

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08416

研究課題名(和文) 神経ペプチドシグナルによる樹状細胞の機能制御とがん・炎症性疾患の発症機序解明

研究課題名(英文) Studies of neuropeptide signaling on functional regulation of dendritic cells and the pathogenesis of cancer and inflammatory diseases

研究代表者

北村 秀光 (Kitamura, Hidemitsu)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：40360531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、神経ペプチド、ニューロキニンAの受容体NK2Rを介した神経ペプチドシグナルによるがんの悪化や炎症性腸疾患の制御メカニズムの解明を行なった結果、樹状細胞を介した過剰な炎症反応や抗原特異的T細胞応答、がん細胞の悪化においてSTAT1シグナルやNK2Rを介した神経ペプチドシグナルが関与することを確認した。さらにウイルス感染が起因となり発症するがん患者の腫瘍組織や炎症性腸疾患患者の病変組織においてNK2Rが過剰発現していることを見出した。従って、神経ペプチドシグナルの制御による、ウイルス感染症、難治性炎症性腸疾患や感染がんの治療に資する科学的エビデンスが得られたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the precise roles of neuropeptide signaling through NK2R, a receptor of neurokinin A, in tumorigenesis of cancer cells and inflammatory bowel disease (IBD) involving with inflammation and immune responses. We found that NK2R expression levels of murine and human dendritic cells were augmented by type-1 IFN stimulations in a STAT-1-dependent manner. Antigen-specific T cell responses were attenuated in the presence of a NK2R antagonist in vitro. Next, we revealed that in vivo administration of a NK2R antagonist reduced tumorigenesis of CT26 cancer cells and disease state of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis model. Furthermore, we confirmed that NK2R was expressed in lesion and inflammation areas of patients with hepatocellular carcinoma, cervical cancer, colorectal cancers, and IBD. Based on these findings we speculate that regulation of neuropeptide signaling may be a promising tool in the development of effective therapy for cancers and IBD.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞 神経ペプチド 神経ペプチド受容体 サイトカイン産生 抗原提示能 抗原特異的T細胞 感染症 がん

1. 研究開始当初の背景

現代社会において、ヒト体内での免疫担当細胞による生体調節機構およびその恒常性が破綻し、花粉症、喘息、アトピーなどアレルギー性疾患のみならず潰瘍性大腸炎、ウイルス感染症、感染がんなどの難治性・慢性炎症性疾患が年々増加していると考えられている。従って、その発症機序解明と病態の改善・治療を目指した基礎・臨床研究の実施は社会的なニーズの一つとなっている。

最近、申請者らはステロイド抵抗性の IFN- γ /Th1 細胞依存性好中球浸潤型の喘息モデルマウスを作出し、神経ペプチドの一つ、ニューロキニン A(NKA)の受容体である NK2R の拮抗阻害薬の投与が IFN- 刺激による気道過敏性の上昇を有意に抑制することを見出した。この発見は、NK2R を介した神経ペプチドシグナルが感染などにより惹起される過剰な免疫応答や慢性炎症反応に密接に関与することを示唆する。

また IFN- / や IFN- などの Type 1 サイトカインおよび LPS や polyI:C など TLR リガンド刺激による STAT1 依存的な Type 1 免疫応答において、マウスおよびヒト樹状細胞における NK2R の発現レベルが著しく上昇すること、さらに NKA/NK2R シグナルカスケードが樹状細胞を介した抗原特異的ヘルパー・キラーT 細胞応答を増強する、神経系と免疫系とのクロストーク機構の存在を明らかにした。

さらに申請者らは、ヒト樹状細胞の神経ペプチドシグナルの下流標的分子について、DNA マイクロアレイ法を用いて検索した結果、特異的に発現増強あるいは低下する幾つかの遺伝子を見出すとともに、ヒト臨床検体を用いた免疫組織染色による最新の予備的検討の結果、HBV、HCV や HPV 等のウイルス感染および炎症の慢性化により発症する肝がん・子宮頸がんの腫瘍組織において、免疫担当細胞の浸潤と NK1R および NK2R の発現を見出し、神経ペプチドシグナルの病態への関与が考えられる。

そこで本研究において、ヒト樹状細胞における NK1R および NK2R を介した神経ペプチドシグナルの活性化と T 細胞を基軸とした免疫賦活メカニズムの解明を行なうとともに、感染がん患者や慢性炎症性疾患患者の臨床検体やマウス生体モデルを使用して、生体内での神経ペプチドシグナルの作用機序と疾患症状との関連を証明することで、過剰な免疫応答が引き起こす難治性の慢性炎症性疾患、ウイルス感染症、感染がんにおける新しい治療ターゲットの創出に繋ぐ新しい知見を提供することが可能になると考えられる。

