

研究種目：基盤研究 (C) (一般)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590879

研究課題名 (和文)

Th17 細胞が非小細胞肺癌細胞の腫瘍血管新生能を増強する詳細な機序の解明

研究課題名 (英文)

Analyze of the detailed mechanism of the augmentation of angiogenic potential of non-small cell lung cancer by Th17 cells

研究代表者 沼崎宗夫 (NUMASAKI MUNEO)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：50344677

研究成果の概要：健常成人のボランティアより採取した末梢血より比重遠心分離法により単核球を分離し、さらに CD4 T 細胞分離カラムを用いて CD4 T 細胞を分離し、Anti-human CD3 mAb を coating した plate で IL-23 存在下に培養し、IL-17 の産生を特徴とするヒト Th17 細胞を誘導した。Th17 細胞を非小細胞肺癌細胞や肺線維芽細胞とトランスウエルを用いて 48 時間共培養し、培養液中の多種類の血管新生因子の濃度を ELISA kit を使用して測定した。Th17 細胞を非小細胞肺癌細胞や肺線維芽細胞とトランスウエルを用いて共培養すると、肺癌細胞や線維芽細胞からの血管新生因子 IL-8、ENA-78、GRO-alpha などの産生が著明に増加した。この現象は、樹状細胞などより分泌される IL-12 で誘導される Th1 細胞と、非小細胞肺癌細胞や肺線維芽細胞を共培養すると、培養液中の血管新生抑制因子 IP-10 や MIG の濃度が、Th1 細胞や肺癌細胞を単独で培養した際の培養液中の濃度に比較して著明に上昇することと極めて対照的であった。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|------|-----------|
| 平成19年度 | 2,600,000 | 0 | 2,600,000 |
| 平成20年度 | 1,000,000 | 0 | 1,000,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 0 | 3,600,000 |

研究分野 医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 ・呼吸器内科学

キーワード：肺癌、血管新生、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

CD4 T helper cell は分泌するサイトカイン、発現するレセプター及び機能の面より Th1、Th2 及び Th17 細胞の 3 つの異なる亜集団に分かれる。Th1 細胞は IFN-gamma を産生し、それによってマクロファージ、NK 細胞及び CD8 T cell を活性化する。Th2 細胞は、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 及び IL-25 を産生し、

IgG1 や IgE 産生を補助して、液性免疫やアレルギー反応に関与する。Th17 細胞は IL-17 を産生する細胞として近年新規に同定され、IL-17A、IL-17F、IL-21 及び IL-22 を産生する。

ナイーブ CD4 T cell は、マクロファージや樹状細胞から産生される IL-12 の働きで Th1 細胞に分化誘導される。IL-12 は p40

と p35 という 2 つのサブユニットから構成されており、NK 細胞を活性化する因子として同定された。Th1 細胞は IL-12 レセプターのサブユニットである $\beta 2$ 鎖を発現している。この $\beta 2$ 鎖は Th1 細胞特異的で、IFN- γ によって発現が誘導され、逆に IL-4 によって発現が抑制される。 $\beta 2$ 鎖により STAT4 及び STAT1 が活性化され、引き続き T-bet 発現を誘導する。この転写因子 T-bet が Th1 細胞特異的な遺伝子の発現を引き起こす。Th2 細胞は、IL-4 が STAT6 の活性化を介して GATA-3 の発現を誘導し、引き続きこの転写因子 GATA-3 が Th2 細胞特異的な遺伝子の発現を誘導する。

