

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861583

研究課題名(和文)ビスフォスフォネート存在下の骨代謝における T細胞の意義

研究課題名(英文)The interplay between bone and ex vivo-expanded gamma delta T cells.

研究代表者

堂前 英資 (DOMAE, Eisuke)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：50454559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：炎症環境がビスフォスフォネートで増幅させたV γ 9V δ 2 T細胞(以下 T細胞)に及ぼす影響を検討した。炎症性サイトカインであるIL-12とIL-18は T細胞による機能分子の発現や細胞傷害活性(骨芽細胞を含む)を亢進することが明らかとなった。またその他の活性化マーカーの発現亢進や細胞増殖を促すことも明らかとなった。これらの活性化メカニズムとしてIL-12とIL-18はお互いの受容体の発現を亢進することや、その下流で働く転写因子の活性化を促すことが明らかとなった。このように炎症性サイトカインは、ビスフォスフォネートにより増幅された T細胞を、抗原非存在下で活性化することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of inflammatory environment on ex-vivo expanded V γ 9V δ 2 T cells. V γ 9V δ 2 T cells treated with IL-12 and IL-18 enhanced effector functions, including the expression of IFN- γ and granzyme B, and cytotoxicity. These enhanced effector responses following IL-12 and IL-18 treatment were associated with homotypic aggregation, enhanced expression of ICAM-1 and decreased expression of the B- and T-lymphocyte attenuator (BTLA), a co-inhibitory receptor. IL-12 and IL-18 also induced the antigen-independent proliferation of V γ 9V δ 2 T cells. Increased expression of I β B δ , IL-12R α 2 and IL-18R α following IL-12 and IL-18 stimulation resulted in sustained activation of STAT4 and NF- κ B. Thus, we showed that IL-12 and IL-18 synergize to activate human ex vivo-expanded V γ 9V δ 2 T cells.

研究分野：生化学、免疫学

キーワード：T cells IL-12 IL-18 STAT4 NF- κ B I β B δ

1. 研究開始当初の背景

窒素含有ビスホスフォネート(N-BPs)は破骨細胞を抑制する作用から、骨粗鬆症、高カルシウム血症、多発性骨髄腫の治療や、癌の骨転移による骨疼痛の緩和などに用いられている。近年、N-BPsが骨と直接関連の無い腫瘍に対しても抗腫瘍作用を示すことが明らかとなり、N-BPsの腫瘍治療への応用が始まった。N-BPsによる抗腫瘍作用のメカニズムとしては、腫瘍細胞のメバロン酸経路のファルネシルピロリン酸(FPP)合成酵素の抑制による、RasやRhoなどのGタンパク質のファルネシル化やゲラニルゲラニル化の抑制が考えられている。このような直接的な抗腫瘍作用に加え、最近、N-BPsによるT細胞の活性化とその抗腫瘍作用が注目されている。

Tリンパ球はT細胞受容体(TCR)を発現するT細胞とTCRを発現するT細胞に大別することができる。末梢血T細胞の大部分はT細胞であり、T細胞は2-5%程度を占めるに過ぎず、特異的な抗原も長らく不明であった。1995年にT細胞の主要な集団であるV γ 9V δ 2 T細胞がメバロン酸経路の中間代謝産物である Isopentenyl pyrophosphate(IPP)と細菌由来の hydroxymethyl-but-2-enylpyrophosphate(HMBPP)などの非ペプチド性リン酸抗原を特異的に認識することが明らかとなった(Tanaka Y, Nature, 1995)。

V γ 9V δ 2 T細胞の抗原の同定から約4年後に、第2世代N-BPであるパミドロネートを投与された患者の末梢血中でV γ 9V δ 2 T細胞が活性化・増殖していることが報告された(Kunzmann V, NEJM, 1999)。V γ 9V δ 2 T細胞はヒトを含む霊長類にのみ存在することもありその活性化機構の詳細は不明であったが、最新の研究で腫瘍細胞やマクロファージに発現するCD277/butyrophilin-3(BTN3A)がリン酸抗原をT細胞に提示する際に必須の分子であることが報告された(Vavassori S, Nature Immunology, 2013)。以上の報告から、N-BPsの作用により腫瘍細胞内に蓄積したIPPをBTN3A分子がV γ 9V δ 2 T細胞に抗原提示し活性化するという、N-BPsによるV γ 9V δ 2 T細胞の活性化機構が明らかとなった。

KalyanらはN-BPsによる治療歴がありかつ顎骨壊死を経験した患者の末梢血リンパ球を解析し、対照群と比較して顎骨壊死患者ではV γ 9V δ 2 T細胞数が有意に減少していたことを報告した(JBMR, 2013)。この報告はN-BPs存在下の病的骨代謝とV γ 9V δ 2 T細胞の活性化との関連を示唆するものである。近年デノスマブ(抗RANKL抗体)治療においても顎骨壊死を発症することが明らかとなり、顎骨壊死はN-BPs治療に特有のものではないことが明らかとな

ったが、マウスの一部のT細胞はRANKLを発現し免疫機能維持に重要な役割を果たしていることから、抗RANKL抗体治療も骨代謝と免疫系との関係を修飾している可能性がある。

以上の背景から申請者は、本研究でV γ 9V δ 2 T細胞の活性化と病的骨代謝の関係を明らかにするための基礎的研究をおこなうべく、以下の研究計画を立案した。

2. 研究の目的

病的環境下(特に炎症環境)にあるT細胞の機能を解析し、骨組織を構成する細胞(特に骨芽細胞系細胞)に対する影響を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

ヒト末梢血単核細胞(PBMC)から、窒素含有ビスホスホネート(ゾレドロネート)とインターロイキン(IL)-2を用いて14日間培養増幅することにより得られたヒトV γ 9V δ 2 T細胞を用いて、その機能を解析した。また、一部の実験ではPBMCからネガティブセレクション(ミルテニーのキットを用いた)により濃縮したヒトV γ 9V δ 2 T細胞を用いて解析を行った。

解析の大部分は蛍光標識特異抗体を用いて、フローサイトメトリーにて行った。細胞表面の抗原の検出は通法に従って行った。サイトカインや転写因子などの細胞内・核内タンパク質はそれぞれ専用のキットを用いて固定・透過処理を行い蛍光標識特異抗体により検出した。

ヒトV γ 9V δ 2 T細胞へのsiRNAの導入はエレクトロポレーション(Amaxa)により行った。

骨芽細胞株に対するヒトV γ 9V δ 2 T細胞の障害活性は、4時間の共培養の後に骨芽細胞上のホスファチジルセリンの検出(蛍光標識Annexin V)により評価した。

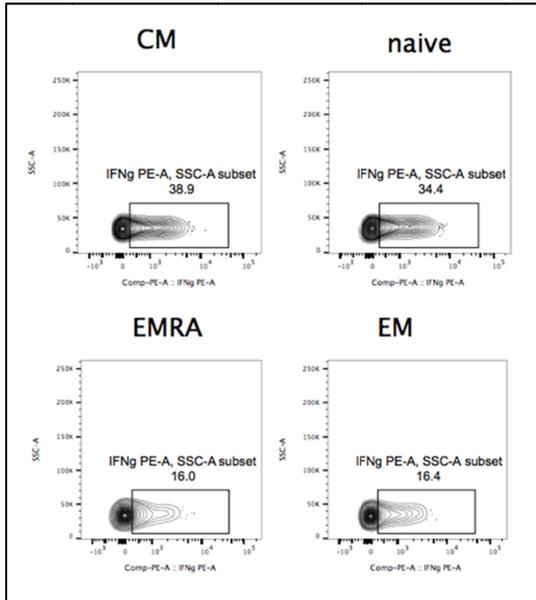
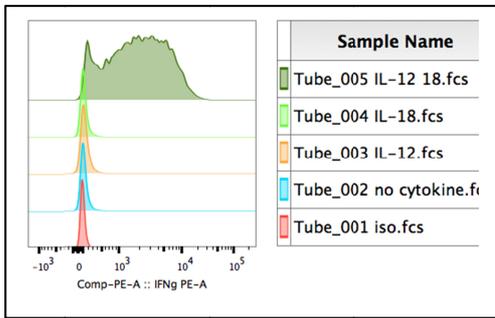
転写因子の機能解析はクロマチン免疫沈降法(ChIP)により行った。

4. 研究成果

(1) ヒトV γ 9V δ 2 T細胞は抗原非存在下でIL-12とIL-18刺激によりIFN- γ を発現する。

炎症性サイトカインであるIL-12とIL-18を同時に作用させると、抗原刺激がないにも関わらずIFN- γ の発現が誘導された。

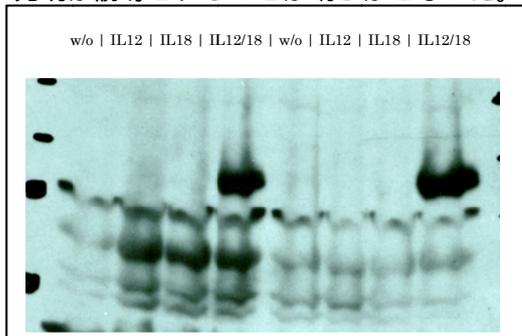
また、IL-12とIL-18によるIFN- γ の誘導は、ゾレドロネートとIL-2による培養を経ない、末梢血から直接調整されたヒトV γ 9V δ 2 T細胞でも観察された。CD45RAとCD27の発現を検討した結果ナイーブ、エフェクター、メモリーのすべてのヒトV γ 9V δ 2 T細胞でIFN- γ の発現が観察された。