2. 研究の目的

現代社会において、ウイルス感染症、感染がんや難治性炎症性疾患の発症メカニズム解明と免疫担当細胞の機能制御による、これ

らの疾患治療法開発への応用は重要な課題の一つである。

本研究では、代表的な抗原提示細胞である樹状細胞に着目し、サブスタンス P・ニューロキニン A の神経ペプチド受容体である NK1R および NK2R を介したシグナル伝達経路の活性化による新しい免疫制御メカニズムの解明を目指し、ヒト末梢血リンパ球より誘導した樹状細胞と抗原特異的ヘルパーT 細胞を使用して検証した。

さらに、神経ペプチドシグナルと感染がん、慢性炎症性疾患の発症との関連性について、ヒト臨床検体およびマウス生体モデルを使用して検証することで、その詳細な生体内作用機序を明らかにし、慢性炎症性疾患、感染症、さらには感染がんの改善・治療法開発に繋ぐ科学的エビデンスを得ることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、はじめに同意を得られた健康人ボランティアよりヒト末梢血を採取し、*in vitro* 培養系にて樹状細胞、シラカバ花粉などのアレルゲン、ウイルス抗原やがん抗原に特異的に反応するヘルパーT 細胞を誘導して神経ペプチドシグナルによる機能制御について解析を行なった。

また実際に神経ペプチドシグナルを介した炎症反応・免疫制御機構を明らかにするため、IFN- / 、IFN- 、IL-6 や TNF- などのサイトカインや自然免疫系の受容体のアゴニストである、LPS や polyI:C などを用いてヒト樹状細胞を刺激した時の神経ペプチド受容体、NK1R および NK2R の発現レベルを確認するとともに、樹状細胞の抗原提示に関与する HLA、副刺激分子、ケモカイン、サイトカイン産生能を評価した。さらに、これらの機能制御分子群が、NK1R あるいは NK2R の阻害剤添加で変動するかどうかを確認した。

また、抗原特異的ヘルパーT 細胞と樹状細胞との共培養を実施し、NK2R のアゴニストあるいは阻害剤添加で、抗原特異的に反応する T 細胞の増殖やサイトカイン産生プロファイルが変動するかどうかを検証した。

さらに、新たな創薬のターゲットを創出するために、これまで申請者が既に DNA マイクロアレイで探索したヒト樹状細胞の NK1R・NK2R を介した神経ペプチドシグナルの下流標的分子群について、実際に樹状細胞の抗原提示能を制御し得るかどうかが、候補分子の過剰発現系、siRNA を用いたノックダウンシステム、中和抗体あるいは阻害剤を用いて、樹状細胞の活性化および抗原特異的 T 細胞の応答性を指標に検証した。

有望な候補分子については、これまで申請者が作出したマウス炎症性疾患モデルやがんモデルについて、アゴニストや阻害剤の

投与を開始し、疾患の改善・治療効果を検証するとともに、実際に感染がん患者や難治性の慢性炎症性疾患において、神経ペプチドシグナルによる免疫制御が新しい治療ターゲットと成り得るかどうかについて、ヒト臨床検体を使用して検討した。

本研究にて得られた神経ペプチドシグナルカスケードを標的とした候補ターゲット分子について、詳細な作用機序の解明を行なった。ヒト樹状細胞のNK1RあるいはNK2Rを介した神経ペプチドシグナルの下流標的分子が実際に樹状細胞の抗原提示能を制御し得ることを、レトロ感染システムによる過剰発現系、あるいは中和抗体、siRNA ノックダウンシステムや阻害剤を用い、抗原特異的T細胞の誘導・活性化について、前述の試験管内評価法により検証した。

次いで、ヒト臨床検体を使用し、慢性炎症性疾患およびウイルス感染、感染がんにおける神経ペプチドシグナルの作用機序を検証した。具体的には、慢性炎症性疾患患者および感染がん患者を対象とし、NK1RおよびNK2Rの発現が認められる病変局所、樹状細胞などの免疫担当細胞において、これまで申請者らが探索した神経ペプチドシグナルの下流分子の発現を遺伝子レベルおよび免疫組織化学染色法にて確認した。

前述のヒト臨床検体において、マクロファージ、樹状細胞、CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞の炎症局所への浸潤を精査するとともに、対象患者の臨床的背景、標準治療前後、あるいは正常部位と病変部位による標的分子の発現、および病態との相関関係を検証し、NK1RおよびNK2Rを介した神経ペプチドシグナルによる慢性炎症性疾患、ウイルス感染、および感染がんの発症機序・免疫制御メカニズムを解明した。

さらに、これまでの実験・検証により得られた有望な候補分子について、マウス生体モデルによる疾患改善効果の検証とその詳細な作用機序の解明を行なった。具体的には、マウス気道炎症モデル、大腸炎モデル、あるいはヒト化担がんモデルにおいて、候補のミミック分子あるいはその阻害剤を用いた治療を実施し、疾患の改善効果を検証する。その結果をもとに候補因子が分子標的薬のターゲットとして有効かどうか確認し、難治性の慢性炎症性疾患、ウイルス感染症、さらには感染がんにおいて、神経ペプチドシグナルによる免疫制御が新しい治療ターゲットと成り得ることを検証した

4．研究成果

本研究において、健常人末梢血より単球を回収し、ヒト樹状細胞を誘導した。この単球由来樹状細胞における神経ペプチド受容体

NK1R および NK2R の阻害あるいはノックダウンにより、サイトカイン産生能や抗原提示能が抑制されることを確認し、神経ペプチドシグナルを介した樹状細胞の新規機能制御メカニズムの存在と炎症応答や抗原特異的T細胞免疫の賦活に重要であることを見出した。また肝がんや子宮頸がんの患者の病変組織における神経ペプチド受容体の発現について、免疫組織化学染色により解析し、NK1R および NK2R が、炎症組織、腫瘍組織あるいは浸潤している免疫細胞に発現していることを明らかにした。さらに、ヒト樹状細胞におけるNK2Rを介した神経ペプチドシグナルの下流標的分子群について、候補分子のsiRNAを用いたノックダウン法により検証し、ヒト樹状細胞の機能制御に関することも確認した。

さらに、マウス大腸がん細胞株を野生型マウスに移植する担がんモデルを作出し、神経ペプチド受容体NK2Rに対するアンタゴニストを投与する治療モデル、およびNK2R遺伝子の過剰発現およびノックダウン細胞株を使用し、腫瘍形成に及ぼす神経ペプチドシグナルの影響を検討した結果、NK2Rを介した神経ペプチドシグナル伝達経路とその下流分子によるがんの進展や転移巣の系形成の制御機構の存在を見出した。

従って、神経ペプチドシグナルカスケードの関連分子や下流標的分子薬剤などを用い、その治療効果を確認することで、慢性炎症性疾患のみならず、感染症、感染が起因となって発生するがん。およびその他のがん疾患においても、神経ペプチドシグナルを標的とした新しい治療法開発への応用が期待される。本研究により、最終的にヒト臨床応用が見込まれる、非常に有望な成果・エビデンスが得られたと考えている。

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6件)

Ohno Y, Toyoshima Y, Yurino H, Monma N, Xiang H, Sumida K, Kaneumi S, Terada S, Hashimoto S, Ikeo K, Homma S, Kawamura H, Takahashi N, Taketomi A, Kitamura H. Lack of IL-6 in the tumor microenvironment augments type-1 immunity and increases the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Science*, 査読有、108、2017、1959-1966

DOI : 10.1111/cas.13330.

Kitamura H, Ohno Y, Toyoshima Y, Ohtake J, Homma S, Kawamura H, Takahashi N,

Taketomi A, IL-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy、Cancer Science、査読有、108、2017、1947-1952
DOI : 10.1111/cas.13332.

北村 秀光、血清マイクロ RNA による免疫体質判定法の確立とコンパニオン診断薬への応用、化学工業、査読有、67、2016、27-33
DOI : なし

Ohno Y, Kitamura H, Takahashi N, Ohtake J, Kaneumi S, Sumida K, Homma S, Kawamura H, Minagawa N, Shibasaki S, Taketomi A.、IL-6 down-regulates HLA class II expression and IL-12 production of human dendritic cells to impair activation of antigen-specific CD4(+) T cells.、Cancer Immunology, Immunotherapy、査読有、65、2016、193-204
DOI: 10.1007/s00262-015-1791-4.

Ohtake J, Kaneumi S, Tanino M, Kishikawa T, Terada S, Sumida K, Masuko K, Ohno Y, Kita T, Iwabuchi S, Shinohara T, Tanino Y, Takemura T, Tanaka S, Kobayashi H, Kitamura H.、Neuropeptide signaling through neurokinin-1 and 2 receptors augments antigen presentation by human dendritic cells.、Journal of Allergy and Clinical Immunology、査読有、2015、136、1690-1694
DOI: 10.1016/j.jaci.2015.06.050.

Sumida K, Ohno Y, Ohtake J, Kaneumi S, Kishikawa T, Takahashi N, Taketomi A, Kitamura H.、IL-11 induces differentiation of myeloid-derived suppressor cells through activation of STAT3 signalling pathway.、Scientific Reports、査読有、2015、5、13650

[学会発表](計12件)

木井 修平、北村 秀光、項 慧慧、橋本 真一、池尾 一穂、豊島 雄二郎、岡田 尚樹、大野 陽介、市川 伸樹、吉田 雅、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、炎症性腸疾患における STAT1 の活性化を介したシグナルカスケードの関与、第 118 回 日本外科学会定期学術集会(一般演題) 2018
木井 修平、北村 秀光、豊島 雄二郎、岡田 尚樹、項 慧慧、寺田 聖、大野 陽介、市川 伸樹、吉田 雅、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、炎症性腸疾患

における STAT1 の関与、第 72 回日本大腸肛門病学会学術集会(一般演題) 2017
北村 秀光、項 慧慧、豊島 雄二郎、木井 修平、橋本 真一、池尾 一穂、小林 博也、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、神経ペプチド受容体を介した腫瘍形成メカニズムの解明と新規がん治療法への応用、第 21 回 日本がん免疫学会総会(一般演題) 2017

Huihui Xiang, Yujiro Toyoshima, Satoshi Terada, Shinichi Hashimoto, Kazuho Ikeo, Hiroya Kobayashi, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi, Hidemitsu Kitamura、Neuropeptide signaling through NK2R is related to tumorigenesis in vivo、The 36th Sapporo International Cancer Symposium (国際学会) 2017

木井 修平、北村 秀光、豊島 雄二郎、岡田 尚樹、項 慧慧、寺田 聖、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、炎症性腸疾患における STAT1 の活性化を介したシグナルカスケードの関与、第 117 回 日本外科学会定期学術集会(一般演題) 2017

Huihui Xiang, Yujiro Toyoshima, Satoshi Terada, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi, Hiroya Kobayashi, Hidemitsu Kitamura、Neuropeptide signaling through NK1R and NK2R is related to inflammation and tumorigenesis in vivo、第 45 回 日本免疫学会学術集会(一般演題) 2016

Huihui Xiang, Yujiro Toyoshima, Satoshi Terada, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi, Hiroya Kobayashi, Hidemitsu Kitamura、Neuropeptide signaling through NK1R and NK2R of cancer cells is required for promotion of tumorigenesis in vivo、第 75 回 日本癌学会学術総会(一般演題) 2016

北村 秀光、大竹 淳矢、寺田 聖、項 慧慧、豊島 雄二郎、岡田 尚樹、木井 修平、大野 陽介、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、血清マイクロ RNA による抗腫瘍免疫応答の判定と個別化がん免疫治療への応用、第 8 回 血液疾患免疫療法学会(一般演題) 2016

項 慧慧、豊島 雄二郎、寺田 聖、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、小林 博也、北村 秀光、神経ペプチドシグナルによる腫瘍形成促進メカニズムの解明と新規がん治療法への応用、第 20 回 日本がん免疫学会総会(一般演題) 2016

Takayuki Ohkuri, Junya Ohtake, Shun Kaneumi, Hidemitsu Kitamura, Hiroya Kobayashi, A novel mechanism for activating Type-1 immunity by neuropeptide signalings through NK1R and NK2R in tumor microenvironments, The 10th International Symposium of the Institute Network "Towards the next generation research for cancer and immunology" (国際学会)、2015

Satoshi Terada, Hidemitsu Kitamura, NK2R-mediated neuropeptide signaling regulates inflammation and Type-1 immune responses, 第44回日本免疫学会学術総会・学術集会(一般演題)、2015

Hidemitsu Kitamura, Junya Ohtake, Shun Kaneumi, Mishie Tanino, Takuto Kishikawa, Satoshi Terada, Kentaro Sumida, Kazutaka Masuko, Toshiyuki Kita, Sadahiro Iwabuchi, Shinya Tanaka, Hiroya Kobayashi, Neuropeptide signalings enhance cytokine production by antigen-specific T cells through activation of human dendritic cells, 第44回日本免疫学会学術総会・学術集会(一般演題) 2015

〔図書〕(計1件)

大竹 淳矢, 寺田 聖, 北村 秀光, 科学評論社、臨床免疫・アレルギー科、2016、5頁

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

北海道大学ホームページ、Research Press Release、ヒト免疫応答を調節する神経ペ

プチド受容体を介した新たな制御メカニズムの解明

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/public/20150912.html>

北海道大学ホームページ、Research Press Release、ヒト免疫抑制細胞の新しい分化・誘導メカニズムが明らかに

http://www.hokudai.ac.jp/news/151007_igm_pr.pdf

<https://www.oia.hokudai.ac.jp/blog/121novel-regulatory-mechanism-to-modulate-human-immune-responses-mediated-by-neuropeptidereceptors/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

北村 秀光 (KITAMURA, Hidemitsu)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授
研究者番号：40360531

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

小林 博也 (KOBAYASHI Hiroya)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：90280867

大栗 敬幸 (OHKURI Takayuki)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：70564061

(4)研究協力者

()