

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 7日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究（C）一般

研究期間：2010～2012

課題番号：22590869

研究課題名（和文） Th17 細胞の関与する非小細胞肺癌一問質相互作用による腫瘍血管新生

研究課題名（英文） INVOLVMENT OF TH17 CELLS IN TUMOR ANGIOGENESIS INDUCED BY INTERACION BETWEEN NON-SMALL CELL LUNG CANCER CELLS AND INTERSTITIAL STROMAL 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（和文）：CD4 T 細胞を IL-23 または IL-12 存在下に培養し、Th17 細胞および Th1 細胞を誘導した。IL-17 または IFN-gamma 産生細胞分離キットで Th17 細胞及び Th1 細胞を単離し、培養上清を採取した。Th17 細胞の培養上清は血管新生活性を有し、一部 IL-17A 抗体で阻害された。さらに、Th17 細胞の培養上清は、HMVEC の遊走を促進した。また、Th17 細胞、肺癌細胞及び線維芽細胞を共培養すると、培養液中の血管新生因子の濃度が有意に増加した。

研究成果の概要（英文）：Th17 cells were isolated and culture supernatants were collected. Culture supernatants of Th17 cells were found to have the activity to induce neovascular formation, and this activity was inhibited, in part, by an anti-IL-17 antibody.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 2,200,000 | 660,000   | 2,860,000 |
| 2011年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 2012年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

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：サイトカイン、肺癌、Th17 細胞、血管新生、血管新生因子

### 1. 研究開始当初の背景

我々のこれまでの研究により、CD4 T 細胞より産生される 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 IL-17 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となった (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- $\alpha$  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増強すること、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肺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)。IL-17 を産生する CD4 T 細胞は、T helper type 1 (Th1) や Th2 細胞とは全く異なる新規の T ヘルパー subset Th17 細胞であることが報告された (Nat. Immunol. 2005)。Th17 細胞と癌との関係に関しては、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 (J. Immunol. 2007)、さらに卵巣癌と末梢血 naive 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)。我々は健康人末梢血 CD4 T 細胞より Th17 細胞を誘導し、Th17 細胞と非小細胞肺癌細胞や肺繊維芽細胞をトランスウェルで共培養し、養液中の VEGF などの多種類の血管新生因子の濃度を測定し、共培養液中の血管新生因子の濃度が Th17 細胞、肺癌細胞や肺繊維芽細胞を単独で培養した際の培養液中の濃度に比較して 3~7 倍程度高くなることを見出した。我々は、これまでの研究成果及び他の研究グループの研究報告を基に、Th17 細胞は IL-17 などの液性因子を産生することで血管新生を促進する細胞であり、リンパ球は IFN-gamma を産生することで血管新生を阻害する Th1 細胞と血管新生を促進する Th17 細胞のバランスにより生体内の血管新生をレギュレーションしているのではないかと推測していた。

## 2. 研究の目的

腫瘍関連マクロファージなどとは異なり、むしろ癌の増殖を抑制する役割を担うと考えられてきたリンパ球の一種である Th17 細胞が、血管新生を促進する生物活性を有する細胞であり、癌-間質相互作用により腫瘍血管新生を増強し、非小細胞癌の増殖を促進するという新しい知見を明らかにする。

## 3. 研究の方法

Th17 細胞が血管新生を促進する細胞であることを証明するために、まず Th17 細胞を誘導・増殖させ、ヒト IL-17A 産生細胞分離キットで単離する。単離した Th17 細胞の培養上清に、新生血管を誘導する活性があるかを angiogenesis kit を用いて検討する。さらに、SCID マウスの系で Th17 を用いた matrigel assay 及び mouse dorsal air sac assay を行い、一部の実験では阻害抗体を用

いて Th17 細胞の血管新生活性を介在する因子を同定する。次に、CEA に反応する Th17 細胞を人工的に作製、さらに MHC class II を発現している非小細胞肺癌を作製し、この細胞を用いて非小細胞肺癌細胞に特異的に反応する Th17 細胞を樹立し、これらの細胞を用いることにより生体内で Th17 細胞が癌-間質相互作用により癌組織の血管新生を促進し、非小細胞肺癌の増殖を助長する細胞であることを、SCID マウスに非小細胞肺癌を移植した in vivo の系で検討する。

## 4. 研究成果

健康なボランティアの末梢血から比重遠心分離法で分離した単核球より、human CD4 T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) を使用して CD4 T 細胞を単離した。Anti-human CD3 monoclonal antibody (mAb) と anti-human CD28 mAb を coating した culture plate で、単離した CD4 T 細胞を IL-23 存在下に 7~14 日間培養し、IL-17A 産生を特徴とする Th17 細胞を誘導・増殖させた。同様に、anti-human CD3 mAb と anti-human CD28 mAb を coating した culture plate で、分離した CD4 T 細胞を IL-12 存在下に 7~14 日間培養し、IFN-gamma 産生を特徴とする Th1 細胞を誘導・増殖させた。増殖した細胞中の Th17 細胞及び Th1 細胞の比率を、各々の細胞の IL-17A と IFN-gamma の細胞内発現を flow cytometry で検討し確認した。誘導・増殖させた細胞中の Th17 細胞及び Th1 細胞をヒト IL-17A 産生細胞分離キット及びヒト IFN-gamma 産生細胞分離キットで単離することに成功した。分離した Th17 細胞をさらに IL-23 存在下に anti-human CD3 mAb と anti-human CD28 mAb で刺激し、培養上清を採取した。同様に、分離した Th1 細胞をさらに IL-12 存在下に anti-human CD3 mAb と anti-human CD28 mAb で刺激し、培養上清を採取した。Th17 細胞の培養上清が血管新生活性を有するか、angiogenesis kit を用いて検討した。その結果、Th17 細胞の培養上清が血管を新生する活性を有することが判明した。Th17 細胞の培養上清が有する血管を新生する活性は、抗 IL-17A 阻害抗体により減弱することが判明した。さらに、Th17 細胞の培養上清が human dermal microvascular endothelial cell (HMVEC) の遊走を刺激するか検討した結果、Th17 細胞の培養上清は、HMVEC の遊走を促進することが判明した。また、Th17 細胞、肺癌細胞及び線維芽細胞を共培養すると、コントロールの培養系と比較して培養液中の血管新生因子濃度が有意に増加することを見出した。Th17 細胞を担癌 SCID マウスの尾静脈より数回投与した場合は、コントロールの細胞を投与

した癌組織の増殖と比較して増殖速度に変化は認められなかった。

#### 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6件)

A distinct regulatory role of Th17 cytokines IL-17A and IL-17F in chemokine secretion from lung microvascular endothelial cells, Fujie H, Niu K, Ohba M, Tomioka Y, Kitazawa H, Nagashima K, Ohru T, Numasaki M, *Inflammation*, 35, 1119-1131, 2012, (査読あり)  
doi: 10.1007/s10753-011-9419-0.

2. Adenoviruses-mediated transduction of human oesophageal carcinoma cells with the interferon- $\lambda$  genes produced anti-tumour effects, Li Q, Kawamura K, Okamoto S, Fujie H, Numasaki M, Namba M, Nagata M, Shimada H, Kobayashi H, Tagawa M, *Brit. J. Cancer*, 105, 1302-1132, 2011, (査読あり)  
doi: 10.1038/bjc.2011.379.

3. Antitumor activity of type III interferon alone or in combination with type I interferon against human non-small cell lung cancer, Fujie H, Tanaka T, Tagawa M, Kaijun N, Watanabe M, Suzuki T, Nakayama K, Numasaki M, *Cancer Sci.*, 102, 1977-1990, 2011, (査読あり)  
doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02079.x.

4. Toll-like receptor-2-activating bifidobacteria strains differentially regulate inflammatory cytokines in the porcine intestinal epithelial cell culture system: finding new anti-inflammatory immunobiotic, Fujie H, Villena J, Tohno M, Morie K, Shimazu T, Aso H, Suda Y, Shimosato T, Iwabuchi N, Xiao JZ, Yaeshima T, Iwatsuki K, Saito T, Numasaki M, Kitazawa H, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 63, 129-139, 2011, (査読あり)  
doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00837.x.

5. Molecular cloning, tissue expression, and subcellular localization of porcine peptidoglycan recognition proteins 3 and 4. Ueda W, Tohno M, Shimazu T, Fujie H, Aso H, Kawai Y, Numasaki M, Saito T, Kitazawa H, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 143, 148-154, 2011, (査読あり)  
doi: 10.1016/j.vetimm.2011.05.026.

6. Interferon-lambda induces G1 phase arrest or apoptosis in oesophageal carcinoma cells and produces anti-tumour effects in combination with anti-cancer agents. Li Q, Kawamura K, Ma G, Iwata F, Numasaki M, Suzuki N, Shimada H, Tagawa M, *Eur. J. Cancer*, 46, 180-190, 2010, (査読あり)  
doi: 10.1016/j.ejca.2009.10.002.

[学会発表] (計9件)

1. Fujie H, Villena J, Tohno M, Morie K, Shimazu T, Aso H, Suda Y, Shimosato T, Iwabuchi N, Xiao JZ, Yaeshima T, Iwatsuki K, Numasaki M, Kawai Y, Saito T, Kitazawa H, Toll-like receptor-2 activating bifidobacteria strains regulate inflammatory responses in porcine intestinal epithelial cells. 4th FEMS Congress of European Microbiologists, 2011年6月、スイス

2. 沼崎宗夫, 招待講演、Th17 サイトカインと肺癌、シンポジウム 炎症と肺癌－発症、進展における共通のメカニズムを探る－、第51回日本呼吸器学会学術講演会、2011年4月、東京

3. 野口 愛、沼崎宗夫、IL-17 cytokine family IL-17A、IL-17A/F 及び IL-17F による気道上皮細胞のケモカイン産生の制御、第51回日本呼吸器学会学術講演会、2011年4月、東京

4. 成井ももこ、沼崎宗夫、IL-17 は、血管内皮細胞上のフラクタルカインが誘導するNK cell の活性化により腫瘍の肺転移を抑制する、第51回日本呼吸器学会学術講演会、2011年4月、東京

5. 藤江瞳、田川雅敏、沼崎宗夫、IL-17 は血管内皮細胞のフラクタルカインの発現を増強することにより腫瘍の肺転移を抑制する、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月、大阪

6. 田川雅敏、川村希代子、岡本慎也、楊珊、深町利彦、小林弘、藤江瞳、沼崎宗夫、島田英昭、インターフェロンラムダ発現型アデノウイルスによる食道がんに対する抗腫瘍効果、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月、大阪

7. Matoshi Tagawa, Quanhai Li, Kiyoko Kawamura, Shinya Okamoto, Shan Yang、

Hiroshi Kobayashi, Muneo Numasaki, Yuji Tada, Kenzo Hiroshima, and Hideaki Shimada. Adenoviruses-mediated expression and cell-mediated delivery of interferon-lambda produced anti-tumor effects to human esophageal carcinoma *in vivo*. ASGCT 2010 Clinical Trials Training Course and 13th Annual Meeting, 2010年5月、アメリカ

8. Msatoshi Tagawa, Quanhai Li, Kiyoko Kawamura, Shinya Okamoto, Shan Yang, Hitomi Fujie, Muneo Numasaki, Hideaki Shimada, and Hiroshi Kobayashi, Adenoviruses-mediated expression and cell-mediated delivery of interferon-lambda achieve anti-tumor effects *in vivo*. 第16回日本遺伝子治療学会、2010年4月、栃木

9. Hitomi Fujie, Muneo Numasaki, and Hidenori Takahashi. The additive cytostatic effect of Type I and Type III IFNs against human NSCLC. 第50回日本呼吸器学会学術講演会、2010年4月、京都

[図書] (計1件)

1. Fujie H, Numasaki M, Type III Interferons IL-28 and IL-29: Novel Interferon Family Members with Therapeutic Potential in Cancer Therapy. In *Advancements in Tumor Immunotherapy and Cancer Vaccines*, edited by Arnouk H., InTech, Rijeka, Croatia, 175-196, 2011, (査読なし)

[その他]

ホームページ等

[http://www.josai.ac.jp/~facpharm/pharma4/yk/department\\_of\\_nutritional\\_physiology.html](http://www.josai.ac.jp/~facpharm/pharma4/yk/department_of_nutritional_physiology.html)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 沼崎 宗夫  
(NUMASAKI MUNE0)  
研究者番号: 50344677

(2) 研究分担者 萩原 弘一  
(HAGIWARA KOUITI)  
研究者番号: 00240705

(3) 連携研究者 田川 雅敏  
(TAGAWA MASATOSHI)  
研究者番号: 20171281