以上の結果から、炎症性サイトカインの存在下では、抗原非存在下でも、ヒト V 9V 2 T 細胞は活性化されることが明らかとなった。

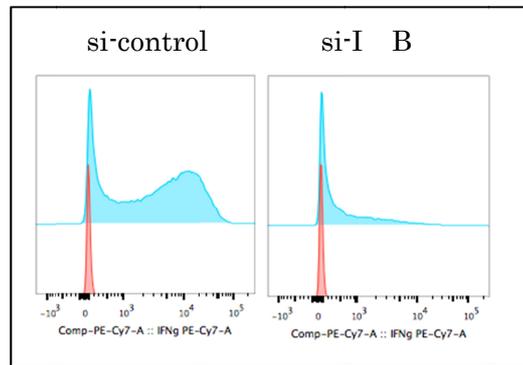
(2) IL-12/IL-18 により刺激されたヒト V 9V 2 T 細胞では I B の発現が誘導される。

IFN- γ 発現との関連が知られている転写因子を複数検討した結果、ヒト V 9V 2 T 細胞では、IL-12/IL-18 刺激により I B の発現が誘導されることが明らかとなった。

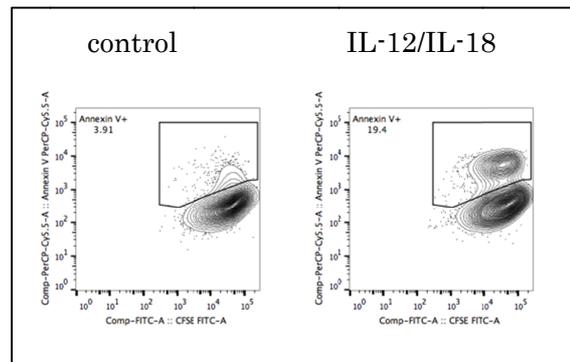


(3) I B の発現は、IL-12/IL-18 刺激により誘導される IFN- γ 産生に必要である。

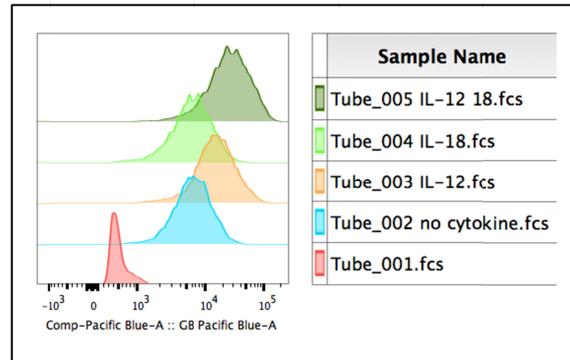
IL-12/IL-18 刺激による IFN- γ 産生における、I B の発現の意義を検討するために、siRNA によるノックダウンを行った。その結果、I B をノックダウンしたヒト V 9V 2 T 細胞では、IL-12/IL-18 刺激によって誘導される IFN- γ が大きく抑制されることが明らかとなった。



(4) IL-12/IL-18 により活性化されたヒト V 9V 2 T 細胞は骨芽細胞株 MG-63 を殺傷する。



ヒト V 9V 2 T 細胞を MG-63 骨芽細胞株と共培養した結果、未刺激の V 9V 2 T 細胞では細胞傷害活性を示さなかったが、IL-12/IL-18 により活性化した V 9V 2 T 細胞は強い細胞傷害活性を示した。



また、この結果は IL-12/IL-18 による活性化により V 9V 2 T 細胞による Granzyme B の発現が亢進したと関連があると考えられる。

(5) IL-12 と IL-18 による相乗効果によるヒト V 9V 2 T 細胞の活性化

本研究で明らかとなった IL-12 と IL-18 による相乗的な活性化機構は他に、ICAM-1、CD25、の発現上昇や抑制性受容体である BTLA の発現抑制などがある。これらの活性化マーカーは、上記の I B を介した機構には依存していないことが明らかとなったため、その他の活性化機構を検討した。IL-12 と IL-18

はそれぞれお互いの受容体の発現を亢進することが明らかとなった。この受容体の発現亢進により下流で働く転写因子 STAT4, NF- κ B の活性化時間の延長が確認された。

以上の結果から、炎症性サイトカインである IL-12 と IL-18 に晒された V γ 2 T 細胞はサイトカイン産生能の亢進や細胞傷害活性の獲得を介して、骨芽細胞を傷害する可能性が示唆された。

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)

Eisuke Domae, Yuya Hirai, Takashi Ikeo, Seiji Goda, Yoji Shimizu.

Cytokine-mediated activation of human ex vivo-expanded V γ 2 T cells.

Oncotarget, 査読有, 2017

DOI: 10.18632/oncotarget.17498

[学会発表](計 1 件)

堂前 英資、合田 征司、吉川 美弘、鎌田 愛子、池尾 隆、IL-12 と IL-18 は抗原非依存的にヒト V γ 2 T 細胞を活性化する、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年 8 月 16 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堂前 英資 (DOMAE, Eisuke)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 50454559

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし