

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790302  
 研究課題名 (和文) 癌が分泌する乳酸によって免疫応答が増強されるメカニズムの解明  
 研究課題名 (英文) Analysis of the immune response enhanced by tumor-secreted lactic acid  
 研究代表者  
 志馬 寛明 (SHIME HIROAKI)  
 北海道大学・大学院先端生命科学研究院・特任助教  
 研究者番号：70372133

## 研究成果の概要：

IL-23 は、癌組織に浸潤したマクロファージや樹状細胞で高発現し、炎症を誘導することによって癌の進展を促進するが、高発現する原因は明らかでない。一方、癌細胞は解糖系が亢進しており、その周囲に乳酸を多量に分泌するが、その意義はよく分かっていない。本研究では、乳酸が IL-23-IL-17 炎症経路を特異的に誘導することを示し、その作用の詳細を明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：乳酸、癌、炎症、IL-23、IL-17、Toll-like receptor (TLR)、抗原提示細胞

## 1. 研究開始当初の背景

癌組織では炎症が誘発されており、マクロファージ、樹状細胞、T 細胞など様々な免疫細胞の浸潤がみられる。癌の発生初期には、免疫細胞は癌細胞の除去に働く。しかし、その一方で慢性的な炎症は癌の進展に寄与することが示唆されていた。

Langowski らは、癌組織に浸潤したマクロ

ファージや樹状細胞から IL-23 が大量に産生されており、その結果、癌の増殖が促進されることを示した (Nature. 2006, 442:461-5)。本来、IL-23 は感染防御に働くサイトカインであるが、癌組織で高発現した IL-23 は、IL-12 による IFN- $\gamma$  を介した細胞性免疫応答に拮抗して、癌細胞の増殖に必須である炎症と血管新生を誘発する

IL-17の産生誘導、およびCD8陽性T細胞の浸潤を阻止するために、癌の進展に寄与すると考えられた。これらのことから、癌組織においてIL-23が大量に産生される原因を明らかにすれば、根本的にIL-23の産生を抑制して癌の進展を阻止することができると考えられたが、その原因は明らかでなかった。申請者は、癌細胞の培養上清にIL-23産生を増強する活性があることを見だし、活性因子が乳酸であることを突き止めていた。乳酸の免疫応答に与える影響を詳細に解析することにより、癌をはじめとする高乳酸分泌を伴う種々の疾患の発症機構の解明および治療法の開発に貢献すると考え、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、癌細胞から分泌される乳酸が免疫系のIL-23/IL-17経路を選択的に誘導することを見出した。本研究では、乳酸によるIL-23/IL-17経路の誘導機構を明らかにするために、乳酸の作用機構の解析およびこの応答に関与する免疫細胞の同定を行い、免疫系における乳酸の作用と意義を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)IL-23p19遺伝子プロモーター領域の解析

マウスマクロファージ様細胞株にIL-23p19遺伝子のプロモーター領域とルシフェラーゼレポーター遺伝子から構成される一連のコンストラクトを導入し、安定発現株を作製した。TLR刺激と乳酸を加え、プロモーターのどの領域が乳酸に応答するか調べた。また、既知の転写因子結合配列レポーターコンストラクトを作製し同様に調べた。

### (2)乳酸が獲得免疫誘導に与える影響の解析

OVA特異的T細胞レセプタートランスジェニックマウスOT-IIの脾臓細胞に、OVAペプチド抗原と乳酸を添加し、T細胞からのサイトカイン産生に与える乳酸の影響を調べた。さらに、マウス脾臓や皮下に移植した腫瘍から各種免疫細胞を表面マーカーにより単離し、再構築を試みた。

## 4. 研究成果

癌細胞の培養上清にToll-like receptor (TLR) 2/4リガンドで活性化した単球/マクロファージからのIL-23産生を増強する活性があることを見出し、その活性物質が乳酸であることを明らかにしてきた。本研究では、乳酸の作用機構を解析した。IL-23p19遺伝子プロモーター領域とルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーターアッセイ系を構築し、TLRリガンドで刺激する際の乳酸添加の有無によるルシフェラーゼ活性の変化を調べたところ、翻訳開始点から上流約2.7kb内に乳酸シグナルに応答する領域が存在すると考えられた。(図1)

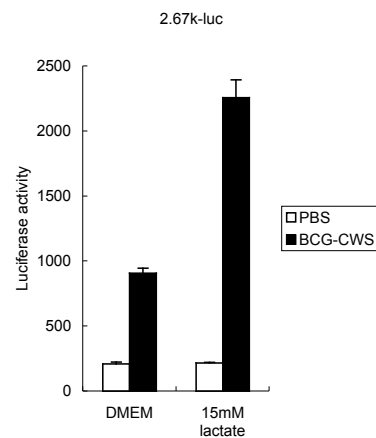
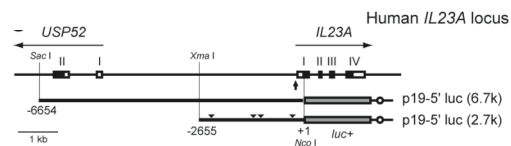


図 1

2.7kb 領域内の塩基配列を解析したところ、TLR シグナルで活性化される主要な転写因子である NF- $\kappa$ B が結合する領域が存在していたが、NF- $\kappa$ B 結合配列と minimal promoter から構成されるレポーター遺伝子アッセイ系では、乳酸による活性増強はみられなかった。また、乳酸を加えても NF- $\kappa$ B の標的配列への結合活性に影響はなかった。2.7kb 内には TLR シグナルによって活性化される転写因子の結合配列が他にも存在していたが、いずれの結合配列も TLR リガンド刺激には応答するものの、乳酸には応答しなかった。以上の結果から、乳酸は TLR シグナルとは異なるシグナル伝達経路を介して IL-23p19 遺伝子の発現を正に調節していると考えられた。また、乳酸の IL-23p19 遺伝子発現増強作用は、細胞外液の pH を中和することで消失し、乳酸ナトリウムや塩酸では転写増強活性がみられなかったことから、monocarboxylate transporters (MCTs) を介して細胞内に取り込まれた乳酸イオンが活性を発揮すると考えられた。

さらに、乳酸が獲得免疫応答に与える影響を解析した。IL-23 は、メモリーT 細胞から IL-17 産生を誘導する。マウス脾細胞を抗原と TLR2 リガンドであるペプチドグリカンまたは TLR4 リガンドである BCG-CWS で刺激するとき、乳酸を加えると IL-23p19 の転写および IL-17 産生が増強したが、IFN- $\gamma$ 産生は変化しなかった。乳酸による IL-17 産生の増強は、抗 IL-23p19 中和抗体によって阻害された。興味深いことに、IL-17 産生は、TLR リガンド無しでも抗原と乳酸を加えるだけでみられた。(図2)

この現象に関わる細胞を同定するために、脾細胞を分画し、再構築を試みた。CD11b 陽性細胞と CD4 陽性 CD62L 陰性メモリーT 細胞、抗原および乳酸を混合すると IL-17 産生が誘

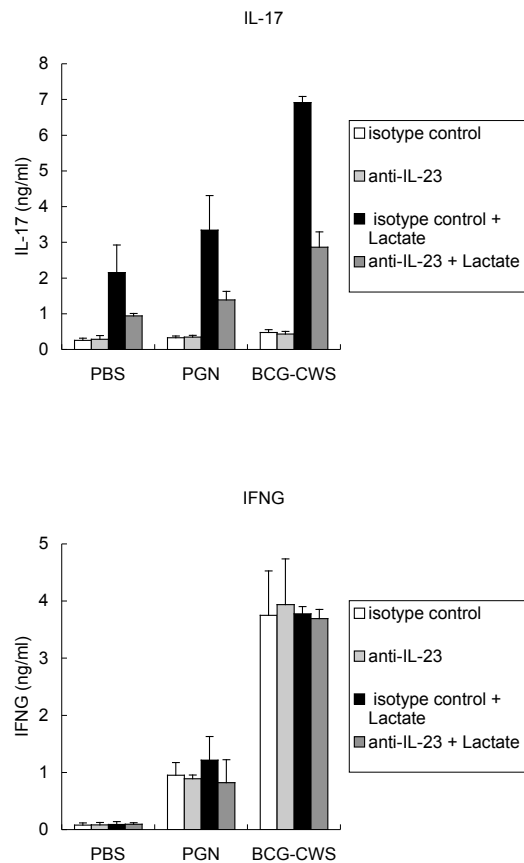


図 2

導された。一方、IFN- $\gamma$ 産生は全く誘導されなかった。これらの結果から、抗原と抗原特異的T 細胞、抗原提示細胞と乳酸が存在すれば、炎症が特異的に誘導されることが明らかとなった。メモリーT 細胞の代わりに CD4 陽性 CD62L 陽性 naïve T 細胞を加えた場合、IL-17 産生は誘導されなかった。(図3) また、Th17 細胞の分化も誘導されなかった。以上の結果から、乳酸の獲得免疫に対する作用は、主として IL-23 産生の増強を介したメモリーT 細胞からの IL-17 産生誘導であると考えられた。

これらの現象が、癌組織に浸潤した免疫細胞でもみられるかどうか調べた。マウス皮下に移植した腫瘍から CD11b 陽性細胞を単離し、TLR リガンドで刺激するとき、乳酸を加えると IL-23p19 の発現が増強された。(図4) また、単離した CD11b 陽性細胞を OT-II マウス

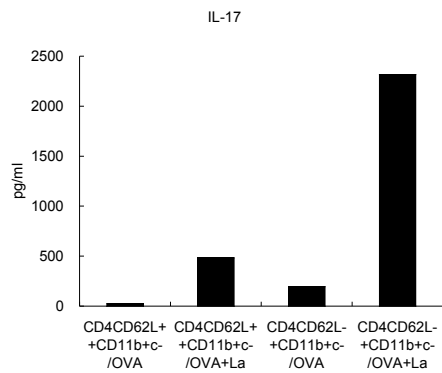


図 3

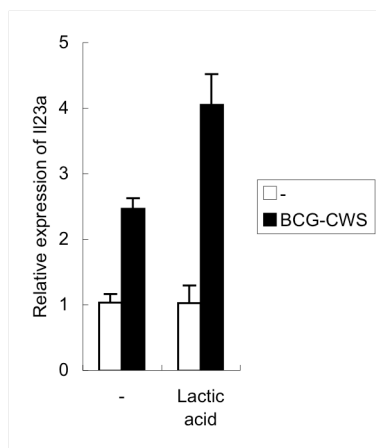


図 4

の CD4 陽性細胞と混合し、抗原存在下で乳酸を加えたところ、IL-17 産生の増強がみられた。IFN- $\gamma$  産生には影響がなかった。(図 5)

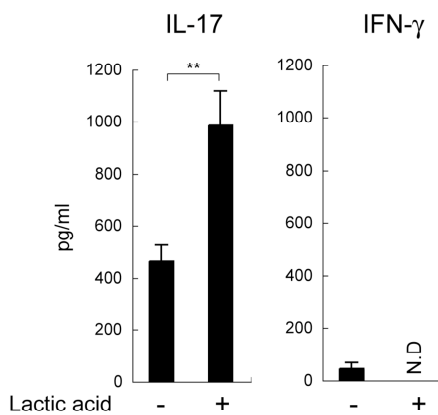


図 5

以上の成果により、乳酸が免疫応答に与える影響が明らかとなった。本研究成果は、これまで単なる代謝産物の一つとしての認識しか無かった乳酸が積極的に細胞機能を調節するシグナル分子として働くという新しい概念を提唱するものである。また、癌組織の他にも、慢性関節リウマチ患者の関節液、創傷部位、動脈硬化プラーク、心筋梗塞、細菌感染部位などでは、血液の供給不足や過度の細胞増殖、免疫細胞の浸潤などが原因で低酸素状態となるため、局所的に乳酸濃度が高い。これらの疾患は炎症との関連性が高いことから、本研究成果は、これらの疾患の発症機構の解明に貢献することが期待される。

#### 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 2 件)

①志馬寛明、井上徳光、松本美佐子、瀬谷司、TLR 刺激による Th17 細胞の増加、臨床免疫・アレルギー科、51 巻、479-486、2009、査読無

②Shime H, Yabu M, Akazawa T, Kodama K, Matsumoto M, Seya T, Inoue N. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway, J Immunol., 180, 7175-83, 2008, 査読有

[学会発表] (計 7 件)

①志馬寛明、Lactic acid is a modulator to activate the IL-23/IL-17 pathway in an Ag-dependent manner、第 38 回日本免疫学会総会、2008 年 12 月 1 日、京都

②井上徳光、癌から分泌される乳酸は癌微小環境の炎症を促進するメディエーターである、第 67 回日本癌学会総会、2008 年 10 月 29 日、名古屋

③井上徳光、癌から分泌される乳酸による IL-23/IL-17活性化経路、3学会合同集会「自然免疫の最前線」Frontier of Innate Immunity第73回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会/第19回日本生体防御学会学術総会/第45回補体シンポジウム、2008年7月11日、札幌

④志馬寛明、癌から分泌される乳酸は IL-23/IL-17 経路を誘導する、第4回北海道癌免疫制御研究会、2008年6月7日、札幌

⑤志馬寛明、癌から分泌される乳酸は IL-23/IL-17経路を誘導する、日本分子生物学会 第8回春季シンポジウム、2008年5月26日、札幌

⑥Shime, H, Tumor-secreted lactic acid enhances IL-23-IL-17 pathway, Keystone symposia, Feb13, 2008, Santa Fe, USA

⑦志馬寛明、癌から分泌される乳酸による IL-23-IL-17 炎症経路の誘導、第44回 補体シンポジウム、2007年8月25日、神奈川

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

志馬 寛明 (SHIME HIROAKI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・  
特任助教

研究者番号：70372133

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし