

平成 21 年 4 月 21 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890081
 研究課題名（和文） CD4+CD8+マクロファージの抗腫瘍メカニズムと免疫学的役割に関する研究
 研究課題名（英文） The cytotoxic mechanism and immunological role of CD4+CD8+ macrophages.
 研究代表者
 馬場 智久 (BABA TOMOHISA)
 金沢大学・がん研究所・助教
 研究者番号： 00452095

研究成果の概要：ラット脾臓内 CD4⁺CD8⁺マクロファージを用いて、数種類の腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を検討し、またそのメカニズムを解析したところ、NK 細胞と同様に、活性型 NK レセプター（NKRP2）を介して腫瘍細胞表面上の RAET1 分子を認識し、granzyme や perforin などの細胞傷害因子を分泌することで、抗腫瘍細胞傷害活性を示すことが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：マクロファージ、腫瘍免疫、細胞傷害活性

1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍免疫や感染症研究分野において自然免疫に関わる細胞に注目が集まっている。自然免疫機構を中心的に担っていると考えられている単球/マクロファージでは、以下のようなサブポピュレーションが発見され、臨床病態との関連が想定されている。

- (1) CD16⁺単球：TNF- α 、NO の高産生により、強い細胞傷害活性を示す。
- (2) CD56⁺単球：MHC クラス II が高発現しており、T 細胞に対する強い増殖活性を持つ。

- (3) Tumor-associated macrophage (TAM)：腫瘍組織内で IL-10、TGF- β などの炎症抑制性サイトカインを産生し、抗腫瘍免疫反応の制御、さらには腫瘍細胞増殖を助ける働きがある。

研究代表者は、以前の解析から、全身性の炎症性自己免疫疾患を発症するモデルラットの末梢血、脾臓中に CD4 と CD8 を共に発現する CD68⁺単球/マクロファージ系細胞が増加していることを見出した。その後の解析から、CD4⁺CD8⁺マクロファージは、結核死菌を含むアジュバント免疫などの強い炎症性

刺激によっても増加することがわかった。さらには、機能的な解析の結果、本細胞は NK 細胞の活性型レセプターである NKR-P2 (ヒト NKG2D の orthologue) や、抗腫瘍活性に重要な細胞傷害因子であるパーフォリンやグランザイムを強く発現していることが観察されたため、抗腫瘍免疫において、新しいエフェクター細胞として重要な役割を担っている可能性がある」と着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、初めに、ラット脾臓から採取した CD4⁺CD8⁺マクロファージの腫瘍細胞に対する細胞傷害活性の検討、さらには、細胞傷害メカニズムの解明を目的として、解析を開始した。また、ヒト、マウスにおける相同的な細胞の同定、最終的には、ヒトにおける腫瘍性疾患、感染症、自己免疫疾患への本細胞の免疫病理学的な関連について明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

我々は、以上の研究目的を達成するために、以下の方法で解析を遂行した。

(1) ラットをモデル動物とした CD4⁺CD8⁺マクロファージによる抗腫瘍メカニズムの解明

- ① 結核死菌を免疫したラットの脾臓から CD4⁺CD8⁺マクロファージを分離し、4 種類の腫瘍細胞株 (MT:胸腺上皮性腫瘍株、RCN-9:大腸癌株、SST-2:乳癌株、NBT-II:膀胱癌株) をターゲットとした細胞傷害性試験を行ない、細胞傷害率を LDH 測定法により測定し、感受性細胞株と抵抗性細胞株を区分した。同時に陽性対照として、NK 細胞による細胞傷害活性を測定し、感受性パターンを比較検討した。
- ② セルカルチャーインサートを用いて、ターゲット細胞との接着を阻害した状態での細胞傷害率を阻害しない対照群と比較検討した。
- ③ ①の解析結果から CD4⁺CD8⁺マクロファージの細胞傷害活性に対して感受性の細胞株と抵抗性の細胞株から、それぞれ mRNA を抽出し、RT-PCR により細胞傷害に関わる遺伝子 (NKG2D リガンド、Fas、TRAIL レセプターなど) の発現比較を行なった。得られた結果から感受性細胞株に特異的に高発現している遺伝子を標的細胞認

識に関わる候補分子として抽出した。

- ④ ③で抽出した遺伝子について、それぞれ発現ベクターを作成し、COS-7 細胞株に遺伝子導入し、得られた細胞株に対する、細胞傷害性試験を行なった。

- ⑤ CD4⁺CD8⁺マクロファージの細胞傷害活性へのパーフォリンやグランザイム B の関与を、これらの阻害剤を用いて検討した。パーフォリンやグランザイム B の機能発現には細胞内へのカルシウム流入が必要であることがわかっているため培養液中のカルシウムキレート剤として EGTA を使用した。また、グランザイム阻害剤としてはセリンプロテアーゼ阻害剤の 3,4-dichloroisocoumarin (DCI) を用いた。

- ⑥ 結核死菌免疫により、生体内の CD4⁺CD8⁺マクロファージを高頻度に増加させたラットに対して、腫瘍細胞を皮下摂取し、腫瘍増殖を経過的に測定し、生体内での腫瘍増殖抑制効果を検討した。

