

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 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591253

研究課題名（和文）

白血病細胞が産生する神経栄養因子による制御性 T 細胞誘導メカニズムの解明

研究課題名（英文）

BDNF produced by leukemia cells induced regulatory T cells

研究代表者

吉田 安宏 (YOSHIDA YASUHIRO)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10309958

研究成果の概要（和文）：

申請者は BDNF という分泌タンパクが、白血病の細胞株より常に産生され、この BDNF が免疫細胞のひとつである T 細胞に作用して、がん細胞が生存しやすくするのを手助けするはたらきをする制御性 T 細胞という細胞群を誘導すること、またその経路の一部を見出した。また白血病の患者さんには血清中に BDNF を多く持っている人もいることがわかった。BDNF は、抗腫瘍効果を考える上で非常に興味深い分子であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We found that BDNF is continuously secreted by leukemia cells. BDNF induced regulatory T cells, which function as a suppressor cells to immune systems. It might help for tumor progression. In addition, we observed that some serum from a patient of adult T cell leukemia contain high amount of BDNF than healthy donor. It is thought that BDNF is very interesting molecules for modulating an antitumor effect.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬系 免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：白血病 BDNF Treg（制御性 T 細胞） TrkB RhoA NFAT

1. 研究開始当初の背景

白血病細胞の生存・増殖に種々のサイトカインなどの関与が報告されている。申請者は平成19-20年度科学研究費基盤研究(C)において神経栄養因子の一つであるBDNFが、白血病細胞株より恒常的に産生されていることを見だし、報告してきた。最近、炎症反応の場でサイトカインプロファイルにより分類されるTh1、Th2サブセットの他に、Th17サブセット、制御性T細胞(Treg)が報告され、種々の病態への関与が示唆されている。特にTregの腫瘍環境における役割については、新たな創薬への着眼点として注目を浴びている。

以上を鑑みると、BDNFは抗原提示細胞のみならず、T細胞群にも影響し、腫瘍の免疫機構からのエスケープを行っていることを想起させた。白血球増殖性疾患におけるBDNFの役割については申請者が発見した機構で他に類をみない着眼点であり、BDNFによるTreg誘導機構に関する報告も見られないのが現状である。

2. 研究の目的

申請者は白血病細胞株から神経栄養因子であるBDNFが産生されることを見出している。そのBDNFが制御性T細胞を誘導する新しい知見を得た。そこでBDMF誘導FOXP3+細胞群のサイトカインプロファイル及び細胞増殖への影響を解析する。本研究では白血球増殖性疾患におけるBDNFの役割を、Treg誘導機構を機軸とした免疫抑制機構に着目し、その機構解明による新たな創薬の焦点・治療法の確立を目的としている。

3. 研究の方法

(1) マウス脾臓細胞を用いたBDNFによるTreg誘導能の検討

マウス脾臓細胞全体及びマグネティックビーズを用いてCD4陽性細胞を調製し、BDNF、固相化CD3の存在下で、培養する。その細胞、細胞溶解液、及び培養上清を用いて以下の実験を行った。

①Foxp3の検出

細胞溶解液を用いてTregのマーカーであるFoxp3の発現をウエスタンブロット及び細胞内染色によるフローサイトメトリーにより解析する。

②培養上清中のサイトカイン

培養上清中、および血清中のサイトカイン量をELISA法により定量する。

③制性細胞の機能解析

①においてFoxp3が陽性だった細胞群を用い

て、それらが抑制作用を持つかどうかを検討する。実際には調製した脾臓細胞にFOXP3陽性細胞群を加えた後、マイトジェン(ConA或いはLPS)で刺激し、 $[^3\text{H}]$ -thymidineの取り込みによるDNA合成能による増殖反応により、或いは非RI系アッセイ法であるATPアッセイ法を用い、評価する。

④TrkBの発現解析

調製した細胞群におけるBDNFの受容体であるTrkBの発現を、ウエスタンブロット法にて解析する。

(2) ヒトサンプルを用いた検討

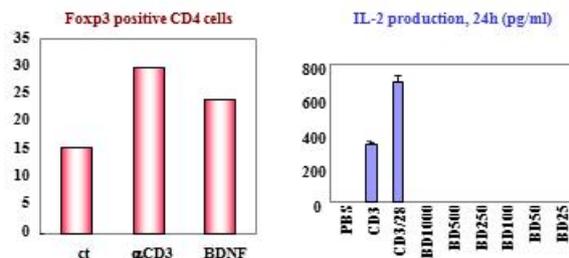
九州はATLの患者が多い事で知られている。そのため患者さんからの血液もインフォームドコンセプトのもと、他地域に比べ得られやすい利点がある。そこでATLの患者さんから血液を採取し、血清を調製し、血清中サイトカイン量をELISA法にて測定する。

4. 研究成果

(1) BDNFによる制御性T細胞の誘導

マウスの脾臓細胞より、CD4陽性細胞を磁

BDNF induces Foxp3 in CD4 T cells

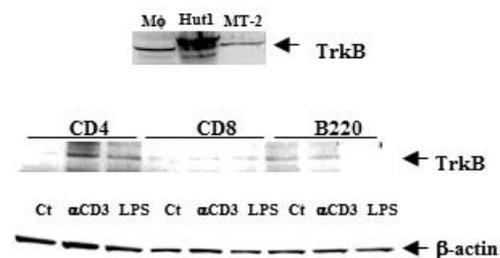


気ビーズ法により調製し、それらをBDNF或はCD3で刺激したところ、制御性T細胞のマーカーであるFoxp3の発現誘導が見られた。

(2) 活性化CD4陽性細胞はBDNFの受容体であるTrkBを強発現する

BDNFの受容体であるTrkBの発現をウエスタンブロットで解析したところ、薬剤で誘導

Activated CD4 T cells express TrkB



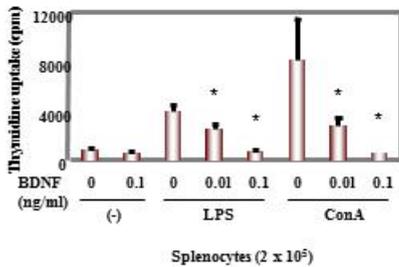
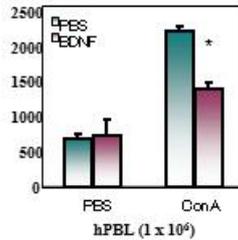
M ϕ :Thioglycolate induced-macrophage
TrkB: specific receptor for BDNF

したマクロファージ、活性化 CD4 陽性 T 細胞において TrkB の発現が認められた。

(3) BDNF は脾臓細胞、ヒト末梢血細胞の活性化を抑制する

刺激されたマウス脾臓細胞およびヒト末梢血細胞の増殖反応を BDNF は抑制した。

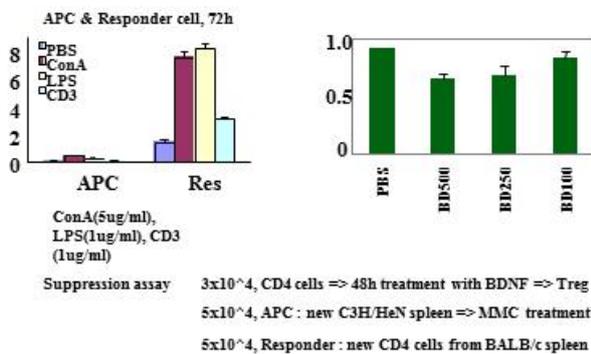
BDNF inhibits cell proliferation



(4) BDNF 誘導制御性 T 細胞は T 細胞活性化に抑制効果を持つ

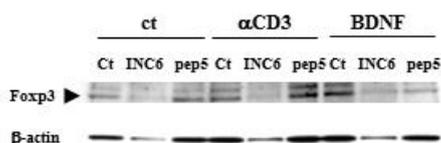
制御性 T 細胞として BDNF で 4 8 時間処理した CD4 細胞を調製し、T 細胞応答を増殖反応で評価したところ、BDNF で誘導された制御性 T 細胞が抑制効果を持つことが示された。

BDNF-induced Treg suppresses T cell response



(5) Foxp3 発現誘導のパスウェイの解析
 Foxp3 の誘導には、NF-AT、NF-κB、Smad などの関与が知られている。それらに特異的な阻害剤を用い、発現誘導を解析したところ、

BDNF induces Foxp3 in CD4 T cells, which is inhibited by NF-AT and Smad3 inhibitors



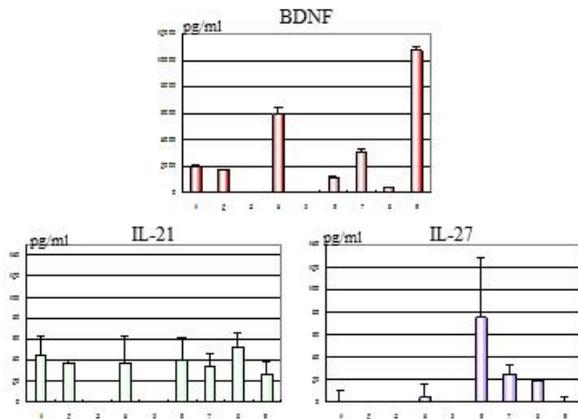
発現の減弱が認められた。また、BDNF のレセプターとして働くことが知られている p75-NTR の (RhoA) の阻害剤によっても発現の阻害が認められた。

(6) BDNF は ATL 患者血清において検出される

パイロットスタディとして健常人血清と ATL 患者血清を採取し、血清中サイトカインを ELISA により解析したところ、BDNF 量が高値の患者血清も検出された。IL-21 は、健常人と患者血清において有意な差は認められなかった。興味深かったのは、IL-27 において、健常人では検出されなかったものの、患者血清では検出されたものもあった。

以上より、白血病細胞から産生される BDNF は、免疫システムに対し抑制作用を持つ制御性 T 細胞およびその受容体を誘導し、白血病細胞増殖の環境に影響を与えている可能性が示唆され、さらには患者血清において BDNF は高値を示すプライマリーデータが示唆された。

BDNF is detected in serum from ATL patient



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 7 件)

(1) Tin-Tin-Win-Shwe, Kunugita, N., Yoshida, Y., Nakajima, D., Tsukahara, S., Arashidani, K. and Fujimaki, H.: Differential mRNA expression of neuroimmune markers in the hippocampus of infant mice following toluene exposure during brain developmental period. *Journal of Applied Toxicology*, 32 ;126-134, 2012. (査読有) DOI: 10.1002/jat.1643.

(2) Ding, N., Yamashita, U., Matsuoka, H., Sugiura, T., Tsukada, J., Noguchi, J. and Yoshida, Y.: Apoptosis induction through proteasome inhibitory activity of cucurbitacin D in human T-cell leukemia. *Cancer*, 117 : 2735-46, 2011. (査読有) DOI: 10.1002/cncr.25711.

(3) Tsukada, J., Yoshida, Y., Kominato, Y. and Auron, P.E.: The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine*, 54 : 6-19, 2011. (査読有)

(4) Tin-Tin-Win-Shwe, Yoshida, Y., Kunugita, N. and Fujimaki, H.: Role of hippocampal TLR4 in neurotoxicity in mice following toluene exposure. *Neurotoxicology and Teratology*, 33 : 598-602, 2011. (査読有)

(5) Liu, JQ., Yoshida, Y., Kunugita, N., Noguchi, J., Sugiura, T., Ding, N., Arashidani, K., Fujimaki, H. and Yamashita, U.: Thymocytes are activated by toluene inhalation through the transcription factors NF- κ B, STAT5 and NF-AT. *Journal of Applied Toxicology*, 30 ;656-660, 2010. (査読有) DOI: 10.1002/jat.1536.

(6) Tin-Tin-Win-Shwe, Yoshida, Y., Kunugita, N., Tsukahara, S. and Fujimaki, H.: Does early life toluene exposure alter the expression of NMDA receptor subunits and signal transduction pathway in infant mouse hippocampus? *NeuroToxi*, 31 : 647-653, 2010. (査読有)

(7) Yoshida, Y., Ding, N.: Enhanced effect of new proteasome inhibitor cucurbitacin

D on LPS-induced IL-1 production in Raw264 cells. *Proceedings of the Cytokines 2010*, 39-43, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

(1) 吉田 安宏: Glucocorticoid receptor signaling is important for BDNF-induced CD4+ Foxp3+ and CD8+ Foxp3+ T cells
第40回日本免疫学会, 2011年11月28日, 幕張メッセ (千葉)

(2) 吉田 安宏: BDNF induces regulatory T cells
第23回日本神経免疫学会学術集会, 2011年9月17日, 京王プラザホテル (東京)

(3) 吉田 安宏: Autocrine loop of BDNF is involved in cell growth of T cell leukemia cells
金沢国際がん生物学シンポジウム, 2011年5月26日, 金沢音楽堂 (金沢)

(4) 吉田 安宏 ほか; 神経栄養因子および抗アポトーシスタンパク質に対するフロンド代替物質1-ブロモプロパンの作用
平成22年度産業神経・行動学研究会「環境と脳のはたらき」, 2010年12月11日, 北九州学研都市産学連携センター (北九州)

(5) 宋 媛, 丁 宁, 金沢 保, 吉田 安宏: Proteasome inhibitor cucurbitacin D induces autophagy in prostate cancer cells
第33回日本分子生物学会, 2010年12月10日, 神戸ポートアイランド (神戸)

(6) 吉田 安宏, 宋 媛, 丁 宁: Proteasome inhibitor, cucurbitacin D induces cell death in adult T-cell leukemia through apoptosis and autophagy
第33回日本分子生物学会, 2010年12月9日, 神戸ポートアイランド (神戸)

(7) Yoshida, Y. and Tsukada, J.: BDNF produced by leukemia cells attenuates cytokine production in macrophages and induced Foxp3 positive cells through NF-AT, Smad and RhoA.
14th International Congress of Immunology, 2010年8月25日, 神戸ポートアイランド (神戸)

(8) Ding, N. Yamashita, U. and Yoshida, Y.: Anti-proliferative activity of cucurbitacin D on T-cell leukemia through proteasome inhibition.
14th International Congress of Immunology, 2010年8月25日, 神戸ポートアイランド (神戸)

戸)

(9) Nanbara, H., Wara-aswapati, N., Yoshida, Y., et al. P. gingivalis LPS induce Wnt5a via NF- κ B and STAT1 signaling pathway.

14th International Congress of Immunology, 2010年8月25日, 神戸ポートアイランド(神戸)

(10) Yoshida, Y.: Analysis of mechanism of the IL-1 induction by new proteasome inhibitor Cucurbitacin D

Bit's 3rd. Annual World Cancer Congress 2010, 2010年6月23日, シンガポール EXPO (シンガポール・シンガポール)

(11) Yoshida, Y.: BDNF produced by leukemia cells modulates immune responses 1st. World Congress of Immunodiseases and Therapy, 2010年5月16日, 北京国際コンベンションセンター (中国・北京)

(12) Yoshida, Y., Ding, N., Yamashita, U.: Induction of apoptosis in T-cell leukemia by new drug which targeted a proteasome inhibition.

World Congress of Gene-2009, 2009年12月6日, Foshan Golden Sun Hotel (中国・佛山)

(13) 吉田 安宏, 丁 宁, 山下 優毅: BDNF produced by leukemia cells activates AP1 and NF-AT, which resulted in induction of Foxp3.

第39回日本免疫学会総会・学術集会, 2009年12月3日, 大阪国際会議場 (大阪)

(14) 丁 宁, 吉田 安宏, 山下 優毅: Cucurbitacin Dの転写および転写後修飾によるIL-1 β 産生の調節機構

第39回日本免疫学会総会・学術集会, 2009年12月2日, 大阪国際会議場 (大阪)

(15) Yoshida, Y., Ding, N., Yamashita, U.: Triterpenoids cucurbitacin D isolated from cucurbitaceae induces apoptosis in adult T-cell leukemia through proteasome inhibition.

2009 4th Medical Biotech Forum, International experts symposium, 2009年8月8日, Dalian Municipal Party Committee Hotel (中国・大連)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 安宏 (YOSHIDA YASUHIRO)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 10309958

(2) 研究分担者

塚田 順一 (TSUKADA JUNICHI)

産業医科大学・大学病院・准教授

研究者番号: 20227367