

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18790180

研究課題名（和文）癌骨転移成立・進展過程において制御性 T 細胞が果たす役割の検討

研究課題名（英文）Role of the regulatory T cells in development of bone metastasis

研究代表者

神谷 貞浩 (KAMIYA SADAHIRO)

城西国際大学 薬学部 助手

研究者番号：10398555

研究成果の概要：

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：炎症・免疫

## 1. 研究開始当初の背景

転移性骨病変は骨破壊からの疼痛や病的骨折による機能障害をもたらす。また時に高カルシウム血症により生命を脅かす。転移局所での病変の進展機構として、最近では癌細胞がその生存・増殖のため骨髄・骨微小環境を巧みに利用する機構が明らかとされつつある。病変部での骨破壊は腫瘍そのものが直接的に骨を破壊するのではなく、腫瘍により分化誘導された破骨細胞が骨吸収を営んだ後、空隙に腫瘍塊を置換する様に進むと考えられるようになった。この骨転移の成立過程には、微小環境を形成する骨髄細胞、骨の細胞系や免疫細胞、基質などが様々に関与する

と想定されるが、詳細は十分に解明されていない。

本講座の小野らはこれまでに、癌細胞と骨髄間質細胞との共存実験で、多様な癌細胞が cyclooxygenase (COX) -2 発現を導き、局所で産生された PGE<sub>2</sub> が破骨細胞分化を誘導し、癌進展に寄与する事実を遺伝子改変動物などを用いて示してきた (1-3)。一連の研究過程で、マウス乳癌細胞 4T1 と BALB/c-MC を、それぞれ野生型マウスとヌードマウスに心腔内投与したところ、癌細胞の骨への転移（生着）を観察し得たのは、4T1 では野生型マウスの 40%、ヌードマウスでは 5%であった (未発表データ)。また BALB/c-MC は野生

型マウスの20-40%に転移したが、ヌードマウスでの転移は認められなかった。一般にT細胞系を欠如するヌードマウスでは免疫機構が正常に働かず転移効率が高いと考えられるが、少なくとも我々の成績は一般常識と異なる結果であった。

T細胞系に着目すると、最近癌患者でのCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性T細胞(Treg)の増加による癌免疫応答低下が報告されている(4)。TregはTh1及びTh2細胞の活性化・増殖を制御し、Tregの除去は様々な自己免疫疾患を惹起する。Treg機能の調節は、癌免疫、局所の癌進展、更にはアレルギーを制御する可能性を持つ。Treg機能を増強する因子として、プロスタノイドの重要性を示す一連の事実も明らかとなってきた(5)。また、申請者(研究代表者)らが研究を進めてきた新規IL-12ファミリーに属するIL-27に関しては、その受容体であるWSX-1, gp130ヘテロダイマーがTregで発現していること、WSX-1欠損マウスが過剰免疫に関与すること、更に抗腫瘍作用についても示されている(6-8)。一方で、癌の骨転移過程におけるプロスタノイドとTregの関与を検討した成績は我々の知る限りはない。

これまでの実験成果より、骨転移の成立・進展過程における癌免疫と免疫寛容という課題が提起された。骨転移癌と宿主細胞系の相互作用の過程で癌細胞によりT細胞系が機能不全に陥っている可能性も推測でき、更に最近の報告ではTregがB細胞及びマクロファージに直接作用し、それらの機能を抑制するとの成績も示されている。従って申請者(研究代表者)は、癌細胞からT細胞系への影響が骨転移の成立に関与し、その中でTregが必須な役割を担っている可能性を考えている。

1. Ono K. et al. J. Bone Miner Res. 1998;13(3):400-408.
2. Ono K. et al. J. Bone Miner Res. 2002;17(5):774-781.
3. Ono K. et al. Bone. 2003;33(5):798-804.
4. Ormandy L. A. et al. Cancer Res. 2005;65(6):2457-2464.
5. Baratelli F. et al. J. Immunol. 2005;175(3):1483-1490.
6. Villarino A. V. et al. J. Immunol. 2005;174(12):7684-7691.
7. Villarino A. et al. Immunity. 2003;19(5):645-655.
8. Hisada M., Kamiya S. et al. Cancer Res. 2004;64(3):1152-1156.

