

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11096

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌モデル動物の抗腫瘍免疫能に低線量・低線量率放射線被ばくが及ぼす影響

研究課題名(英文) Antitumor immunities with low dose / low dose rate radiation on murine model with oral squamous cell carcinoma

研究代表者

高山 英次 (Takayama, Eiji)

朝日大学・歯学部・准教授

研究者番号：70533446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：同系マウス腫瘍細胞株を皮下および静脈内に移植した、原発巣および肺転移巣モデルを確立した。骨髄球由来抑制細胞(MDSC)は、原発巣モデルで増加した。CD4+およびCD8+T細胞およびCD4+Foxp3+T細胞は、原発巣モデルにおいて有意に減少した。さらに、原発巣モデルでTh1免疫能が増強した。原発巣モデルのTh1免疫能増強は、IL-4、IL-9およびIL-10産生能の減弱により特徴付けられた。肺転移巣モデルでは、IL-10産生が増強した。これらの結果は、腫瘍発生の様式が全身性免疫に異なる効果を及ぼし、癌患者の治療へのアプローチに影響を及ぼし得ることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Syngeneic mouse subcutaneous and pulmonary tumor models by local subcutaneous and intravenous injection of colon carcinoma CT26 cells were established. Myeloid-derived suppressor cell (MDSC) were significantly increased in the subcutaneous tumor model, but not the pulmonary model. Both CD4+ and CD8+ T cells as well as CD4+ Foxp3+ T cells were significantly decreased in the subcutaneous tumor model, but not the pulmonary model. In addition, the subcutaneous model, but not the pulmonary model, displayed a Th1 polarization bias. This bias was characterized by decreased IL-4, IL-9, and IL-10 production, whereas the pulmonary model displayed increased production of IL-10. These results suggest that the mode of tumor development has differential effects on systemic immunity that may, in turn, influence approaches to treatment of cancer patients.

研究分野：口腔生化学

キーワード：腫瘍 放射線 免疫 T細胞 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

腫瘍は患者の免疫能に干渉するので、癌患者の免疫能は健常者の免疫能とは異なる。また、治療や事故による放射線被ばくは免疫能を減弱させるが、一方では損傷組織が免疫系を刺激して炎症を引き起こす。そこで、種々の放射線被ばくが癌患者の免疫能に及ぼす影響を、口腔扁平上皮癌細胞株とマウスを用いて検討する。

健常者と癌患者の全身免疫能の違いは、種々の癌患者においても腫瘍を移植されたモデル動物においても、数多く報告があり周知である。癌患者や癌モデル動物では末梢血や脾細胞において、CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性の調節性T細胞 (Treg 細胞) や、CD14 陽性 CD33 陽性 HLA-DR 陰性 (CD11b 陽性 Gr-1 陽性 Ly6c 陽性 Ly6g 陰性 CD49d 陽性) の骨髄由来抑制細胞 (MDS 細胞) が増加することにより、抗腫瘍免疫能が減弱している。そして、本研究代表者らや他の多くの研究者は、胃癌、肝細胞癌、転移性黒色腫、口腔癌、などを伴う患者の末梢血で終末分化型 CD57 陽性 CD28 陰性 T細胞 (CD57+ T細胞) が増加していること、この CD57+ T細胞は Treg 細胞とは異なる T細胞亜集団であること、この CD57+ T細胞は病期の進行や予後と関連することを報告している (Chochi, Takayama E ら, Onc Rep, 2003; Akagi J & Baba H, Int J Clin Onc, 2008, Akagi J & Baba H, Int J Clin Onc, 2010; Shiraki T, Takayama E ら, Onc Rep, 2011; Wu RC ら, Clin Can Res, 2012; Iida M, Takayama E ら, Antican Res, 2014)。一方で本研代表者らは、健常者においても健常実験動物においても、老化に伴い抗腫瘍性 Th1 型サイトカインであるインターフェロン-ガンマ (IFN- γ) の産生能は増強され Th1 型免疫能が優位となること、老化に伴い強力な早期 IFN- γ 産生能を持つ CD8 陽性 CD122 陽性 T細胞 (マウスでは CD8+CD122+ T細胞, ヒトでは CD8+CD57+ T細胞) が増加すること、CD8+CD122+ T細胞は CD4 陽性 T細胞の IFN- γ 産生能をも促進すること、CD8+CD122+ T細胞は NKT 細胞に匹敵する細胞障害活性を持つこと、CD8+CD122+ T細胞は Th1 型免疫反応のみを促進して NKT 細胞が持つ Th2 型免疫反応促進能 (早期インターロイキン (IL)-4 産生能) を持たないこと、などを明らかにした (Takayama E ら, J Immunol, 2000; Takayama E ら, Immunol, 2003) (図 1)。さらに、本研究代表者らは、ヒト癌患者のみならず、ヒト腫瘍細胞株やマウス動物モデルを用いて、腫瘍や感染症が免疫能に及ぼす影響を、試験管内 (*ex vivo*) やモデル動物個体内 (*in vivo*) で、末梢血や脾細胞を用い、Tリンパ球亜集団と抗腫瘍性および調節性サイトカインの動態から検討してきた (Iida M, Takayama E ら, Antican Res, 2014; Ono T, Takayama E ら, Vaccine, 2012; Shiraki T, Takayama E ら, Onc Rep, 2011, Takayama E ら, Int J Parasitol, 2010; Sugawara H, Takayama E ら, Int J Can, 2008; Kosaka T, Takayama

E ら, Prostate, 2007; Majima T, Takayama E ら, Int J Can, 2006; Sato K, Takayama E ら, 2005; Tsujimoto H, Takayama E ら, Shock, 2005; Shinomiya N, Takayama E ら, Clin Exp Immunol, 2004; Chochi K, Takayama E ら, Onc Rep, 2003; Majima T, Takayama E ら, Antican Res, 2002; Habu Y, Takayama E ら, J Immunol, 2001, Kawabata T, Takayama E ら, Cancer, 2001; Majima T, Takayama E ら, J Surg Onc, 2001)。癌患者や癌モデル動物の末梢血や脾細胞において、Treg 細胞や MDS 細胞に加えて CD57+ T細胞や CD8+CD122+ T細胞など T細胞亜集団、そして IFN- γ , IL-10, IL-17, IL-18, などのサイトカイン産生能を検討することが、病期、予後、抗腫瘍免疫能、などに関連する全身免疫能の評価に重要である。

本研究代表者らは、口腔扁平上皮癌を伴うヒト患者の末梢血中 Tリンパ球亜集団構成は、病期の進行に伴い変化することを明らかにした (Iida M, Takayama E ら, Antican Res, 2014)。また、本研究代表者らは、口腔扁平上皮癌を伴うヒト患者において、末梢血球の抗腫瘍性 Th1 型サイトカイン IFN- γ の産生能と調節性 Th2 型サイトカイン IL-10 の産生能は病期の進行に伴い変化するという事を明らかにした (Naganawa K, Takayama E ら, Open Dent J, 2015)。これらのことは、本研究代表者らや他の多くの研究者により、胃癌、肝細胞癌、転移性黒色腫、前立腺癌、子宮頸癌、などを伴う患者の末梢血を用いた検討から報告されたこれまでの内容と大きな隔たりはない。しかし、種々の放射線被ばくが腫瘍を伴う患者の免疫能に及ぼす影響については、口腔扁平上皮癌を伴う患者に限らず、未だ十分な検討はなされていない。

本研究代表者らは、マウス由来口腔扁平上皮癌細胞株 (Sq1979 株) を移植された同系統マウス (C3H/HeN 系統) においては、MDS 細胞が増加 (Sumi S, Takayama E ら, Onc Rep, 2017)、IFN- γ 産生能は減弱され、IL-10 の産生能は増強された (Azuma Y, Takayama E ら, Can Transl Med, 2017)。この結果は、他の研究者らにより種々の腫瘍を伴う動物モデルについて報告されているものと大きな隔たりは無い。しかし、腫瘍細胞株を同系統のマウスに移植した癌モデル動物において、種々の放射線被ばくが全身免疫能や抗腫瘍免疫能に及ぼす影響については、口腔扁平上皮癌モデル動物の例に限らず、未だ十分な検討はなされていない。

2. 研究の目的

本研究代表者らは、口腔扁平上皮癌マウス動物モデルの全身免疫能について、免疫担当細胞亜集団構成や抗腫瘍性サイトカイン産生能などが変化することを明らかにした (Sumi S, Takayama E ら, Onc Rep, 2017; Azuma Y, Takayama E ら, Can Transl Med, 2017)。このような癌モデル動物において低

線量・低線量率放射線被ばくが癌患者の腫瘍および免疫系に及ぼす影響を明らかにする。そして、得られた知見の治療への応用を探る。

放射線は発癌にも腫瘍成長抑制にも免疫能抑制にも炎症惹起にも作用することは、疫学研究、治療研究、動物モデルを用いた研究、などから周知のことである。そして、癌患者に特異的な免疫能も、ヒト患者やモデル動物を用いた研究から周知のことである。しかし、放射線高感受性実験動物はそもそも免疫系が不全であるため、放射線被ばくが癌患者に特異的な免疫能にどのように影響して、そしてその免疫能の変化が腫瘍成長や予後にどのように影響するかという仕組みについては、モデル動物を用いた検討はほとんどなされていない。そこで、本研究では免疫系が正常な癌モデル動物を作成して、放射線被ばくが癌患者に特異的な免疫能に及ぼす影響を検討する。本研究で明らかとなる知見は、単に低線量・低線量率放射線被ばくが癌患者特異的な免疫能に及ぼす影響を明らかにするのみならず、予防や治療に有益な新規の情報を提供すると期待される。

3. 研究の方法

本代表研究者らは、マウス由来癌細胞株を同系統マウスの皮下に移植すると、ヒト癌患者と同様に、MDS細胞が増加し (Sumi S, Takayama E, *ら*, *Onc Rep*, 2017)。抗腫瘍性 Th1 型サイトカインである IFN- γ の産生能が減弱する一方で調節性 Th2 型サイトカインである IL-10 の産生能は増強されることを明らかにしている (Azuma Y, Takayama E, *ら*, *Can Transl Med*, 2017)。

そこで、マウス由来癌細胞株を同系統マウスの (1) 皮下に移植したモデル動物、(2) 静脈内に移植したモデル動物を作成する。この癌患者に特異的な免疫能をもつ癌モデル動物の (3) 様々な放射線量の被ばく癌モデル動物を作出する。そして、それぞれのマウスの (1) 免疫担当細胞亜集団、(2) サイトカインの産生能、(3) 腫瘍成長、(4) 予後を調べる。

4. 研究成果

大腸癌細胞 CT26 株を同系マウス (BALB/c) の皮下および静脈内に移植して、原発巣および肺転移巣のモデルを確立した。MDS 細胞は、原発巣モデルで増加した。CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞および CD4 陽性 Foxp3 陽性 T 細胞は、原発巣モデルにおいて減少した。さらに、原発巣モデルで、Th1 免疫能が増強した。原発巣モデルの Th1 免疫能増強は、IL-4、IL-9 および IL-10 産生能の減弱により特徴付けられた。肺転移巣モデルでは、IL-10 産生能が増強した。これらの結果は、腫瘍発生の様式が全身性免疫能に異なる効果を及ぼすこと示すとともに、癌患者の治療へのアプローチに重要な知見を示唆している。

また、様々な放射線量で被ばくした健常マウスの免疫担当細胞亜集団とサイトカインの産生能を調べた。ある線量で白血球細胞は減少しないが MDS 細胞の割合が増加し、ある線量で白血球細胞は減少して MDS 細胞および CD4 陽性 T 細胞の両者の割合が増加した。さらに、ある線量で Th1 免疫能が増強しないが、ある線量で Th1 免疫能が増強した。Th1 免疫能増強は、IFN- γ 産生能の増強と IL-4 産生能の減弱により特徴付けられた。CT26 株を同系統マウスの皮下に移植した原発巣モデルでは、ある線量で腫瘍成長が促進され予後が増悪し、ある線量では腫瘍成長が抑制され予後が改善した。これらの結果は、異なる線量が全身性免疫能に異なる効果を及ぼすこと示すとともに、癌患者の治療へのアプローチに重要な知見を示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

1. Masuda J, Takayama E, Ichinohe T, Strober W, Mizuno-Kamiya M, Ikawa T, Kitani A, Kawaki H, Fuss IJ, Kawamoto H, Seno A, Vaidyanath A, Umemura N, Mizutani A, Kasai T, Honjo Y, Satoh A, Murakami H, Katsura Y, Kondoh N, Seno M. Immunosuppression effect by adipose tissue-derived mesenchymal stem cells isolated from 2-microglobulin deficient mice. *Exp Ther Med*, in press.
2. Kondoh N, Mizuno-Kamiya M, Takayama E, Kawaki H, Umemura N, Yamazaki Y, Mitsudo K, Tohnai I. Perspectives of immune suppression in the tumor microenvironment. *Open Dent J*, in press.
3. Masuda J, Shigehiro T, Matsumoto T, Satoh A, Mizutani A, Umemura C, Saito S, Kijihira M, Takayama E, Seno A, Murakami H, Seno M. Cytokine expression and macrophage localization in xenograft and allograft tumor models stimulated with lipopolysaccharide. *Int J Mol Sci*, 19:1261, 2018.
4. Adachi M, Mizuno-Kamiya M, Takayama E, Kawaki H, Umemura N, Inagaki T, Sumi S, Motohashi M, Muramatsu Y, Sumitomo S, Shikimori M, Yamazaki Y, Kondoh N. Gene expression analyses associated with malignant phenotypes of metastatic subclones derived from a mouse oral squamous cell carcinoma cell line, Sq-1979. *Onc Lett*, 15:3350, 2018.