IL-23 は、IL-12 の共通のサブユニットである p40 と p35 と同一性を有する p19 サブユニットで構成されている。メモリー CD4 T cell を IL-23 で刺激すると IL-17 産生が誘導されることや、IL-23 の p19 サブユニットを欠損させたり p19 に対する特異抗体で阻害したりすると、Th17 細胞が減少することから、IL-23 が Th17 細胞の分化誘導に重要な役割を果たしていると考えられていた。しかしナイーブ CD4 T cell を TCR 刺激存在下に IL-23 で刺激しても Th17 細胞には分化できない。これはナイーブ CD4 T cell には IL-23 レセプターが発現していないからであり、このことから IL-23 はメモリー CD4 T cell からの Th17 細胞への分化には関与しているが、ナイーブ CD4 T cell からの Th17 細胞への分化には関与しないことがわかる。ナイーブ CD4 T cell から Th17 細胞への分化には TGF- β 、IL-6、IL-1 及び IL-21 が重要で、IL-23 は Th17 細胞の生存に重要であると報告されている。TGF- β と IL-6 はナイーブ CD4 T cell に作用して、ROR γ t と呼ばれる転写因子の発現を誘導する。ROR γ t は核内オーファンレセプターで、IL-23 レセプターの発現を誘導する。ROR γ t の発現には STAT3 の活性化が重要で、STAT3 の活性化には IL-6 と IL-21 が重要である。逆に STAT5 は IL-2 を介して活性化され、これによって ROR γ t の発現は抑制される。

Th17 cell より産生される IL-17 はマウスの T 細胞ハイブリドーマからクローニングされ、CTLA-8 と名付けられた。IL-17 はホモダイマーの糖蛋白質であり、同一性を持つ 5 つのファミリー分子 IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E 及び IL-17F と共に IL-17 サイトカインファミリーを形成している。IL-25 (IL-17E) は Th2 細胞に関連があり、他の IL-17 ファミリーは CD8 T cell、NK 細胞及び顆粒球から生産される。IL-17 は繊維芽細胞、上皮細胞や血管内皮細胞などに作用して、炎症性サイトカインやケモカイン、細胞接着因子などを誘導して炎症を誘導するこ

とが知られている。IL-17R は種々の細胞で発現している。リガンドと同様にレセプターも IL-17RA、IL-17RB、IL-17RC、IL-17RD 及び IL-17RE のサイトカインレセプターファミリーを形成している。

我々のこれまでの研究により IL-17 が新規血管新生因子であり、血管内皮細胞の遊走及び管腔形成を促進すること、レトロウイルスベクターによりマウス IL-17 cDNA を遺伝子導入した癌細胞は、親株の癌細胞や Neo 耐性遺伝子を遺伝子導入した癌細胞に比較して、同系マウスでの *in vivo* の増殖が著明に促進すること、IL-17 を遺伝子導入した癌細胞は腫瘍血管新生能が増強し、癌組織の血管密度が著明に増加することなどが明らかになった (Numasaki et al., Blood 2003)。さらに、IL-17 は非小細胞肺癌細胞の主要な血管新生因子 IL-8、ENA-78 及び GRO- α の産生を促進することにより、非小細胞肺癌細胞の腫瘍血管新生能を著明に増強すること、ヒト IL-17 cDNA を遺伝子導入した非小細胞肺癌細胞は、SCID マウスでの *in vivo* の増殖が増強すること、RT-PCR 法による検討で約 60 % の手術摘出非小細胞肺癌組織で IL-17 mRNA の発現が認められ、肺癌組織での IL-17 mRNA の発現量と血管密度には正の相関があること、免疫組織染色法での検討の結果、肺癌組織で IL-17 を産生している細胞は、癌組織に浸潤している T 細胞及び多核白血球であることを報告した (Numasaki et al., J. Immunol. 2005)。また、IL-17 が肺繊維芽細胞からの VEGF や HGF など多種類の血管新生因子の産生を増強すること (Numasaki et al., Immunol. Lett. 2004)、IL-17 が bFGF、HGF 及び VEGF の誘導する血管内皮細胞の増殖を増強することを明らかにした (Takahashi et al., Immunol. Lett. 2005)。一方、癌細胞の産生する乳酸が Th17 細胞に作用し、IL-17 の産生を増強することが報告され (J. Immunol. 2007)、さらに卵巣癌と末梢血 naïve CD4 T 細胞の共培養系にて、高い確立で IL-17 を産生する Th17 細胞が誘導され、卵巣癌組織に Th17 細胞が密に浸潤していることが報告された (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2008)。

2. 研究の目的

我々は健常人末梢血 CD4 T 細胞より Th17 細胞が誘導できるか、及び Th17 細胞と非小細胞肺癌細胞をトランスウエルで共培養し、共培養液中の VEGF などの多種類の血管新生因子の濃度が上昇するか検討した。

3. 研究の方法

3-1. 単核球分離

リンホセパールを遠心チューブに 2 ml 分注。200 ml の血液に等量の PBS を加え、分離液

の入ったチューブに混合液を重層するように静置。1800 rpm、室温で 20 分間遠心し、上清を取り除いた。スポイトを使って中間層（単核球層）を回収した。回収した液量の約 2 倍量の PBS を加えてピペティングした。1500 rpm、4 °C で 5 分間遠心し上清を除去。この作業を 3 回行った。細胞のペレットを PBS で懸濁し、1 本のチューブにまとめた。1500 rpm、4 °C で 5 分間遠心後 PBS で再懸濁した。血球計算板を用いて単核球濃度を測定した。

3 - 2. CD4 T cell を磁気分離

単核球懸濁液を 300 g、4 °C で 10 分間遠心し、上清を完全にに取り除いた。1x10⁷ 個の細胞あたり 40 µl の Buffer を加え再懸濁した。1x10⁷ 個の細胞あたり 10 µl の Biotin-Antibody Cocktail 加えた。4 °C、10 分間インキュベートした。1x10⁷ 個の細胞あたり 30 µl の Buffer を加え、さらに 1x10⁷ 個の細胞あたり 20 µl の Anti-Biotin MicroBeads を加え、4 °C で 15 分間インキュベートした。20 倍量の Buffer を加え 300 g、4 °C で 10 分間遠心し、上清を完全にに取り除いた。1x10⁸ 個の細胞あたり 500 µl の Buffer で再懸濁した。MACS 分離器に MS カラムとコレクティングチューブをセットした。500 µl の Buffer でカラムをすすいだ。カラムに懸濁液をアプライした。500 µl の Buffer でカラムを 3 回洗浄。コレクティングチューブ内の細胞液を 15 ml チューブに移した。1 ml の Buffer でコレクティングチューブを洗い、細胞液を 15 ml チューブに移した。300 g、4 °C で 5 分間遠心後に上清を取り除き、RPMI メジウムで再懸濁した。血球計算板を用いて CD4 T cell をカウントした。

3 - 3. CD4 T cell から Th1 細胞および Th17 細胞への誘導

6 well プレート (SUMILON) の使用する各 well に 1 ml の PBS を加えた。anti-human CD3 mAb を 8 µg、anti-human CD28 mAb を 4 µg 加えた。室温で 1 時間静置した (30 分経ったら 1 度ゆらして抗体を均一化した)。PBS を取り除き、3 ml の MEDIUM で well を洗い取り除いた。各 well に 4x10⁶ 個 / 5 ml の CD4 T cell を播いた。Th17 細胞に誘導する細胞に rhIL-23 を、Th1 細胞に誘導する細胞に rhIL-12 を各 50 ng ずつ添加した。7 日間継代し、それ以降の継代はきっちり 48 時間後に行い、その際上清と細胞を回収した。計 14 日間継代培養した。

3 - 4. ELISA 法による上清 (サンプル) に含まれる IL-17 の測定

各 well に Assay Diluent RD1-36 を 100 µl 加えた。分化誘導の際回収した、サンプルを各 well に 100 µl 加えた。この作業は 15 分以内に行い、その後、シールでカバーをして、室温で 3 時間インキュベートした。各 well を Wash Buffer (400 µl) で洗った。この作業を計 3 回行った。その後、キムタオルの上でプレートを叩き、液を完全にに取り除いた。各 well に IL-17 Conjugate を 200 µl 加えた。シールでカバーをして、室温で 1 時間インキュベートした。先に示した作業と同じ方法で各 well を洗い液を完全にに取り除いた。各 well に Substrate Solution を 200 µl 加えた。遮光して、室温で 30 分間インキュベートした。各 well に Stop Solution を 50 µl 加えた。この時、溶液の色が青から黄に変わった。変わらなかった well があった場合、タッピングを行い溶液を混合した。リファレンスを 590 nm として、450 nm の吸光度を測定した。

3 - 5. ELISA 法による上清 (サンプル) に含まれる IFN-gamma の測定

各 well に Assay Diluent RD1-51 を 100 µl 加えた。各 well にスタンダード、サンプルを 100 µl 加えた。この作業は 15 分以内に行い、その後、シールでカバーをして、室温で 2 時間インキュベートした。各 well を Wash Buffer (400 µl) で洗った。この作業を計 4 回行った。その後、キムタオルの上でプレートを叩き、液を完全にに取り除いた。各 well に IFN-gamma Conjugate を 200 µl 加えた。シールでカバーをして、室温で 2 時間インキュベートした。先に示した作業と同じ方法で各 well を洗い液を完全にに取り除いた。各 well に Substrate Solution を 200 µl 加えた。遮光して、室温で 30 分間インキュベートした。各 well に Stop Solution を 50 µl 加えた。この時、溶液の色が青から黄に変わった。変わらなかった well があった場合、タッピングを行い溶液を混合した。リファレンスを 590nm として、450 nm の吸光度を測定した。

3-6. Th17 細胞-非小細胞肺癌細胞共培養系における培養上清中の血管新生因子の濃度の測定

分離した CD4 T 細胞を IL-23 存在下に anti-CD3 mAb を coating した plate で培養し、ヒト Th17 細胞を誘導する。Th17 細胞を線維芽細胞とトランスウエルを用いて共培養し、培養液中の多種類の血管新生因子の濃度を測定する。

4. 研究成果

4 - 1. CD4 T cell 分化誘導

CD4 T cell を anti-human CD3 抗体および

anti-human CD28 抗体で刺激し、IL-12 もしくは IL-23 の添加により、それぞれ Th1 もしくは Th17 細胞に誘導し培養した結果を以下のグラフによって示した (図 1、2)。

図 1. IL-12

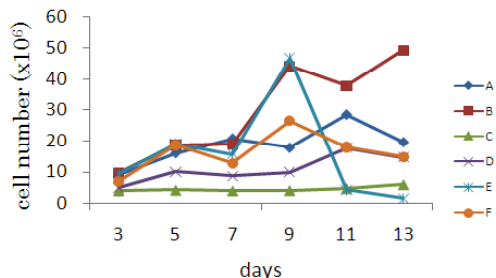
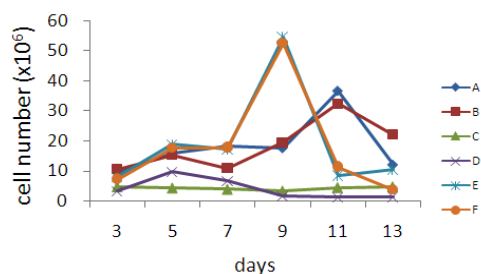


図 2. IL-23



いずれの結果においても安定した増殖結果は得られなかった。播いた数より細胞数が減少したサンプルでは計算板を用いてカウントした時に死細胞が目立っていた。ほとんどのサンプルで培養の最後の時期に、死細胞が目立っていた。また、継代前に細胞サンプルを観察した際、本来増殖されていれば、クラスターが形成されるはずだが、そのクラスターがあまり形成されていないサンプルがあった。

4-2. ELISA 法による測定の結果
 分化誘導が適切に行われていれば、Th17 細胞が増加すれば IL-17 量が、Th1 細胞が増加すれば IFN-gamma 量がそれぞれ増加する。また、日が経過するにつれ全細胞に対する、サイトカイン産生細胞の割合が増加するため、サイトカイン量は増加する。ELISA 法によってそれぞれの上清に分泌された IFN-gamma 及び IL-17 の 1 well あたりの量を調べた (図 3、4)。

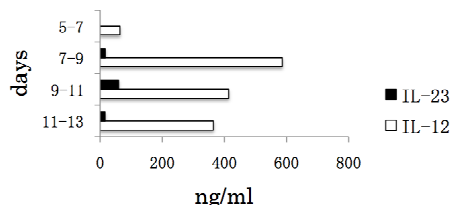
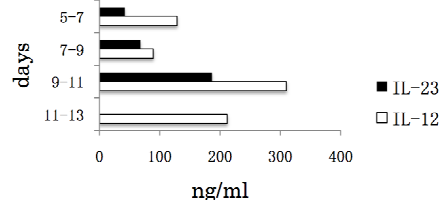
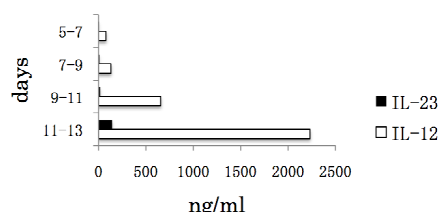
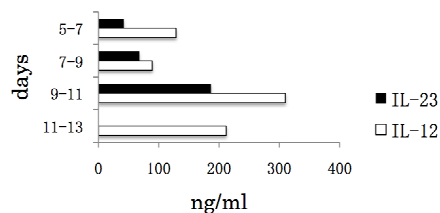
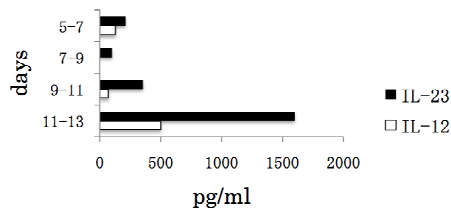


図 3. IFN-gamma の産生量

IFN-gamma の濃度は IL-12 に比べて IL-23の方がほとんどの結果において濃度が低かった。次に時間経過によるサイトカインの産生量の変化をみてみた。日を経るごとに産生量は多くなるはずだが、時間経過によって減少がみられるデータもあるため本来考えられる結果とは異なるものになった。



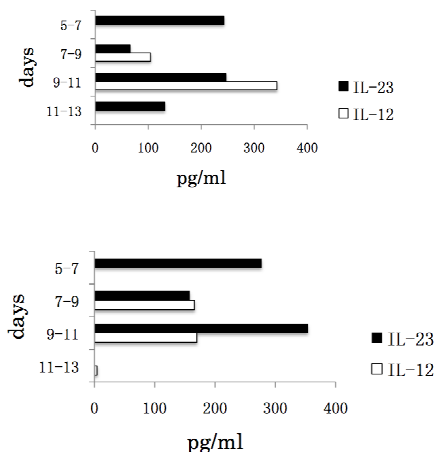


図 4. IL-17 の産生量

IL-12 に比べて IL-23 のほうが産生量は多かった。しかし IL-12 の方が数値が高いデータもあった。次に時間経過によるサイトカインの産生量の変化をみてみた。IFN-gamma と同様にこちらも日を経るごとに産生量が増加するはずだが、時間経過によって減少がみられるデータもあった。

4-3. Th17 細胞と非小細胞肺癌細胞の共培養液中の血管新生因子の量

Th17 細胞と非小細胞肺癌細胞をトランスウエルで共培養すると、培養液中の腫瘍血管新生因子の濃度が、Th17 細胞と肺癌細胞を単独で培養した際の培養液中の濃度に比較して 10 倍程度高くなることが判明した。さらに Th17 細胞と癌細胞の共培養系で、癌細胞から血管新生因子の産生が著明に増加する現象の一部は、Th17 細胞が産生する IL-1、IL-17 や IL-26 が癌細胞に作用することにより生じることが判明した。しかし、これらのサイトカインを同時に阻害しても癌細胞からの血管新生因子産生の増加を約 50% 程度しか抑制できないことが判明した。

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 3 件)

Numasaki M. et al. Congenital tracheal stenosis and an anomalous origin of the right upper lobe bronchus. *Lancet*, 371, 1526, 2008.

Inoue D. et al. Submucosal gland cells in

human lower airways produce MUC5AC protein. *Respirology*, 13, 285-287, 2008.

Inoue D. et al. Erythromycin attenuates MUC5AC synthesis and secretion in cultured human tracheal cells infected with RV14.. *Respirology*, 13, 215-220, 2008.

[学会発表] (計 1 件)

第 6 8 回 日本癌学会学術総会 横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

沼崎宗夫 (NUMASAKI MUNEO)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：50344677

(2)研究分担者

鈴木 貴 (SUZUKI TAKASHI)

東北大学・医学部・教授

研究者番号：10261629

相場節也 (AIBA SETSUYA)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80159269

(3)連携研究者