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、腫瘍あるいは炎症性骨・関節疾患における骨破壊メカニズムへの免

疫系細胞の関与という点に着目し、局所免疫と骨破壊の関係を解析することである。

## 3. 研究の方法

①マウス乳癌細胞株 BALB/c-MC/骨髄細胞共存培養上清中のPGE<sub>2</sub>濃度測定:培養上清中のPGE<sub>2</sub>濃度をELISAにて測定した。

②活性化T細胞のサイトカイン産生に及ぼすPGE<sub>2</sub>の影響:抗CD3抗体により活性化させたT細胞からのサイトカイン(IFN $\gamma$ , IL-4, GM-CSF, IL-10, TNF $\alpha$ )産生をELISAにて測定した。

③IL-12関連新規サイトカインIL-27の骨芽細胞および破骨細胞形成に対する影響:

1)骨芽細胞への影響:骨芽細胞培養系にIL-27を添加し、骨芽細胞における表現型(ALP活性, mRNA(type I collagen, ALP, Runx2, Osteocalcin)発現)を常法により測定した。

2)破骨細胞分化への影響:M-CSF/Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand(RANKL)存在下、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞を誘導する系に、活性化T細胞, IL-27を添加し、多核破骨細胞(酒石酸耐性酸フォスファターゼ(TRAP)染色陽性細胞)の分化を観察した。

④活性化T細胞のサイトカイン産生に及ぼすIL-27の影響:破骨細胞分化抑制性サイトカイン(IFN $\gamma$ , IL-4, GM-CSF, IL-10)、および促進性サイトカイン(TNF $\alpha$ , RANKL)の産生をELISAにて測定した。

⑤活性化T細胞の可溶性及び膜型RANKL発現に及ぼすIL-27の影響:活性化T細胞より産生された可溶性及び膜型RANKLをELISA及びフローサイトメーターにてそれぞれ測定した。

⑥未感作CD4<sup>+</sup>T細胞より、Th17細胞を分化誘導し、破骨細胞前駆細胞と共存培養し、破骨細胞形成を試みた。また、このときのIL-27の影響を観察した。

## 4. 研究成果

はじめに、マウス乳癌細胞株BALB/c-MC細胞および骨髄細胞の共存培養上清中におけるPGE<sub>2</sub>濃度測定を行った結果、培養上清中のPGE<sub>2</sub>濃度はコントロールの3~5倍に上昇した。またPGE<sub>2</sub>は、活性化T細胞におけるIFN $\gamma$ , IL-4, GM-CSF, IL-10, TNF $\alpha$ の産生をいずれも抑制した[未発表データ]。PGE<sub>2</sub>は骨芽細胞からのHGF産生を約3倍上昇させ、HGFがBALB/c-MC乳癌細胞のマトリゲルへの浸潤を

有意に増大させることが明らかとなっている[1]. これらの知見より、乳癌細胞の骨転移局所では、産生された PGE<sub>2</sub> が免疫機能を抑制し、かつ HGF 産生を増大させ癌細胞の浸潤を促すことにより骨転移の成立・進展に寄与している可能性が示唆された.

一方、I 型ヘルパー T (Th1) 細胞の分化に関与する IL-27 は、骨芽細胞の表現型 (ALP 活性, mRNA (type I collagen, ALP, Runx2, Osteocalcin) 発現), IL-6 誘導性の RANKL 発現には何等影響を及ぼさなかったが、活性化 T 細胞存在下および非存在下、破骨細胞前駆細胞からの破骨細胞分化を対照に比し有意に抑制した[2]. IL-27 による T 細胞を介した破骨細胞形成抑制機構を解明する目的で、活性化 T 細胞からの破骨細胞分化に影響を及ぼすサイトカインの産生に対する IL-27 の作用を観察したところ、IL-27 は、活性化 T 細胞からの IL-10 の産生を対照の約 2~3 倍に増大させ、逆に可溶性 RANKL を 1/10 に減少させた。以上の結果より、IL-27 は活性化 T 細胞を介し破骨細胞分化を抑制することが明らかとなり、また免疫抑制性サイトカインである IL-10 産生を促進させることにより免疫抑制的にも作用する可能性が示唆された。さらに興味深いことは、IL-27 が活性化 T 細胞での RANKL の発現を顕著に抑制することである。RANKL は、活性化 T 細胞上に発現し、樹状細胞の生存に関与する分子として見出され、その後破骨細胞分化因子として同定された分子である。このため現在では骨代謝学と免疫学を繋ぐ重要な分子であると認識されており、従って研究代表者は次に、IL-27 の RANKL 発現抑制作用に着目し、更なる解析を行った。

IL-27 の T 細胞における RANKL 発現抑制作用は、同様の作用が報告されている IL-10 に非依存的な作用であることが、IL-10 欠損マウス由来の T 細胞を用いた実験で判明した[論文投稿中]. 次に、磁気ビーズを用い未感作 CD4+T 細胞を分離し、Th1, Th2, および Th17 細胞誘導条件にて誘導した Th 細胞サブクラスの RANKL 発現に対する IL-27 の影響を観察した結果、いずれのサブクラスにおいても可溶性および膜結合型 RANKL の発現が誘導され、IL-27 はこれらの発現を抑制した。次に IL-27 のシグナル伝達分子である STAT1 または STAT3 を欠損した T 細胞サブクラスを用いて検討した結果、IL-27 の RANKL 発現抑制作用は、部分的に STAT3 に依存していることが明らかとなった[論文投稿中]. 一方、破骨細胞前駆細胞と Th17 細胞との共存培養にて破骨細胞に特徴的な TRAP 陽性の細胞が、単核の

細胞ではあるが、形成され、IL-27 および RANKL 阻害分子である osteoprotegerin はこの作用を抑制した[論文投稿中].

以上の結果より、IL-27 は RANKL 産生を抑制し、TRAP 陽性細胞形成を抑制することから、悪性腫瘍、関節リウマチなどの炎症性疾患局所における骨破壊を抑制できる可能性が考えられた。

今後、疾患局所における IL-27 の発現、IL-27 の治療薬としての可能性、RANKL 発現抑制作用の免疫学的意義、また転移性乳癌細胞が T 細胞サブクラスに与える影響や RANKL 発現、破骨細胞形成に及ぼす影響について解析していきたいと考えている。

1. Ono K, Kamiya S, et al. *Bone*, 39, 27-34, 2006
2. Kamiya S, et al. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 25, 277-285, 2007

#### 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 15 件)

① Kamiya S, et al. IL-27 suppresses RANKL expression in CD4<sup>+</sup> T cells in part through STAT3 pathway, *投稿中*, 査読有.

② Tanaka R, Owaki T, Kamiya S, et al. VLA-5-mediated adhesion to fibronectin accelerates hemin-stimulated erythroid differentiation of K562 cells through induction of VLA-4 expression, *The Journal of Biological Chemistry*, 2009 May 21. [Epub], 査読有.

③ Kamiya S, et al. Effects of IL-23 and IL-27 on osteoblasts and osteoclasts: inhibitory effects on osteoclast differentiation, *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 25, 277-285, 2007, 査読有.

④ Saito Y, Imazeki H, Miura S, Yoshimura T, Okutsu H, Harada Y, Ohwaki T, Nagao O, Kamiya S, et al. A peptide derived from tenascin-C induces beta1 integrin activation through syndecan-4, *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 34929-34937 2007, 査読有.

⑤ Miura S, Kamiya S, et al. Antiadhesive sites present in the fibronectin type III-like repeats of human plasma fibronectin, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30, 891-897, 2007, 査読有.

⑥ Ono K, Kamiya S, et al. Involvement of hepatocyte growth factor in the development of bone metastasis of a mouse mammary cancer cell line, BALB/c-MC, *Bone*, 39, 27-34, 2006, 査読有.

⑦ Owaki T, Asakawa M, Kamiya S, et al. IL-27 suppresses CD28-mediated IL-2 production

through suppressor of cytokine signaling 3, *The Journal of Immunology*, 176, 2773-2780, 2006, 査読有.

⑧ Wada S, Fukawa T, Kamiya S, Newly developed drugs for osteoporosis in overseas and their future roles for the therapy, *Clinical Calcium*, 2008, 18, 1483-1492, 2008, 査読無.

⑨ Wada S, Kamiya S, Fukawa T, Bone quality changes in diabetes, *Clinical Calcium*, 18, 600-605, 2008, 査読無.