5. Inagaki T, Mizuno-Kamiya M, Takayama E, Kawaki H, Chihara E, Muramatsu Y, Sumitomo S, Kondoh N. Suppressive effect of mesenchymal stromal cells on interferon- γ -producing capability of spleen cells was specifically enhanced via humoral mediator(s) from mouse oral squamous cell carcinoma Sq-1979 cells in vitro. *Can Transl Med*, 4:9, 2018.
6. Masuda J, Takayama E, Strober W, Satoh A, Morimoto Y, Honjo Y, Ichinohe T, Tokuno S, Ishizuka T, Nakata T, Mizutani A, Umemura N, Kitani A, Fuss IJ, Shigehiro T, Kawaki H, Mizuno-Kamiya M, Kondoh N, Seno M. Tumor growth limited to a single site vs tumor growth in multiple sites exhibit differential effects on systemic immunities. *Oncol Rep*, 38:449, 2017.
7. Sumi S, Umemura N, Takayama E, Ohkoshi E, Adachi M, Mizuno-Kamiya M, Inagaki T, Kawaki H, Sumitomo S, Kondoh N. Metastasized murine oral squamous cell carcinoma cells induce intratumoral polymorphonuclear myeloid derived suppressor cells. *Onc Rep*, 37:2897, 2017.
8. Azuma Y, Mizuno-Kamiya M, Takayama E, Kawaki H, Inagaki T, Chihara E, Muramatsu Y, Kondoh N. The producing capabilities of interferon (IFN)- γ and interleukin (IL)-10 of spleen cells in primary and metastasized oral squamous cell carcinoma cells-implanted mice. *Cancer Transl Med*, 3:194, 2017.
9. Adachi N, Takayama E, Adachi M, Mizuno-Kamiya M, Kawaki H, Takeuchi H, Kubo S, Ishigami H, Kurachi M, Kondoh N. Promotion of Nickel (Ni) Allergy by Anamnestic Sensitization with a Bacterial Component, Lipopolysaccharide (LPS), in Mice. *Open Dent J*, 10:531, 2016.
10. Masuda J, Kawamoto H, Strober W, Takayama E, Mizutani A, Murakami H, Ikawa T, Kitani A, Maeno N, Shigehiro T, Satoh A, Seno A, Arun V, Kasai T, Fuss IJ, Katsura Y, Seno M. Transient Tcf3 Gene Repression by TALE-Transcription Factor Targeting. *Appl Biochem Biotechnol*, 180:1559, 2016.
11. Naganawa K, Takayama E, Adachi M, Mitsudo K, Iida M, Kamiya-Mizuno M, Kawaki H, Ichinose M, Motohashi M, Muramatsu Y, Tohnai I, Sumitomo S, Shikimori M, Kondoh N. Producing

Capabilities of Interferon-gamma and Interleukin-10 in Peripheral Blood from Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Open Dent J*, 9:120, 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 英次 (TAKAYAMA Eiji)

朝日大学 歯学部 准教授

研究者番号 : 70533446

(2) 研究分担者

一戸 辰夫 (ICHINOHE Tatsuo)

広島大学 原爆放射線医科学研究所 教授

研究者番号 : 80314219

佐藤 あやの (SATO Ayano)

岡山大学 ヘルシシステム統合科学研究科 准教授

研究者番号 : 40303002

増田 潤子 (MASUDA Junko)

岡山大学 ヘルシシステム統合科学研究科 助教

研究者番号 : 20424674

近藤 信夫 (NOBUO Kondoh)

朝日大学 歯学部 教授

研究者番号 : 40202072

川木 晴美 (KAWAKI Harumi)

朝日大学 歯学部 准教授

研究者番号 : 70513670

神谷 真子 (KAMIYA Masako)

朝日大学 経営学部 准教授

研究者番号 : 80181907

梅村 直己 (UMAMURA Naoki)

朝日大学 歯学部 助教

研究者番号 : 80609107

中田 隆博 (NAKATA Takahiro)

常葉大学 健康マネジメント学部 教授

研究者番号 : 40273932

本庶 仁子 (HONJO Yoshiko)

広島大学 原爆放射線医科学研究所 講師

研究者番号 : 80614106

足立 誠 (ADACHI Makoto)

朝日大学 歯学部 講師

研究者番号 : 10468192