

博士論文

癌細胞由来の新規炎症メディエーター、
乳酸の同定と、
その IL-23 依存的／非依存的 IL-17 産生
増強作用機構の解析

藪 政彦

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞構造学講座
(大阪府立成人病センター研究所)
(塩坂 貞夫 教授)

平成 22 年 12 月 21 日提出

目次

序論	3
第1章：癌細胞由来免疫調節因子、乳酸の IL-23p19 遺伝子 プロモーター活性への増強作用の解析	7
1-1. はじめに	8
1-2. 実験材料及び方法	9
1-3. 結果	11
1-4. 考察	19
第2章：乳酸による IL-23 依存的・非依存的 IL-17A 産生増強作用の解析	22
2-1. はじめに	23
2-2. 実験材料	24
2-3. 実験方法	27
2-4. 結果	31
2-5. 考察	64
謝辞	69
参考文献	70

序論

炎症反応は外来性病原体の感染だけではなく、自己免疫疾患や代謝異常、腫瘍、組織破壊の結果としてもたらされる自己由来成分によっても誘導されることがわかってきている。病原体の共通構造を認識する受容体として Toll-like receptor や NOD-like receptor、C 型レクチン受容体が既に知られている。近年、これらの受容体が自己由来成分、すなわち、High mobility group box 1 (HMGB1) や Sap130 (small nuclear riboprotein の構成成分) といった核内タンパク、そして尿酸や ATP など、遊離した細胞内成分を認識し、免疫系を活性化させて炎症を誘導することが報告されている(1-6)。

癌が慢性炎症の発症部位に頻繁に生じることと、免疫担当細胞が癌組織内にしばしば浸潤していることに基づき、癌と炎症は密接に関係しているのではないかと 19 世紀後半から考えられていた(7,8)。実際、(1) 慢性炎症は様々な癌の発症率を高める、(2) 非ステロイド型抗炎症剤は特定の癌において発症率を下げ、生存率を高める、(3) 動物実験モデルや臨床検体の癌組織において免疫担当細胞やケモカイン、サイトカインが確認される、(4) TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインや、NF- κ B などの炎症誘発に関わる転写因子を標的とした治療法は癌の発症率を下げ、腫瘍の成長を抑制する、(5) 炎症細胞の移植や炎症性サイトカインの過剰な発現は癌の発症率を高める、などが分かってきている。また、癌組織に浸潤した免疫担当細胞は炎症性サイトカインやケモカインを産生して血管内皮細胞や線維芽細胞に働きかけ、血管新生や組織再構築の誘導に関わっていることが分かっており、このような現象は慢性炎症や創傷治癒の時によく認められるものである。

近年、炎症性サイトカインの 1 つ、Interleukin-23 (IL-23) の発現が癌組織では著しく上昇しており、IL-23 は腫瘍の成長促進に働くことを Oft らが報告した(9)。また別のグループから、腫瘍浸潤マクロファージにおける IL-23 の発現が STAT3 依存的であり、この IL-23 により腫瘍浸潤 regulatory T 細胞において IL-10 産生が誘導されることが報告された(10)。しかしながら、彼らはどうして癌組織で IL-23 が高発現しており、それが腫瘍の成長促進に繋がるのかは明らかにはしていなかった。

IL-23 は p19 と、IL-12 と共通のサブユニット p40 とで構成されるヘテロ二量体であり(11)、単球・マクロファージや DC といった抗原提示細胞が Toll-like receptor (TLR) ligand 刺激による活性化に伴って発現・

分泌する炎症性サイトカインである(12)。その受容体もヘテロ二量体で、IL-12 receptor β 1 (IL-12R β 1) が p40 を、IL-23 receptor (IL-23R) が p19 を認識し、主に活性化 T 細胞に発現する(13)。このようなサブユニット及び受容体を IL-12 と共有するという構造上の共通点から、1 型 CD4⁺ ヘルパー T (Th1) 細胞を活性化し、この細胞からの IFN- γ 産生を誘導するといった、IL-12 と類似の生理活性を有することが予想されていた(14)。IL-23p19 ノックアウトマウスを用いた解析によって、多発性硬化症や結節性大腸炎等の自己免疫性疾患、感染防御や炎症誘発に関与すると考えられている(15-20)。さらに、IL-23 は抗癌免疫への関与も示唆されており、IL-23 の全身的な投与や、癌細胞での IL-23 の強制発現により担癌マウスで癌が退縮するという報告がある(21-23)。一方で、前述したように、IL-23 が癌組織で高発現しており、炎症を誘導することにより腫瘍の成長を促進する、との報告もある。

最近、これまでの CD4⁺ ヘルパー T 細胞、Th1 及び Th2 細胞に加え、その新しいサブセット、IL-17 産生 CD4⁺ helper T (Th17) 細胞が同定され、その naïve CD4⁺ T 細胞からの分化誘導には IL-6 と TGF- β が必須であることが報告された(24-27)。また、この Th17 細胞の機能維持に IL-23 を始め、IL-1 β や IL-21、IL-22 が必要、と考えられている(28,29,30,31)。IL-17 は IL-17A~F というアミノ酸配列のよく似た 6 種類のタンパク質から構成される炎症性サイトカインファミリーであるが、中でも IL-17A/F は活性化 CD4⁺ T 細胞からのみ分泌されるサイトカインである。IL-17A/F は好中球の分化誘導や細胞増殖、血管上皮細胞への血管新生、線維芽細胞の増殖などに働き、慢性炎症や自己免疫性疾患と関与するとされている(32)。このような活性をもつことから、IL-17 も癌との関わりが示唆されている。移植癌モデル実験において免疫能の低下したマウスを用いた論文では、癌細胞に IL-17 を強制発現させると、血管新生や matrix metalloprotease の発現が腫瘍組織に誘導され、IL-17 が腫瘍の成長促進に働くと報告された(33)。同様に、MB49 膀胱癌細胞の移植モデルでは、IL-17 あるいは IL-17 receptor ノックアウトマウスを用いると腫瘍の成長が抑制され、IL-17 は STAT3 依存的に IL-6 や VEGF を誘導することによって、炎症や血管新生を誘導して腫瘍の成長を促進すると報告されている(34)。一方で、免疫能の正常なマウスを用いた移植癌モデル実験の系では、癌細胞に IL-17 を強制発現させると癌の成長が抑制され、この作用は CTL 依存的であることが報告されている(35)。さらに MC38 大腸癌細胞や B16F10 メラノーマ細胞

の系では、IL-17 ノックアウトマウスで移植した癌の成長が促進すると報告されている(36,37)。このように、IL-17 は用いる実験系によって、癌に対して促進作用を、一方で抑制作用を示すと両方の報告があるが、おそらく免疫担当細胞に働くと抗腫瘍効果をもたらし、血管内皮細胞や線維芽細胞などの免疫系以外の細胞に働くと腫瘍の成長促進に繋がるのであろうと考えられている(38)。

当研究室では、肺癌細胞の培養上清が、Toll-like receptor (TLR)リガンドで活性化したマクロファージ・DC における IL-23p19 遺伝子の転写を増強する活性を有することを見出した。この培養上清中の増強因子を同定し、その機能を解析するために、私はヒト IL-23p19 遺伝子 5' 上流領域をルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポーター遺伝子アッセイ系を、J774.1 細胞株を用いて構築した。このアッセイ系により当研究室において、乳酸が TLR シグナルにより誘導される IL-23p19 遺伝子の発現を増強する活性を有することを発見した(39)。

正常細胞は細胞質内の解糖系によりグルコースをピルビン酸に代謝し、ミトコンドリア内のクエン酸回路・電子伝達系において酸素依存的に CO_2 と H_2O に代謝することで ATP を生産する。一方で、細胞は嫌気的条件下において、乳酸脱水素酵素 (Lactate dehydrogenase、LDH) によりピルビン酸から乳酸を生成する乳酸発酵により、NADH を NAD^+ を変換することにより ATP を生産する。乳酸は monocarboxylate transporters (MCTs) を介して、プロトン依存的に細胞内外を双方向性に輸送される(40)。癌細胞は好気的条件下であっても、解糖系の恒常的な活性化と TCA サイクルの抑制によって乳酸を分泌することが知られており、この現象は“Warburg Effect”と呼ばれている(41)。これまでの研究により“Warburg effect”に関わる分子機構は説明されてきている。Glucose transporter (GLUT) 1 の発現は hypoxia-inducible factor (HIF) -1 α や Akt により調節されている。グルコースをグルコース-6-リン酸に変換する反応を触媒する酵素、Hexokinase II の発現は p53 により負に調節されており、p53 の機能欠損によりその発現は上昇する。また c-Myc の恒常的な活性化により LDH-A の発現が上昇する。一般的に、癌細胞では p53 の機能欠損や c-Myc の恒常的な活性化はよく見られるものであり、“Warburg effect”は癌細胞に共通的な表現型と考えられている。過去の報告から、頭頸部癌や子宮頸部癌において乳酸は癌細胞の転移や担癌患者予後の悪化との関連性が言われている(42-46)。また他のグループから癌細胞由来の乳酸が、樹状細胞の機能に影響を与え、

CD8⁺ T 細胞の増殖と細胞障害活性を抑制することが報告されている(47,48)。これらのことから、乳酸は嫌氣的条件下の解糖系における単なる代謝最終産物であるだけでなく、免疫調節因子としても働き得ると考えられる。

最近、当研究室において、乳酸が、OT-II トランジェニックマウス脾細胞において TLR リガンド存在下で抗原刺激により誘導される IL-17 産生を IL-23 依存的に増強するという現象を発見した(39)。さらに、乳酸は TLR リガンド非存在下で抗原刺激依存的な IL-17 産生を IL-23 依存的に増強するという興味深い現象も見いだした。このことから私は、癌由来抗原による刺激を受けたマクロファージ・DC に、癌細胞由来の乳酸が癌局所で働き、これらの細胞からの IL-23 の分泌を増強することにより、IL-17 産生をより促進するという仮説を考えていた。

第 1 章では癌細胞由来の因子、乳酸による IL-23p19 のプロモーター活性を増強する作用機序について、今回構築したアッセイ系を用いて明らかにした事象について報告する。第 2 章では、乳酸が、抗原依存的な IL-17 産生の増強に働く過程で、IL-23 依存的な経路に作用するだけでなく、IL-23 非依存的な経路にも作用するといった非常に興味深い証拠が得られたので、報告する。

第 1 章

癌細胞由来免疫調節因子、乳酸の
IL-23p19 遺伝子プロモーター活性への
増強作用の解析

1-1. はじめに

当研究室において、肺癌細胞株の培養上清が IL-23p19 遺伝子の TLR リガンド刺激依存的な発現を増強することを見出した。その増強因子を探索し、作用機構を明らかにするため、私は J774.1 細胞株にて、ヒト IL-23p19 遺伝子プロモーター領域をもつレポーター遺伝子アッセイ系を構築した。このアッセイ系を用いて培養上清中の増強因子を探索した結果、当研究室で、乳酸が IL-23p19 遺伝子の発現を増強することを発見した。私は、乳酸が TLR リガンド刺激依存的な IL-23p19 遺伝子発現を増強するのに関与するシグナル経路を、レポーター遺伝子アッセイ系を用いて解析した。第 1 章では、この研究により得られた成果と、そこから私が考察した事柄について以下に報告する。

1 - 2 . 実験材料及び方法

細胞株及び細胞培養

マウスマクロファージ細胞株 J774.1 (RCB0434) は理化学研究所、バイオリソースセンター・細胞バンクより購入し用いた。ヒト肺腺癌由来細胞株、CADO-LC10 は大阪府立成人病センター、呼吸器外科、児玉憲博士より供与して頂いた(49)。

ヒト肺腺癌由来細胞株 CADO-LC10 は高グルコース (4.5 mg/ml) 含有 DMEM 培地を用いて培養した。マウスマクロファージ細胞株 J774.1 は、10%非働化 FCS、100 U/ml penicillin 及び 100 µg/ml streptomycin を添加した RPMI1640 培地で培養した。細胞培養は全て、5% CO₂、37°C の条件にて行った。

試薬及び抗体

L-lactic acid は Sigma 社から購入したものを用いた。TLR2 リガンドとして、*Streptococcus aureus* 由来 peptidoglycan (PGN) は sigma-aldrich 社より購入し用いた。

レポーター遺伝子コンストラクトの構築、ならびに J774.1 安定発現株の樹立

(1) IL-23p19 遺伝子 5'上流領域のクローニング、及びその領域を有するレポーター遺伝子コンストラクト

ヒト IL-23p19 遺伝子 5'上流領域において、翻訳開始点から -6654bp に位置する Sac I サイトまでの領域、長さ 6.7kbp の DNA 断片を、PCR 法を用いて増幅した。この 6.7kbp のクローニングには BAC クローン、RP11-348M3 (Accession No. AC025574) を PCR のテンプレートとし、PCR primer は次に挙げた配列のものを用いた。なお、各塩基配列において、大文字は遺伝子由来の配列を、小文字は末端に付加した配列を、下線部は用いた制限酵素認識配列を、括弧内は付加した配列を認識する制限酵素を示している。

ヒト IL-23 p19 上流領域 6.7kbp

5'- accatggTTTTGCCTTCTTCTCAAATCTGGCT -3' (Bgl II)

5'- aagatctCGATTCTCCTGCCTCAGCCTTCC -3' (Nco I)

得られた PCR 産物を pGL3 promoter vector (Promega 社) の Sac I 及び Nco I サイトにサブクローニングし、これを p19-5' 6.7k luc vector とした。この p19-5' luc vector を、制限酵素 Sac I 及び Xma I サイトにて切断し、T4 DNA polymerase を用いて末端平滑処理を施した後、self-ligation を行い、p19-5' 2.7k luc vector とした。さらに、pGKEM7-neoW vector より得られた PGK (phosphoglycerate kinase) プロモーター依存的に発現する neomycin 耐性遺伝子を含む DNA 断片を、制限酵素 Xho I 及び Bam HI サイトを用いて p19-5' 2.7k luc vector に挿入し、p19-5' 2.7k luc neo vector を作製した。

(2) 転写因子結合配列を有するレポーター遺伝子コンストラクト

TLR シグナル経路下流の主要な転写因子、NF- κ B の活性化について調べるため、次のようなプラスミドを作製した。以下に示すような標準的な NF- κ B 結合配列を 2 個有する合成オリゴヌクレオチドをアニーリングして Xho I, Sac II と同じ突出末端をもつ DNA 断片を作製した。

NF- κ B 結合配列 (下線部) をもつ合成オリゴヌクレオチドの配列

5'-TCGAGAAATGGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCGCAAACCG-3'

5'-GGTTTGCGAAAGTCCCCAGCGGAAAGTCCCCATTC-3'

※このオリゴヌクレオチドをアニーリングさせると、5'突出末端 TCGA と、3'突出末端 G を有する二本鎖 DNA が出来上がり、それぞれを制限酵素サイト Xho I、Sac II とライゲーションすることが可能になる。

この NF- κ B 結合配列を含む断片と、pNF- κ B-luc vector (Stratagene 社) 由来のミニマルプロモーターを含む Sac II と Nco I サイトで挟まれた DNA 断片とともに、pGL3 promoter vector の Xho I、Nco I サイトに挿入し、pGL3 2 κ B-luc vector とした。さらに、この pGL3 2 κ B-luc vector にも前述の p19-5' 2.7k luc vector と同様に neomycin 耐性遺伝子を含む断片を挿入し、pGL3-2 κ B neo vector を作製した。

また NF- κ B 以外に、TLR シグナル経路下流で標的遺伝子の転写制御に関わる経路、MAP kinase (MAPK)、あるいは IRF 経路の関与を調べるため、CRE (cAMP-responsible element)、AP-1 (activator protein 1)、ISRE (Interferon-stimulated response element) 領域をもったコンストラクトを以下のように作製した。pCRE-luc、pAP-1-luc、そして pISRE-luc

(いずれも Stratagene 社) より、タンデムに配置された転写因子結合配列とミニマルプロモーターを含む断片を、制限酵素サイト、Sac I と Nco I にて pGL4.17 vector (Promega 社) に挿入し、それぞれを pGL4 CRE luc neo vector、pGL4 AP1 luc neo vector、そして pGL4 ISRE luc neo vector とし作製した。

(3) J774.1 安定発現株の樹立

これらのプラスミドを以下の方法で J774.1 細胞株に遺伝子導入することにより安定発現株を樹立した。p19-5' 6.7k luc vector と pGKEM7-neoW vector とを二つ併せて、あるいは p19-5' 2.7k luc neo vector、pGL3-2κB neo vector、pGL4 CRE luc neo vector、pGL4 AP1 luc neo vector、そして pGL4 ISRE luc neo vector はそれぞれ単独で、J774.1 細胞株に Fugene 6 (Roche 社) あるいは Fugene HD を用いて遺伝子導入した。この J774.1 細胞を遺伝子導入 48 時間後に、G418 200 μg/ml にて選択することにより安定発現株を樹立した。

ルシフェラーゼアッセイ

前述の方法により樹立した J771.1 安定発現株を $0.5 \sim 1 \times 10^5$ cells/well にて 96 穴アッセイプレートに播種し、PGN 10 μg/ml、あるいは PGN と 15 mM 乳酸にて 24 時間刺激した。刺激後に細胞を Glo lysis buffer (Promega 社) を用いて溶解し、溶解液中のルシフェラーゼ活性を検出するために、次のようにして Bright-Glo luciferase assay system を用いて検出した。この細胞溶解液 10 μl と、同量の Bright-Glo reagent を白色 96 ウェルアッセイプレート上にて混合し、Mithras LB940 マルチモードプレートリーダーを用いて、ルシフェラーゼによる発光を 1 秒/サンプルにて測定した。

統計学的解析

サイトカイン産生量並びに遺伝子発現量の測定により得られたデータは全て、triplicate の mean value ± S.D. にてグラフに示した。有意差検定は Student's *t* test にて行った。全ての提示したデータは、少なくとも 2 回の独立した実験の内、一方の結果を示している。

1-3. 結果

1-3-1. ヒト IL-23p19 遺伝子上流領域のクローニングとレポーター遺伝子アッセイ系の構築

Toll-like receptor (TLR) リガンド刺激により単球やマクロファージ、樹状細胞では IL-23p19 遺伝子の転写が誘導される。当研究室では、肺癌細胞株の培養上清がヒト IL-23p19 遺伝子の転写活性を増強することを見出していた。そこで、ヒト IL-23p19 遺伝子の 5' 上流領域に、培養上清中の因子からのシグナルに応答する DNA エlement が存在すると考え、この Element を同定することにより増強因子からのシグナル経路を明らかにしようと試みた。

増強因子からのシグナルに応答する DNA Element の同定を目的としたレポーター遺伝子アッセイ系を構築するために、ヒト IL-23p19 遺伝子 5' 上流領域をクローニングし、この領域をルシフェラーゼ遺伝子に繋いだコンストラクトを作製した (図 1-3-1.)。ヒトあるいはマウス由来の単球・マクロファージ系細胞株を数種類用い、肺癌細胞株の培養上清に対する応答を調べた結果、ヒト由来では THP-1 と MonoMac 6、そしてマウス由来では RAW264 と J774.1 細胞株が培養上清に反応し、TLR リガンド刺激により誘導される IL-23p19 遺伝子の転写活性が上昇した。これら 4 つの細胞株のうち、IL-23 産生量が増強したのは、J774.1 細胞株のみであった。このことから、前述のコンストラクトを有するプラスミドを J774.1 細胞株に遺伝子導入し、安定発現株を作製した。この安定発現株は TLR リガンドである PGN による刺激に反応して、ルシフェラーゼ活性が上昇した (図 1-3-2. 左図)。

1-3-2. J774.1 レポーター遺伝子アッセイ系による肺癌細胞株培養上清中の増強因子、乳酸の同定

共同研究者が、この J774.1 細胞を用いたヒト IL-23p19 遺伝子プロモーター領域をもつレポーター遺伝子アッセイ系により、培養上清中の増強因子を同定しようと試みた (39)。増強因子の性状について精査した結果、増強因子は、(1) 分子量 500 Da 以下、(2) 加熱処理耐性、(3) Proteinase K 処理耐性、(4) 培地中のグルコース濃度の上昇に応じて培養上清の活性が上昇したこと、(5) 細胞外 pH 依存的な増強作用、を有することがわかった。これらの事実より増強因子の候補として乳酸が示唆されたため、精製標品を用いると、乳酸は TLR リガンド刺激によ

る IL-23p19 のプロモーター活性を増強した (図 1-3-2. 左図) だけではなく、生細胞における IL-23p19 の遺伝子発現も増強した。また、siRNA や阻害剤により肺癌細胞株の LDH 活性を抑制すると、その細胞の培養上清では増強活性がほぼ消失し、このことは、癌細胞由来の乳酸が増強因子であることを支持している。

1-3-3. 乳酸は TLR リガンド刺激による NF- κ B の活性化には影響を及ぼさない

TLR シグナル経路では、TLR のアダプター分子である MyD88 を介して NF- κ B が主に活性化し、TLR シグナルの標的遺伝子である炎症性サイトカインの転写が誘導される。また、転写因子結合配列予測プログラム、TFSEARCH を利用した TRANSFAC データベース (50) (<http://www.rwcp.or.jp/papia/>) を用いて転写因子結合配列を検索したところ、4つの NF- κ B 結合サイトが、この 5'上流領域 2.7kbp 内に存在すると予想され、IL-23p19 遺伝子の転写に働くと考えられた (図 1-3-1.)。この TLR シグナル下流の主な転写因子、NF- κ B が乳酸の増強作用に関わるかどうかを調べるために、典型的な NF- κ B 結合配列を 2 つもつレポーター遺伝子コンストラクトを、J774.1 細胞株に導入し、安定発現株 J774.1 2 κ B luc を樹立した (図 1-3-2. 右図)。この細胞株を PGN、あるいは PGN と乳酸により刺激すると、PGN 刺激に応答してルシフェラーゼ活性は上昇した。乳酸単独刺激ではルシフェラーゼ活性に変化はなく、また PGN との共刺激時では乳酸による増強効果は全く認められなかった (図 1-3-2. 右)。この結果から、乳酸は、TLR リガンド刺激により誘導される NF- κ B の活性化には関与しないことが示唆された。

1-3-4. 乳酸は CREB、AP-1 及び IRF 非依存的に、IL-23p19 遺伝子のプロモーター活性を増強する

TLR シグナル経路下流では NF- κ B 経路だけではなく、MAP kinase、あるいは IRF (Interferon-responsible factor) 経路も標的遺伝子の転写制御に関わっており、activated protein 1 (AP-1) や cAMP response element-binding protein (CREB)、interferon regulatory factor (IRF) を活性化する。そこで、これらの転写因子が乳酸による増強作用に関与するかどうかについて調べるため、各転写因子に対する一般的な結合配列をもつレポーター遺伝子コンストラクトを作製した。これらのコンストラクトを J774.1 細胞に遺伝子導入し、それぞれの安定発現株、

J774.1 CRE luc、J774.1 AP-1 luc、並びに J774.1 ISRE luc を樹立し、PGN あるいは PGN と乳酸にて刺激した (図 1-3-3.)。その結果、いずれの細胞株も PGN 刺激に応答して、ルシフェラーゼ活性は上昇した。また J774.1 2κB luc の場合と同様に、乳酸による増強効果は全く認められなかった。これらの結果から、

1-3-5. 乳酸からのシグナルに応答する DNA エLEMENT は IL-23p19 遺伝子 5'上流領域 2.7kbp に存在する

さらに、乳酸に応答する IL-23p19 プロモーター領域を狭めるために、5'上流領域のより短いフラグメント p19-5' 2.7k を有するコンストラクト、p19-5' 2.7k luc をもつ安定発現株である J774.1 p19-5' 2.7k luc を樹立した (図 1-3-4.)。その結果、この細胞株は PGN 刺激に対して応答してルシフェラーゼ活性は上昇し、乳酸存在下ではさらに増強した。このことから、乳酸からの増強シグナルに応答する DNA エLEMENT は、ヒト IL-23p19 遺伝子の 5'上流領域 2.7kbp 内に存在することが確認出来た。

Human *IL23A* locus

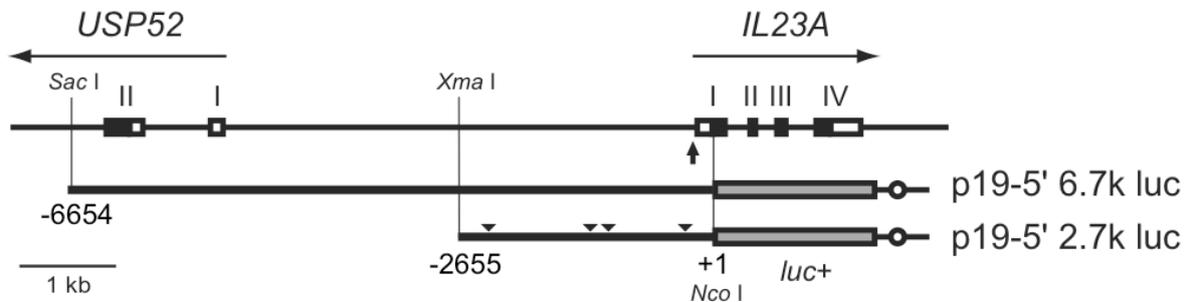


図 1-3-1. ヒト *IL-23p19* (*IL23A*) 遺伝子座、及びその 5'上流領域、同遺伝子由来 5'上流領域を有するレポーター遺伝子コンストラクトの構造の模式図

ヒト *IL-23p19* 遺伝子 5'上流領域には別の遺伝子、*USP52* 遺伝子座が存在する。翻訳開始点 (+1) はそれぞれのコンストラクトに示してある。またこの図には非翻訳領域 (□)、*IL-23p19* 及び *USP52* 遺伝子エクソンのコード領域 (■)、ルシフェラーゼ遺伝子 (■)、SV40 由来ポリ A シグナル (○) 及び TATA ボックス (↑) が示されている。翻訳開始点から *Sac* I サイトまでの領域、6,654 bp をルシフェラーゼ遺伝子に連結したコンストラクトを p19-5' 6.7k luc とした。さらに、同じく翻訳開始点から *Xma* I サイトまでの領域、2,655 bp をルシフェラーゼ遺伝子に連結したコンストラクトを p19-5' 2.7k luc とした。

また、TRANSFAC データベース検索より、5'上流領域 2.7kb 上において、4 つの NF- κ B 結合サイト (▼) が翻訳開始点よりそれぞれ、(1) -2311 ~ -2302、(2) -1261 ~ -1252、(3) -1049 ~ -1040、(4) -256 ~ -245、に位置すると予測された。

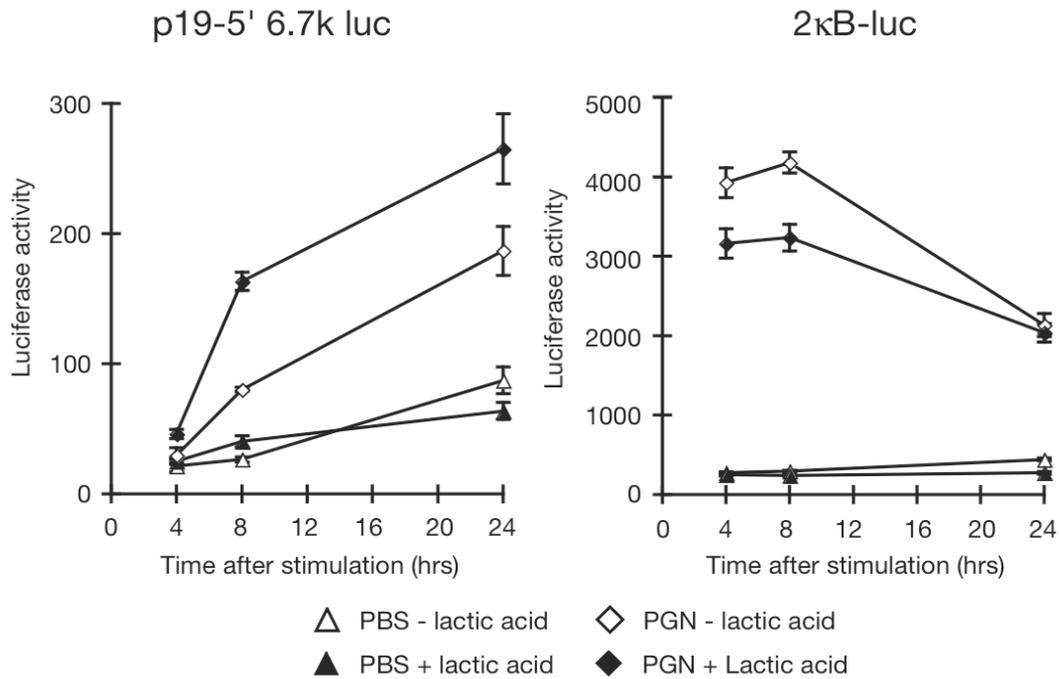


図 1-3-2. 乳酸は TLR リガンド 刺激により誘導されるヒト IL-23p19 遺伝子のプロモーター活性を増強するが、NF-κB の活性化には影響しない

J774.1 p19-5' 6.7k luc 細胞株を 15 mM 乳酸の存在下にて 10 μg/ml PGN で刺激した (左)。4 または 8、24 時間刺激した後に、この細胞におけるルシフェラーゼ活性を測定した。また、NF-κB 結合配列を有するコンストラクトを導入した、J774.1 2κB-luc 細胞株を作製した (右)。この細胞を J774.1 p19-5' 6.7k luc 細胞株と同様に刺激し、ルシフェラーゼ活性を検出した。各グラフに示したデータは平均値±標準偏差 (n=3) で示してある。なお、同じコンストラクトを導入した細胞株を少なくとも 2 つ作製しており、同様の結果が得られているが、それらの内の 1 つの結果を示した。

J774.1 p19-5' 6.7k luc 細胞株ではルシフェラーゼ活性は刺激時間の長さに応じて PGN 刺激により上昇し、この活性は乳酸存在下ではさらに増強した。一方、J774.1 2κB-luc 細胞株では、PGN 刺激によりルシフェラーゼ活性は上昇するが、乳酸によるルシフェラーゼ活性の増強効果は認められなかった。

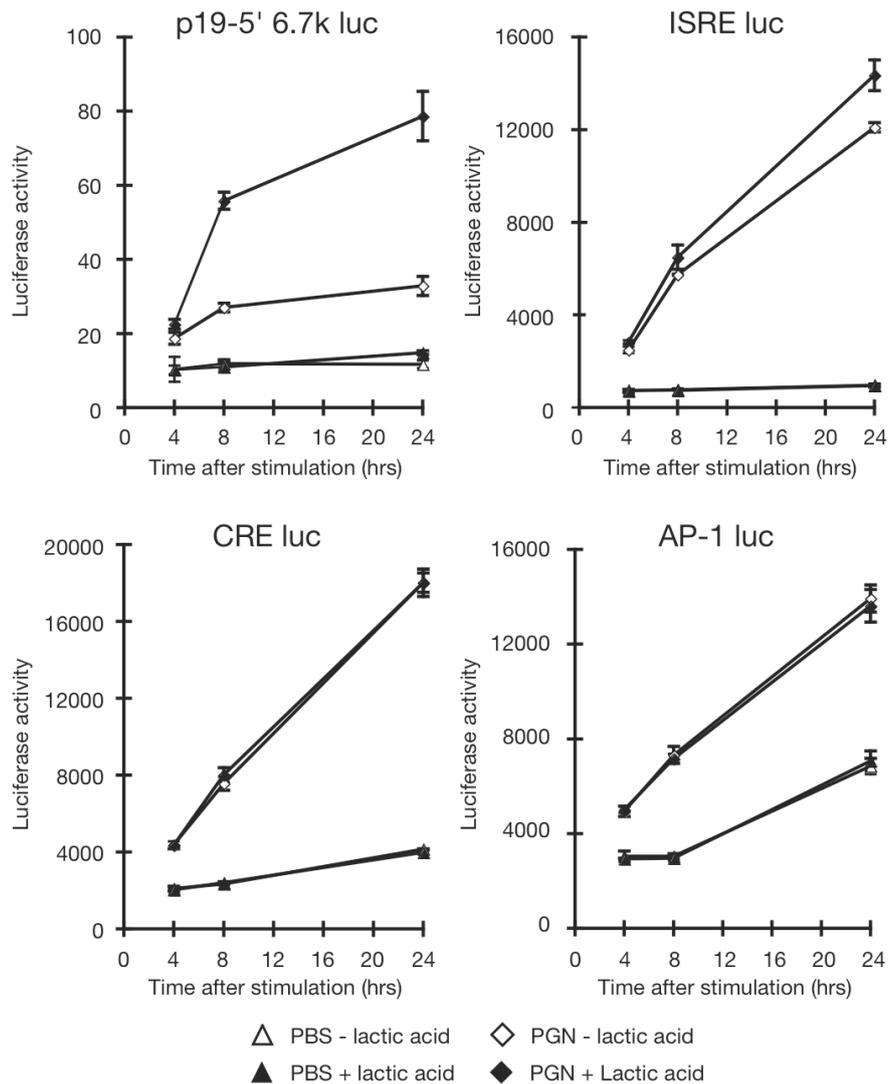


図 1-3-3. 乳酸は ISRE、CRE、AP-1 非依存的に、IL-23p19 遺伝子のプロモーター活性を増強する

TLR シグナル経路下流で関わる NF- κ B 以外の転写因子の関与を調べるため、J774.1 細胞に ISRE luc、CRE luc、そして AP-1 luc それぞれを導入し、安定発現株を作製した。前述の J774.1 p19-5' 6.7 luc 細胞株と同時に、これらの安定細胞株を 10 μ g/ml PGN、あるいは PGN と乳酸で刺激した。刺激してから 4、8 そして 24 時間後に、各細胞株におけるルシフェラーゼ活性を測定した。各グラフに示したデータは平均値 \pm 標準偏差 (n=3)で示してある。なお、同じコンストラクトを導入した細胞株を少なくとも 2 つ作製し、同様の結果が得られているが、それらの内の 1 つの結果を示した。

同時に行った IL-23p19 のプロモーター活性は乳酸により増強した一方、J774.1 安定発現株 ISRE luc、CRE luc、並びに AP-1 luc におけるルシフェラーゼ活性は PGN 刺激に反応し、刺激時間の長さに応じて上昇したにも関わらず、乳酸では増強しなかった。

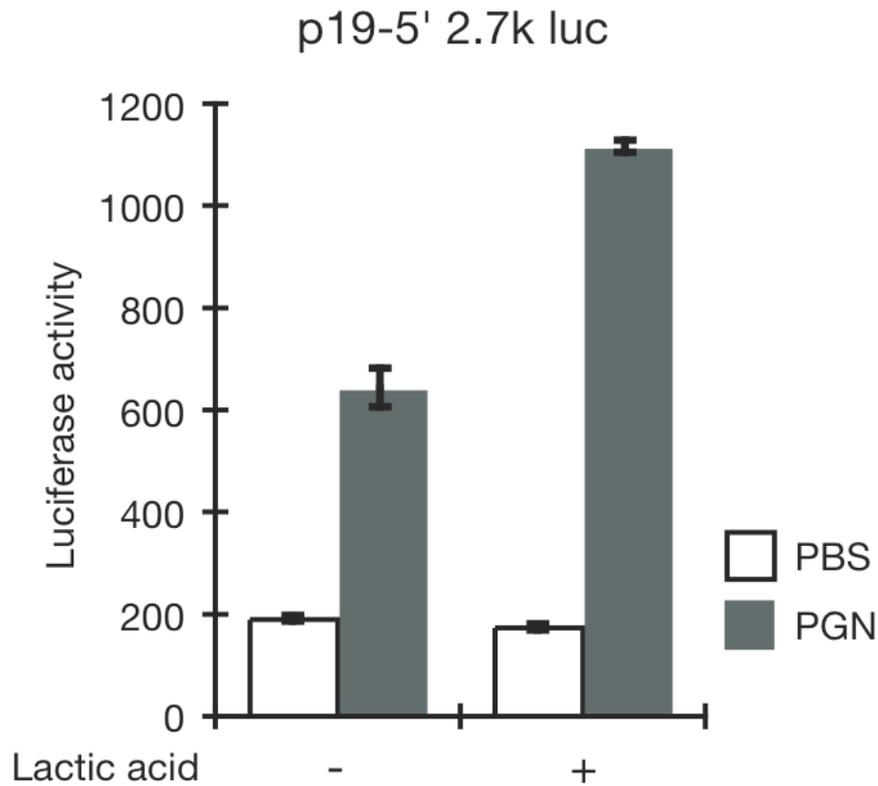


図 1-3-4. 乳酸からのシグナルに応答し、TLRシグナル増強に関わる DNA エレメントは p19-5'上流領域 2.7k 上に存在する

ヒト IL-23p19 5'上流領域を 6.7kbp よりさらに短くしたものをルシフェラーゼ遺伝子に繋いだコンストラクト、p19-5' 2.7k luc を作製した。これを J774.1 細胞株に遺伝子導入し、安定発現株 J774.1 p19-5' 2.7k luc を樹立した。15 mM 乳酸の存在下にて 10 μ g/ml PGN で刺激し、24 時間後に、この細胞におけるルシフェラーゼ活性を測定した。なお、グラフに示したデータは平均値 \pm 標準偏差 (n=3) で示してある。また同じコンストラクトを導入した細胞株を少なくとも 2 つ作製しているが、それらの内の 1 つの結果を示した。

J774.1 p19-5'2.7k luc 細胞株におけるルシフェラーゼ活性は PGN 刺激により上昇し、この活性は乳酸存在下ではさらに増強した。

1 - 4 . 考 察

本研究では、乳酸からの増強シグナルに応答する DNA エlement がヒト IL-23p19 遺伝子の 5' 上流領域 2.7kbp 上に存在することを見出した。また、この 5' 上流領域には、4 つの NF- κ B 結合サイトが存在することが予測されたが、NF- κ B シグナル経路は TLR シグナル経路の下流で重要な働きをするにも関わらず、乳酸は、典型的な NF- κ B 結合配列をもつルシフェラーゼの活性を増強しなかった (図 1-2, 右図)。従って、乳酸からのシグナルは NF- κ B シグナル経路に非依存的であると考えられる。また、TLR シグナル経路下流では NF- κ B 以外に、CREB や AP-1、IRF が活性化し、標的である炎症性サイトカイン遺伝子の転写を誘導する。これらの転写因子により誘導されるルシフェラーゼ活性は TLR リガンド刺激に反応して上昇したにも関わらず、乳酸はこの活性を増強しなかった。

実際、MAPK 経路は乳酸からのシグナルに関与しなかった。このレポーター遺伝子アッセイ系において、TLR リガンド刺激により誘導される IL-23p19 遺伝子のプロモーター活性に対する乳酸の増強効果は、p38 MAPK 特異的阻害剤 SB203580、ならびに Erk1/2 特異的阻害剤 PD98059 では阻害されず、これらの経路は乳酸からのシグナルに関与しないことが示唆された (未掲載データ)。

当研究室において、乳酸は pH 依存的に細胞内に輸送され、IL-23p19 のプロモーター活性を増強することが確かめられた (39)。このことから、乳酸は細胞内に輸送されて、IL-23p19 遺伝子の転写を増強すると考えられる。MCT を介して細胞内に過剰に乳酸イオンが取り込まれると、細胞内に存在するセンサー分子が乳酸を認識して活性化し、その分子からのシグナルが直接、あるいは間接的に IL-23p19 遺伝子の転写を増強するかもしれない。この分子からのシグナルは TLR シグナルとクロストークするかもしれないが、先に述べたように乳酸は、TLR シグナル下流で標的遺伝子の転写を制御する既知の転写因子、NF- κ B、CREB、AP-1、そして IRF の活性化には影響しなかった。このことから、これら以外の転写因子が TLR シグナル下流の転写因子と協調的に働いて IL-23p19 遺伝子のプロモーター活性を増強し、その転写を促進すると考えられる。乳酸からのシグナルに反応する DNA エlement を追求するため、さらに、p19-5' 上流領域 2.7kbp を 5' 末端より 200 bp ずつ短くした領域をもつルシフェラーゼ遺伝子コンストラクトを作製し、各領

域のプロモーター活性に対する乳酸による増強作用を調べた。その結果、領域が短くなるのに伴い、増強作用は徐々に減少していき、乳酸からのシグナルに応答する DNA エlement を同定するまでに至らなかった。これらのことから、乳酸からのシグナルによる IL-23p19 遺伝子のプロモーター活性への増強作用はいわゆる、各転写因子群がプロモーター領域上の DNA エlement に結合することによって標的遺伝子の転写が誘導される、といった既知の遺伝子発現調節機構には則さないものと考えられる。従って、乳酸からのシグナルは、遺伝子発現を制御する他の分子機構、ヒストン H3 分子のアセチル化などに影響を与え、クロマチンの再構築に関与する、と考えられる。

解糖系ではグルコースはピルビン酸へと代謝される。嫌気的条件下において細胞は、このピルビン酸を LDH により乳酸へと代謝する経路で、NADH を NAD^+ へ変換するのに必要な ATP を確保する。生成された乳酸イオンはモノカルボン酸トランスポーター (MCT) を通じて、プロトンと共に細胞外に排出される。つまり、MCT を介した乳酸イオンの輸送は細胞膜内外における pH 勾配に依存する。乳酸は前述のように解糖系の最終産物であるが、乳酸が細胞内に大量に流入した場合、ピルビン酸から乳酸を生成する乳酸発酵経路の反応は可逆反応であるため、化学平衡が乳酸側に傾き、流入した乳酸からピルビン酸が生成されることが考えられる。実際に、肝細胞は糖新生の過程で、筋肉組織で生成され血流により運ばれてきた乳酸を取り込み、ピルビン酸へと変換する。免疫担当細胞が、細胞外に大量の乳酸が存在する時に同じ過程をとり、ピルビン酸を生成し得るとすれば、細胞の代謝が亢進し、サイトカイン産生能の上昇につながるかもしれない。事実、T 細胞は抗原刺激により活性化するために CD28 からのシグナルを必要とするが、このシグナルにより T 細胞において Akt が活性化し、GLUT1 の発現を誘導する (51-53)。活性化した CD8^+ 細胞傷害性 T 細胞は IFN- γ や perforin、granzyme B の産生に解糖系を介して生産される ATP を要求する。また解糖系の阻害剤である 2-deoxyglucose は単球において LPS 刺激により誘導される TNF- α 産生を阻害する (47)。

今回、構築した IL-23p19 遺伝子 5' 上流領域をもつレポーター遺伝子アッセイ系により、乳酸からのシグナルは、転写因子を介した既知の遺伝子発現調節機構には関与せず、他の分子機構により遺伝子発現を調節する可能性が示唆された。免疫担当細胞、特に単球・マクロファージにおけるエネルギー代謝と、サイトカイン産生との間に関わる分

子機構については今だほとんどわかっておらず、この分野を研究することで、細胞外環境を認識して免疫機能を調節する新しい分子機構を見出すことができるかもしれない。従って、今後は、乳酸が免疫担当細胞内で働き、その免疫機能を調節する分子機構を明らかにしていきたいと考えている。

第 2 章

乳酸による IL-23 依存的・非依存的な IL-17A 産生増強作用

2-1. はじめに

前章で紹介した、J774.1細胞株におけるヒト IL-23p19 遺伝子 5'上流領域を用いたレポーター遺伝子アッセイ系により、肺癌細胞株培養上清中の IL-23p19 遺伝子発現への増強因子は乳酸であることが当研究室で確かめられた。さらにこの過程で、乳酸が IL-23 依存的に、抗原刺激により誘導される IL-17 産生を増強することが見出された。この章では、この現象に関わる作用機序を明らかにするために行った研究により、興味深い結果が得られたため、その成果について報告するとともに、そこから私が考察した内容について紹介する。

2-2. 実験材料

マウス

C57BL/6 マウスは日本クレアから購入した。OVA 特異的 MHC クラス II 拘束性 TCR $\alpha\beta$ 遺伝子トランジェニック (OT-II) マウス(54)は W. R. Heath 博士 (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, Australia) より供与された。Myd88(C57BL/6) (55)、Card9(C57BL/6) (56)の各遺伝子ノックアウトマウスはそれぞれ、審良静男教授 (大阪大学微生物病研究所)、斉藤隆教授 (理研・免疫アレルギー科学総合研究センター) より供与された。これらのマウスは全て、大阪府立成人病センター研究所動物実験施設内の特定病原体除去領域にて維持・管理を行った。全ての動物実験は大阪府立成人病センターの動物実験指針、並びに同センター動物実験委員会の許可に基づいて行われた。

試薬及び抗体

L-lactic acid は Sigma 社から、OVA₃₂₃₋₃₂₉ ペプチドは Bio synthesis 社から、phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) 及び ionomycin は Calbiochem 社から、5(6)-carboxyfluorescein diacetate - N - hydroxy-succinimide ester (CFSE) は同仁化学薬品から購入したものを用了。脾細胞からの免疫担当細胞の分画には抗 CD11b、抗 CD11c、抗 CD62L、抗ビオチンの各抗体結合 microbeads、そして CD4⁺ T cell isolation kit を Miltenyi Biotec 社より購入し用了。骨髓細胞からのマクロファージあるいは樹状細胞の誘導にはそれぞれ、recombinant mouse macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)、recombinant mouse granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)を Peprrotech 社より購入し用了。IL-12p40 サブユニットを含むサイトカインの関与を調べるため、IL-12p40 homodimer を Biolegend 社より、IL-12p70 及び IL-23 を Peprrotech 社より購入し用了。IL-1 の関与を調べるために IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1RA) を R&D 社より購入し用了。抗体は特に記述のない限り、以下のリストに示したものを eBioscience 社から購入し用了が、細胞培養には Functional Grade (endotoxin-free and sodium azide-free grade) のものを用了。

サイトカイン中和抗体

抗 IL-1 β 抗体(クローン: B122、Armenian hamster IgG)
抗 IL-12/23p40 抗体(クローン: C17.8、Rat IgG2a、 κ)
抗 IL-23p19 抗体(クローン: G23-8、Rat IgG1、 κ)
抗 IL-23p19 抗体 (Goat IgG、R&D systems)
抗 IL-23R 抗体 (クローン: 258010、Rat IgG2b、R&D systems)
Armenian hamster IgG isotype control (クローン: eBio299Arm)
Rat IgG1、 κ isotype control (クローン: eBRG1)
Rat IgG2a、 κ isotype control (クローン: eBR2a)
Rat IgG2b、 κ isotype control (クローン名なし)

細胞表面タンパク質の発現の検出

ビオチン標識抗 CD3 ϵ 抗体 (クローン: 145-2C11)
PE 標識抗 CD4 抗体 (クローン: GK1.5)
FITC 標識抗 CD11b 抗体 (クローン: M1/70)
PE 標識抗 CD11c 抗体 (クローン: HL3)
FITC 標識抗 CD62L 抗体 (クローン: MEL-14)
ビオチン標識抗 F4/80 抗体 (クローン: BM8)
PE 標識抗 Gr-1 抗体 (クローン: RB6-8C5)

細胞内サイトカイン産生の検出

FITC または APC 標識抗 IFN- γ 抗体 (クローン: XMG1.2)
APC 標識抗 IL-17A 抗体 (クローン: eBio17B7)
Alexa Fluor 647 標識抗 IL-17A 抗体 (クローン: TC11-18H10)

CD40-CD40L を介した細胞間相互作用

抗 CD40 刺激抗体(クローン: HM40-3)
抗 CD40L 阻害抗体(クローン: MR1、Armenian hamster IgG)
Armenian hamster IgG isotype control (クローン: eBio299Arm)

試薬その他

各種バッファ類は以下に示した組成のものを調整し用いた。

脾細胞からの免疫担当細胞の分画

ACK lysing buffer

: 150mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM EDTA, pH7.3

MACS buffer : 1% FCS 及び 0.05% EDTA 添加 Dulbecco's PBS (-)

MACS labeling buffer

: 1% normal rat serum 添加 MACS buffer (抗原提示細胞の分画)

: 10% FCS 添加 RPMI1640 培地 (CD4⁺ T 細胞の分画)

蛍光標識抗体による細胞表面抗原や細胞内サイトカイン染色

FACS buffer : 5% BSA 及び 0.05% NaN₃ 添加 Dulbecco's PBS (-)

Fixation buffer : 4% PFA 添加 Dulbecco's PBS (-)

Staining buffer: 1% FCS 及び 0.05% NaN₃ 添加 Dulbecco's PBS (-)

その他、実験に用いた 2-mercaptoethanol や HEPES、100% ethanol は細胞培養グレード、あるいは試薬特級のものを購入し用いた。

2-3. 実験方法

細胞培養

OT-II トランスジェニックマウス由来脾細胞、または C57BL/6、OT-II 各マウスの脾細胞から精製した各細胞画分は、10% 非働化 FCS、100 U/ml penicillin 及び 100 µg/ml streptomycin を添加した RPMI1640 培地で培養した。マウス骨髄細胞は前述の培地に 10 mM HEPES と 55 µM 2-mercaptoethanol を加えたものを用いて培養した。細胞培養は全て、5% CO₂、37°C の条件にて行った。

脾細胞からの免疫担当細胞の分画

C57BL/6、OT-II 各マウス腹腔内より脾臓を摘出した後、滅菌スライドガラスを用いて搗り潰し、ACK lysing buffer を用いて溶血することにより赤血球を除去した。溶血処理をした脾細胞を 40 µm セルストレーナーにて濾過し、線維組織などを除去した。このようにして、C57BL/6 あるいは OT-II 各マウス由来脾細胞は調整し、実験に用いた。

CD11b⁺、CD11c⁺各画分は C57BL/6 マウス脾細胞をそれぞれ、CD11b、又は CD11c microbeads にて標識した後、MidiMACS separator と LS カラムを用いて分離した。カラムを通過した flow-through はそれぞれ、CD11b⁻、CD11c⁻画分とし、カラムに残存した画分を CD11b⁺、CD11c⁺画分として回収した (positive selection 法)。F4/80⁺画分は、ビオチン化抗 F4/80 抗体と抗ビオチン抗体標識 microbeads を用いて positive selection 法により精製した。CD11b⁺/c⁻、CD11b⁻/c⁺各画分は前述の positive selection に伴う flow-through を用い(negative selection 法)、それぞれに対して CD11b、又は CD11c microbeads を用いた positive selection 法を再度行うことにより精製した。CD11b⁻/c⁻画分は CD11b 及び CD11c microbeads を用いた negative selection 法により精製した。各画分の純度は FACScalibur system(BD bioscience 社)により確認した。

OT-II マウス由来 CD4⁺ T 細胞は CD4⁺ T cell isolation kit (Miltenyi biotech 社) を用い、次のように分離・精製した。OT-II マウスより採取した脾細胞を 2.5 × 10⁸/ml にて 10%FCS 添加 RPMI1640 培地に懸濁し、この細胞懸濁液に、細胞 10⁸ 個に対して 100 µl の CD4⁺ T cell Biotin-Antibody cocktail を加え、4°C にて 15 分間静置した。さらに細胞 10⁸ 個に対し、300 µl の 10%FCS 添加 RPMI1640 培地と、200 µl の anti-biotin microbeads を加えて、4°C にて 10 分間静置した。このように処理した細胞を 6 ml の 10%FCS 添加 RPMI1640 培地に懸濁し、2 ml ず

つ LD カラムを通した。さらに 6 ml の 10%FCS 添加 RPMI1640 培地を 2 ml ずつ LD カラムを通し、カラム未結合の細胞を洗い出した。これらの素通り画分を CD4⁺ T 細胞として精製した。なお、FACScalibur system により純度を調べたが、この画分における CD3⁺/CD4⁺の細胞の割合は 90%以上であった。naïve 又は effector/memory CD4⁺ T 細胞は、前述の方法で CD4⁺ T 細胞を CD4⁺ T cell isolation kit にて精製した後、CD62L microbeads を用いた positive 又は negative selection 法により精製した。また、CD4⁺ T 細胞の抗原刺激依存的な細胞増殖を測定するために、5% FCS と 5 μM CFSE を添加した D-PBS(-)中に、精製 CD4⁺ T 細胞を 5 × 10⁶/ml にて懸濁し、室温で 5 分間静置することにより蛍光標識した。

Bone marrow-derived macrophage(BMDM)、並びに dendritic cell(BMDC)の誘導

骨髄細胞は C57BL/6 マウス大腿骨より単離した。この細胞を、BMDM 誘導には 50 ng/ml mouse M-CSF を、BMDC 誘導には 10 ng/ml mouse GM-CSF を加えた培地で 5 日間培養した(57,58)。培地交換は 2 日毎に行い、細胞は 5 日目に回収したものを実験に用いた。回収した細胞は CD11b、CD11c、Gr-1、F4/80 の各細胞表面分子の発現を FACS にて測定することによって、BMDM 又は BMDC への分化誘導を確認した。

in vitro-differentiated Th17 細胞の誘導

抗 CD3ε 抗体と抗 CD28 抗体でコートした培養ディッシュ、またはプレートは、10 μg/ml 抗 CD3ε 抗体(クローン：145-2C11)及び 10 μg/ml 抗 CD28 抗体(クローン：37.51)を加えた PBS (-) 溶液を培養容器に入れ、この容器を 4°C にて一晩(12 時間以上)静置することにより、準備した。OT-II マウス由来 naïve CD4⁺ T 細胞を前述の方法で精製した後、抗 CD3ε 抗体と抗 CD28 抗体でコートした培養ディッシュ、またはプレート内で、2 ng/ml human TGF-β1、20 ng/ml mouse IL-6 を加えた 10% FCS 添加 RPMI1640 培地中で 4~5 日間、培養することにより、in vitro-differentiated Th17 細胞を誘導した(24,26,59)。培養してから 5 日後に、細胞を回収し、細胞内タンパク輸送阻害剤 Brefeldin A 存在下に 50 ng/ml PMA 及び 750 ng/ml ionomycin により 5 時間再刺激を行い回収した。回収した細胞は PE 標識抗 CD4 抗体にて染色した後、4% paraformaldehyde 添加 PBS (-) 溶液に懸濁して 4°C にて 20 分間、あるいは一晩静置し、固定した。固定した細胞に対し、BD Cytotfix/CytoPerm

kit を用いて膜透過処理を行い、FITC 標識抗 IFN- γ 抗体 (XMG1.2) または APC 標識抗 IL-17A 抗体 (eBio17B7) にて染色した。染色した細胞における細胞表面 CD4、並びに細胞内サイトカインの発現は、FACS により測定した。

Cytokine production assay

脾細胞から精製した抗原提示細胞の各画分、BMDM 又は BMDC は、OT-II 由来の CD4⁺ T 細胞、あるいは *in vitro*-differentiated Th17 細胞と U 底 96 ウェルプレートにおいて混合培養し、15 mM L-lactic acid 存在下又は非存在下にて 200 ng/ml OVA peptide にて刺激し、12 時間又は 4 日間培養した。培養プレートを 600 × g にて 10 分間遠心することにより細胞を除き、その上清を培養上清として回収して、凍結保存した。培養上清中の炎症性サイトカインの産生量はそれぞれ、Mouse IL-1 β 、IL-12/23p40、IL-23 ELISA kit (Biosource 社)、または Quantikine Mouse IL-17 ELISA kit (R&D systems) を用いて、サンドウィッチ ELISA 法にて測定した。各サイトカインの産生量は試料と同時に測定した精製標品の検量線に基づいて、定量した。抗原刺激後の CD4⁺ T 細胞のサイトカイン産生能を調べるために、刺激 4 日目に細胞を回収し、前述のように再刺激と細胞内サイトカイン染色を行い、FACS にて測定した。

Real-time RT-PCR

RNA を抽出するために、2-mercaptoethanol を加えた SV RNA lysis buffer (Promega 社) を用いて、刺激した細胞を溶解した。SV96 total RNA isolation kit (Promega 社) を用いて付属マニュアルに従って細胞溶解液より抽出・精製し、ゲノム DNA を除くために RNase-free DNase I 処理を施した。cDNA は PrimeScript RT reagent kit (Perfect real time) (Takara Bio 社) を用いて、37°C・15 分間→85°C・5 秒間の反応により合成した。Real-time PCR は Taqman gene expression master mix、Taqman gene expression system 及び ABI 7500 real-time PCR system、あるいは ABI StepOne real-time PCR system (いずれも Applied Biosystems 社) を用い、1) 50°C・2 分・1 サイクル→2) 95°C・10 分・1 サイクル→3) 95°C・15 秒・40 サイクル→4) 60°C・1 分・40 サイクル・蛍光検出、以上 4 段階の反応プロトコールにて行った。なお、各遺伝子に対応する Taqman probe・primer セットは、次に列挙したアッセイ番号のものを用いた。

Taqman probe・primer セット

Mouse interleukin-1 β ; *Il1b* : Mm00434228_m1

Mouse interleukin-6; *Il6* : Mm99999064_m1

Mouse interleukin-12/23p40; *Il12b* : Mm99999067_m1

Mouse interleukin-17A; *Il17a* : Mm00439619_m1

Mouse interleukin-23p19; *IL23a* : Mm00518984_m1

eukaryotic 18S rRNA : 4352930E

各遺伝子の発現量は 18S rRNA の発現量にて標準化し、 $\Delta\Delta\text{Ct}$ method を用いた相対定量法にて算出した(60)。

活性化 NF- κ Bp52 または p65 の検出

精製した CD11b⁺細胞と CD4⁺T 細胞を共培養し、15 mM L-lactic acid 存在下あるいは非存在下で 200 ng/ml OVA ペプチドにて刺激した。6 時間刺激を行った後、核抽出物を Nuclear Extract kit を用いて分画した。転写因子 NF- κ B p52 あるいは p65 の DNA 結合活性はそれぞれ、TransAM NF- κ B Chemi p52 kit、TransAM NF- κ B p65 kit を用い、付属マニュアルに準じて測定した。なお、各サンプルのタンパク量は Bradford 法を用いて定量し、タンパク量を一定にしたサンプルをアッセイに用いた。

統計学的解析

サイトカイン産生量並びに遺伝子発現量の測定により得られたデータは全て、triplicate の mean value \pm S.D.にてグラフに示した。有意差検定は Student's *t* test にて行った。提示したデータは全て、少なくとも 2 回の独立した実験のある一つの結果を示している。

2-4. 結果

2-1. 乳酸は CD4⁺ T 細胞の抗原刺激依存的な IL-17A 産生を増強する

当研究室は、乳酸が、TLR リガンド非存在下での OVA ペプチド刺激により誘導される OT-II トランスジェニックマウス由来脾細胞からの IL-17 産生を IL-23 依存的に増強するという興味深い現象を以前に報告した(39)。乳酸が IL-23/IL-17 経路を増強するメカニズムを調べるため、C57BL/6 マウス脾細胞より CD11b⁺細胞を、OT-II トランスジェニックマウス脾細胞より CD4⁺T 細胞を MACS により分離し、これらを共培養する系を構築し、乳酸存在下にて OVA ペプチドにより刺激した。その結果、この共培養系でも脾細胞と同様な IL-17A 産生の増強が認められた(図 2-1-1.)。この時、炎症性サイトカインの遺伝子発現を調べたところ、IL-23p19、IL-17A、IL-21 各遺伝子の発現は乳酸により増強したが、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 の発現は変化が認められなかった(図 2-1-2. A、B)。

以前の論文において、乳酸ナトリウムは、J774.1 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイ系において IL-23p19 遺伝子のプロモーター活性に影響しないことを報告した。乳酸イオンは MCT を介して pH 依存的に、すなわちプロトン H⁺と共に細胞内に取り込まれ、乳酸イオンは中性条件下では細胞内に輸送されない。それゆえ、乳酸が MCT を介した輸送により細胞内に運ばれ、TLR シグナルを増強したことを示唆している。そこで、今回用いている共培養系における IL-23p19 の遺伝子発現、並びに IL-17A 産生についても、乳酸は同様の機序により増強作用を及ぼすかどうかについて、乳酸ナトリウムと比較することにより調べた。その結果、IL-23p19 の発現量、及び IL-17A 産生は共に、乳酸では増強したが、乳酸ナトリウムではほとんど変化が認められなかった(図 2-1-3.)。このことは、今回用いた共培養系でも、乳酸が細胞内に輸送されて、増強作用を及ぼしたことを示唆している。

2-2. 乳酸は IFN- γ 及び IL-17 産生 CD4⁺ T 細胞の抗原刺激依存的な細胞増殖を抑制するが、IL-17 産生細胞の割合及びサイトカイン産生能を増加させる

乳酸による IL-17A 産生量の増強という現象が、IL-17A 産生 CD4⁺T 細胞の細胞増殖によるものかどうかを調べるために、CD11b⁺細胞と OT-II 由来 CD4⁺ T 細胞を共培養し OVA ペプチドで刺激した後に浮遊細

胞を回収し、brefeldin A (細胞内タンパク輸送阻害剤) 存在下にて PMA 及び ionomycin で再刺激した。再刺激した細胞の細胞内サイトカイン産生を特異的抗体によって検出することにより、IFN- γ または IL-17A 産生細胞を FACS にて測定した。その結果、乳酸存在下で OVA 刺激を加えた CD4⁺ T 細胞では OVA 単独刺激のものに比べ、IL-17A 産生細胞の割合が増えた (0.19 \rightarrow 0.56 %) だけではなく、IL-17A 陽性細胞における蛍光強度も増強した (687 \rightarrow 1501) (図 2-2-1.)。一方、乳酸を加えると IFN- γ 産生 CD4⁺ T 細胞の割合は減少した。

乳酸添加により IL-17A 産生 CD4⁺ T 細胞の割合が増加したため、次に、この IL-17 産生細胞の割合の増加は、IL-17 産生細胞の増殖能が亢進し、IFN- γ 産生細胞の増殖が抑制された結果としてもたらされたものかどうか検証した。細胞膜透過性の蛍光物質 CFSE により標識した CD4⁺ T 細胞を用い、細胞分裂に伴って CFSE の蛍光強度が減弱することを利用して、CD4⁺ T 細胞の抗原刺激による細胞増殖を検出した。この細胞を PMA と ionomycin で再刺激し、CD4 と IFN- γ 、あるいは IL-17 を染色し、サイトカイン産生細胞の細胞増殖を測定した (図 2-2-2.)。その結果、IFN- γ 産生細胞 (図 2-2-2. A)、そして IL-17 産生細胞 (図 2-2-2. B) の両者は共に、CFSE の蛍光強度は乳酸を加えたものの方が高く、すなわち、これらの細胞増殖は抑制されていた。IFN- γ 産生細胞の割合は著しく減少した一方、IL-17 産生細胞は増加し、その蛍光強度も上昇していた。これらの結果から、乳酸による IL-17A 産生の増強効果は IFN- γ 産生細胞と比較して、IL-17 産生細胞の機能維持と、CD4⁺ T 細胞からの IL-17 産生の亢進によるものと示唆された。

2-3. 乳酸はマクロファージに作用して IL-17A 産生増強をもたらす

脾細胞中のどのような種類の抗原提示細胞が、乳酸による IL-17A 産生増強に関与するか調べるため、DC・マクロファージなど骨髄系細胞の細胞表面抗原である CD11b、又は CD11c を用いた MACS により脾細胞中の抗原提示細胞を分画して OT-II 由来 CD4⁺ T 細胞と共培養する系を用いて、乳酸存在下で OVA ペプチド刺激を行い、IL-17A 産生量の各画分における増強効果の違いを比較した (図 2-2-3.)。その結果、CD4⁺ T 細胞からの IL-17 産生は CD11b⁺画分で強く増強し、CD11b⁺/c⁻画分でも増強活性は認められたが、CD11b⁻/c⁺画分では増強活性は消失していた。また、マクロファージの細胞膜表面抗原である F4/80 で分離した画分 (F4/80⁺) でも、CD11b⁺画分と同様の増強活性を示した (図 2-3-1. 下図)。

さらに、骨髄細胞から M-CSF 刺激により誘導した骨髄由来マクロファージ (Bone marrow-derived macrophage; BMDM) を用いると、この細胞でも脾臓由来 CD11b⁺画分と同様に、IL-17 産生及び IL-23p19 の発現において顕著な増強活性が認められた (図 2-3-2. A)。同時に GM-CSF 刺激により誘導した骨髄由来 DC (BMDC) を用いたが、一般に DC はマクロファージよりも MHC class II の発現が高いことから、強い抗原提示能をもっていると考えられている。BMDC は抗原刺激による IL-17 産生を強く誘導したが、乳酸による IL-17 産生増強効果は、BMDM では 11.8 倍であったのに比べ、BMDC では 2.2 倍と弱かった (図 2-3-2. B)。これらの結果から、乳酸がマクロファージに作用して IL-17A 産生増強をもたらすことを示唆された。

2-4. 乳酸による IL-17A 産生増強作用への effector/memory CD4⁺ T 細胞の関与

CD4⁺ T 細胞には CD62L (L-selectin) 発現量の異なる細胞集団が含まれており、CD4⁺ CD62L⁺ 細胞は naïve T 細胞を、CD4⁺ CD62L⁻ は effector/memory T 細胞を含むとされている。S. Aggrawal らは、IL-23 が CD4⁺ CD44^{low} CD62L⁺ naïve T 細胞ではなく、CD44^{hi} CD62L⁻ memory T 細胞に作用して IL-17 産生を誘導することを報告した (61)。そこで、どちらの T 細胞が乳酸の増強作用に関与するかどうか調べるために、OT-II 由来 CD4⁺ T 細胞を CD4⁺CD62L⁺ と CD62L⁻T 細胞とに分画した後、C57BL/6 由来 CD11b⁺細胞と共培養して刺激した。その結果、naïve T 細胞からの IL-17A 産生は検出できなかったが、memory T 細胞からの IL-17A 産生には乳酸による増強効果が顕著に認められた (図 2-4.)。

2-5. 乳酸は Th17 細胞分化には関与しないが、Th17 細胞の割合及びサイトカイン産生能を増加させる

最近、新しい種類のヘルパー T 細胞、IL-17 産生ヘルパー T (Th17) 細胞が報告され、この細胞の分化には IL-6 と TGF-β が必須であるとされている (62)。そこで、この Th17 細胞分化への乳酸の影響を調べるため、OT-II 由来 naïve CD4⁺ T 細胞を IL-6 及び TGF-β 存在下で CD11b⁺細胞と共培養し、OVA ペプチド刺激による IL-17 産生量を測定した。その結果、IL-6 及び TGF-β 刺激により誘導された IL-17 産生は乳酸存在下で抑制された (図 2-5-1. A)。この時、細胞を再刺激して CD4⁺ T 細胞の IL-17A 産生能を調べると、IL-17A 産生細胞の割合は乳酸を加えると減少し

(3.73% → 0.28%)、CD4⁺ T 細胞の IL-17 産生能は著しく抑制されていた (図 2-5-1. B)。

次に、naïve CD4⁺ T 細胞を、IL-6・TGF-β存在下で抗 CD3 及び抗 CD28 抗体で刺激するという in vitro で Th17 細胞を誘導する系を用いて、乳酸の Th17 分化への関与を検討した。その結果、naïve T 細胞は IL-6 及び TGF-β刺激により IL-17A を産生するが、乳酸存在下ではこの IL-17A 産生は著しく抑制された (図 2-5-2.)。しかしながら、IL-6・TGF-β刺激により誘導した Th17 細胞を CD11b⁺細胞と共培養すると、抗原刺激によって誘導された IL-17A 産生並びに、IL-23p19、IL-17A 両遺伝子の発現は共に、乳酸により増強され、IL-17A 産生細胞の割合も増加した (図 2-5-3 及び 4.)。これらのことから乳酸は Th17 細胞分化には関与しないが、脾臓由来 CD4⁺ T 細胞と同様に、分化した Th17 細胞に対してもマクロファージを介して働き、IL-17A 産生を増強すると示唆された。

2-6. 乳酸の増強作用には CD40-CD40 ligand (CD40L) を介した細胞間相互作用によって誘導される IL-12/23 p40 が不可欠である

抗原提示細胞が CD4⁺ T 細胞に抗原を提示し、抗原特異的な CD4⁺T 細胞を活性化させるとき、その細胞間相互作用では様々なサイトカインや共刺激分子が関与する。中でも CD40-CD40 ligand (CD40L) を介した細胞間相互作用はよく知られている。抗原刺激を受けて活性化した T 細胞は CD40L を発現し、抗原提示細胞側の CD40 と結合することによって抗原提示細胞を活性化させる (63,64)。この活性化により抗原提示細胞側では IL-12/23p40 や共刺激分子の発現が誘導されることが知られている。

この CD40-CD40L を介した細胞間相互作用の増強作用への関与を調べるため、IL-17A 産生及び IL-12p40 発現の増強作用への CD40L 阻害抗体の影響を検討した (図 2-6-1.)。その結果、IL-17A 産生への増強作用は CD40L 阻害抗体により抑制され (図 2-6-1. 左図)、また乳酸により軽微に増強する IL-12/23p40 の発現も抑制された (図 2-6-1. 右図)。さらに IL-12/23p40 中和抗体を用いると CD40L 阻害抗体と同様に IL-17A 産生の増強作用は抑制された (図 2-6-2.)。これらのことから、CD40-CD40L 細胞間相互作用が、IL-17A 産生に働く IL-12/23p40 を誘導するのに必要であることが示唆された。

CD40-CD40L 細胞間相互作用により、IL-12/23p40 といった炎症性サイトカインのように、CD40 分子自身の発現が誘導されることが知られて

いる。乳酸により誘導される IL-17A 産生の増強が、CD40 タンパクの発現の上昇によりもたらされたものであるかどうかを確かめるため、CD11b⁺細胞表面上の CD40 発現量を FACS と Real-time PCR により定量した。その結果、CD40 の細胞表面発現量、及び遺伝子発現量は共に、乳酸により変化しなかった (図 2-6-3 及び 2-6-4.)。

さらに CD40 シグナル下流では転写因子 NF- κ Bp52、あるいは p65 が活性化することがわかっている。そこで、乳酸の NF- κ B 活性化に及ぼす影響について調べてみると、乳酸は IL-12/23p40、IL-17A 両遺伝子の発現量を増強させたが、NF- κ B の核内移行、すなわち活性化には関与しなかった (図 2-7.)。事実、抗 CD40 刺激抗体によって CD11b⁺細胞に刺激を加えても、IL-12/23p40 遺伝子の発現は抗体刺激により誘導され、抗体濃度の増加に伴い上昇したが、乳酸を加えるとむしろ抑制された (図 2-6-4.)。一方、乳酸により増強する IL-23p19 の発現は抗 CD40L 阻害抗体で抑制されず、また抗 CD40 抗体刺激は IL-23p19 の発現を誘導できなかった。(図 2-8.)

これらの結果から、乳酸による IL-17A 産生の増強作用には CD40-CD40L を介した細胞間相互作用による CD11b⁺細胞の活性化と、それによって CD11b⁺細胞にて誘導される IL-12/23p40 の発現が不可欠であることが示唆された。

2-7. IL-17A 産生増強への IL-23 非依存的経路の関与

IL-23 は IL-12R β 1/IL-23R を介して Th17 細胞や memory CD4⁺ T 細胞に働きかけて IL-17A 産生を促すため、乳酸による IL-17A 産生増強作用機構を考えるに当たり、CD40/CD40L に次いで、IL-23 の関与が疑われた。また、図 2-6-2. の結果から、IL-23p19 とヘテロ二量体を形成する IL-12/23p40 が増強作用に関与することから、乳酸による IL-17A 産生増強作用には IL-23 が関与すると予想された。そこで、抗 IL-23p19 中和抗体が、乳酸による IL-17A 産生増強作用に影響を及ぼすかどうかを調べた。その結果、抗 IL-23p19 抗体 (G23-8) は、脾細胞では IL-17A 産生増強作用を限定的に抑制し、IL-17A 産生量は有意に減少した (図 2-9-1. 左図)。しかしながら、CD11b⁺と CD4⁺ T 細胞との共培養系では予想に反して、抗 IL-23p19 抗体 (G23-8) は増強作用を抑制することができなかった (図 2-9-1.右図)。また、他の抗 IL-23p19 抗体 (goat IgG) や、抗 IL-23R 抗体 (258010) を用いても増強作用を抑制することができなかった (図 2-9-2.)。さらに、IL-23 産生は脾細胞、そして共培養系

のどちらでも ELISA では検出できなかった（データ未掲載）。

次に、IL-12/23p40 を含む IL-12 サイトカインファミリーの増強作用への影響について検討するため、IL-23（IL-12p40/IL-23p19 ヘテロ二量体）、IL-12p40 ホモ二量体 [IL-12(p40)₂]、あるいは IL-12p70（IL-12p40/p35 ヘテロ二量体）のいずれかのサイトカイン共存下にて、CD11b⁺細胞と CD4⁺T 細胞とを、乳酸と OVA ペプチド、あるいは OVA ペプチドのみで刺激した。その結果、乳酸非存在下の IL-17A 産生は IL-23 濃度依存的に上昇し、さらに、乳酸は IL-23 により上昇した IL-17A 産生量を上昇させた（図 2-9-3. A）。また IL-23 非存在下で乳酸により増強した IL-17A 産生量は、IL-23 0.25 ng/ml で刺激したものに比べ、有意に上昇した。IL-23 に対して、IL-12p40 ホモ二量体や IL-12p70 は乳酸による IL-17 産生増強作用を著しく抑制した（図 2-9-3. B）。しかしながら、プレート表面に固層化した抗 CD3ε 及び抗 CD28 抗体にて、CD4⁺T 細胞のみを刺激すると、IL-17A 産生量は IL-23 刺激により上昇したが、乳酸はこれを抑制した（図 2-9-4. 左図）。一方、IL-12p40 ホモ二量体や IL-12p70 は CD4⁺T 細胞からの IL-17A 産生には影響を及ぼさなかった（図 2-9-4. 右図）。以上から、乳酸による IL-17A 産生の増強作用には、IL-23 だけではなく、IL-12/23p40 を含む未知のサイトカイン、あるいは IL-17A 産生誘導に働く別の因子が関与することが示唆された。

2-8. 乳酸による IL-17A 産生への増強作用は MyD88、CARD9 及び IL-1β 非依存的である

単球・マクロファージ、樹状細胞は様々な細胞内成分を認識して、活性化し、そのシグナル経路には MyD88 や CARD9 が関与することが知られている(1,2,6)。乳酸からのシグナルに、これらのシグナル経路が関与するかどうか調べるため、Myd88 あるいは Card9 の各ノックアウトマウスの脾臓より CD11b⁺細胞を精製し、OT-II 由来 CD4⁺T 細胞と共培養し、OVA ペプチド、あるいは OVA ペプチドと乳酸で刺激し、IL-17 産生量と、IL-23p19、IL-17A 両遺伝子の発現量を測定した。その結果、Myd88、そして Card9 ノックアウトマウスのいずれであっても、IL-17 産生、そして IL-23p19 及び IL-17A 両遺伝子の発現への乳酸の増強効果には変化が認められなかった（図 2-11-1、及び 2.）ため、乳酸による IL-17A 産生の増強作用には Myd88 そして Card9 は関与しないことが示唆された。

NLRP3-inflammasome 経路が ATP などの細胞内成分により活性化すると、pro IL-1 β はカスパーゼ 1 によるプロセッシングを受けて、分泌型 IL-1 β となる。分泌された IL-1 β は IL-17A 産生の誘導と、Th17 細胞の機能維持に関与することが知られている。乳酸による IL-17A 産生増強作用への IL-1 β の関与を調べるため、IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) あるいは抗 IL-1 β 中和抗体の存在下にて、CD11b⁺細胞と CD4⁺T 細胞を乳酸と OVA ペプチドで刺激した (図 2-10 C 左)。その結果、IL-1RA、抗 IL-1 β 抗体の両者はともに、OVA ペプチド刺激、あるいは乳酸と OVA ペプチド刺激により誘導された IL-17A 産生を著しく抑制した。しかしながら、乳酸による増強活性は、IL-1RA、あるいは抗 IL-1 β 抗体のどちらの処理でも、Buffer : 12.1 倍に対し IL-1RA : 11.8 倍、コントロール抗体 : 14.4 倍に対し抗 IL-1 β 抗体 : 18.7 倍、と認められた (図 2-11-3.)。さらに、同時に IL-1 β 産生量を測定したが、IL-17A 産生量の増強が認められるのにもかかわらず、IL-1 β の遺伝子発現量、並びに産生量は、乳酸存在下でもほとんど変化しなかった (図 2-11-3.)。

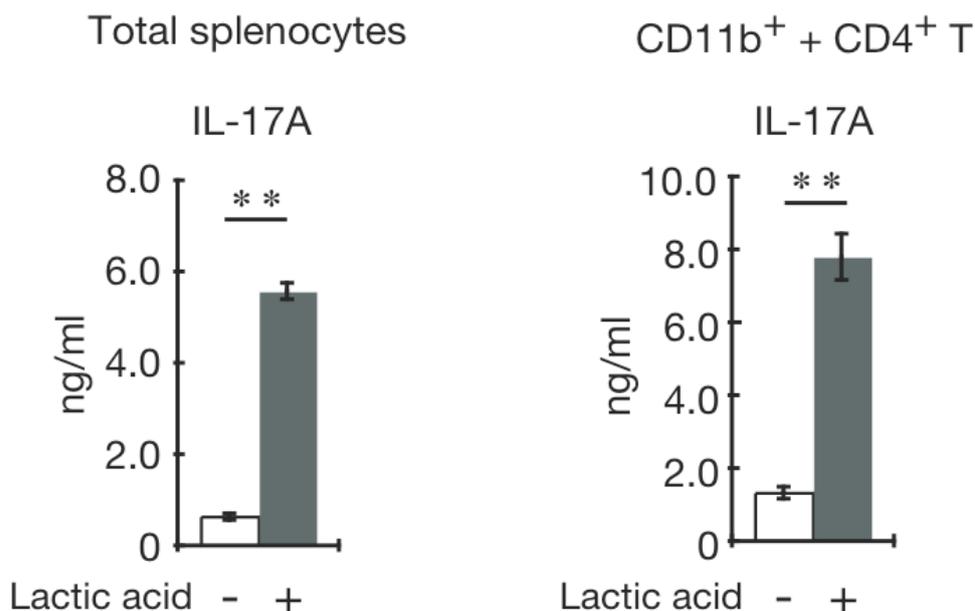


図 2-1-1. CD11b⁺細胞と CD4⁺T 細胞との共培養系における乳酸の IL-17 産生への増強効果の確認

OT-IIトランスジェニックマウス由来脾細胞 5×10^5 を、15 mM 乳酸存在下（灰色バー）あるいは非存在下（白色バー）にて OVA ペプチド 200 ng/ml にて 4 日間刺激し、IL-17 産生量を測定した（左）。また、C57BL/6 マウス由来脾細胞より精製した CD11b⁺ 細胞 1×10^5 と、OT-II トランスジェニックマウス由来脾細胞より精製した CD4⁺T 細胞 1×10^5 とを混合して共培養し、15 mM 乳酸存在下（灰色バー）あるいは非存在下（白色バー）にて OVA ペプチド 200 ng/ml にて 4 日間刺激し、IL-17 産生量を測定した（右）。なお、グラフに示したデータは平均値 \pm 標準偏差（ $n=3$ ）で示してある。*, $p < 0.05$ 、**, $p < 0.01$ 。

IL-17 産生に対する乳酸の増強効果は OT-II 由来脾細胞と同様に、分離・精製した抗原提示細胞と T 細胞とから構築した共培養系においても確かめられた。

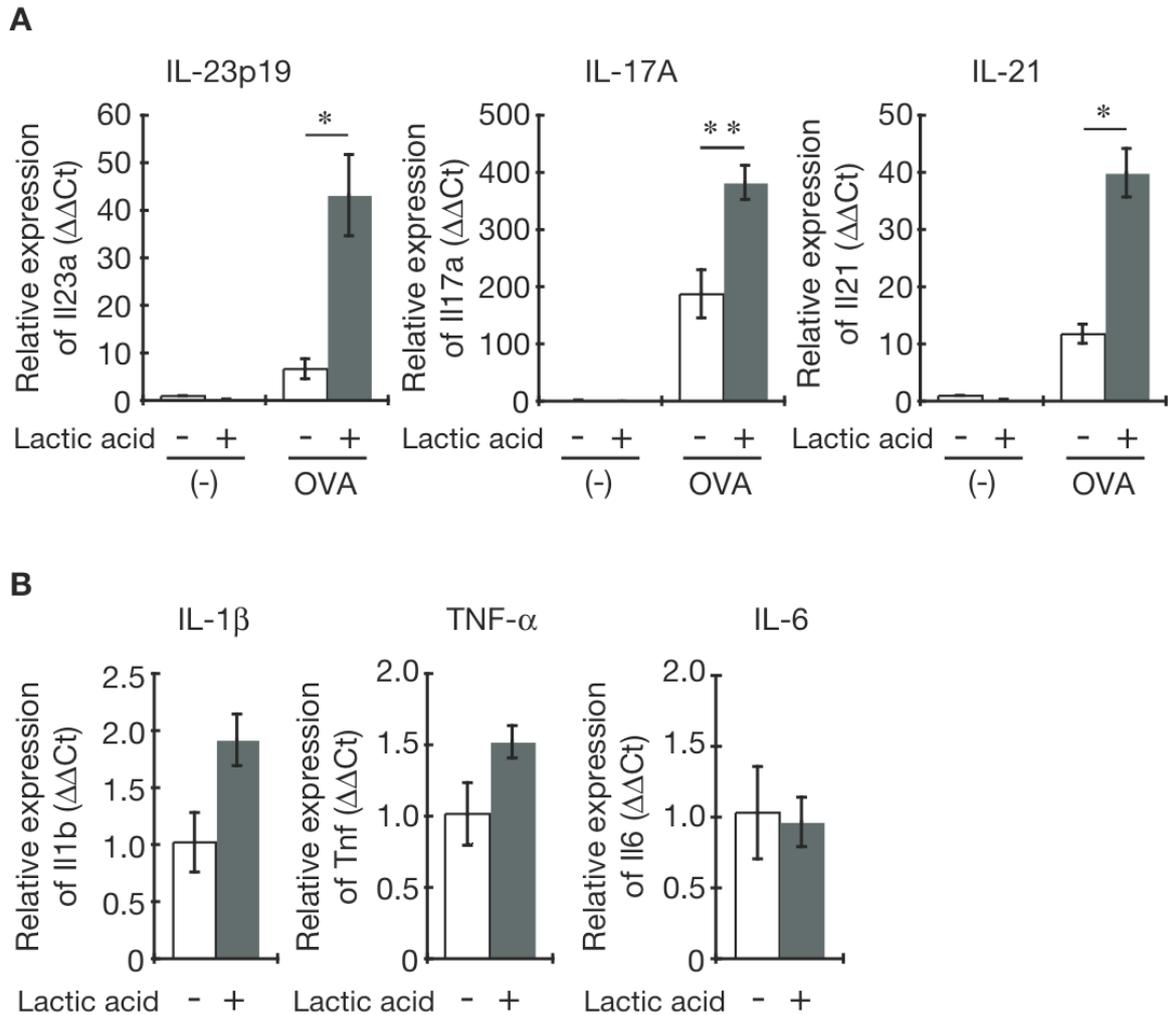


図2-1-2. 炎症性サイトカイン各遺伝子の発現における乳酸の影響

(A、B) CD11b⁺細胞とOT-II由来CD4⁺T細胞とを図2-1と同様に1:1にて混合して共培養し、乳酸存在下あるいは非存在下にてOVAペプチドで刺激した。12時間刺激後に、IL-23p19、IL-17A及びIL-21 (B)、並びにIL-1β、IL-6及びTNF-α (C) の各遺伝子の発現量をReal-time PCRにて測定した。炎症性サイトカイン各遺伝子の相対的な発現量は、18S rRNA遺伝子の発現量で標準化し、無刺激または乳酸なしのものを1として $\Delta\Delta Ct$ 法により算出した。なお、グラフに示したデータは平均値 \pm 標準偏差 (n=3) で示してある。*, $p < 0.05$ 、**, $p < 0.01$ 。

OVAペプチド刺激により誘導されたIL-23p19、IL-17A及びIL-21遺伝子の発現量は乳酸により増強した。しかしながら、IL-1βとTNF-αの発現量は軽微な増加にとどまり、IL-6の発現量は全く変化しなかった。

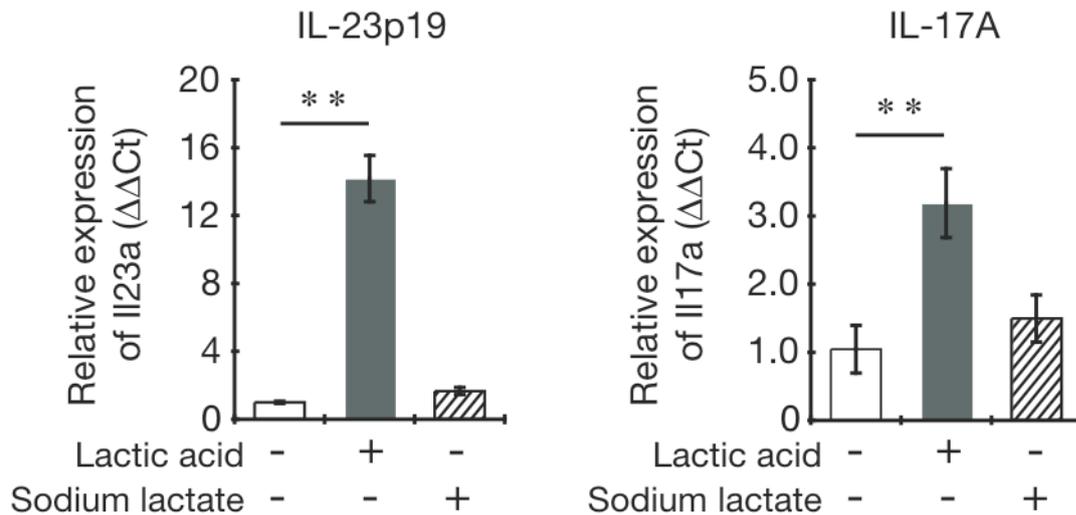


図 2-1-3. 乳酸ナトリウムは IL-23p19 あるいは IL-17A 両遺伝子の転写活性に影響しない

CD11b⁺細胞と OT-II 由来 CD4⁺T 細胞を共培養し、15mM 乳酸（灰色バー）または 15mM 乳酸ナトリウム（斜線バー）の存在下、あるいは非存在下（白色バー）にて OVA ペプチドで刺激した。12 時間刺激後に、IL-23p19、IL-17A 各遺伝子の発現量を Real-time PCR にて測定した。各遺伝子の発現量は 18S rRNA 遺伝子の発現量で標準化し、OVA ペプチド単独刺激のものを 1 として ΔΔCt 法により定量した。なお、グラフに示したデータは平均値 ± 標準偏差（n=3）で示してある。**, $p < 0.01$ 。

IL-23p19 ならびに IL-17A 各遺伝子の発現量は、乳酸では増強したが、乳酸ナトリウムでは増強しなかった。

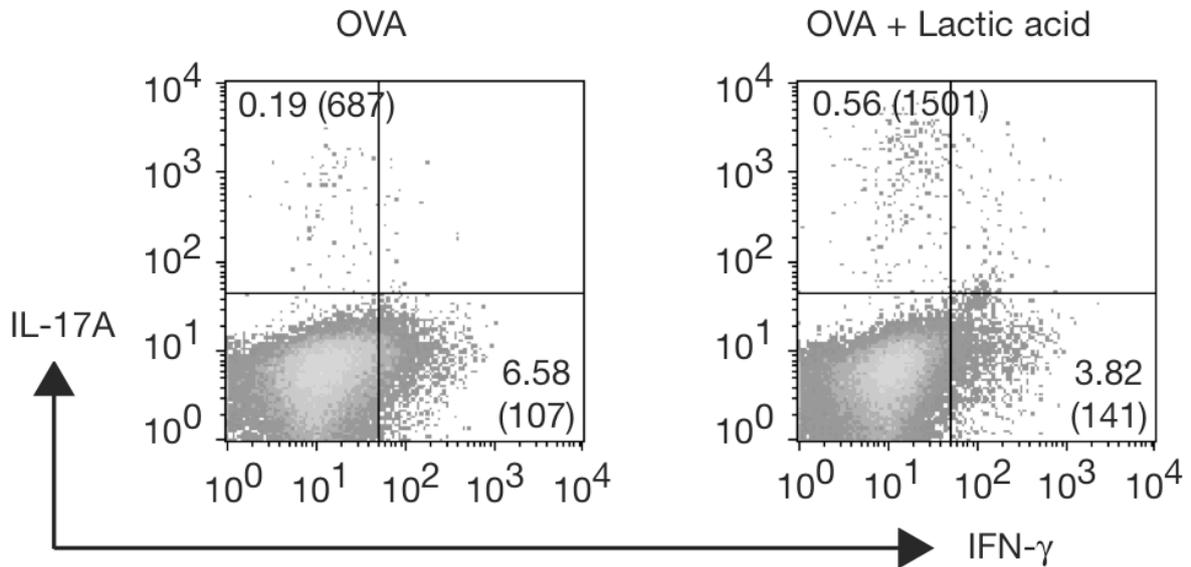


図 2-2-1. IL-17 産生、または IFN- γ 産生 CD4⁺ T 細胞のサイトカイン産生能への乳酸の影響

CD11b⁺細胞と OT-II 由来 CD4⁺ T 細胞を共培養し、OVA ペプチド（右）あるいは、OVA ペプチドと乳酸（左）で刺激した。4.5 日間刺激した後に、浮遊細胞を回収して 1×10^6 /ml にて懸濁し、brefeldin A 存在下にて PMA 50 ng/ml と Ionomycin 750 ng/ml にて刺激した。5 時間刺激した後に、CD4、IFN- γ 、IL-17A を染色し、FACS にて検出した。図示したプロットは CD4⁺ T 細胞にゲートをかけたものを示している。図中の数字は CD4⁺ 細胞中における IFN- γ ⁺ または IL-17A⁺ 細胞集団のパーセンテージを、括弧内の数値は各細胞集団の蛍光強度を示してある。

IFN- γ 産生細胞の割合は乳酸により減少したが、一方で乳酸により、IL-17 産生細胞の割合が増加した。さらに、乳酸存在下では IL-17 産生細胞の蛍光強度も増加した。

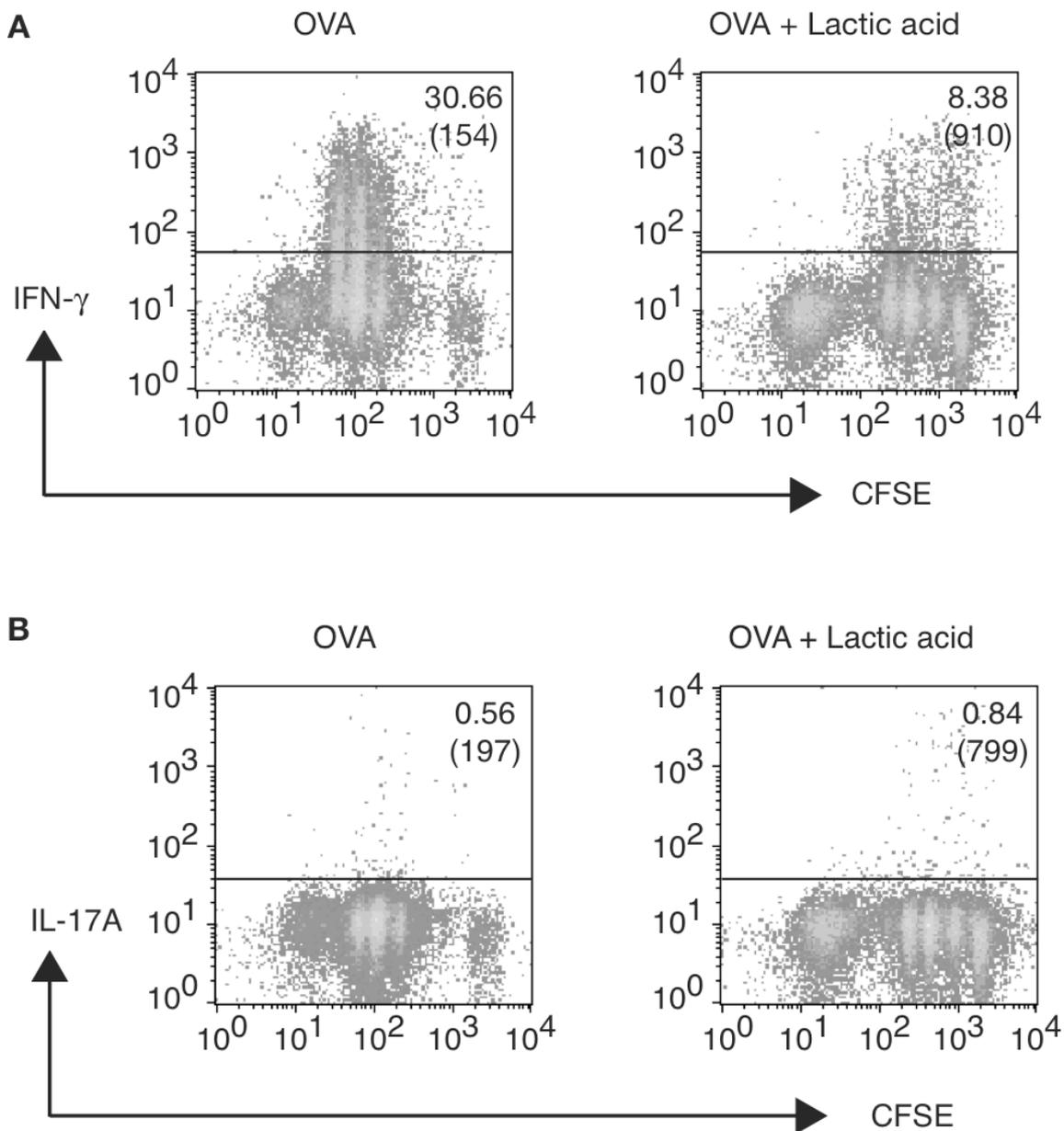


図 2-2-2. IFN- γ 産生、または IL-17産生 CD4⁺ T細胞の抗原刺激依存的な細胞増殖への乳酸の影響

蛍光色素 CFSE にて標識した OT-II 由来 CD4⁺ T 細胞を、CD11b⁺ 細胞と共培養し、OVA ペプチド、あるいは OVA ペプチドと乳酸により刺激した。4.5 日間刺激した後、T 細胞を brefeldin A 存在下にて PMA と Ionomycin で 5 時間再刺激し、CD4 と IFN- γ (A)、または IL-17A (B) を染色した。右上の数字は CD4⁺ 細胞中の IFN- γ ⁺/CFSE⁺ または IL-17A⁺/CFSE⁺ 各細胞集団のパーセンテージを、括弧内の数値は蛍光強度を示してある。乳酸は IFN- γ 産生、または IL-17 産生 CD4⁺ T 細胞のどちらであっても、抗原刺激依存的な細胞増殖を抑制した。

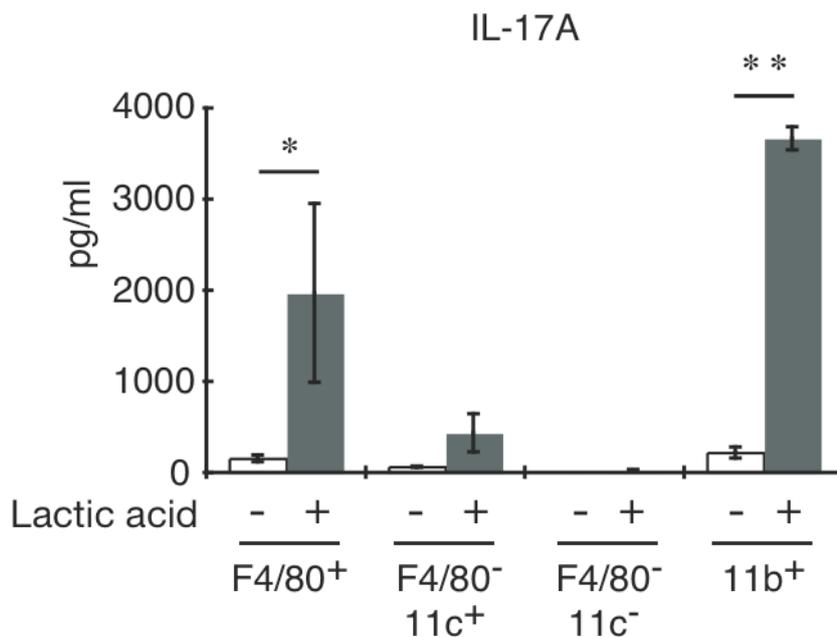
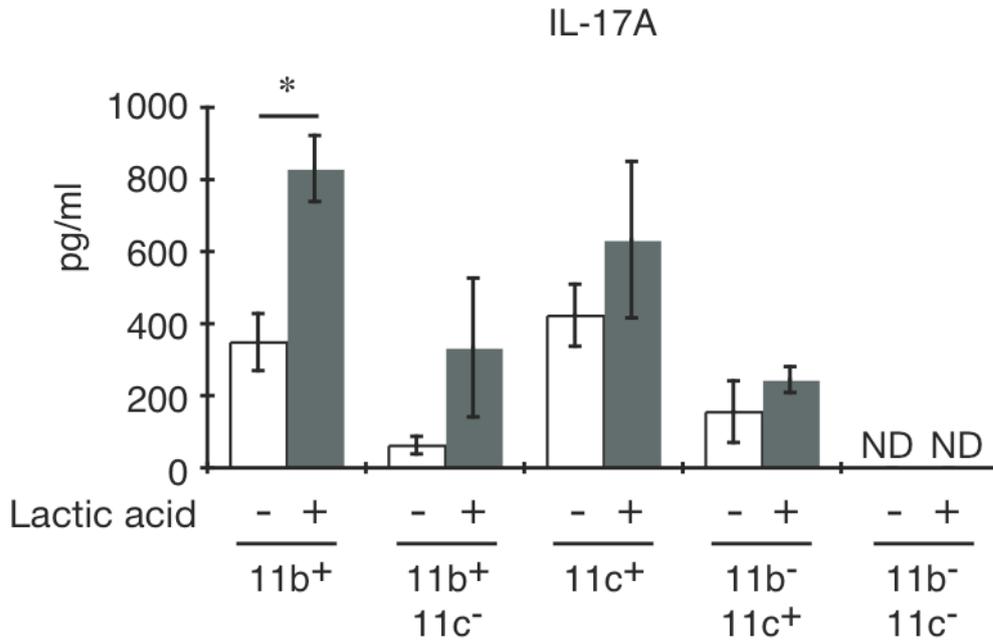


図2-3-1. 脾細胞中の単球・マクロファージが乳酸による増強作用に関与する

脾細胞中の抗原提示細胞を細胞表面マーカー、CD11b (11b⁺)、CD11c (11c⁺)、F4/80 (F4/80⁺) により分画した。各画分を、OT-II由来CD4⁺T細胞と1:1の細胞比にて共培養し、OVAペプチド (白色バー) またはOVAペプチドと乳酸 (灰色バー) にて4日間刺激した。IL-17産生量はELISAにて測定・算出した。各データは平均値±標準偏差 (n=3)で示してある。*, $p < 0.05$ 、**, $p < 0.01$ 。

単球・マクロファージを含むCD11b⁺、またはF4/80⁺画分が、最も強い増強活性を示した。

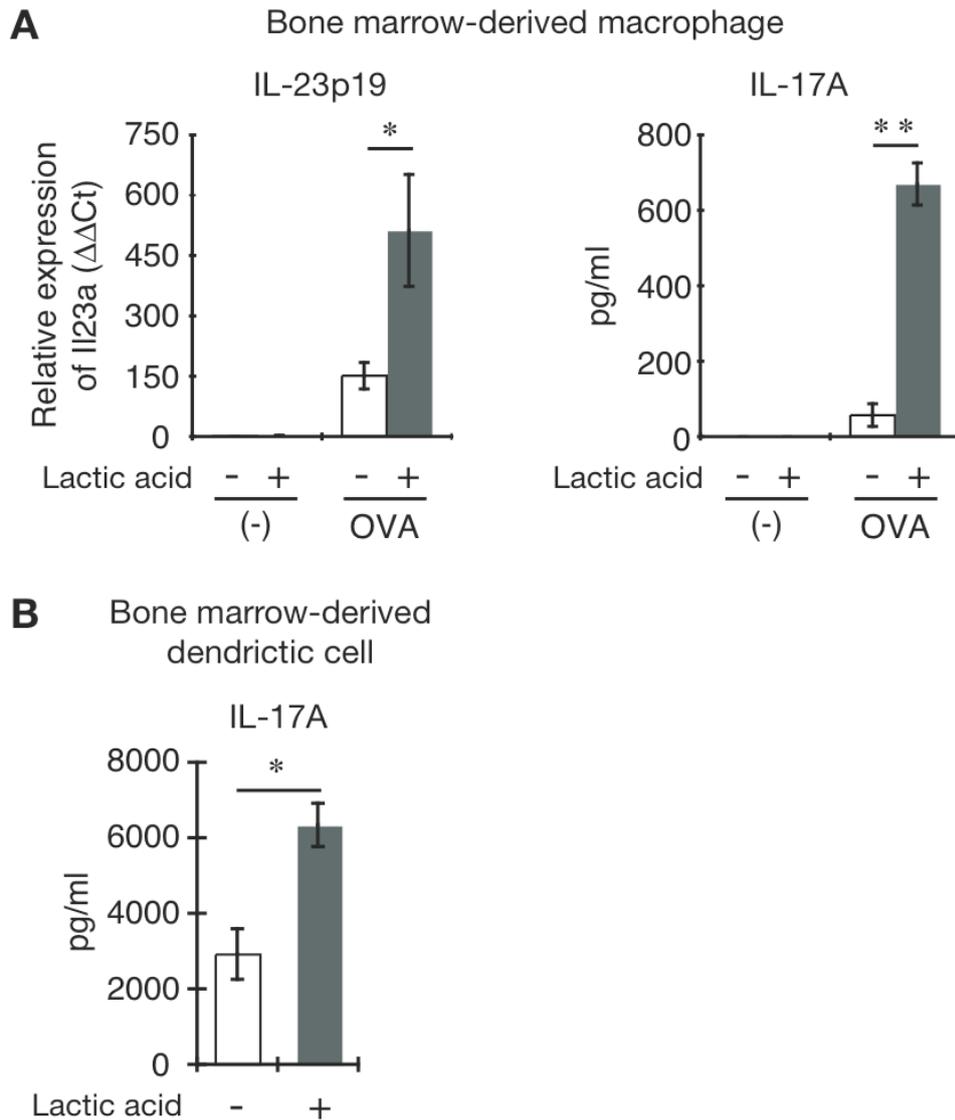


図 2-3-2. 骨髄由来マクロファージは骨髄由来DCに比べ強い増強活性を示す

(A) M-CSFにて誘導した骨髄由来マクロファージ 1×10^5 と、OT-II由来 $CD4^+T$ 細胞 5×10^5 とを混合し、OVAペプチド、あるいはOVAペプチドと乳酸により刺激した。12時間刺激後、IL-23p19の発現量をReal-time PCRで測定・定量した。また4日間刺激した後に、IL-17Aの産生量をELISAで測定した。

(B) GM-CSFにて誘導した骨髄由来DC 1×10^4 と、OT-II由来 $CD4^+T$ 細胞 1×10^5 とを混合し、OVAペプチド、あるいはOVAペプチドと乳酸により刺激した。4日間刺激した後に、IL-17Aの産生量をELISAで測定した。各データは平均値 \pm 標準偏差 (n=3)で示してある。*, $p < 0.05$ 、**, $p < 0.01$ 。

乳酸によるIL-17産生増強作用は、骨髄由来DCが2.2倍であったのに対して、骨髄由来マクロファージは11.8倍と強い活性を示した。

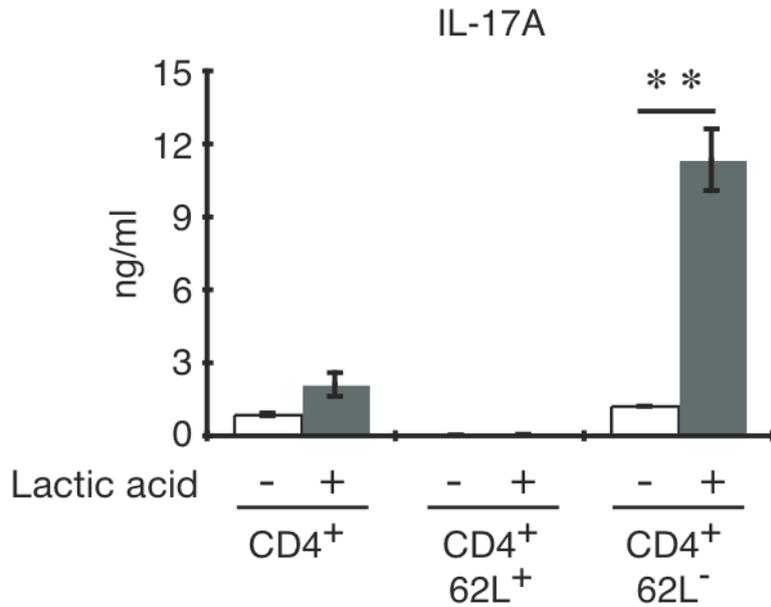


図 2-4. 乳酸は effector/memory CD4⁺ T 細胞からの IL-17 産生を増強する

OT-II マウス由来 CD4⁺T 細胞、CD4⁺ CD62L⁺ (naive) あるいは CD4⁺ CD62L⁻ (effector/memory) T 細胞と、C57BL/6 マウス由来 CD11b⁺ 細胞とを 1:1 の割合で混合培養し、OVA ペプチド (白色バー) または OVA ペプチドと乳酸 (灰色バー) にて刺激した。4 日後に培養上清を回収し、IL-17 産生量を ELISA で測定した。各データは平均値 ± 標準偏差 (n=3) で示してある。**, $p < 0.01$ 。

CD4⁺ CD62L⁺ (naive) T 細胞画分では IL-17 産生がほとんど検出されなかったのに対して、CD4⁺ CD62L⁻ (effector/memory) T 細胞では IL-17 産生が認められ、この量は乳酸により顕著に上昇した。

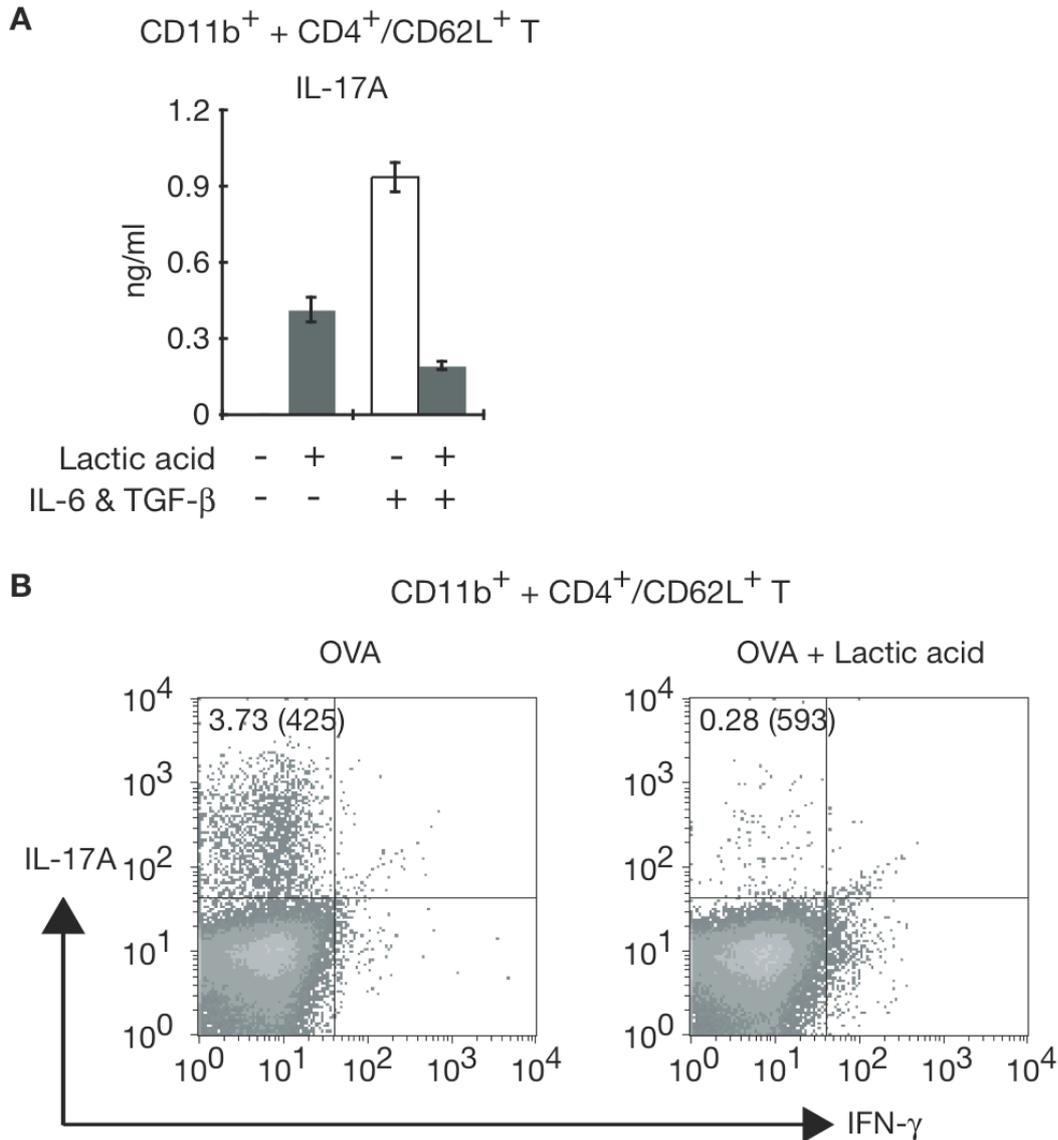


図 2-5-1. 乳酸はIL-6・TGF-β刺激により誘導されるnaïve CD4⁺ T細胞からのIL-17産生を抑制する

OT-IIマウス由来naïve CD4⁺ CD62L⁺ T細胞を、CD11b⁺細胞と1:1の割合で混合培養し、IL-6とTGF-βとOVAペプチド、あるいは、IL-6とTGF-βとOVAペプチドと乳酸にて刺激した。4日間刺激後に、培養上清中のIL-17産生量をELISAで測定した(A)。さらに刺激4.5日後のT細胞のサイトカイン産生能を調べるため、PMAとionomycinで再刺激し、CD4、IFN-γ、IL-17Aの発現をFACSにて測定した(B)。グラフに示したデータは平均値±標準偏差(n=3)で示してある。また図示したプロットはCD4⁺集団に絞ってあり、左上の数字はIFN-γ⁺、またはIL-17A⁺の各細胞集団のパーセンテージ、括弧内の数値はその蛍光強度を示している。

IL-6・TGF-β刺激により誘導されたIL-17産生は乳酸により抑制され、またT細胞のサイトカイン産生能も同じく乳酸により抑制された。

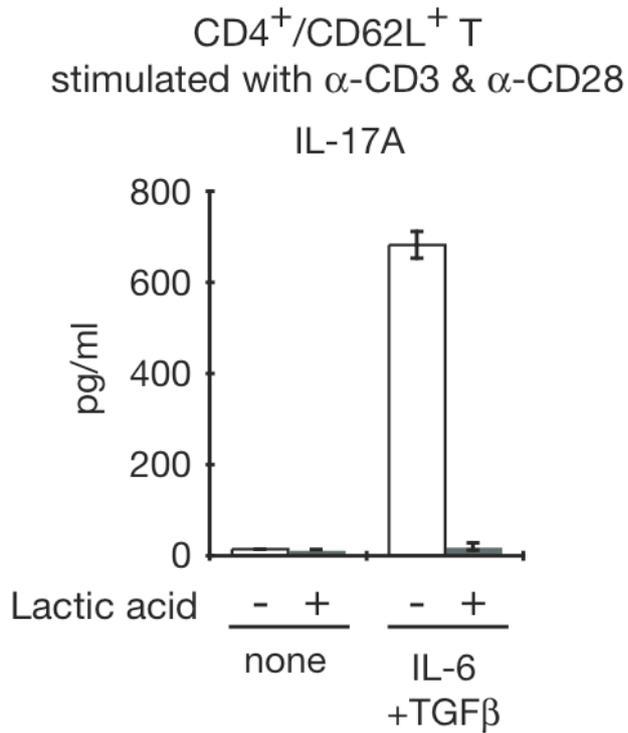


図 2-5-2. 乳酸は IL-6・TGF- β 刺激により誘導される naïve CD4⁺ T 細胞から Th17 細胞への分化を抑制する

OT-IIマウス由来 naïve CD4⁺ CD62L⁺ T細胞 1×10^5 を、IL-6 と TGF- β の存在下にてプレートに固相化した抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体にて 4 日間刺激し、Th17 細胞への分化を誘導した。この条件下における乳酸の影響を調べた。4 日間培養した後、培養上清中の IL-17 産生量を ELISA で測定した。グラフに示したデータは平均値 \pm 標準偏差 (n=3) で示してある。

IL-6・TGF- β 刺激により Th17 分化が誘導され、IL-17 産生が確認出来たが、乳酸存在下ではこの IL-17 産生は著しく抑制された。

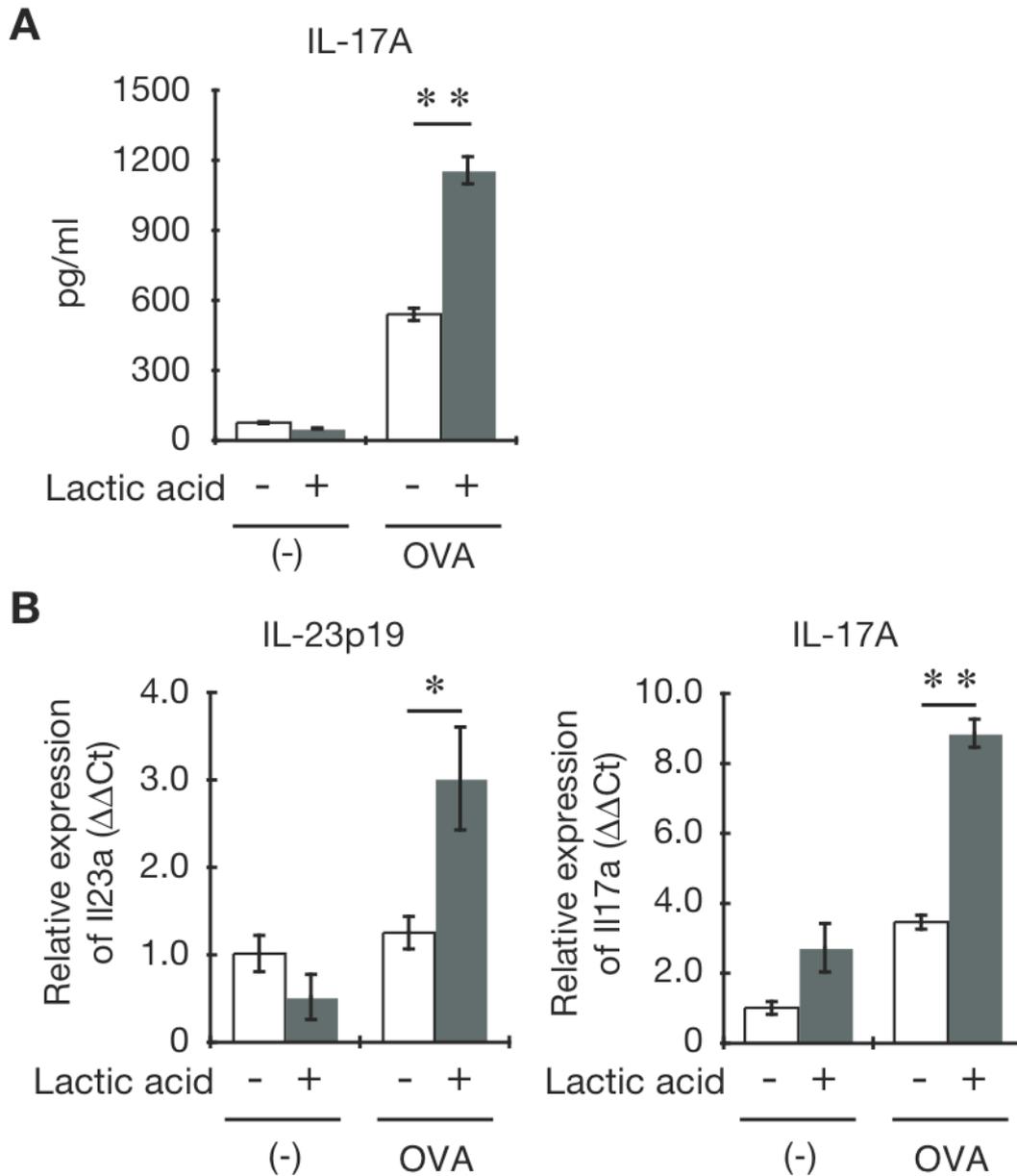


図 2-5-3. 乳酸は 誘導 Th17細胞からの抗原再刺激による IL-17産生を増強する

*in vitro*にてTh17細胞を誘導するために、OT-IIマウス由来naive CD4⁺ CD62L⁺ T細胞を、IL-6・TGF- β 存在下で抗CD3抗体と抗CD28抗体にて刺激した。この誘導したTh17細胞1 \times 10⁵を、CD11b⁺細胞1 \times 10⁵と混合培養し、OVAペプチド（白色バー）またはOVAペプチドと乳酸（灰色バー）で刺激した。4日間刺激後にIL-17産生量をELISAにて（A）、12時間刺激後にIL-23p19及びIL-17Aの各遺伝子の発現量をReal-time PCRにて測定した（B）。グラフに示したデータは平均値 \pm 標準偏差（n=3）で示してある。**、p < 0.01

乳酸は、誘導Th17細胞において、CD11b⁺細胞からの抗原刺激により誘導されたIL-17産生を増強した。

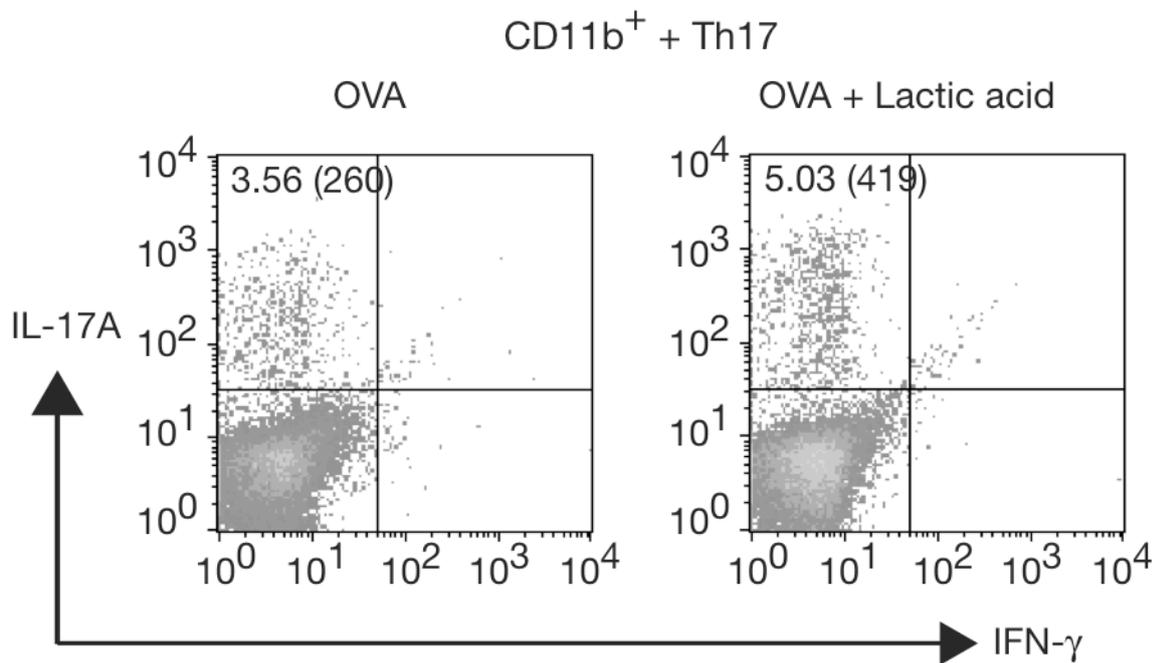


図 2-5-4. 乳酸はTh17細胞のIL-17産生能を増強する

図2-4-4と同様に、誘導したTh17細胞をCD11b⁺細胞と混合培養し、OVAペプチド、またはOVAペプチドと乳酸にて4.5日間刺激した。この後に、Th17細胞をPMAとionomycinにて5時間再刺激し、CD4と、細胞内におけるIFN- γ 、IL-17Aの発現をFACSにて測定した。図示したプロットはCD4⁺細胞集団に絞ったものを示してある。また、図内左上の数字はIFN- γ ⁺、またはIL-17A⁺の各細胞集団のCD4⁺細胞中のパーセンテージ、括弧内の数字はその集団における平均蛍光強度を示してある。

乳酸はTh17細胞において、抗原刺激により誘導されるIL-17産生能を増強した。

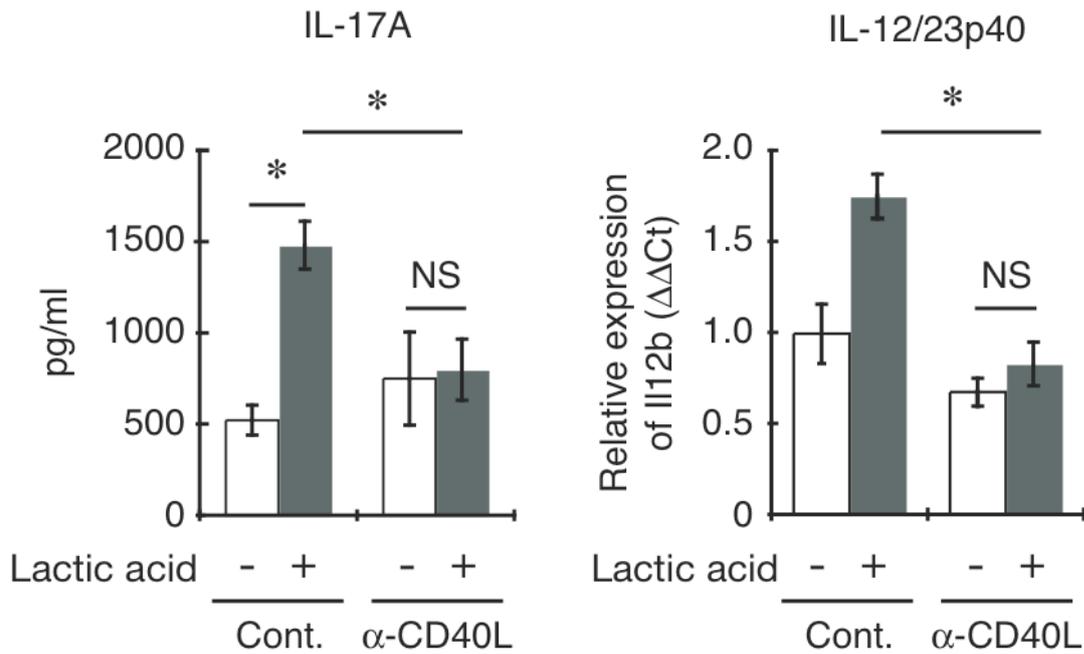


図 2-6-1. CD40-CD40L を介した細胞間相互作用は乳酸による IL-17A 産生増強作用に關与する

CD11b⁺細胞 1×10^5 を、OT-II 由来 CD4⁺T 細胞と 1×10^5 と混合培養し、抗 CD40L 阻害抗体 (α -CD40L) 10 μ g/ml、または同量のコントロール抗体 (Cont.) を加え、OVA ペプチド単独 (白色バー) または OVA ペプチドと乳酸 (灰色バー) にて刺激した。4 日間刺激後に培養上清中の IL-17 産生量を ELISA で、12 時間刺激後に IL-12/23p40 遺伝子の発現を real-time PCR にて測定した。各グラフのデータは平均値 \pm 標準偏差 (n=3) で示してある。NS、有意差無し、*、 $p < 0.05$ 、**、 $p < 0.01$ 。

乳酸により増強した IL-17 産生は抗 CD40L 抗体により抑制された。また、乳酸により軽微に増強した IL-12/23p40 の発現も抗 CD40L 抗体により抑制された。

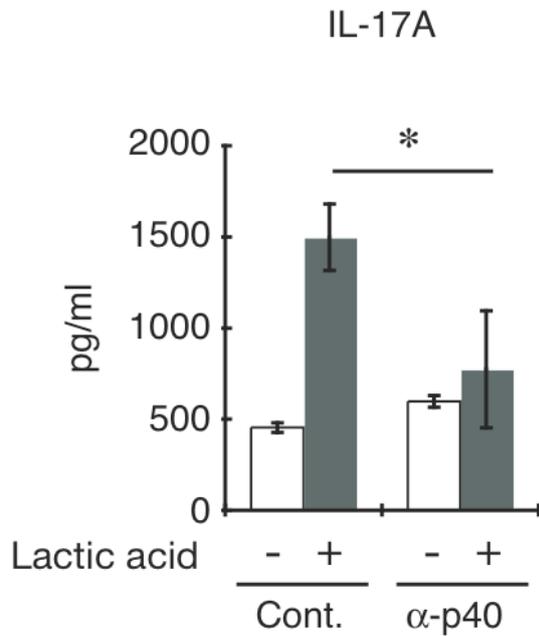


図 2-6-2. IL-12/23p40は乳酸によるIL-17A産生増強作用に関与する

CD11b⁺細胞 1×10^5 をOT-II由来CD4⁺T細胞 1×10^5 と共培養し、乳酸存在下、あるいは非存在下にて、抗IL-12/23p40中和抗体(α-p40)またはコントロール抗体(Cont.) 10 μg/mlを加えてOVAペプチド 200 ng/mlにて刺激した。4日間刺激した後に、培養上清中のIL-17産生量をELISAにて測定した。グラフのデータは平均値±標準偏差(n=3)で示してある。*、p < 0.05。

乳酸により増強したIL-17産生量は、抗IL-12/23p40中和抗体により抑制された。

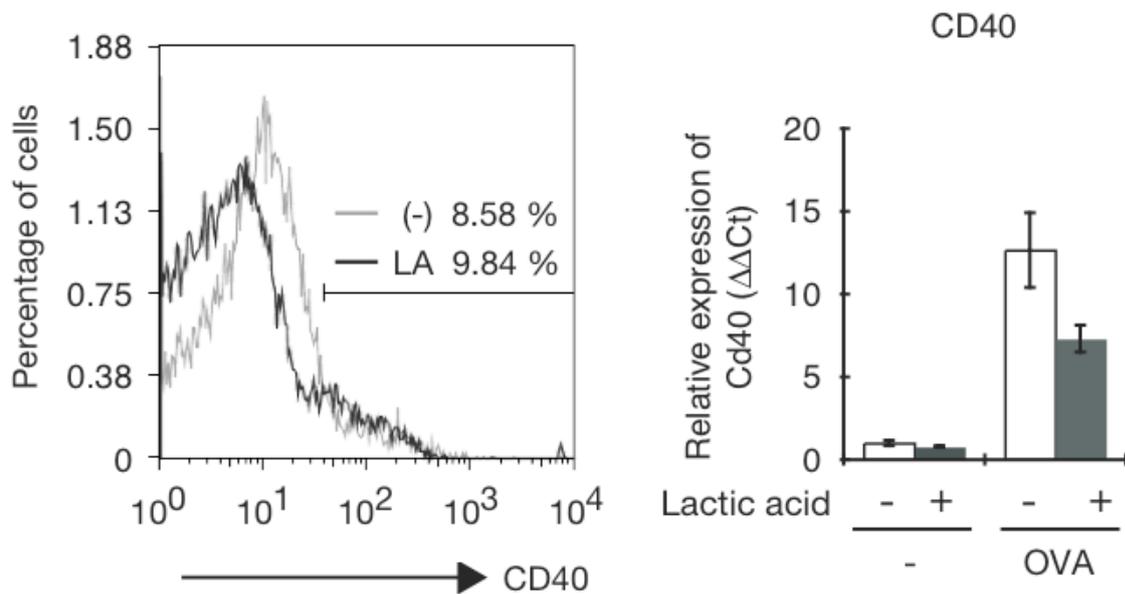


図 2-6-3. 乳酸は、CD11b⁺細胞におけるCD40の発現量を変化しない

CD11b⁺細胞をOT-II由来CD4⁺ T細胞を1:1にて共培養して、OVAペプチド、またはOVAペプチドと乳酸にて刺激した。4日間刺激した後に、CD11b⁺細胞におけるCD40タンパクの発現をFACSにて検出した（左図）。また12時間刺激後に、CD40遺伝子の発現量をreal-time PCRにて測定した（右図）。左図はCD11b⁺細胞集団にゲートをかけたものを示しており、縦軸に示したpercentage of cellsはFlowJoソフトウェアを用いて算出した。右図グラフのデータは平均値±標準偏差（n=3）で示してある。

CD11b⁺細胞におけるCD40タンパクの発現量は乳酸では変化しなかった。また、CD40遺伝子の転写産物量は乳酸により軽微に減少したが、有為な差は認められなかった。

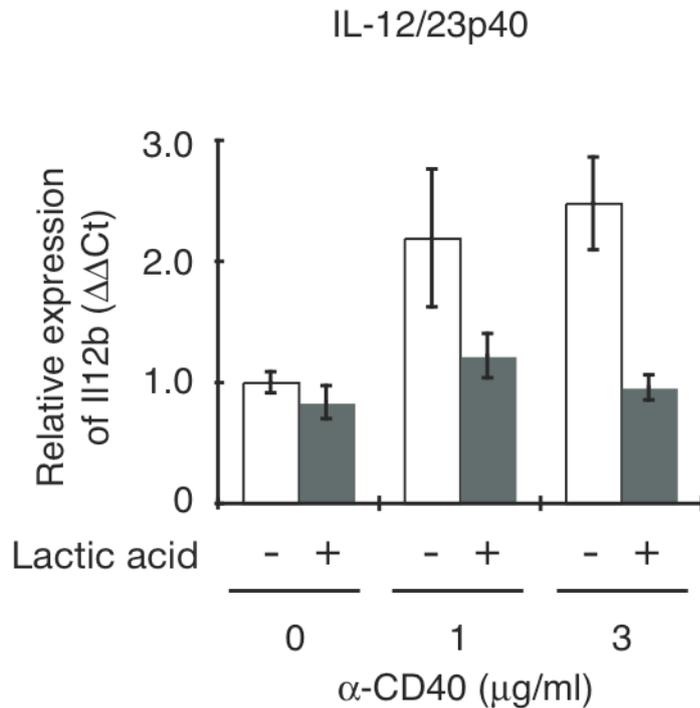


図 2-6-4. 乳酸はCD40刺激により誘導されるIL-12/23p40の発現を増強しない

C57BL/6脾細胞より精製したCD11b⁺細胞 3.5×10^5 を、平底96ウェルプレートに播き、抗CD40刺激抗体 (HM40-3) のみ、あるいは抗CD40刺激抗体と乳酸にて刺激した。なお、抗CD40刺激抗体 (HM40-3) の濃度は、グラフ横軸に示したように、0、1、3 μg/mlにて用いた。12時間刺激した後に、IL-12/23p40遺伝子の発現量を real-time PCRにて調べた。各グラフのデータは平均値±標準偏差 (n=3)で示してある。

CD11b⁺細胞におけるIL-12/23p40遺伝子の発現量は、抗CD40刺激抗体の濃度依存的に上昇したが、乳酸存在下では抑制された。

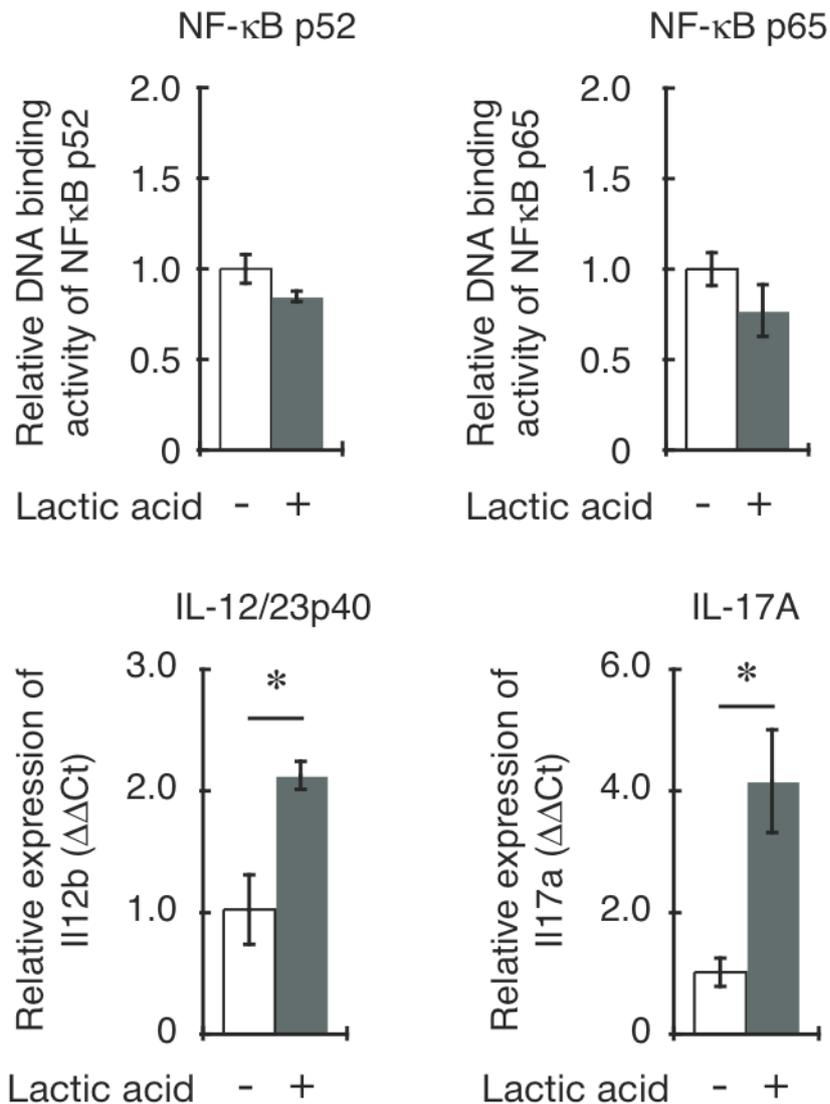


図 2-7. 乳酸は古典的あるいは非古典的 NF-κB シグナル経路に影響しない

NF-κB の活性化と、IL-12/23p40 または IL-17 遺伝子の発現について調べるため、CD11b⁺細胞と OT-II 由来 CD4⁺T 細胞とを 1:1 にて共培養し、OVA ペプチド（白色バー）または OVA ペプチドと乳酸（灰色バー）にて刺激した。刺激 6 時間後に核抽出物を調整し、この核抽出物液中における NF-κB p52 あるいは p65 の DNA 結合活性を TransAM にて検出した（上段グラフ）。また、12 時間刺激後に IL-12/23p40 と IL-17A の発現量について調べた（下段グラフ）。各グラフのデータは平均値 ± 標準偏差（n=3）で示してある。*、p < 0.05。

同時に実験を行った IL-12/23p40、あるいは IL-17A 遺伝子の発現量は乳酸により増強したが、NF-κBp52、あるいは p65 の活性化は乳酸により変化しなかった。

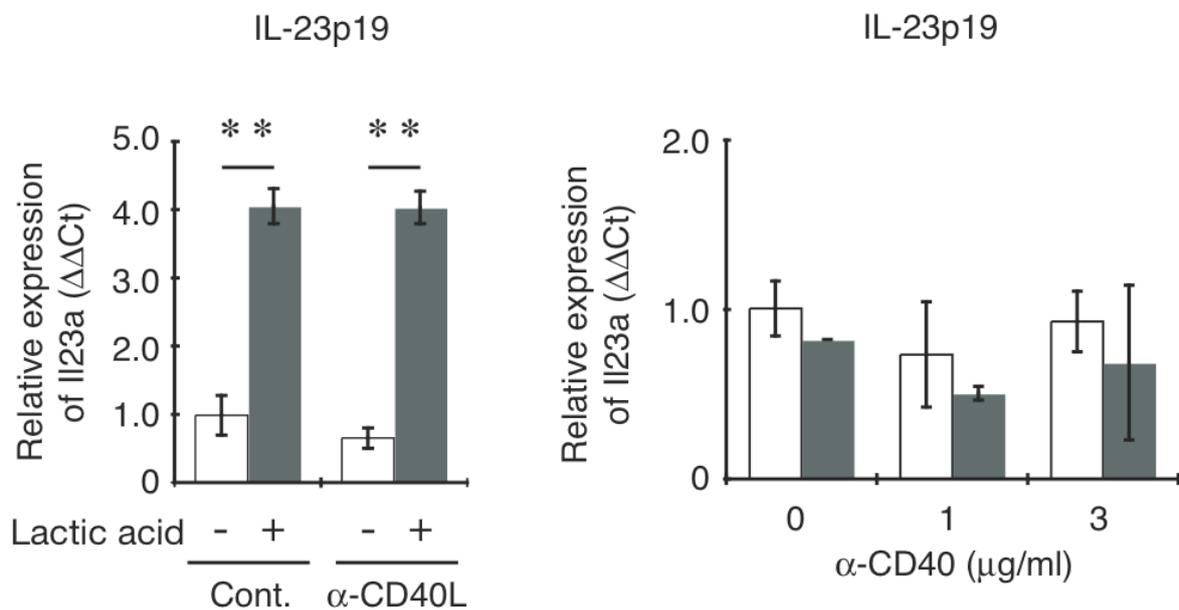


図 2-8. CD40 シグナル非依存的な IL-23p19 遺伝子の発現

CD11b⁺細胞と OT-II 由来 CD4⁺T 細胞とを細胞比 1:1 にて共培養し、抗 CD40L 抗体 (α-CD40L) 10 μg/ml を加えて、OVA ペプチド (白色バー)、あるいは OVA ペプチドと乳酸 (灰色バー) で刺激した。12 時間刺激後、IL-23p19 遺伝子の発現量を real-time PCR にて測定した (右図)。また、CD11b⁺細胞 3.5 × 10⁵ を、平底 96 ウェルプレートに播き、抗 CD40 刺激抗体 (HM40-3) のみ、あるいは抗 CD40 刺激抗体と乳酸にて刺激した (左図)。なお、抗 CD40 刺激抗体 (HM40-3) の濃度は、グラフ横軸に示したように、0、1、3 μg/ml にて用いた。12 時間刺激後に、IL-23p19 の発現量を real-time PCR にて測定した。各グラフのデータは平均値 ± 標準偏差 (n=3) で示してある。**、p < 0.01

乳酸により増強した IL-23p19 遺伝子の発現量は抗 CD40L 阻害抗体を加えても、全く抑制されなかった。また、抗 CD40 抗体刺激は、CD11b⁺細胞における IL-23p19 遺伝子の発現を全く誘導せず、乳酸による影響も認められなかった。

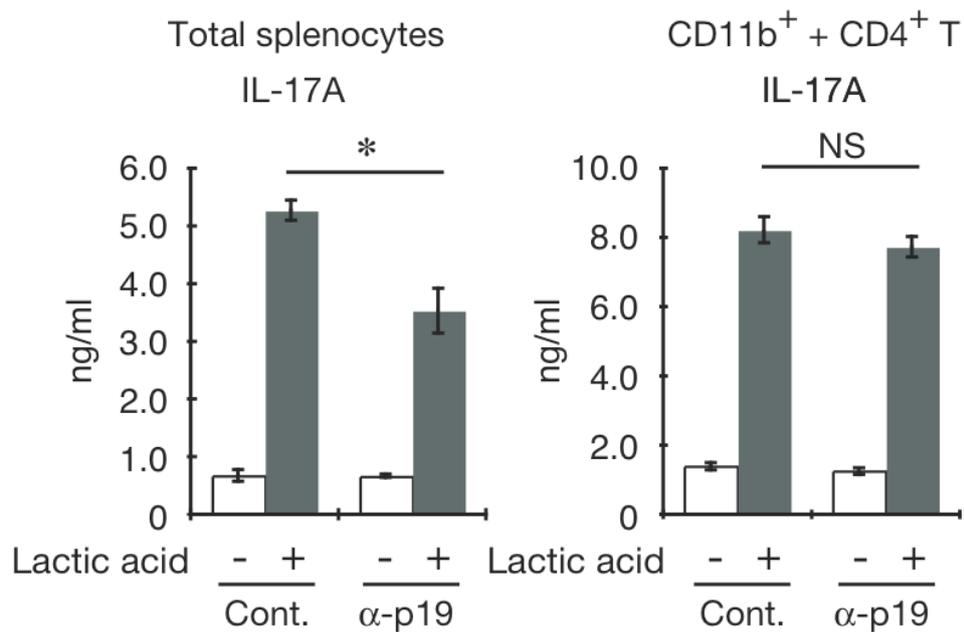


図 2-9-1. 乳酸による IL-17 産生増強効果への抗 IL-23p19 抗体の影響

OT-II 由来脾細胞 5×10^5 (左図)、または CD11b⁺細胞と OT-II 由来 CD4⁺T 細胞とを細胞比 1:1 にて共培養したもの (右図) を、抗 IL-23p19 抗体 (G23-9、α-p19) 10 μg/ml、あるいは同量のコントロール抗体 (Cont.) を加え、OVA ペプチド (白色バー)、または OVA ペプチドと乳酸 (灰色バー) にて刺激した。4 日間刺激した後、培養上清中の IL-17 産生量を ELISA で測定した。各グラフのデータは平均値 ± 標準偏差 (n=3) で示してある。NS、有意差無し、**、 $p < 0.01$ 。

抗 IL-23p19 抗体は、OT-II 由来脾細胞では乳酸による IL-17 増強効果を弱いながらも有為に抑制したが、CD11b⁺細胞と CD4⁺T 細胞との共培養系では全く抑制しなかった。

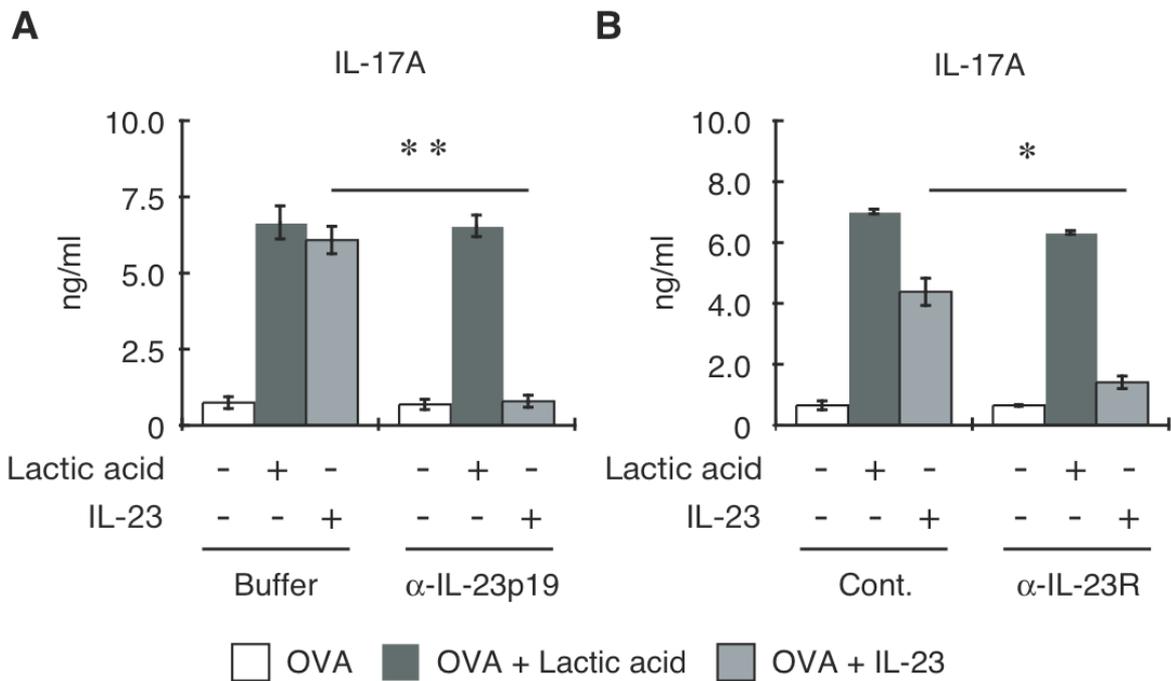


図 2-9-2. 乳酸による IL-17 産生増強作用への抗 IL-23p19 あるいは抗 IL-23 受容体抗体の影響

(A) ヤギポリクローナル抗 IL-23p19 抗体 (α -IL-23p19) 10 μ g/ml を、CD11b⁺細胞と CD4⁺T 細胞との共培養系に加え、OVA ペプチド単独 (白色バー)、乳酸と OVA ペプチド (暗灰色バー)、あるいは 0.5 ng/ml IL-23 と OVA ペプチド (明灰色バー) のいずれかで刺激した。4 日間刺激した後、培養上清中の IL-17 産生量を ELISA で測定した。

(B) ラットモノクローナル抗 IL-23 受容体抗体 (258010、 α -IL-23R) 5 μ g/ml を、CD11b⁺細胞と CD4⁺T 細胞との共培養系に加え、OVA ペプチド単独、乳酸と OVA ペプチド、あるいは 0.5 ng/ml IL-23 と OVA ペプチドのいずれかで 4 日間刺激した。刺激後に、培養上清中の IL-17 産生量を ELISA で測定した。各グラフのデータは平均値 \pm 標準偏差 (n=3)で示してある。*、p < 0.05、**、p < 0.01。

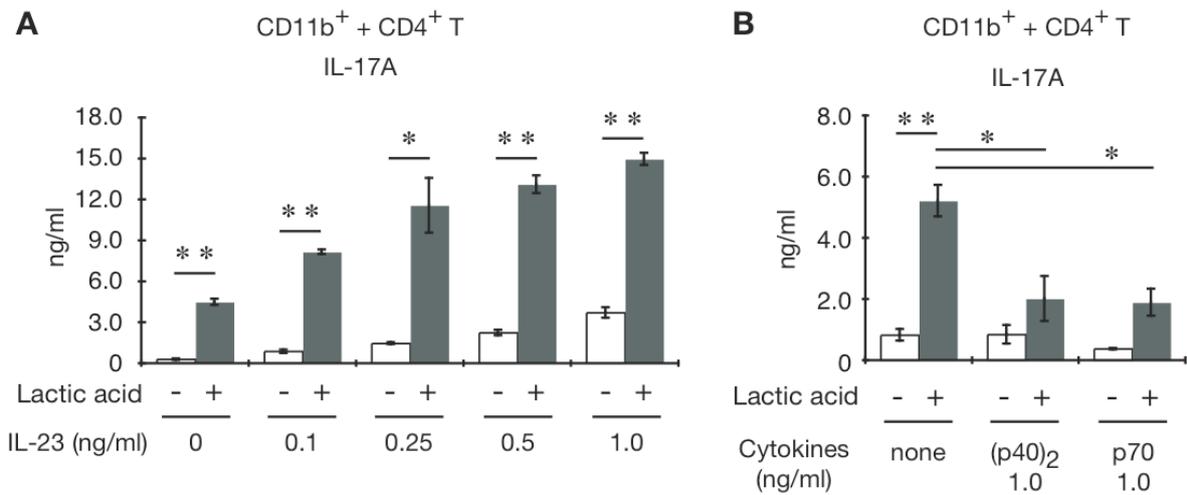


図 2-9-3. 乳酸による IL-17 産生増強効果への外来性サイトカインの影響

(A) CD11b⁺細胞と CD4⁺T 細胞との共培養系に、組換えマウス IL-23 を 0 ~ 1.0 ng/ml の範囲で加え、OVA ペプチド（白色バー）、あるいは OVA ペプチドと乳酸（灰色バー）にて刺激した。4 日間刺激した後に、培養上清中の IL-17 産生量を ELISA にて測定・定量した。

(B) 組換えマウス IL-12/23p40 ホモダイマー [(p40)₂]、または IL-12p70 を 1.0 ng/ml にて (A) と同様に共培養系に加え、OVA ペプチド（白色バー）、あるいは OVA ペプチドと乳酸（灰色バー）にて刺激した。4 日間刺激した後に、培養上清中の IL-17 産生量を ELISA にて測定・定量した。各グラフのデータは平均値±標準偏差 (n=3) で示してある。*、p < 0.05、**、p < 0.01。

IL-17 産生量は IL-23 の濃度依存的に上昇し、乳酸存在下では、それがさらに上昇した。一方で、IL-23 と同様に p40 サブユニットを含むサイトカイン、IL-12(p40)₂、並びに IL-12p70 は乳酸による IL-17 産生量への増強効果を抑制した。

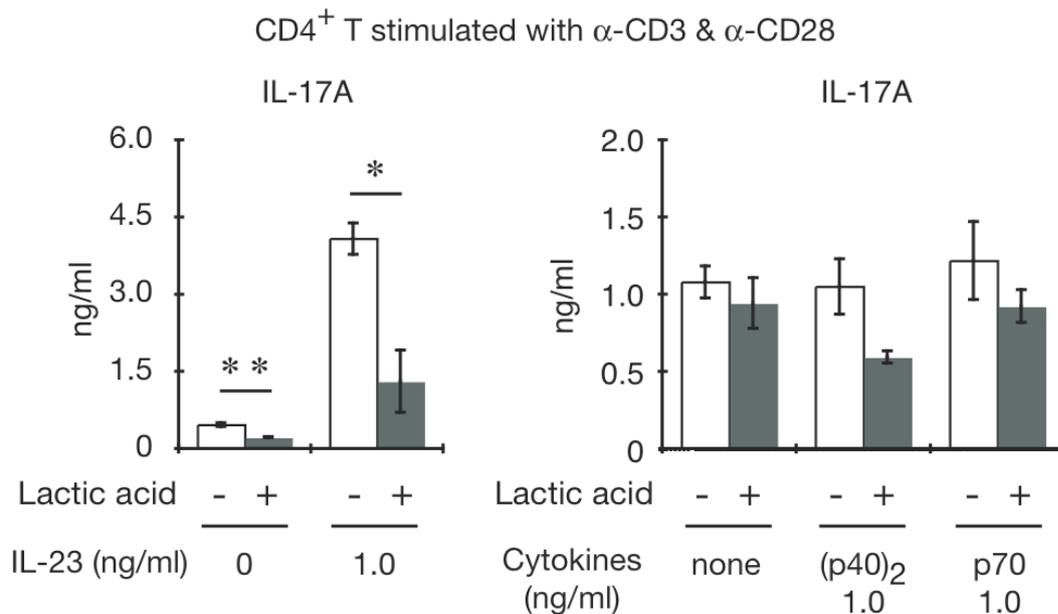


図 2-9-4. CD4⁺T 細胞からの IL-17 産生に対する外来性サイトカインと乳酸の影響

OT-II 由来 CD4⁺T 細胞 1×10^5 に対して、IL-23、IL-12/23p40(p40)₂ または IL-12p70 それぞれを 1.0 ng/ml にて加え、乳酸存在下（灰色バー）あるいは非存在下（白色バー）にて固層化した抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激した。4 日間刺激した後、培養上清を回収し、上清中の IL-17 産生量を ELISA にて測定・定量した。各グラフのデータは平均値±標準偏差（n=3）で示してある。*、 $p < 0.05$ 、**、 $p < 0.01$ 。

IL-23 は CD4⁺T 細胞からの IL-17 産生を誘導したが、乳酸はこれを有為に抑制した。また、IL-12 (p40)₂ や IL-12p70 は CD4⁺T 細胞からの IL-17 産生を誘導せず、乳酸共存下でもそれは全く変化しなかった。

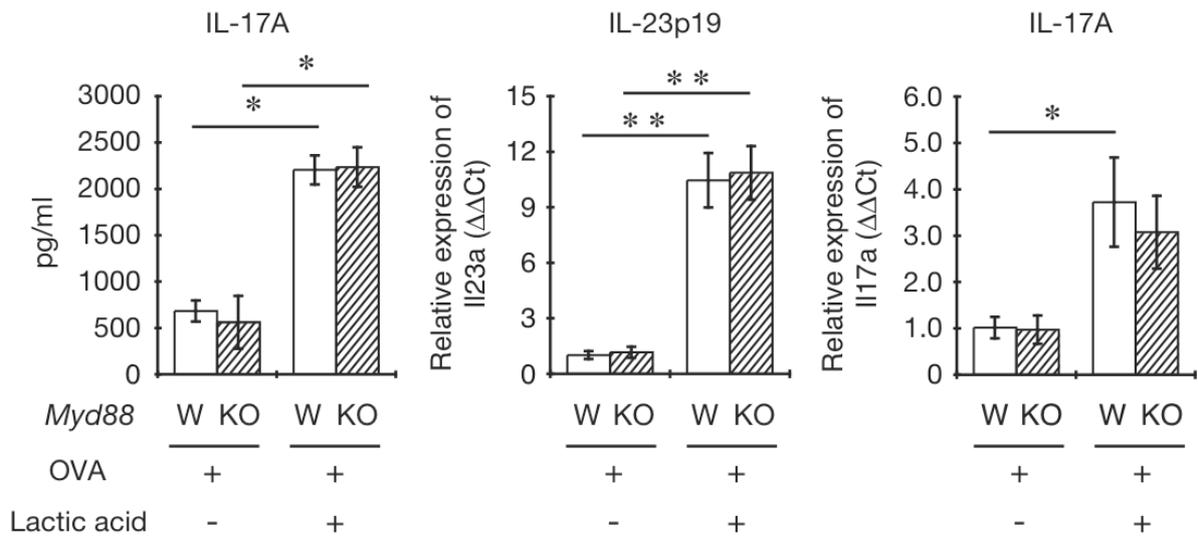


図2-11-1. 乳酸はMyD88非依存的にIL-17産生を増強する

MyD88ノックアウトマウス (*Myd88*^{-/-}、KO)、あるいはそのlittermate controlマウス (W) 由来脾細胞よりCD11b⁺細胞を精製した。どちらか一方のマウス由来CD11b⁺細胞 1×10^5 と、OT-II由来CD4⁺T細胞 1×10^5 とを混合培養し、OVAペプチド、またはOVAペプチドと乳酸により刺激した。4日間刺激した後に、培養上清中のIL-17産生量をELISAで測定した(左図)。また、12時間刺激後に、IL-23p19、IL-17Aの各遺伝子の発現量はReal-time PCRにて測定し、18S rRNAの発現量で標準化した後、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いた相対定量により算出した(中、及び右図)。なお、各グラフにおいて、白色バーはlittermate control由来の、斜線バーはノックアウトマウス由来のCD11b⁺細胞を用いた結果を示してある。各データは平均値 \pm 標準偏差 (n=3)で示してある。*、 $p < 0.05$ 、**、 $p < 0.01$ 。

MyD88野生型、並びにノックアウトのどちらのマウス由来CD11b⁺細胞を用いても、IL-17産生量、及びIL-23p19、IL-17各遺伝子の発現量に対する乳酸の増強作用に変化は認められなかった。

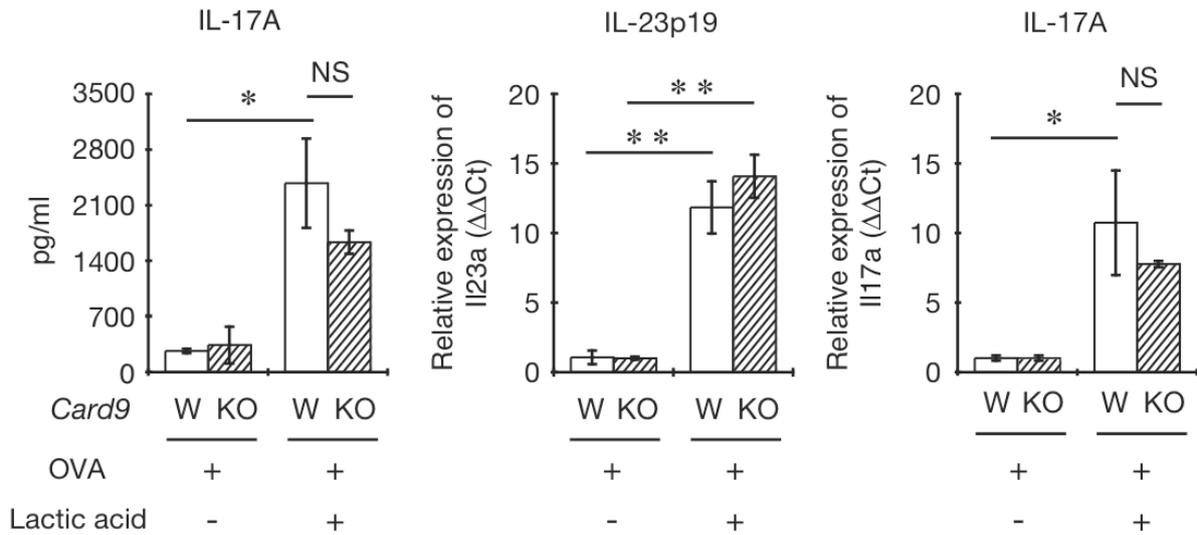


図 2-11-2. 乳酸は CARD9 非依存的に IL-17 産生を増強する

CARD9 ノックアウトマウス (*Card9*^{-/-}、KO)、あるいはその littermate control マウス (W) 由来脾細胞より CD11b⁺ 細胞を精製し、どちらか一方のマウス由来 CD11b⁺ 細胞と、OT-II 由来 CD4⁺T 細胞とを細胞比 1:1 にて混合培養し、OVA ペプチド、または OVA ペプチドと乳酸により刺激した。4 日間刺激した後に、培養上清中の IL-17 産生量を ELISA で測定した (左図)。また、12 時間刺激後に、IL-23p19、IL-17A 各遺伝子の発現量は Real-time PCR にて測定した (中、及び右図)。なお、各グラフにおいて、白色バーは littermate control 由来の、斜線バーはノックアウトマウス由来の CD11b⁺ 細胞を用いた結果を示してある。各データは平均値 ± 標準偏差 (n=3) で示してある。*、p < 0.05、**、p < 0.01、NS、有意差無し。

CARD9 野生型、並びにノックアウトのどちらのマウス由来 CD11b⁺ 細胞を用いても、IL-17 産生量、及び IL-23p19、IL-17 各遺伝子の発現量に対する乳酸の増強作用に差異は認められなかった。

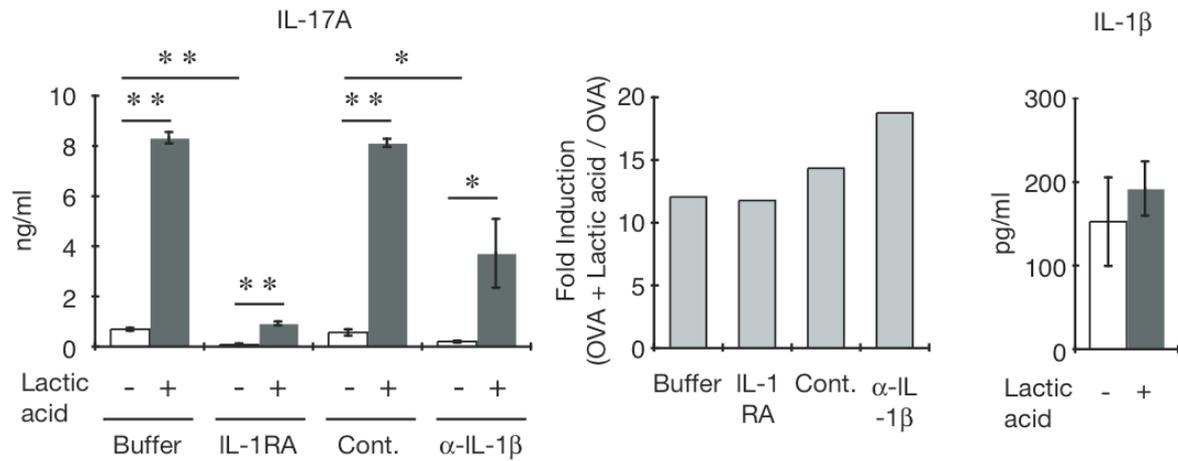


図 2-11-3. 乳酸は IL-1 非依存的に IL-17 産生を増強する

CD11b⁺細胞と OT-II 由来 CD4⁺T 細胞とを共培養し、IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) 0.25 μg/ml またはそのコントロールとしての 0.1% BSA 含有 PBS (Buffer)、抗 IL-1β 阻害抗体 (α-IL-1β) 10 μg/ml またはそのコントロール抗体 (Cont.) のいずれか 1 つを加えて、OVA ペプチド (白色バー)、あるいは OVA ペプチドと乳酸 (灰色バー) にて刺激した。4 日間刺激した後、培養上清中の IL-17 産生量を測定した (左図)。また、同一のサンプルを用いて、IL-1β 産生量も同じく ELISA にて測定した (右図)。なお、真ん中のグラフには、乳酸により IL-17 産生量は何倍上昇したかを、OVA ペプチド単独刺激を 1 とした相対値として算出した数値を示した。左右のグラフにおけるデータは、平均値 ± 標準偏差 (n=3) で示してある。*、p < 0.05、**、p < 0.01。

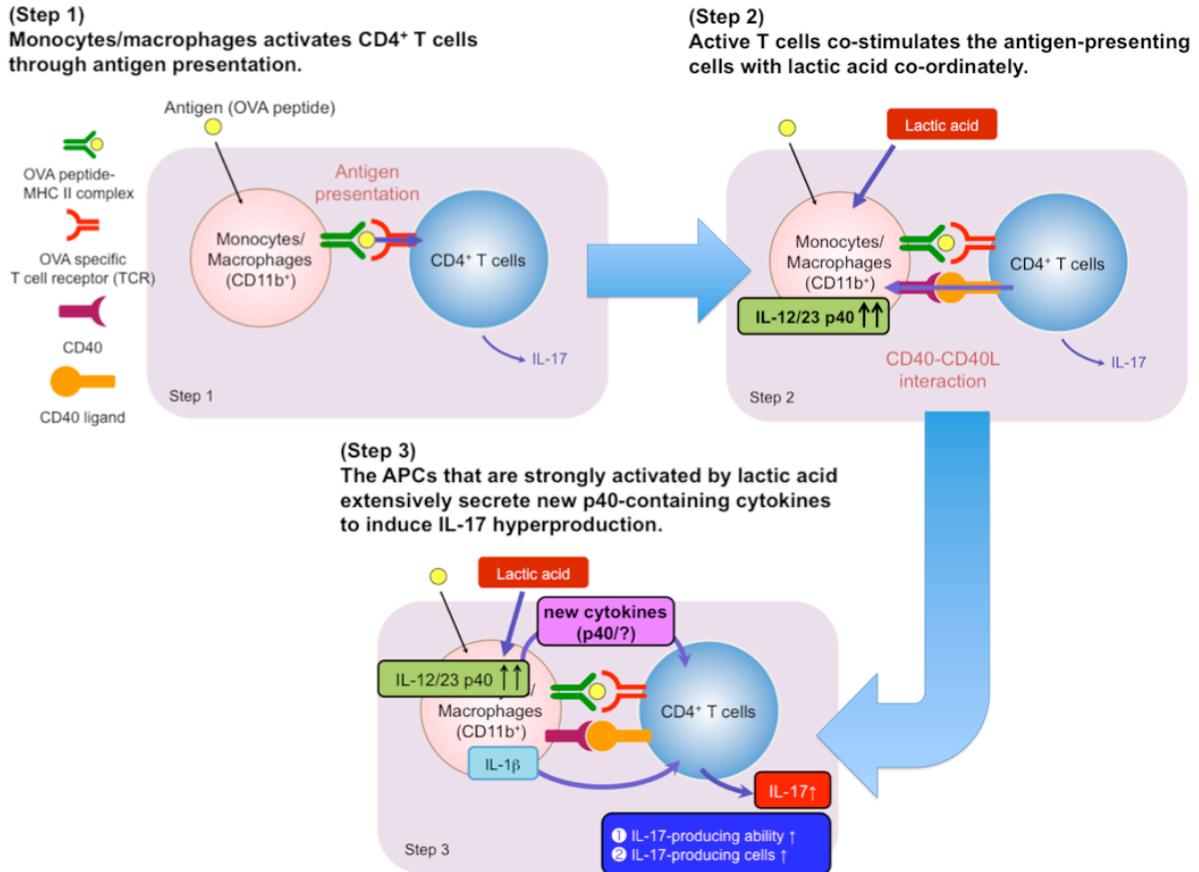


図 2-12. 乳酸の IL-17 産生への予想される増強作用機序

抗原刺激により誘導される IL-17 産生への乳酸による増強作用の機序には 3 段階のステップが存在する。

- ① 単球・マクロファージが MHC クラス II 上に抗原を提示し、CD4⁺ T 細胞が T 細胞受容体を介して、これを認識して活性化する。
- ② 活性化 CD4⁺ T 細胞からの CD40 を介したシグナルと、乳酸からのシグナルとを認識することにより、単球・マクロファージが活性化し、IL-12/23p40 の発現が誘導される。
- ③ 活性化した単球・マクロファージより分泌された、IL-12/23p40 を含む未知のサイトカインが CD4⁺ T 細胞に働き、その IL-17 産生を増強させる。なお、この時に分泌される IL-1β は IL-17 産生を上昇させるのには必要だが、乳酸による増強作用には関与しない。

2 - 5 . 考 察

本研究では、OT-II マウス由来脾細胞において TLR リガンド刺激非依存的に、抗原刺激により誘導される IL-23/IL-17 経路への乳酸による増強作用について詳しく解析を行った。この作用機序について次に列挙する 3 段階のステップが存在すると考えた。① 単球・マクロファージといった抗原提示細胞が MHC クラス II 上に抗原を提示し、CD4⁺ T 細胞は MHC クラス II 上に提示された抗原を、T 細胞受容体を介して認識・活性化する。② 活性化 CD4⁺ T 細胞からのシグナルと、乳酸からのシグナルとを認識することによって、抗原提示細胞が活性化する。③ 活性化した抗原提示細胞からの刺激を受けて CD4⁺ T 細胞はさらに活性化し、IL-17 を分泌する。本研究では、乳酸による IL-17A 産生増強作用を解析することにより、次に述べる事柄を明らかにした。(1) 脾細胞の分画により、単球・マクロファージ及び、effector/memory CD4⁺ T 細胞が、抗原刺激依存的な IL-17A 産生への乳酸による増強作用に必須である。(2) 乳酸は、IL-17A あるいは IFN- γ 産生 CD4⁺ T 細胞の増殖を抑制するが、IL-17A 産生細胞の機能は維持する。(3) CD40-CD40L 細胞間相互作用が先に述べたステップ 2 において、乳酸と共に働き、抗原提示細胞を活性化させ、IL-12/23p40 産生を誘導するのに必須である。(4) IL-12/23p40 産生は IL-17 産生を増加させるのに必要であるが、IL-12/23p40 を含む既知のサイトカイン、IL-23、IL-12、及び IL-12 ホモ二量体はこの IL-17 産生の上昇には関与しない。従って、IL-12/23p40 を含む未知のサイトカインが、前述のステップ 3 における effector/memory CD4⁺ T 細胞からの IL-17 産生に対する、乳酸による増強作用に関与する因子の一つである。(5) IL-1 β 産生の誘導は乳酸の有無にかかわらず、ステップ 3 における IL-17A 産生の増加に重要であるが、乳酸による IL-17A 産生増強作用にはあまり関与しない。

脾細胞中の抗原提示細胞を分画したところ、CD11b⁺ 及び F4/80⁺ 細胞は乳酸に応答し、CD4⁺ T 細胞からの抗原刺激依存的な IL-17 産生に、著しく強い増強活性を示した (図 2-3-1.)。同様に、M-CSF により誘導した骨髄由来マクロファージも増強活性を示した (図 2-3-2.)。従って、単球・マクロファージが乳酸による IL-17 産生への増強に主に働くことが示唆された。一方、樹状細胞は単球・マクロファージに比べて高い抗原提示能力をもつとされているが、CD11b⁺/CD11c⁺、あるいは F4/80⁺/CD11c⁺ 細胞は CD11b⁺ や F4/80⁺ 細胞に比べて弱い増強活性を示した (図 2-3-1.)。また、骨髄由来樹状細胞も CD4⁺ T 細胞からの IL-17 産生を強く誘導するが、その増強活性は骨髄由来マクロファージに比べると弱かった (図 2-3-2.)。これらの結果から、単球・マクロファ-

ジが、その抗原提示能力が弱いにもかかわらず、乳酸による IL-17 産生への増強に働くことが示唆された。この考えを支持するように、腫瘍関連マクロファージが腫瘍組織内の微少環境によく浸潤していることが知られている。従って、腫瘍細胞由来の乳酸がマクロファージに働いて、腫瘍組織内における慢性炎症を誘導している可能性があると考えられる。

本研究では、IL-17A 産生細胞への乳酸の影響についても明らかにした。乳酸は CD4⁺ CD62L⁺ naïve T 細胞ではなく、CD4⁺ CD62L⁻ effector/memory T 細胞や Th17 細胞からの IL-17 産生を増強した (Fig.2A、Fig.4B)。しかしながら、乳酸は IL-6・TGF-β 刺激による naïve T 細胞からの Th17 細胞分化を著しく抑制した。一方で、乳酸は IL-17 産生細胞の割合だけではなく、その発現量も増加させた (図 2-2-1.) が、IFN-γ 及び IL-17 産生細胞のどちらの細胞増殖も抑制した (図 2-2-2.)。Kreutzらは乳酸が、ヒト細胞障害性 T 細胞の細胞増殖と、抗原刺激時の IFN-γ や IL-2 分泌を抑制することを報告している。従って、乳酸は、単球・マクロファージに主に働いて IL-17A や IL-21 のような炎症性サイトカインを分泌させ、炎症を誘導させる方向に働く一方、抗癌免疫に関与する Th1 細胞や細胞障害性 T 細胞の働きを負に調節することが考えられる。

CD40-CD40 ligand (CD40L) を介した細胞間相互作用は CD4⁺ T 細胞による抗原提示細胞からの IL-12/23p40 産生誘導への活性化に必要である (63,64)。今回、この CD40-CD40L 細胞間相互作用が、CD4⁺T 細胞からの IL-17A 産生を増加させる IL-12/23p40 の誘導に必須であることが明らかとなった。しかしながら、NF-κB シグナル経路の活性化、そして CD40 刺激により誘導される IL-12/23p40・CD40 両遺伝子の発現、これらのどれにも乳酸はあまり関与しなかった。従って、乳酸は、CD40 シグナル経路には直接関与しないと考えられる。IL-12/23p40 の発現は乳酸により軽微に増強したが (図 2-6-1.)、乳酸による IL-12/23p40 の産生量は、IL-17 産生量が増加している時、常に上昇した訳ではない (データ未掲載)。

乳酸は IL-23p19 の発現を上昇させた結果、IL-23 を介して IL-17A 産生を増強すると予想していた。しかしながら、抗 IL-23p19 抗体や抗 IL-23R 抗体は、CD11b⁺・CD4⁺T 細胞共培養系における IL-17A 産生の上昇を抑制しなかった (図 2-9-1. 及び 2-10.)。さらに、この系では乳酸による IL-23 産生の誘導が検出できず、また乳酸は、0.25 ng/ml の外来性 IL-23 よりもさらに多い量の IL-17A 産生を誘導した (図 2-9-2.)。これらの結果は、IL-17A 産生の誘導には IL-23 非依存的な経路があり、そこに関わる IL-12/23p40 を含む他のサイトカインが増強作用に関与

したことを示唆している。しかしながら、IL-12/23p40 サブユニットを共有する二つのサイトカイン、IL-12(p40)₂、そして IL-12p70 は共に、抗原刺激依存的な IL-17A 産生を増強しなかった。従って、IL-12/23p40 を含む未知のサイトカインが、effector/memory CD4⁺T 細胞に直接働きかけ、IL-17 産生の上昇を誘導したと考えられる。また、IL-12(p40)₂ や IL-12p70 が IL-17 産生への増強効果を抑制したのは、IL-17 産生を増強に働く一連の経路は IL-12/23p40 の結合による IL-12Rβ1 からのシグナルを必要とするが、これらのサイトカインがこの未知のサイトカインの IL-12Rβ1 への結合を競合的に阻害したため、と思われる。さらに乳酸は、IL-12/23p40 を含む未知のサイトカインを構成するサブユニットの発現を増強するかもしれない。また一方で、この新しいサイトカインは CD11b⁺細胞に働きかけ、T 細胞受容体-MHC 分子間の相互作用に協調して働く共刺激分子の発現を誘導・増強するかもしれない。さらには、乳酸は Th17 細胞において IL-21 の発現を誘導したが、このサイトカインは Th17 細胞の細胞集団を増殖させるのに autocrine あるいは paracrine に働く。従って、IL-21 の発現増強に働く他の因子が、IL-17 産生細胞の増殖の誘導に関与する可能性も考えられる。

細胞由来の内在性成分による炎症誘発刺激への応答には様々なシグナル経路が既に知られている。今回、乳酸からのシグナルが内在性成分を認識して活性化する MyD88、Card9 並びに NALP3 経路に関与するかどうかについて検討した。ノックアウトマウスを用いて得られた実験結果より、乳酸による増強作用は MyD88、及び Card9 非依存的であることが示された。Samuel らは最近、乳酸が、ヒトマクロファージ細胞株、U937 細胞株において MD-2 の発現を介して、TLR4 からのシグナルを増強することを報告した。しかしながら、今回用いた実験系において、TLR4 のアダプター分子である MyD88 は、IL-23p19 の発現及び IL-17A 産生への乳酸による増強作用には関与しなかった。さらに、乳酸は J774.1 細胞株において、TLR リガンド刺激により誘導される NF-κB 経路の活性化を増強しなかった(39)。また、Syk-Card9 経路が IL-17A 産生 CD4⁺T 細胞の分化誘導に関与することが報告されているが(65)、乳酸による IL-17A 産生増強作用は、Card9 ノックアウトマウス由来 CD11b⁺細胞を用いても影響されなかった。さらに、乳酸が NALP3-inflammasome 経路に関わるか調べるため、IL-1β の発現を調べた。OVA ペプチド刺激により誘導された IL-1β の遺伝子発現と分泌量は乳酸を加えても、僅かに増加するか、もしくはほとんど変化しなかった。IL-1RA あるいは抗 IL-1β 抗体による IL-1 シグナルの阻害は、OVA ペプチド刺激、あるいは OVA ペプチドと乳酸の共刺激による IL-17 産生をどちらとも抑制した。しかしながら、これらの阻害処理は、乳酸

による IL-17 産生への増強作用には影響を及ぼさなかった。IL-1 シグナルは Th17 細胞の分化と、その細胞における IL-17 発現の維持に働くことがわかっている(28,66)。これらの結果は、IL-1 刺激が IL-17A 分泌を強く誘導するのに関わるが、乳酸によって誘導されるシグナル経路には関与しないことを示唆している。

細胞膜表面には monocarboxylate transporter (MCT) が存在し、これは乳酸や酢酸、チオグリコール酸といったカルボキシル基を一つ有する分子、いわゆるモノカルボン酸をプロトン依存的に細胞内外に輸送する(40)。当研究室では以前に、TLR リガンド刺激によって誘導されるヒト IL-23p19 遺伝子のプロモーター活性への乳酸の増強作用は pH 依存的であることを報告した(39)。この報告の中で、(1) 乳酸の増強活性が培地 pH の中和により低下し、細胞外 pH に依存すること、(2) その取り込みにより細胞質 pH が低下すること、(3) 単純な細胞外環境の酸性化はプロモーター活性に影響を及ぼさないこと、そして(4) 乳酸ナトリウムには増強活性がないことを示した。また未発表ながら他のモノカルボン酸にも同様の増強活性が存在すること、ジカルボン酸であるコハク酸にはその活性がないことも確かめている。以上のことから乳酸は MCT によって抗原提示細胞内に取り込まれて、IL-23p19 遺伝子の発現を増強すると考えられる。しかしながらその後の作用については、乳酸を認識する未知の細胞内因子が関与するのか、あるいは乳酸の細胞内流入により乳酸発酵経路の平衡状態がピルビン酸側に傾き、NAD/NADH バランスが影響を受けるのか、などが考えられ、作用機序の同定にはさらなる検討が必要である。一方、MCT 以外に、G protein-coupled receptor である GPR81 が乳酸を直接認識し、乳酸は脂肪細胞における脂肪代謝を抑制することが知られている(67-69)。GPR81 の脾臓での発現は認められないながらも、マクロファージに発現している可能性は否定できず、この受容体の関与についても調べる必要がある。またプロトンを取り込み、細胞外環境の酸性化を認識する GPCR (OGR1 や GPR4、G2A、TDAG8) が存在し、その下流では三量体 G タンパクを介して cAMP 経路が活性化することがわかっている(70)。乳酸による増強活性に cAMP が関与するかどうかが調べるために cAMP-responsive element (CRE) により制御されるプロモーター活性への乳酸の影響を調べたが、乳酸はこのプロモーター活性には全く影響を及ぼさず(第1章、図 1-3-3.)、cAMP の活性化に関与しないことが示唆された。このことから、乳酸により誘導されるシグナルの認識に、これらの GPCR は関与しないであろう、と考えられる。

癌細胞から分泌された、サイトカインやケモカインといった種々の免疫調節因子や、障害を受けた細胞から遊離した因子は、免疫担当細胞

胞を腫瘍組織に浸潤させ、腫瘍組織局所において炎症をもたらすことが知られている(8)。しかしながら、腫瘍微小環境において炎症がよく認められるが必ずしも癌排除に働く訳ではなく、腫瘍細胞にそれ以外の恩恵をもたらす。腫瘍微小環境における乳酸濃度の亢進もその一つで、“Warburg effect”という癌細胞に特徴的な現象の結果としてもたらされる。今回の研究成果により乳酸は、CD4⁺ T細胞の抗原刺激依存的な細胞増殖を抑制し、さらに抗腫瘍免疫を担うとされる Th1 細胞からの IFN- γ 産生を抑制することにより、IL-23/IL-17 経路を増強させる方向に働くことが示唆された。従って、乳酸は腫瘍の成長促進に働く重要な免疫調節因子かもしれない。事実、子宮頸癌や頭頸部癌において、腫瘍組織内の乳酸濃度の亢進と、癌転移や予後不良との関連性が報告されている。以上から、乳酸を認識し活性化する免疫反応を標的とすることは多様な癌の治療へと繋がる有効な手段かもしれない。今後は、免疫担当細胞において乳酸を認識し活性化するシグナル経路を解明していきたいと考えている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始適切な御指導、御討論を賜りました大阪府立成人病センター研究所・分子遺伝学部門部長 井上徳光博士に深く御礼申し上げます。終始適切な御指導、御討論を賜りました奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・細胞構造学講座 塩坂貞夫教授に深く御礼申し上げます。

終始熱心な御指導を賜り、また研究の進行方向や思考方法等、度重なる御助言を賜りました、大阪府立成人病センター研究所・分子遺伝学部門 赤澤隆博士、並びに北海道大学医学部・免疫学分野 志馬寛明博士の御両名には感謝の意に耐えません。

数々の研究に対する有意義な御指導や御討論、御協力を賜りました大阪府立成人病センター研究所 分子遺伝学部門の皆様に深く感謝致します。

本論文を審査してくださいました、奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科、竹家達夫教授、石田靖雅準教授、そして大阪府立成人病センター研究所、加藤菊也所長に深く感謝いたします。

最後に、博士後期課程の学生生活を経済面、そして精神面から支えてくれた家族に深く感謝したいと思います。

2011年3月

藪 政彦

参考文献

- 1 Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Criollo, A., Ortiz, C., Lidereau, R., Mariette, C., Chaput, N., Mira, J. P., Delaloge, S., Andre, F., Tursz, T., Kroemer, G., and Zitvogel, L. 2007. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev* 220:47-59.
- 2 Bianchi, M. E. and Manfredi, A. A. 2007. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 220:35-46.
- 3 Duncan, J. A., Bergstralh, D. T., Wang, Y., Willingham, S. B., Ye, Z., Zimmermann, A. G., and Ting, J. P. 2007. Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8041-6.
- 4 Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W. P., Weinrauch, Y., Monack, D. M., and Dixit, V. M. 2006. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440:228-32.
- 5 Sutterwala, F. S., Ogura, Y., Szczepanik, M., Lara-Tejero, M., Lichtenberger, G. S., Grant, E. P., Bertin, J., Coyle, A. J., Galan, J. E., Askenase, P. W., and Flavell, R. A. 2006. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 24:317-27.
- 6 Yamasaki, S., Ishikawa, E., Sakuma, M., Hara, H., Ogata, K., and Saito, T. 2008. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat Immunol* 9:1179-88.
- 7 Balkwill, F., Charles, K. A., and Mantovani, A. 2005. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7:211-7.
- 8 Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436-44.
- 9 Langowski, J. L., Zhang, X., Wu, L., Mattson, J. D., Chen, T., Smith, K., Basham, B., McClanahan, T., Kastelein, R. A., and Oft, M. 2006. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 442:461-5.
- 10 Kortylewski, M., Xin, H., Kujawski, M., Lee, H., Liu, Y., Harris, T., Drake, C., Pardoll, D., and Yu, H. 2009. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 15:114-23.

- 11 Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J. S., Moore, K. W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J. F., and Kastelein, R. A. 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13:715-25.
- 12 Waibler, Z., Kalinke, U., Will, J., Juan, M. H., Pfeilschifter, J. M., and Radeke, H. H. 2007. TLR-ligand stimulated interleukin-23 subunit expression and assembly is regulated differentially in murine plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Mol Immunol* 44:1483-9.
- 13 Hunter, C. A. 2005. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 5:521-31.
- 14 Murphy, K. M. and Reiner, S. L. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2:933-44.
- 15 Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S. A., Gorman, D., Kastelein, R. A., and Sedgwick, J. D. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421:744-8.
- 16 Meeks, K. D., Sieve, A. N., Kolls, J. K., Ghilardi, N., and Berg, R. E. 2009. IL-23 Is Required for Protection against Systemic Infection with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 183:8026-34.
- 17 Kullberg, M. C., Jankovic, D., Feng, C. G., Hue, S., Gorelick, P. L., McKenzie, B. S., Cua, D. J., Powrie, F., Cheever, A. W., Maloy, K. J., and Sher, A. 2006. IL-23 plays a key role in *Helicobacter hepaticus*-induced T cell-dependent colitis. *J Exp Med* 203:2485-94.
- 18 Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A., and Cua, D. J. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233-40.
- 19 Uhlig, H. H., McKenzie, B. S., Hue, S., Thompson, C., Joyce-Shaikh, B., Stepankova, R., Robinson, N., Buonocore, S., Tlaskalova-Hogenova, H., Cua, D. J., and Powrie, F. 2006. Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity* 25:309-18.
- 20 Murphy, C. A., Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R. A., Sedgwick, J. D., and Cua, D. J. 2003. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune

- inflammation. *J Exp Med* 198:1951-7.
- 21 Kaiga, T., Sato, M., Kaneda, H., Iwakura, Y., Takayama, T., and Tahara, H. 2007. Systemic administration of IL-23 induces potent antitumor immunity primarily mediated through Th1-type response in association with the endogenously expressed IL-12. *J Immunol* 178:7571-80.
- 22 Overwijk, W. W., de Visser, K. E., Tirion, F. H., de Jong, L. A., Pols, T. W., van der Velden, Y. U., van den Boorn, J. G., Keller, A. M., Buurman, W. A., Theoret, M. R., Blom, B., Restifo, N. P., Kruisbeek, A. M., Kastelein, R. A., and Haanen, J. B. 2006. Immunological and antitumor effects of IL-23 as a cancer vaccine adjuvant. *J Immunol* 176:5213-22.
- 23 Lo, C. H., Lee, S. C., Wu, P. Y., Pan, W. Y., Su, J., Cheng, C. W., Roffler, S. R., Chiang, B. L., Lee, C. N., Wu, C. W., and Tao, M. H. 2003. Antitumor and antimetastatic activity of IL-23. *J Immunol* 171:600-7.
- 24 Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., and Dong, C. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6:1133-41.
- 25 Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D., Wahl, S. M., Schoeb, T. R., and Weaver, C. T. 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441:231-4.
- 26 Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., and Weaver, C. T. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6:1123-32.
- 27 Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D., Wahl, S. M., Schoeb, T. R., and Weaver, C. T. 2006. Transforming growth factor- β induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441:231-4.
- 28 Stritesky, G. L., Yeh, N., and Kaplan, M. H. 2008. IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *J Immunol* 181:5948-55.
- 29 McGeachy, M. J., Chen, Y., Tato, C. M., Laurence, A., Joyce-Shaikh, B., Blumenschein, W. M., McClanahan, T. K., O'Shea, J. J., and Cua, D. J. 2009. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol* 10:314-24.
- 30 Zhou, L., Ivanov, II, Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy,

- D. E., Leonard, W. J., and Littman, D. R. 2007. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 8:967-74.
- 31 Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. 2007. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8:942-9.
- 32 Kolls, J. K. and Linden, A. 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21:467-76.
- 33 Numasaki, M., Fukushi, J., Ono, M., Narula, S. K., Zavodny, P. J., Kudo, T., Robbins, P. D., Tahara, H., and Lotze, M. T. 2003. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 101:2620-7.
- 34 Wang, L., Yi, T., Kortylewski, M., Pardoll, D. M., Zeng, D., and Yu, H. 2009. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med* 206:1457-64.
- 35 Benchetrit, F., Ciree, A., Vives, V., Warnier, G., Gey, A., Sautes-Fridman, C., Fossiez, F., Haicheur, N., Fridman, W. H., and Tartour, E. 2002. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* 99:2114-21.
- 36 Kryczek, I., Wei, S., Szeliga, W., Vatan, L., and Zou, W. 2009. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* 114:357-9.
- 37 Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X. O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N. P., Overwijk, W. W., and Dong, C. 2009. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* 31:787-98.
- 38 Maniati, E., Soper, R., and Hagemann, T. Up for Mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment. *Oncogene* 29:5653-62.
- 39 Shime, H., Yabu, M., Akazawa, T., Kodama, K., Matsumoto, M., Seya, T., and Inoue, N. 2008. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. *J Immunol* 180:7175-83.
- 40 Halestrap, A. P. and Price, N. T. 1999. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343 Pt 2:281-99.
- 41 Kim, J. W. and Dang, C. V. 2006. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* 66:8927-30.
- 42 Schwickert, G., Walenta, S., Sundfor, K., Rofstad, E. K., and Mueller-Klieser, W. 1995. Correlation of high lactate levels in human

- cervical cancer with incidence of metastasis. *Cancer Res* 55:4757-9.
- 43 Walenta, S. and Mueller-Klieser, W. F. 2004. Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Semin Radiat Oncol* 14:267-74.
- 44 Walenta, S., Salameh, A., Lyng, H., Evensen, J. F., Mitze, M., Rofstad, E. K., and Mueller-Klieser, W. 1997. Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *Am J Pathol* 150:409-15.
- 45 Walenta, S., Wetterling, M., Lehrke, M., Schwickert, G., Sundfor, K., Rofstad, E. K., and Mueller-Klieser, W. 2000. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* 60:916-21.
- 46 Brizel, D. M., Schroeder, T., Scher, R. L., Walenta, S., Clough, R. W., Dewhirst, M. W., and Mueller-Klieser, W. 2001. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51:349-53.
- 47 Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S., Renner, K., Timischl, B., Mackensen, A., Kunz-Schughart, L., Andreesen, R., Krause, S. W., and Kreutz, M. 2007. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 109:3812-9.
- 48 Gottfried, E., Kunz-Schughart, L. A., Ebner, S., Mueller-Klieser, W., Hoves, S., Andreesen, R., Mackensen, A., and Kreutz, M. 2006. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* 107:2013-21.
- 49 Sakuma, T., Kodama, K., Hara, T., Eshita, Y., Shibata, N., Matsumoto, M., Seya, T., and Mori, Y. 1993. Levels of complement regulatory molecules in lung cancer: disappearance of the D17 epitope of CD55 in small-cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 84:753-9.
- 50 Heinemeyer, T., Wingender, E., Reuter, I., Hermjakob, H., Kel, A. E., Kel, O. V., Ignatieva, E. V., Ananko, E. A., Podkolodnaya, O. A., Kolpakov, F. A., Podkolodny, N. L., and Kolchanov, N. A. 1998. Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* 26:362-7.
- 51 Frauwirth, K. A., Riley, J. L., Harris, M. H., Parry, R. V., Rathmell, J. C., Plas, D. R., Elstrom, R. L., June, C. H., and Thompson, C. B. 2002. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* 16:769-77.
- 52 Jacobs, S. R., Herman, C. E., Maciver, N. J., Wofford, J. A., Wieman, H. L.,

- Hammen, J. J., and Rathmell, J. C. 2008. Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. *J Immunol* 180:4476-86.
- 53 Zheng, Y., Delgoffe, G. M., Meyer, C. F., Chan, W., and Powell, J. D. 2009. Anergic T cells are metabolically anergic. *J Immunol* 183:6095-101.
- 54 Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W. R., and Carbone, F. R. 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based α - and β -chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 76:34-40.
- 55 Kaisho, T., Takeuchi, O., Kawai, T., Hoshino, K., and Akira, S. 2001. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* 166:5688-94.
- 56 Hara, H., Ishihara, C., Takeuchi, A., Imanishi, T., Xue, L., Morris, S. W., Inui, M., Takai, T., Shibuya, A., Saijo, S., Iwakura, Y., Ohno, N., Koseki, H., Yoshida, H., Penninger, J. M., and Saito, T. 2007. The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat Immunol* 8:619-29.
- 57 Suzuki, K., Okuno, T., Yamamoto, M., Pasterkamp, R. J., Takegahara, N., Takamatsu, H., Kitao, T., Takagi, J., Rennert, P. D., Kolodkin, A. L., Kumanogoh, A., and Kikutani, H. 2007. Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through α 5 β 1 integrin. *Nature* 446:680-4.
- 58 Akazawa, T., Shingai, M., Sasai, M., Ebihara, T., Inoue, N., Matsumoto, M., and Seya, T. 2007. Tumor immunotherapy using bone marrow-derived dendritic cells overexpressing Toll-like receptor adaptors. *FEBS Lett* 581:3334-40.
- 59 Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., and Stockinger, B. 2006. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24:179-89.
- 60 Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25:402-8.
- 61 Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J., and Gurney, A. L. 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278:1910-4.
- 62 Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M., and Murphy, K. M. 2006. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell

- ties. *Immunity* 24:677-88.
- 63 Kato, T., Hakamada, R., Yamane, H., and Nariuchi, H. 1996. Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction. *J Immunol* 156:3932-8.
- 64 Schulz, O., Edwards, A. D., Schito, M., Aliberti, J., Manickasingham, S., Sher, A., and Reis e Sousa, C. 2000. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* 13:453-62.
- 65 LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M. J., Osorio, F., Slack, E. C., Tsoni, S. V., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G. D., Ruland, J., and Reis e Sousa, C. 2007. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 8:630-8.
- 66 Chung, Y., Chang, S. H., Martinez, G. J., Yang, X. O., Nurieva, R., Kang, H. S., Ma, L., Watowich, S. S., Jetten, A. M., Tian, Q., and Dong, C. 2009. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* 30:576-87.
- 67 Liu, C., Wu, J., Zhu, J., Kuei, C., Yu, J., Shelton, J., Sutton, S. W., Li, X., Yun, S. J., Mirzadegan, T., Mazur, C., Kamme, F., and Lovenberg, T. W. 2009. Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *J Biol Chem* 284:2811-22.
- 68 Ge, H., Weiszmann, J., Reagan, J. D., Gupte, J., Baribault, H., Gyuris, T., Chen, J. L., Tian, H., and Li, Y. 2008. Elucidation of signaling and functional activities of an orphan GPCR, GPR81. *J Lipid Res* 49:797-803.
- 69 Cai, T. Q., Ren, N., Jin, L., Cheng, K., Kash, S., Chen, R., Wright, S. D., Taggart, A. K., and Waters, M. G. 2008. Role of GPR81 in lactate-mediated reduction of adipose lipolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 377:987-91.
- 70 Tomura, H., Mogi, C., Sato, K., and Okajima, F. 2005. Proton-sensing and lysolipid-sensitive G-protein-coupled receptors: a novel type of multi-functional receptors. *Cell Signal* 17:1466-76.