

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790814

研究課題名(和文)肺サーファクタント蛋白SP-Aの免疫調節作用と肺がん進展における役割

研究課題名(英文)Immunoregulatory function of surfactant protein A in lung cancer progression

研究代表者

後東 久嗣(GOTO, Hisatsugu)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号：00437641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：肺サーファクタントタンパク質A(SP-A)は、肺の感染防御に寄与することが知られているが、一方、以前より肺腺癌の診断マーカーの一つとして用いられている。このことはSP-Aは肺癌の増殖・進展にも関わることが示唆される。本研究では、ヒト肺腺癌細胞株にSP-Aを強制発現させ、癌細胞由来のSP-Aが肺癌の増殖・進展にどのように関わるか検討した。結果、SP-Aは腫瘍内のマクロファージを抗腫瘍性(M1)マクロファージへ誘導し、それにより直接抗腫瘍活性を有するNK細胞を腫瘍内に誘導した。SP-Aは宿主の免疫を調節することにより腫瘍進展に抑制的に働くことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Surfactant protein (SP)-A has immunoregulatory function in the lungs. In addition, SP-A is used as a marker of lung adenocarcinoma, suggesting that SP-A also plays role in lung cancer progression. We investigated the role of SP-A in lung cancer progression by introducing the SP-A gene into human lung adenocarcinoma cell lines. SP-A gene transduction suppressed the progression of tumor mice. Immunohistochemical analysis showed that the number of M1 anti-tumor tumor-associated macrophages (TAMs) was increased in the tumor tissue produced by SP-A-expressing cells. In addition, natural killer (NK) cells were also increased and activated in the SP-A-expressing tumor. Taking into account that SP-A did not directly activate NK cells, these results suggested that SP-A inhibited lung cancer progression by recruiting and activating NK cells via controlling the polarization of TAMs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌 肺サーファクタント

1. 研究開始当初の背景

(1) サルファクタントは肺胞内腔を覆う脂質・蛋白質の複合体であり、蛋白質成分は Surfactant protein (SP)-A, -B, -C, -D に分類される。サルファクタントは、その機能として肺胞での気相 - 液相境界の表面張力を低下させ肺虚脱を防ぐ効果が古くから知られているが、近年、SP-A, -D を中心に生体防御機能も有することが分かってきた。特に SP-A は肺胞表面で細菌等の病原体に接着することでオプソニン作用を発揮し、肺胞マクロファージによる病原菌排除を促進することが報告されている。しかし、感染症領域以外での SP-A の免疫調節作用については報告が少ない。

(2) SP-A は以前より肺腺癌のマーカーとして用いられてきた。最近になり、癌細胞における SP-A の発現レベルが肺腺癌の予後に関連するという臨床的な報告がなされてきている。これらの報告は、SP-A が肺癌の単なるマーカーとしてではなく、がんの増殖・進展に関与している可能性を示唆している。

(3) 申請者らはこれまで、SP-A を強制発現させたヒト肺腺癌細胞株 (PC14PE6/SP-A) を Nude マウスに接種することで、*in vivo* における腫瘍増殖がベクター導入株 (PC14PE6/vector) と比較して減少すること、SP-A 強制発現株による腫瘍内では有意にマクロファージ数の増加が認められたこと、を見出した。これらの結果から、SP-A は肺癌進展においても抑制的に作用することが考えられ、その機序の1つとして腫瘍関連マクロファージ (TAMs) への影響が示唆された。

2. 研究の目的

SP-A が TAMs を介して肺癌進展を抑制することが示唆されていることを踏まえ、本研究ではそのメカニズムを掘り下げて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) まず、SP-A 強制発現株 (PC14PE6/SP-A) が *in vivo* においてコントロール株 (PC14PE6/vector) と比較してその増殖が抑制されることを皮下移植モデルで検討した。具体的には各細胞株 (1×10^6 cells/mouse) をマウス皮下に移植し、経時的に腫瘍質量および重量を比較検討した。

(2) TAMs には、その生物学的機能から M1 (抗腫瘍性マクロファージ) と M2 (腫瘍促進性マクロファージ) に分かれ、これらのバランスががん進展に重要であると理解されている。SP-A 強制発現株 (PC14PE6/SP-A) により形成された皮下腫瘍で増加した TAMs がどちらのバランスに傾いているのかを検討するために、腫瘍組織切片を M1 マーカーである TNF- α や、M2 マーカーである MRC-1 で免疫染色を行

い、ベクター導入株 (PC14PE6/vector) と比較した。また、マウス (宿主) 側の各種 M1、M2 マーカー分子の腫瘍内での発現レベルを RT-PCR 法で比較検討した。

(3) 抗腫瘍活性を有する宿主側の細胞としては natural killer (NK) 細胞が主な役割を果たしていると考えられている。SP-A が関与する腫瘍抑制メカニズムにおいて NK 細胞が関わるか否かについて、腫瘍組織中の NK 細胞を免疫染色で検討し、また NK 細胞から産生される perforin 1 や granzyme B の発現レベルを RT-PCR 法で検討した。

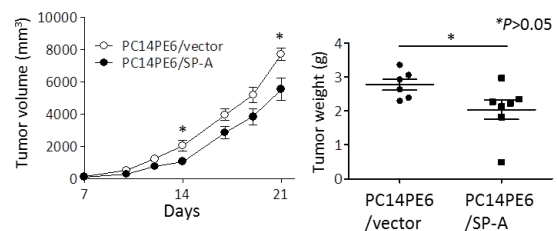
(4) SP-A がマクロファージの生物学的機能にいかに関わるかを検討するために、様々な単球・マクロファージ (チオグリコロートを腹腔内投与後に採取したマウス腹腔マクロファージ、マウスの肺胞洗浄により採取した肺胞マクロファージ、および末梢血から採取したヒト単球) に SP-A 蛋白質を添加し、マクロファージ (単球) の運動能の変化やサイトカインプロファイルの変化を調べた。運動能は boyden chamber を用いて、サイトカインプロファイルは RT-PCR 法を用いて検討した。

(5) SP-A の関与する腫瘍抑制メカニズムにおける NK 細胞の関与を確認するために、抗 IL-2 受容体 鎖抗体 (TM- 1) を用いて NK 細胞を除去した Nude マウスに PC14PE6/SP-A を経尾静脈的に接種し、形成された肺転移を PC14PE6/vector と比較検討した。

4. 研究成果

(1) まず、PC14PE6/SP-A の *in vivo* での増殖能を PC14PE6/vector と比較したところ、PC14PE6/SP-A は腫瘍質量、重量ともにコントロール株と比較して抑制されていた (図 1)。この結果より、SP-A が腫瘍進展に抑制的に作用することが確認された。

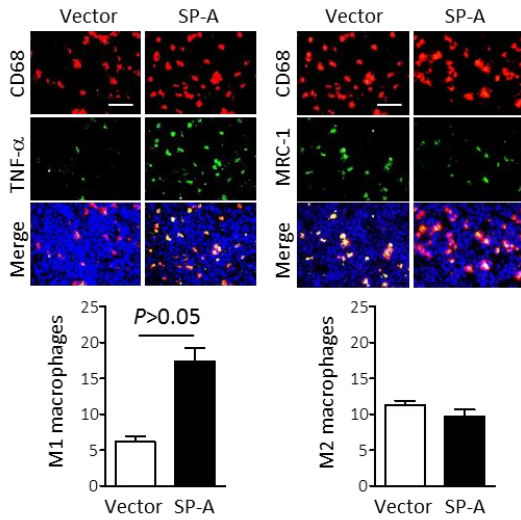
図1 SP-Aの*in vivo*における皮下腫瘍増殖抑制効果



(2) これまでの申請者らの検討で、SP-A 発現腫瘍内には腫瘍関連マクロファージ (TAMs) 数が増加していることが判明している。今回は、PC14PE6/SP-A による皮下腫瘍内で増加した TAMs が M1 マクロファージ、M2 マクロファージのいずれの極性を有するのかについて免疫染色で検討したところ、TNF- α 陽性の M1 マクロファージ数が有意に増加していた (図 2 左)。一方、MRC-1 陽性の M2 マクロファ

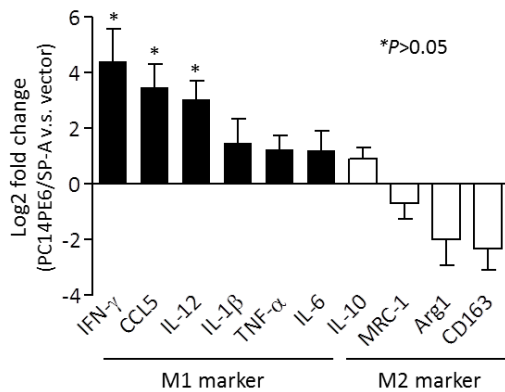
ジ数はコントロール群と比較して変化は認められなかった(図2右)

図2 皮下腫瘍内におけるM1およびM2マクロファージ数の比較



さらに、PC14PE6/SP-A による皮下腫瘍内で M1 マクロファージが増加していることを確認するため、各腫瘍内での複数の M1 および M2 マーカーの発現レベルを RT-PCR 法で比較検討した所、PC14PE6/SP-A では複数の M1 マーカーの発現増加が認められた一方、M2 マーカーの発現増加は認められなかった(図3)

図3 SP-A強制発現腫瘍におけるM1マーカーの増加



(3) 上記結果を受けて、SP-A 強制発現腫瘍では NK 細胞の強い誘導活性化因子である CCL5 が増加していることに注目した。SP-A 強制発現腫瘍において NK 細胞が増加している可能性を考え、免疫染色にて各腫瘍内の NK 細胞を検出した所、PC14PE6/SP-A ではコントロール腫瘍と比較して有意に腫瘍内の Nkp46 陽性 NK 細胞数の増加が認められ(図4)、さらに実際に抗腫瘍活性を有する NK 細胞から産生される perforin 1 (Prf1) や granzyme B (GzmB) の著明な発現増加も認められた(図5)

図4 SP-A発現腫瘍におけるNK細胞の増加

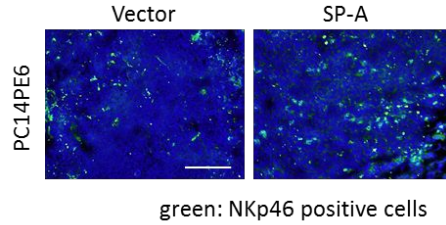
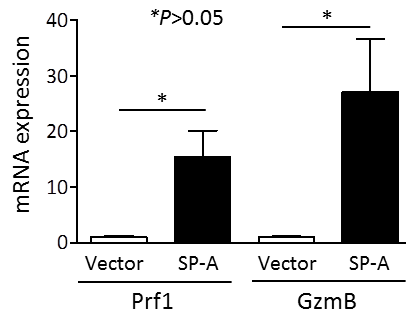


図5 SP-A発現腫瘍におけるperforin 1およびgranzyme Bの発現増加



(4) これまでの結果から、SP-A はマクロファージを M1 側に誘導し、さらに NK 細胞を腫瘍内に動員することで抗腫瘍作用を発揮することが考えられた。そこで、SP-A がどのようなメカニズムでこれらの細胞に作用するか検討するために、それぞれの細胞に SP-A を *in vitro* で添加し、サイトカイン発現プロファイルや細胞運動能を評価した。SP-A をマウス腹腔マクロファージ(図6上)やヒト末梢血単球(図6下)に添加すると CCL5 や IL-1 等の M1 タイプのケモカイン/サイトカインの増加が認められたが、興味深いことに肺胞マクロファージは SP-A に全く反応しなかった(図6上)。肺胞マクロファージは常に肺胞面で SP-A と接しているため、過剰な免疫反応を抑制する何らかのメカニズムが働いていることが示唆された。また、migration assay では、SP-A はマウス腹腔マクロファージの遊走能を増強させた(図7)

図6 SP-Aの各種単球・マクロファージに及ぼす影響(サイトカイン発現プロファイル)

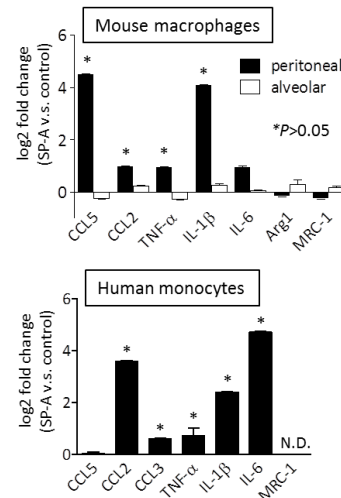
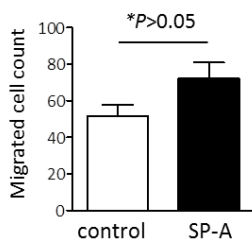


