)、③: Gpnmb と結合して活性化 T 細胞を鎮静化することが知られている SD-4 が黒色腫瘍細胞反応性 T 細胞に存在していたこと (図 3 B)、④: 抗 SD-4 抗体によりこの結合経路を遮断すると、CTL 活性が増強されたこと (図 3 C)、などにより強く支持される。一方で、我々は CTL による細胞傷害能に関しては、Gpnmb ノックダウンによる有意な差異を認めることができなかった。このことは、Gpnmb による活性化 T 細胞の抑制機能は、既に活性化された CTL の細胞傷害能を低減させるものではなく、抗原提示時に同時に共シグナルとして伝達されることによって、活性化 T 細胞の増殖を抑制することにより抗腫瘍免疫反応を制御しているものと考えられた。

また本研究の結果においては、転移に関する明確な関与を認めなかった。これは従来のヒトにおける報告<sup>(15)</sup>と異なる結果であるが、この原因としては実験系が大きく異なる点が挙げられる。具体的には(1)マウスの黒色腫瘍細胞株 vs ヒト黒色腫瘍細胞株であること、(2)本研究では siRNA によるノックダウンした細胞群をあえて bulk のまま調整して使用しているが、既報では Gpnmb 遺伝子導入細胞をクローン化して使用していること (クローン細胞特異的な現象であった可能性)、(3)Gpnmb 蛋白質の発現を実際に使用したクローン細胞に対して検討していないこと、(4)本研究がノックダウン (loss of function) であるのに対し、既報では遺伝子導入による強制発現 (gain of function) であること、(5)本研究が同種マウスの尾静脈注射による肺転移モデルであるのに対し、既

報ではヌードマウスに対するヒト細胞の異種移植であること、などの点である。しかしながら Gpnmb はそれ自体がインテグリンファミリーに属する細胞接着因子であるため転移に関与する可能性は強く、今後も詳細な検討が必要であると考えられる。

以上のことより、我々の Gpnmb に関する新たな知見は、黒色腫細胞に対する免疫サーベイランスならびに抗腫瘍免疫反応を制御するために、Gpnmb/SD-4 経路の遮断という新たな治療戦略を与える非常に重要な基礎的検討であったと言えよう。今後、Gpnmb に関するさらに詳細な検討を行うとともに、マウスのみならず犬、猫などの他の動物種における、Gpnmb を用いた新規免疫療法の開発を目指した研究を進めていくつもりである。

### References

- (1) thor SP et al., *Cancer Immunol Immunother* 1999 Oct; 48 (7): 386-95.
- (2) Rivoltini L et al., *Immunol Rev* 2002 Oct; 188: 97-113.
- (3) Chouaib S et al., *Immunol Today* 1997 Oct; 18 (10): 493-7.
- (4) Carreno BM et al., *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 29-53.
- (5) Dong H et al., *Nat Med* 1999 Dec; 5 (12): 1365-9.
- (6) Freeman GJ et al., *J Exp Med* 2000 Oct 2; 192 (7): 1027-34.
- (7) Latchman Y et al., *Nat Immunol* 2001 Mar; 2 (3): 261-8.
- (8) Carreno BM et al., *Trends Immunol* 2003 Oct; 24 (10): 524-7.
- (9) Zhu C et al., *Nat Immunol* 2005 Dec; 6 (12): 1245-52.
- (10) Sabatos CA et al., *Nat Immunol* 2003 Nov; 4 (11): 1102-10.
- (11) Sanchez-Fueyo A et al., *Nat Immunol* 2003 Nov; 4 (11): 1093-101.
- (12) Hurwitz AA et al., *Curr Opin Immunol* 2000 Oct; 12 (5): 589-96.
- (13) Dong H et al., *Nat Med* 2002 Aug; 8 (8): 793-800.
- (14) Shikano S et al., *J Biol Chem* 2001; 276 (11): 8125-34.
- (15) Weterman MA et al., *Int J Cancer* 1995; 60 (1): 73-81.
- (16) Safadi FF et al., *J Cell Biol* 2001; 84 (1): 12-26.
- (17) Chung JS et al., *Blood* 2007 Feb 6; 109 (10): 4320-7.
- (18) Chung JS et al., *J Immunol* 2007 Nov 1; 179 (9): 5778-84.
- (19) Chung JS et al., *Eur J Immunol* 2009 Apr; 39 (4): 965-74.