

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510300

研究課題名(和文)肝類洞内皮細胞および癌細胞由来リンパ球制御物質の探索

研究課題名(英文) Search for immunoregulatory factors derived from LSECs and Cancer cells

研究代表者

狩野 有宏 (Kano, Arihiro)

九州大学・先端物質化学研究所・准教授

研究者番号：30403950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：脾臓細胞培養中に産生されるIFN- γ を指標に肝類洞内皮細胞および癌細胞培養上清中の免疫制御因子の同定を旨とした。肝類洞内皮細胞はマグネットビーズを使い、90%以上に精製する事に成功した。また乳がん細胞4T1に移植により、培養脾細胞のIFN- γ 産生が一過的に増加しその後減少すること、そして4T1培養上清によってさらに減少することを発見した。この因子の同定を進め、G-CSFとM-CSFを見いだした。CT26細胞分泌因子は10 kDaよりも小さいことからLC-MSによるメタボローム解析を進め、癌進行との関わりが報告されているPGE2を見いだした。このアッセイ系により様々な活性因子の同定が期待される。

研究成果の概要(英文)：Based on the production of IFN- γ from the cultivated splenocytes, I aimed to identify immunoregulatory factors from liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) and cancer cells. I succeeded to isolate and purify LSEC in more than 90% with magnet beads. I discovered that the production of IFN- γ in the cultured splenocytes from the 4T1 tumor-bearing mouse is transiently upregulated and then decreased, and further suppressed by 4T1-conditioned medium. The purification of the suppressive factors from the 4T1-conditioned medium succeeded in the identification of G-CSF and M-CSF. The suppressive factors in the CT26-conditioned medium seemed to be smaller than 10kDa, therefore; these were analyzed by HPLC and LC-MS and succeeded in to show PGE2 in the conditioned medium. It is hoped that various immunosuppressive substances are identified from this assay system.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：がん 腫瘍 免疫抑制 IFN-

1. 研究開始当初の背景

代謝、解毒を担う臓器として肝臓には腸管から門脈を通じて大量の外因性物質が流入する。そして肝臓は移植後の拒絶反応が起きにくい臓器としても知られている。このように機能的あるいは構造的に、肝臓には過剰な免疫反応を抑制するシステムがあると考えられ、そして状況証拠的あるいは実験的にも「免疫寛容」を積極的に誘導するシステムがあるのではないかと近年考えられている (Immunol Rev, 2006. 213:101-18.)。これらの現象を説明するために、Knolleらは肝類洞内皮細胞 (LSEC) が外来抗原提示に必要な全ての補因子を持つ事、そして CD8T 細胞に抗原提示し寛容を誘導できる事を示している (Nat Med. 2000(12):1348-54.)。しかし、LSEC は寛容誘導に十分ではないと反論する形の論文も見受けられ、この問題に対する結論が出ているとは言い難い。申請者は炎症性サイトカインの細胞内情報伝達を担う Stat3 遺伝子を血管内皮特異的に欠損させたマウスが LPS に対し感受性が高い事を見いだしている。さらにこの肝類洞内皮細胞を単離し初代培養条件にて検討した結果、この培養上清が LPS 刺激によるリンパ球活性化を抑制することを見いだした (J Exp Med. 2003 Nov 17;198(10):1517-25.)。これは LPS 刺激した培養脾細胞からのインターフェロン-g (IFN-g) 産生が、マウス肝臓より単離した LSEC との共培養、あるいはその培養上清によって著しく抑制される活性として見いだしたものである (図 1)。この時、TNF-a の産生は IFN-g ほど抑制されない事から、単に脾細胞の生育が悪化したものでは無いと考えられる。この抑制活性は Stat3 欠損 LSEC では観察されない事、加熱によって失活する事から Stat3 依存性のタンパク質であろうと推測している。また、この活性は免疫抑制性サイトカインとして知られる IL-10 や TGF-b などによるものとも考えられたが、いずれも STAT3 遺伝子の有無でその産生量に差は見られなかった。また、IFN- γ の産生を抑制する現象として II 型ヘルパー T 細胞の活性化が考えられたが、その指標となる IL-4 の産生は確認されなかった。以上の事から LSEC 培養上清に観察される LPS 刺激脾細胞の IFN-g 産生抑制活性は、既知のサイトカインとは異なる何らかの液性タンパク質である事が推測される。また、多くのがん細胞培養上清がやはり同じ実験系の IFN- γ の産生を抑制することも偶然見いだした。これは正常細胞には見られない現象である。