⑩ Wada S, Fukawa T, Kamiya S, New bone density conservation agents for osteoporosis under research and development: Anti-RANKL antibody, *日本臨床*, 65, Suppl. 9, 459-642, 2007, 査読無.

⑪ Wada S, Fukawa T, Kamiya S, New bone density conservation agents for osteoporosis under research and development: Zoledronate, *日本臨床*, 65, Suppl 9, 421-425, 2007, 査読無.

⑫ Wada S, Fukawa T, Kamiya S, Parathyroid and bone. Evidence and perspective of parathyroid therapy for patients with osteoporosis, *Clinical Calcium*, 17, 1888-1894, 2007, 査読無.

⑬ Wada S, Fukawa T, Kamiya S, Osteocalcin and bone, *Clinical Calcium*, 17, 1673-1677, 2007, 査読無.

⑭ Wada S, Kamiya S, Fukawa T, Management of osteoporosis in patients with inhaled glucocorticoids, *Clinical Calcium*, 2006, 16, 1871-1877, 2006, 査読無.

⑮ Wada S, Kamiya S, Bone and bone related biochemical examinations. Bone and collagen related metabolites. Osteocalcin, *Clinical Calcium*, 16, 1017-1021, 2006, 査読無.

[学会発表] (計 12 件)

① 神谷貞造 他, T 細胞を介した破骨細胞分化制御に及ぼすインターロイキン-27 の効果, 第 81 回 日本内分泌学会 (2008. 5, ホテル青森/青森文化会館)

② Kamiya S, et al. The effects of IL-27 on regulation of osteoclastogenesis by way of T cells, 第 30 回 米国骨代謝学会 (2008. 9, モントリオール(カナダ))

③ 神谷貞造 他, T 細胞を介した破骨細胞分化制御に及ぼすインターロイキン-27 の効果, 第 26 回 日本骨代謝学会 (2008. 10, 大阪国際会議場)

④ Chiba Y, Kamiya S, et al. Inhibition of RANKL Expression in CD4+ T Cells by IL-27 Partially through STAT3-Dependent Mechanism, 第 38 回 日本免疫学会 (2008. 12, 国立京都国際会館)

⑤ 神谷貞造 他, T 細胞を介した破骨細胞分化制御に及ぼすインターロイキン(IL)-12 関連

サイトカイン IL-27 の効果, 第 80 回 日本内分泌学会 (2007. 6, 東京国際フォーラム)

⑥ 神谷貞造 他, T 細胞を介した破骨細胞分化制御に及ぼすインターロイキン(IL)-12 関連サイトカイン IL-27 の効果, 第 25 回 日本骨代謝学会 (2007. 7, 大阪国際会議場)

⑦ Kamiya S, et al. The effects of IL-12 related cytokines, IL-23 and IL-27 on osteoclast formation and T cell properties, 第 29 回 米国骨代謝学会 (2007. 9, ホノルル)

⑧ 神谷貞造 他, T 細胞を介した破骨細胞分化制御に及ぼすインターロイキン(IL)-12 関連サイトカイン IL-27 の効果, 第 9 回 日本骨粗鬆症学会 (2007. 11, 京王プラザホテル(東京))

⑨ 神谷貞造 他, 破骨細胞分化制御に及ぼすインターロイキン(IL)-12 関連サイトカインの効果, 第 79 回 日本内分泌学会学術総会 (2006. 5, 神戸市)

⑩ 神谷貞造 他, 破骨細胞分化制御に及ぼすインターロイキン(IL)-12 関連サイトカインの効果, 第 24 回 日本骨代謝学会学術集会 (2006.7, 東京)

⑪ 神谷貞造 他, 破骨細胞分化制御に及ぼすインターロイキン(IL)-12 関連サイトカインの効果, 第 8 回 日本骨粗鬆症学会学術総会 (2006.10, 東京)

⑫ Kamiya S, et al. Effects of IL-12-related cytokines, IL-23 and IL-27, and activated T cells on osteoclast differentiation: possible roles on remission of rheumatoid arthritis. 第 28 回 米国骨代謝学会 (2006. 9, フィラデルフィア)

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 貞造

城西国際大学・薬学部・助手

研究者番号: 10398555

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし