[受 賞]

ホジキン病細胞株 KM-H2 による Foxp3 陽性細胞 および細胞傷害性 CD4 陽性 T 細胞の誘導

谷尻 力

(関西医科大学内科学第一講座)

The Differentiation of CD4+Foxp3+ T Cells and CD4+ Cytotoxic T-lymphocytes from CD4+ Naïve T Cells is Promoted by Hodgkin's Reed-Sternberg Cell Line (KM-H2)

Tsutomu TANIJIRI

Department of Internal Medicine 1, Kansai Medical University

はじめに

免疫機構は様々な生体内の恒常性を維持しており、腫瘍細胞排除といった抗腫瘍免疫も例外ではない。これに対して腫瘍細胞が宿主の抗腫瘍免疫を回避する機序も存在すると考えられている。実際にヒト卵巣癌など、様々な固形腫瘍において、末梢血液中および腫瘍組織内において制御性T細胞 (Treg) の増加が認められ、Treg が抗腫瘍免疫の抑制と腫瘍の進展に関与しているものと考えられている^{1,2)}。一般に腫瘍は密集した増殖とその拡大といった進展様式を特徴とするが、Hodgkin 病 (HD) の病変内では豊富な炎症細胞浸潤の中に、わずかの腫瘍細胞が孤立性に存在している。近年、HD のような特異な病変内にも多数の Treg が存在することが報告され、腫瘍における Treg の役割や起源が異なるのではないかと注目されている^{3,4)}。一般に Treg は宿主の胸腺で成熟した後、腫瘍細胞により末梢血流中から腫瘍局所へと化学遊走されるものと考えられているが⁵⁾、Treg は末梢血液中の前駆細胞から局所で分化誘導されることも知られている⁶⁻⁸⁾。我々はこれまでに Hodgkin's Reed-Sternberg (H-RS) 細胞由来の細胞株である KM-H2 が他の lineage marker を発現せず、成熟樹状細胞の marker を発現し、ヒト CD4⁺T 細胞を分化増殖させることを報告してきた^{9,10)}。そこで KM-H2 がヒト末梢血 CD4⁺T 細胞から CD25⁺Foxp3⁺Treg へ

と直接分化誘導することが可能かどうかの検証を行った。

研究方法

インフォームドコンセントを得た健常者から末梢血を採取し、単核球層を比重遠沈法にて分離し、磁気ビーズ法により Naïve CD4⁺T 細胞を採取した。末梢血 Naïve CD4⁺T 細胞と、20 Gy 照射にて不活化させた KM-H2 を共培養し、共培養後の CD4⁺T 細胞における表面抗原、細胞内・核内物質についてフローサイトメトリー (FCM) を用いて解析した。サイトカイン産生能を ELISA 法及び FCM を用いて解析した。RT-PCR 法を用いて *FOXP3* 並びに *T-bet* を解析した。さらに共培養後の CD4⁺T 細胞を、不活化させていない KM-H2 を含めた各種腫瘍細胞株と再度共培養し、腫瘍細胞株に与える細胞傷害性について Cytotox96[®] を用いた比色法にて解析した。

結 果

KM-H2 のリンパ球活性化能

不活化 KM-H2 と Naïve CD4⁺T 細胞を 8 日間共培養することにより、得られた T 細胞 (KM-H2/T) は約 2.5 倍に増殖した (図 1A)。共培養開始時の Naïve CD4⁺T 細胞に CFSE をラベルすることにより、KM-H2/T には、分裂増殖する細胞と増殖しな

図1 KM-H2 との共培養による Naïve CD4⁺ T 細胞の分化・増殖。
 A) 不活化 KM-H2 と 8 日間共培養後の T 細胞数。
 B) CFSE-Naïve CD4⁺ T細胞とKM-H2との共培養。
 KM-H2/T: KM-H2 primed T cells, MAT: medium activated T cells.

い細胞の 2 集団が存在することが確認された (図 1B)。さらに Treg の代表的な marker である CD25 や intracellular CTLA-4 は経時的に up regulate していった (図 2A)。さらに CD25-KM-H2/T は CD45RO, CD122, CD134 や GITR といった他の Treg 関連 marker は陰性であったが, CD25⁺ KM-H2/T はこれらの Treg 関連 marker を発現していた (図 2B)。

CD69 はすべての細胞が共培養開始後すみやかに陽性へと転じており, 増殖を示さなかった細胞も Naïve のままではなく, 何らかの differentiation をしていることが示唆された。

KM-H2 による *Foxp3* 陽性細胞の誘導

次にサイトカイン産生能を ELISA 法にて確認したところ, CD25⁻ KM-H2/T には産生を認めなかったが, CD25⁺ KM-H2/T は IL-10 や IFN- γ の産生を認めた (図 3)。さらに RT-PCR 法にて, CD25⁺ KM-H2/T は末梢血中の Treg と同様に *Foxp3* を mRNA レベルで発現していた。また CD25⁺ KM-H2/T が IFN- γ を産生していたので master Th1 transcriptional factor である *T-bet* を同様に検討したところ, CD25⁺ KM-H2/T にて発現が認められた (図 4A)。Flow cytometry にも CD25⁺ KM-H2/T の中には *Foxp3* を蛋白レベルで発現している細胞が認められた (図 4B)。*Foxp3* と IFN- γ の double staining を行ったところ, *Foxp3*⁺ 細胞は IFN- γ を産生せず, *Foxp3*⁻ 細胞が IFN- γ を産生していることが確認された (図 4B)。以上より, KM-H2/T は CD25⁺ *Foxp3*⁻ IFN- γ 産生細胞群と, CD25⁺ *Foxp3*⁺ IFN- γ 非産生細胞群と, CD25⁻ *Foxp3*⁻ IFN- γ 非産生細胞群の 3 群に分類された。

KM-H2 による細胞傷害性 T 細胞の誘導

次に, KM-H2/T を fresh の KM-H2 と再度 5 日間共培養したところ, KM-H2 のみで培養したものと比べて, CD25⁺ KM-H2/T と共培養することにより, KM-H2 の増殖抑制が確認された (図 5A)。そこで共培養後の KM-H2 において annexin V の陽性率を検討したところ, CD25⁺ KM-H2/T と共培養することにより約 9 割の KM-H2 が陽性となっていた (図 5B)。これらより, CD25⁺ KM-H2/T が KM-H2 にアポトーシスを誘導することが示唆されたため, 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が有する Granzyme や TIA-1 といった細胞質内顆粒蛋白や perforin を検討したところ, CD25⁺ KM-H2/T は Perforin や Granzyme A は検出されなかったが, *Foxp3* 発現の有無とは無関係に, Granzyme B や TIA-1 を細胞内に有している事が明らかとなった (図 5C)。さらに, CD25⁻ KM-H2/T は KM-H2 の viability に何ら影響を与えなかったが, CD25⁺ KM-H2/T は, KM-H2 を強力に傷害することが明らか

図 2 KM-H2/T 細胞における Treg 関連 marker.

A) 共培養後 2, 4, 6, 8 日目の CD25, Intracellular CTLA-4, CD69 染色.

B) 8 日間共培養後の CD25 陽性, 陰性 KM-H2/T における表面 marker.

図 3 KM-H2/T 細胞のサイトカイン産生能.

図 4 KM-H2/T 細胞における Foxp3 の発現.

A) RT-PCR 法.

Lane 1: MAT, Lane 2: CD25⁻ KM-H2/T, Lane 3: CD25⁺ KM-H2/T, Lane 4: 末梢血 CD25⁻CD4⁺ T, Lane 5: 末梢血 CD25⁺CD4⁺ T.

B) FCM 法による核内 Foxp3 と CD25 の二重染色 (左).

PMA, ionomycin, brefeldin A による再刺激後の Foxp3 と IFN-γ の二重染色 (右).

となった. また CD25⁺ KM-H2/T 細胞数依存性に細胞傷害能が高まっていることが確認された (図 5D). 以上より, KM-H2 は末梢血 Naïve CD4⁺ T 細胞より, Foxp3⁺ 細胞と同時に CD4⁺ CTL を誘導することが明らかとなった.

抗原提示能を有する腫瘍細胞株による Foxp3 陽性細胞と CD4 陽性 CTL の誘導

最後に KM-H2 以外の各種悪性腫瘍由来細胞株についても同様の解析を加えたところ, KM-H2 以外の他の HD 細胞株 (L-428, L-540) を用いても同様の細胞集団が誘導され, さらに B 細胞系 (Raji, LCL) やミエロイド系 (HL-60, THP-1) の細胞株でも誘導可能であった (図 6). しかし T 細胞系の Jurkat や上皮系腫瘍の Hela との共培養では得ることが出来なかった. これらの細胞株の違いを調べてみると, CD25⁺Foxp3⁺ 細胞を誘導するには腫瘍細胞株が抗原提示能を有している事が必須であることが明らかとなった.

考 察

昨今, 生体内において腫瘍細胞の増殖に Treg が深く関与していることが明らかとなり, これまでに様々な腫瘍組織中に Foxp3⁺ Treg が存在することが報告されてきた¹⁻⁴⁾. Treg は naturally occurring Treg (nTreg) と inducible Treg (iTreg) に大別される. nTreg は胸腺髄質において, 上皮由来の thymic stromal lymphopoietin (TSLP) によって活性化された CD11c⁺ DC により分化誘導され, 末梢血中に動員される⁵⁾. 一方, 末梢組織においても特定の条件のもとでは, Naïve CD4⁺ T 細胞より iTreg が誘導される⁶⁻⁸⁾. この nTreg と iTreg は表現型も機能も類似しており判別は困難であり, 腫瘍組織中の Foxp3⁺ Treg の起源は明らかとされていない. しかし, 卵巣癌では腫瘍細胞や腫瘍内に存在するマクロファージなどが CCR4 のリガンドである CCL22 を発現しており, CCR4 陽性の Foxp3⁺ Treg が腫瘍周辺へ動員されていると報告されている¹⁾. H-RS 細胞においても高頻度に TARC を発現しており,

図 5 CD25⁺ KM-H2/T における細胞傷害能.

A, B) 8 日間共培養後の KM-H2/T を CD25 陽性群と陰性群に単離し、不活化していない KM-H2 と 5 日間再培養.

A) 再培養後の生存 KM-H2 数.

B) 再培養後の KM-H2 における Annexin V 染色.

C) CD25⁻FcγR3⁻, CD25⁺FcγR3⁻, CD25⁺FcγR3⁺ KM-H2/T における細胞傷害性顆粒の発現の有無.

D) (左) CD25 陽性または陰性 KM-H2/T を不活化していない KM-H2 もしくは Hela と 5 : 1 の割合で共培養した際の細胞傷害活性.

(右) CD25⁺ KM-H2/T と不活化していない KM-H2 をそれぞれの割合で再培養後した際の細胞傷害活性.

胸腺由来 FcγR3⁺ Treg が HD 病変への動員が示唆されている¹¹⁾. このように、これまで腫瘍に浸潤した FcγR3⁺ Treg は宿主の胸腺由来であるとの考え方が主流を占めてきた. 一方で、マウスでは腫瘍局所に存在する TGF-β により CD4⁺CD25⁻ 細胞から FcγR3⁺ Treg へ転換されることも報告されている^{7,8)}. 今回我々は初めて、ヒト腫瘍細胞株 KM-H2 が *in vitro* で Naïve CD4⁺ T 細胞を直接 FcγR3⁺ T 細胞へと転換することを証明した. さらに KM-H2 のみならず、他の H-RS 細胞株や、B 細胞系やミエロイド系の細胞株でも誘導可能であった. これらの細胞株は CD28 のリガンドである CD86 分子を共通して発現していたが、CD86 分子を発現

していない細胞株では誘導されなかった. また KM-H2 の培養上清の添加では誘導されず、腫瘍細胞と T 細胞との direct contact が必須であると考えられた. これらの所見は、抗原提示能を持つ腫瘍細胞株は FcγR3⁺ T 細胞の誘導が可能であることを示している. 従って *in vivo* でも抗原提示能を有する悪性腫瘍細胞は末梢流血中の Naïve CD4⁺ T 細胞を前駆細胞として腫瘍局所で FcγR3⁺ T 細胞を generate している可能性が示唆された (図 7).

腫瘍に浸潤した Treg が臨床像において果たす役割についても様々な考察がなされてきた. マウスにおいて、抗 CD25 抗体や抗 CTLA-4 抗体などを用いて Treg を除去すると抗腫瘍免疫が増強し腫瘍

図 6 各種腫瘍細胞株との共培養。

それぞれの不活化細胞株と Naïve CD4⁺ T 細胞の 8 日間共培養後の核内 Foxp3 と CD25 の二重染色。HD (KM-H2, L-428, L-540), B 細胞系 (Raji, LCL), ミエロイド系 (HL-60, THP-1), T 細胞系 (Jurkat), 上皮系 (Hela). 対象として, 末梢血中の Treg と CD25⁺CD4⁺ T 細胞。

の退縮がみられる¹²⁾。またヒトにおいて、腫瘍局所に Foxp3⁺ Treg が多く浸潤しているほど予後が不良であると、各種固形腫瘍の臨床研究において報告がなされている^{1, 2)}。これらより、腫瘍組織に浸潤した Treg が宿主の抗腫瘍免疫を障害し、結果として腫瘍細胞の増殖を助長していると考えられてきた。しかし最近になり、HD やある種の B 細胞性腫瘍などの造血器悪性腫瘍では、むしろ腫瘍局所での Foxp3⁺ Treg が多いほど予後良好であるとの報告がなされ、両者での相反する結論が議論的となっている^{13, 14)}。今回、抗原提示能を有する腫瘍は腫瘍局所で iTreg と同時に、IFN- γ を産生し、Granzyme や TIA-1 を有し、親細胞である腫瘍

細胞自身に killing 活性を有する CD4⁺ CTL を産生誘導することを明らかにした。CD4⁺ CTL は CMV や EBV などの慢性ウイルス感染患者血中にも増加していることが報告されており、この CD4⁺ CTL は感染細胞自身の増殖を抑制することによって latent infection の維持に寄与と考えられている^{15, 16)}。さらに、いずれの腫瘍細胞株で Foxp3⁺ 細胞を誘導した場合にも必ず CD4⁺ CTL が同時に誘導されていることから、両者が協調的に分化・誘導・機能していると考えられた。以上より CD4⁺ CTL による腫瘍細胞増殖の抑制が過度になりすぎないように、Foxp3⁺ T 細胞が feedback をかけているものと推測された。このように Foxp3⁺ T 細胞と

図 7 腫瘍組織における Treg の誘導.

同時に産生されてくる $CD4^+$ CTL が存在することにより予後を改善している可能性が示唆された。しかし腫瘍局所における nTreg と iTreg/ $CD4^+$ CTL 誘導の相違が臨床的予後と関係するか否かは、今後さらなる検討が必要である。

結 語

現今、様々な腫瘍において Treg depleting therapy の前臨床的研究が盛んに行われているが、本研究の結果により、抗原提示能を持つ造血器悪性腫瘍には固形腫瘍とは異なった治療戦略を創案する検討の余地があると考えられた。

本論文は、学位論文 (Tanijiri T, et al., Hodgkin's reed-sternberg cell line (KM-H2) promotes a bidirectional differentiation of $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T cells and $CD4^+$ cytotoxic T lymphocytes from $CD4^+$ naive T cells. J Leukoc Biol. 82: 576-584, 2007) を基に、第 8 回関西医科大学医学学会賞 (2009 年 3 月 6 日) に応募口演し、医学学会優秀賞を受賞した際の発

表要旨でもある。

文 献

- 1) Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., et al.: Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat Med, 10: 942-949, 2004.
- 2) Petersen, R. P., Campa, M. J., Sperlazza, J., et al.: Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. Cancer, 107: 2866-2872, 2006.
- 3) Marshall, N. A., Christie, L. E., Munro, L. R., et al.: Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. Blood, 103: 1755-1762, 2004.
- 4) Alvaro, T., Lejeune, M., Salvado, M. T., et al.: Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. Clin Cancer Res, 11: 1467-1473, 2005.
- 5) Watanabe, N., Wang, Y. H., Lee, H. K., et al.: Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells in human thymus. Nature, 436: 1181-1185, 2005.

- 6) Moseman, E. A., Liang, X., Dawson, A. J., et al.: Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 173: 4433–4442, 2004.
- 7) Ghiringhelli, F., Puig, P. E., Roux, S., et al.: Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med*, 202: 919–929, 2005.
- 8) Liu, V. C., Wong, L. Y., Jang, T., et al.: Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol*, 178: 2883–2892, 2007.
- 9) Kamesaki, H., Fukuhara, S., Tatsumi, E., et al.: Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease. *Blood*, 68: 285–292, 1986.
- 10) Uehira, K., Amakawa, R., Ito, T., et al.: A Hodgkin's disease cell line, KM-H2, shows biphenotypic features of dendritic cells and B cells. *Int J Hematol*, 73: 236–244, 2001.
- 11) Ishida, T., Ishii, T., Inagaki, A., et al.: Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. *Cancer Res*, 66: 5716–5722, 2006.
- 12) Zou, W.: Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 6: 295–307, 2006.
- 13) Yang, Z. Z., Novak, A. J., Stenson, M. J., et al.: Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 107: 3639–3646, 2006.
- 14) Tzankov, A., Meier, C., Hirschmann, P., et al.: Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, 93: 193–200, 2008.
- 15) van Leeuwen, E. M., Remmerswaal, E. B., Vossen, M. T., et al.: Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *J Immunol*, 173: 1834–1841, 2004.
- 16) Khanna, R., Burrows, S. R., Thomson, S. A., et al.: Class I processing-defective Burkitt's lymphoma cells are recognized efficiently by CD4+ EBV-specific CTLs. *J Immunol*, 158: 3619–3625, 1997.