2. 研究の目的

培養脾細胞から産生される IFN- γ を指標に LSEC、およびがん細胞から産生される免疫制御物質を同定を目指す。

3. 研究の方法

Balb/c マウス脾臓を摘出し、メス及び 19-G 針を通すことで細胞を分散化し、密度勾配遠心法によって脾細胞を単離した。脾細胞を

96-well plate に播種し、10% FBS を含む RPMI 培地で培養した。必要に応じて、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS を添加した。マウス肝臓からコラゲナーゼ灌流法による消化と、密度勾配遠心法によって肝非実質細胞を単離する。6割以上が類洞内皮である非実質細胞各分の無血清培養を行う。その培養上清から、イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーにて活性成分の濃縮を行う。また活性フラクションの二次元電気泳動、TOF-MS 解析により活性成分の同定を目差す。がん細胞培養上清からも同様に活性成分の濃縮、精製を行い、最終的に同定を目差す。がん細胞は同種同系移植が可能なマウス大腸がん細胞の CT26、そして同乳がん細胞の 4T1 を使用する。

4. 研究成果

(1) 肝非実質細胞からの類内皮細胞の精製を検討し、マグネットビーズを使って 90%以上 に精製する事に成功した。一方、同種同系移植が可能な 4T1 細胞を移植後、その脾細胞培養を検討した結果、4T1 細胞移植後の 1 週間で IFN- γ の急激な産生増加が観察されるものの、その後徐々に減少し、3 週間以降ではほぼ測定限界以下になることを見いだした (図 1)。

IFN- γ 産生増加の理由ははっきりしないも

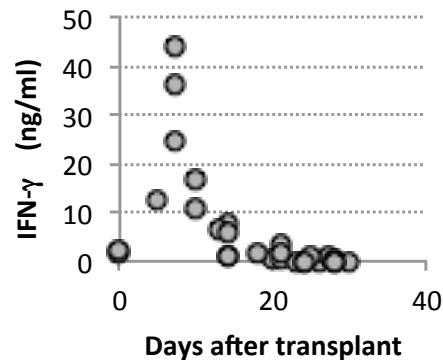


図 1. 4T1 移植後の培養脾細胞による IFN- γ 産生

のその現象は既報の急激に増加する顆粒球のためと推測された。そしてさらに IFN- γ 産生は 4T1 細胞培養上清によって移植後の経過日数に依存して抑制されることを発見した (図 2)。また CT26 培養上清を種々のサイズの限外濾過フィルターで分画した結果、10 kDa 以下に活性が存在することが判明した。以上の結果を踏まえ、より早期に結果が期待できる方に注力するという当初の計画に従い、4T1 と CT26 細胞培養上清中の免疫制御因子の同定を中心に研究を実施した。

(2) 4T1 細胞が産生する免疫制御物質の精製を進めるにあたり、まず、CT26 移植モデルとの比較検討を実施した。CT26 移植培養脾細胞の IFN- γ 産生は移植後 3 週間をピークに上昇した。そして、4T1 及び CT26 どちらの細胞培養上清も IFN- γ 産生を刺激した。これは

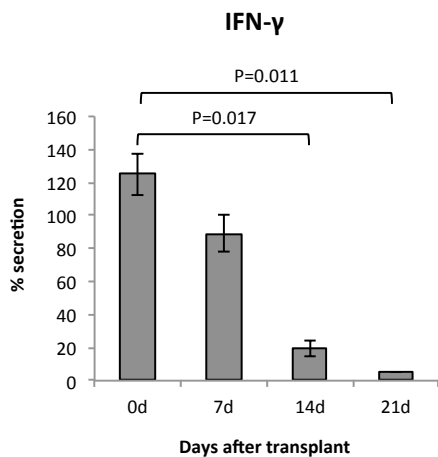


図2. 4T1 培養上清による 4T1 担持マウス脾細胞の IFN- γ 産生抑制

4T1 移植モデルとは全く逆の結果であり、4T1 細胞移植によって脾臓細胞は特徴的な細胞構成になっていることを示唆している。なお主に骨髄球系細胞が産生する TNF- α はより顕著に CT26 移植モデルにおいて両培養上清によって刺激された。続いて 4T1 培養上清を限外濾過フィルターによって分画し検討した結果、10~100 kDa に IFN- γ 産生抑制活性が存在することが明らかとなった。しかしながら興味深いことにこの活性因子は血清存

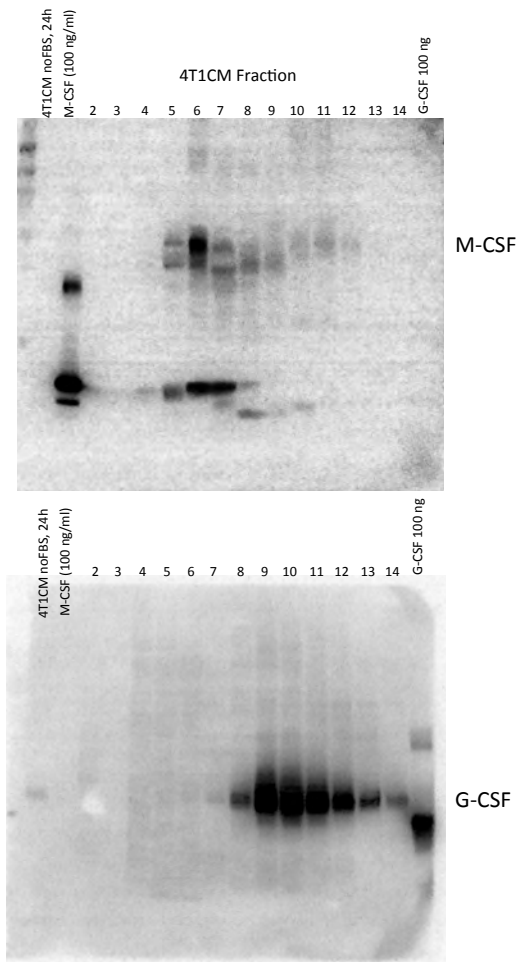


図3. 4T1 精製分画の Western Blotting

在下では 100 kDa フィルターを通らず、何らかの血清タンパク質と相互作用していることが示唆された。次に、308 個の液性因子を同時解析できる Protein Array Assay を実施した。限外濾過フィルターを使った部分精製の前後で比較した結果、Fas, MMP-9, G-CSF など、がんの進行に関わる興味深いタンパク質が検出されたものの、決め手に欠ける結果ではあった。そこでつづいて活性因子の精製を目差し、4T1 培養上清の IFN- γ 産生抑制を指標にカラムクロマトグラフィーを進めた。様々な条件を検討し精製を進め、TOF-MS 解析によって G-CSF と M-CSF を同定した(図3)。G-CSF は 4T1 培養上清中に比較的大量に存在し、4T1 が産生するサイトカインとして既報であった。一方 M-CSF は通常のサンドイッチ ELISA 法では検出限界以下であり、濃縮精製をすることによって初めて検出を成し得たものと考えられた。これまでの検討では G-CSF および M-CSF どちらのサイトカインも IFN- γ 産生抑制因子としては同等の寄与をしている事を示している。発現量が異なるにも関わらず、その活性がほぼ変わらないという点で興味深い。現在、腫瘍の進行にどのように寄与しているかを明らかにすべく、マウスを使った *in vivo* 実験を計画中である。近年がんによる免疫抑制メカニズムの一つとして、Myeloid Derived Suppressor Cell (MDSC) が見いだされた。未分化骨髄細胞として分類される MDSC はその構成により顆粒球型 (Granulocyte)、および単球型 (Monocyte) とに大きく分類されている。4T1 移植モデルでは G-CSF の過剰発現によって顆粒球型であるとの報告もあるが、細胞一個あたりの T 細胞抑制活性は単球型の方が強いとの報告もなされている。本研究で見いだした知見は、MDSC を構成するサブグループとサイトカイン応答、そしてがんによる免疫抑制という関係に新しい発見をもたらせるものと考えられる。そしてそのためには脾臓を構成する細胞群の詳しい調査などの一層の研究が必要であることは疑いない。

(3) CT26 培養上清中には 10 kDa 以下の免疫制御物質があることが確認できたことから、逆相 HPLC での精製を試みた。その結果、異なる二つの溶出位置に IFN- γ 産生を抑制する活性を認めることができた(図4)。また図4中の後半の画分はペプチダーゼに感受性であることを確認した。そこでこの活性フラクションの LC-MS 解析をかずさ DNA 研究所に外注して実施した。その結果、複数の低分子化合物をデータベース上でヒットした。なかでもプロスタグランジン E2 は MDSC を誘導することで腫瘍発達の進行を促進することが報告されている。本研究で確立した *in vitro* アッセイシステムにより、様々な免疫制御因子が同定されることが期待される。図4後半の活性フラクションはペプチダーゼに感受性であったことから、ペプチドデータベース検索を実施した。複数のペプチド性化

化合物が存在することが指摘されたが、データはアミノ酸組成として提供され、配列情報は無いためにそれ以上の確認は困難であった。今回は網羅的 LC-MS 解析を実施したが、より多くの培養上清からスタートし、精製度を上げた HPLC を実施することで、特に低分子活性物質の同定は LC-MS で可能である感触を得た。ペプチド性は活性物質は一層高度な精製と、配列情報も得られる MS-MS 解析が必

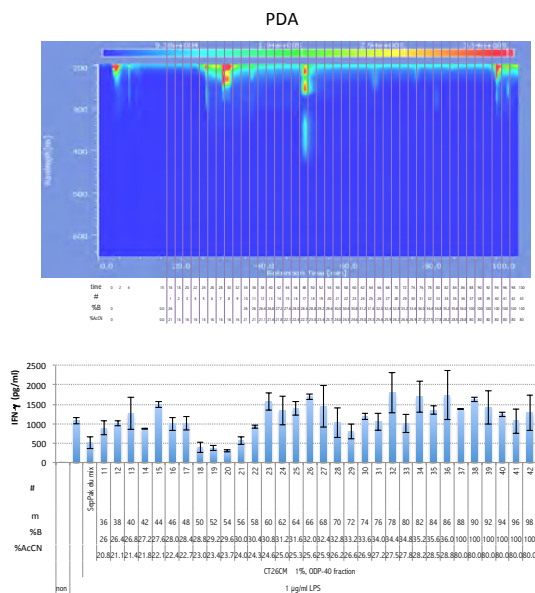


図4. CT26 培養上清の HPLC 分画と活性測定

要であるかもしれない。様々な低分子活性物質の同定に向けて今後努力したい。

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 1 件)

Kano, A., 2015, Tumor cell secretion of soluble factor(s) for specific immunosuppression. : Scientific reports, v. 5, p. 8913, doi:10.1038/srep08913.

[学会発表] (計 2 件)

狩野有宏、マウス乳がん細胞 4T1 が分泌する免疫制御因子の解析、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 16 日、国立京都国際会館、京都府・京都市

狩野有宏、IFN- γ 産生を指標にした乳がん細胞担持マウスの免疫抑制性の解析、第 80 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2015 年 7 月 17、18 日、東京工業大学大岡山キャンパス蔵前会館、東京都・目黒区

[図書] (計 0 件)

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://www.cm.kyushu-u.ac.jp/dv01/kano/Kyushu_Univ_IMCE/Welcome.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

狩野 有宏 (KANO, Arihiro)

九州大学・先導物質化学研究所・准教授

研究者番号：30403950

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：