図7 SP-Aによるマクロファージ遊走能の増強



一方、マウス NK 細胞に SP-A を添加しても perforin 1 や granzyme B の発現増加は認められなかったことより、SP-A は直接 NK 細胞の活性化を誘導しないことが考えられた。以上の結果より、SP-A は腫瘍内において、TAMs の極性を M1 側に誘導し、これらの活性化型マクロファージが NK 細胞を活性化し、腫瘍進展に抑制的に働くことが考えられた。

(5) 最後に、マウスから NK 細胞を除去することで、SP-A の腫瘍進展抑制効果における NK 細胞の役割を *in vivo* で確認した。本研究で用いている PC14PE6 細胞は、Nude マウスに経尾静脈的に投与することで肺転移と胸水を産生することが分かっている。以前の申請者らの報告通り、SP-A 発現細胞 (PC14PE6/SP-A) では、コントロール細胞と比較して肺転移形成および胸水産生の抑制が見られた (表 1)。しかし、NK 細胞除去マウスではこれらの変化は消失したことから、SP-A の腫瘍進展抑制作用における NK 細胞の重要性が確認できた。

表1 NK細胞除去マウスにおけるSP-A強制発現株の肺転移形成および胸水産生能

PC14PE6	Weight (g)	Lung		Pleural effusion	
		Metastasis		Incidence	Volume (μl)
		Incidence	Number		
Vector NK (+)	0.41 (0.24-0.65)	6/6	113.0 (35-197)	6/6	313.3 (20-900)
SP-A NK (+)	0.21 (0.15-0.26)*	5/5	25.6 (6-34)*	1/5	80.0 (0-400)*
Vector NK (-)	0.50 (0.26-0.89)	7/7	148.6 (52-207)	7/7	438.6 (20-1000)
SP-A NK (-)	0.34 (0.21-0.48)	5/5	101.2 (41-181)	4/5	400.0 (0-1200)

PC14PE6 cells were intravenously injected to NUDE mice (1×10^6 cells/mouse) with or without NK cell depletion, and the lung metastasis and pleural effusion were evaluated. Values are the mean (minimum - maximum).

* Statistically significant difference compared with Vector NK (+) ($p < 0.05$).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Hisatsugu Goto, Atsushi Mitsuhashi, Yasuhiko Nishioka. Role of surfactant protein A in non-infectious lung diseases. The Journal of Medical Investigation, 61; 1-6, 2014. 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24705741>

西岡 安彦、後東 久嗣、肺胞上皮傷害と修復、呼吸と循環、61巻、1146-1151、2013、査読なし

Atsushi Mitsuhashi, Hisatsugu Goto (他

13名2番目) Surfactant protein A suppresses lung cancer progression by regulating the polarization of tumor-associated macrophages. American Journal of Pathology, 182; 1843-1853, 2014. 査読有
 doi: 10.1016/j.ajpath.2013.01.030.

〔学会発表〕(計6件)

Hisatsugu Goto, The role of surfactant protein A in the host defense of the lung. Spring congress of the Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Diseases (招待講演) 2014年4月11日、Daemyung Resort (辺山、韓国)

Atsushi Mitsuhashi. Surfactant protein A suppresses progression of human adenocarcinoma in nude mice via modulating host immune response. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiratory, 2013年11月13日、パシフィコ横浜(神奈川県)

Hisatsugu Goto. Surfactant protein A suppresses lung cancer progression by regulating tumor-associated macrophage polarization. American Thoracic Society 2013 Conference, 2013年5月21日、Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, USA)

Sawaka Yukishige. Surfactant protein A suppresses lung cancer progression by regulating tumor-associated macrophage polarization. Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference, 2013年2月24日、Hyatt Regency Maui (Maui, USA)

三橋 惇志、肺 surfactant protein A (SP-A) の肺癌進展における機能解析、第21回日本がん転移学会学術集会・総会、2012年7月12日、オリエンタルホテル広島(広島県)

三橋 惇志、Surfactant protein A suppresses progression of human lung adenocarcinoma in nude mice via modulating host immune response. 第52回日本呼吸器学会学術講演会、2012年4月21日、神戸コンベンションセンター(兵庫県)

〔図書〕(計1件)

後東 久嗣、レスピレーション リサーチ ファウンデーション、呼吸、2012年、98(79-89)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sannai.umin.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後東 久嗣 (GOTO Hisatsugu)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号: 00437641