(2) CD4⁺CD8⁺マクロファージの特異的マーカー遺伝子の抽出によるマウス、ヒトでの相同的な細胞の同定

DNA アレイ解析法を用いた網羅的遺伝子発現解析により、ラット CD4⁺CD8⁺マクロファージに特異的なマーカー遺伝子を抽出した。この遺伝子情報を基にヒト、マウスにおける相同的な細胞を検討した。

(3) CD4⁺CD8⁺マクロファージに対応するヒトの細胞集団についての各種疾患との関連性の検討

腫瘍をはじめとする各種疾患の病理検体を用いて、病変局所に浸潤するその細胞の多寡を免疫染色の手法で調べ、CD4⁺CD8⁺マクロファージと疾患との関連性を検討した。

4. 研究成果

4 種類の腫瘍細胞株に対する細胞傷害性を検討したところ、MT と NBT-II に対する強い細胞傷害活性を示したのに対し、RCN-9、SST-2 に対してはほとんど細胞傷害活性が認められなかった。また、セルカルチャーインサートを用いることで、細胞傷害活性が完全

に消失したことから、細胞間の接着が必要不可欠であることが明らかになった。さらに、細胞傷害活性に感受性、非感受性の腫瘍細胞株から mRNA を抽出し、細胞傷害関連分子のプロファイリングを行なったところ、感受性株において、ラット RAET1 分子の高発現が観察された。RAET1 は活性化型 NK レセプターの一つである NKG2D のリガンドであることが知られており、NK 細胞による標的細胞認識に重要な役割を担っていることが報告されている。そこで、NK 細胞と同様に、RAET1 分子が CD4⁺CD8⁺マクロファージによる細胞傷害過程にも関与しているかを検討するため、RAET1 の発現ベクターを作製し、過剰発現細胞株に対する細胞傷害活性を測定した。その結果、非遺伝子導入細胞株と比較して、RAET1 分子の発現により細胞傷害活性が増強することを確認した。また、以前から本細胞での高発現が認められている granzyme や perforin などの細胞傷害因子に対しても、それらの inhibitor を用いることで、細胞傷害活性がほぼ完全に抑制されることも確認した。これらの結果から、本細胞は活性化型 NK レセプターを介した標的細胞の認識により、granzyme/perforin 依存性の細胞傷害活性を示すことを証明した。さらに、生体内においても、本細胞群を結核死菌免疫により、増加させることで、腫瘍増殖を効果的に抑制することを証明した。これらの結果は、Journal of Immunology に報告し(発表論文 2)、世界的にも腫瘍免疫療法における新しいエフェクター細胞としての有用性が期待されている。

CD4⁺CD8⁺マクロファージ特異的なマーカー遺伝子の抽出に関しては、cDNA マイクロアレイ解析の結果から、leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (Lilrb) を始めとするいくつかの細胞表面分子の高発現が観察された。しかしながら、定量的 PCR 法による詳細な解析の結果、結核死菌を免疫したラットから採取した CD4⁺CD8⁺マクロファージと生理的条件下で採取したものでは、発現パターンが異なっており、安定した特異的マーカーの同定には至っておらず、ヒトやマウスでのカウンターパートの指標としては、本細胞の分化過程における経過的解析など、さらに詳細な検討を必要とする。一方で我々は、マウスを用いた腫瘍肺転移モデルにおいて、CCR5 などのケモカインシグナルを介して腫瘍組織に浸潤するマクロファージ系細胞が腫瘍増殖に重要な役割を担っていることを明らかにしており(発表論文 1)、CD4⁺CD8⁺マクロファージとの関連性についても検討を加える予定である。また、現在、各種疾患との関連性も踏まえ、腫瘍性疾患、自己免疫疾患などの様々なマウスモデルを用いて、免疫組織学的解析を進めており、今後、ヒト・マウスでのカウンターパートの同定が

期待される。

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 2 件)

1. Wu Y, Li YY, Matsushima K, Baba T, Mukaida N. CCL3-CCR5 axis regulates intratumoral accumulation of leukocytes and fibroblasts and promotes angiogenesis in murine lung metastasis process. *J. Immunol.* 181: 6384-6394, 2008. 査読有
2. Baba T, Iwasaki S, Maruoka T, Suzuki A, Tomaru U, Ikeda H, Yoshiki T, Kasahara M, Ishizu A. Rat CD4⁺CD8⁺ Macrophages Kill Tumor Cells through an NKG2D⁻ and Granzyme/Perforin-Dependent Mechanism. *J. Immunol.* 180: 2999-3006, 2008. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 馬場 智久
CD4/CD8 double positive マクロファージの発見と自然免疫系における新しいエフェクター細胞としての展開
日本病理学会 2008 年 5 月 15 日 金沢
- (2) 馬場 智久
CD4/CD8 double-positive monocytes/macrophages: a subpopulation of the macrophage/dendritic cell lineage with a cytotoxic phenotype
16th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages
2007 年 6 月 14 日 静岡
- (3) 馬場 智久
CD4/CD8 double positive マクロファージによる抗腫瘍メカニズムの解明
日本病理学会 2007 年 3 月 14 日 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 智久 (BABA TOMOHISA)
金沢大学・がん研究所・助教
研究者番号: 00452095

(2) 研究分担者
無

(3) 連携研究者
無