

令和元年6月20日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19866

研究課題名(和文) 腫瘍促進マクロファージの抑制を介した抗腫瘍T細胞活性化による膵・胆道癌治療

研究課題名(英文) Pancreatic-biliary tract cancer treatment with an anti-tumor T cell activation through inhibition of tumor-promoting macrophages

研究代表者

三浦 卓也 (Miura, Takuya)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30722136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝外胆管癌患者において腫瘍促進TAM高浸潤および抗腫瘍T細胞低浸潤が予後に悪影響を及ぼすことを明らかにした。In vitro研究で予定した実験計画の見込みが外れ計画変更を要した。学内協力体制から実現可能な研究方法を考慮し、TLR3に着目した。腫瘍細胞がnecrosisを起こした際、それから放出されるDAMPsと呼ばれる内在性因子が腫瘍微小環境ではTLR3を介して腫瘍促進または抑制に働くとされている。本研究では腫瘍細胞のTLR3発現はリンパ節転移に関連し、CCL2、CCL5、IL-8の発現を誘導することが示唆され、TLR3の腫瘍細胞発現は周囲微小環境に影響を与え転移能に関連することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍促進TAMを標的とし、抗腫瘍T細胞浸潤を調節することで予後の改善が期待できることを示唆した一方、TLR3という免疫機構に関連するシステムが腫瘍細胞に存在し、それが腫瘍微小環境に影響を与え、腫瘍の進展に寄与することを示唆したことが研究成果である。この知見は、宿主に存在する免疫機構の中心的存在であるマクロファージやT細胞を標的とする場合、それらの免疫機構を調節することは、腫瘍細胞にも影響を及ぼす事実を示している。腫瘍免疫の複雑系を示唆し、微小環境を標的とする際、腫瘍細胞自体にも着目する必要があることを示したことに社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In the patients with extrahepatic bile duct cancer, the histopathological analysis demonstrated high infiltration of tumor-promoting macrophages and low infiltration of tumor-killing T-cells have a poor prognostic impact. In vitro research was conducted on pancreatic and biliary cancer, but the prospect of the experimental design was out of order. Considering feasible research from the cooperation system in our institution, we focused on TLR3. Tumor cells are known to undergo necrosis due to external stress such as chemotherapy and radiation therapy. In this situation, endogenous factors called DAMPs are thought to work in tumor promotion or suppression via TLR3 in tumor microenvironment. In this research, TLR3 expression in tumor cells is associated with lymph node metastasis and induces expression of CCL2, CCL5, and IL-8. Tumor cell expression of TLR3 is suggested to affect surrounding microenvironment and to be related to metastatic potential.

研究分野：消化器癌

キーワード：腫瘍促進TAM 抗腫瘍T細胞 TLR3

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵・胆道癌は切除後においても再発率は高く、現標準治療の切除治療のみでは十分な予後が得られていない。他癌種においてみられる化学療法の有効性も満足されるものではなく、新しい治療方法の開発が望まれている。腫瘍には多数の腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage, TAM) が存在するが、“TAM” は腫瘍細胞との相互作用により“腫瘍促進 TAM” の形質を有し、抗腫瘍 T 細胞を抑制することで、腫瘍の浸潤・増殖を促進することが知られている (Biswas, Nature Immunol, 2010、図1)。以上より申請者らは、腫瘍促進 TAM を抑制することで抗腫瘍 T 細胞が活性化され、膵・胆道癌における効果的で新しい治療法の開発が可能であると予想していた。

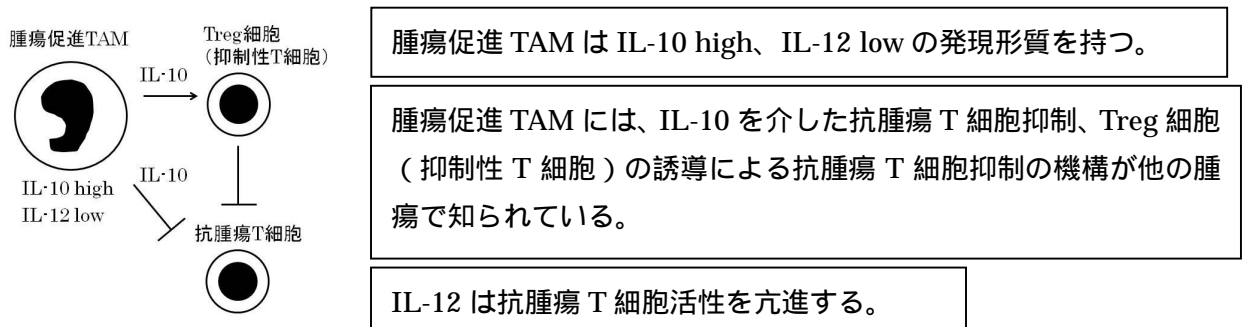


図1 . 腫瘍促進 TAM の抗腫瘍 T 細胞への影響

(2) マクロファージは CpG-DNA 配列を Toll-Like Receptor 9 (TLR9) を介して認識する機構を有しており、その CpG-DNA に stat3 siRNA を結合させた CpG-stat3 siRNA によるヒト樹状細胞を介した T 細胞刺激効果が近年明らかにされた (Zhang, Blood, 2013)。一方、stat3 は腫瘍促進 TAM において、抗腫瘍 T 細胞機能に関わる因子の発現を調節しており (Biswas, Nature Immunol, 2010) その silencing により抗腫瘍 T 細胞刺激が期待される (図2)。しかしながら、膵・胆道癌における腫瘍促進 TAM の T 細胞への影響は十分に明らかにされておらず、CpG-stat3 siRNA による腫瘍促進 TAM の抑制効果と、それを介した T 細胞への効果に関しても不明である。

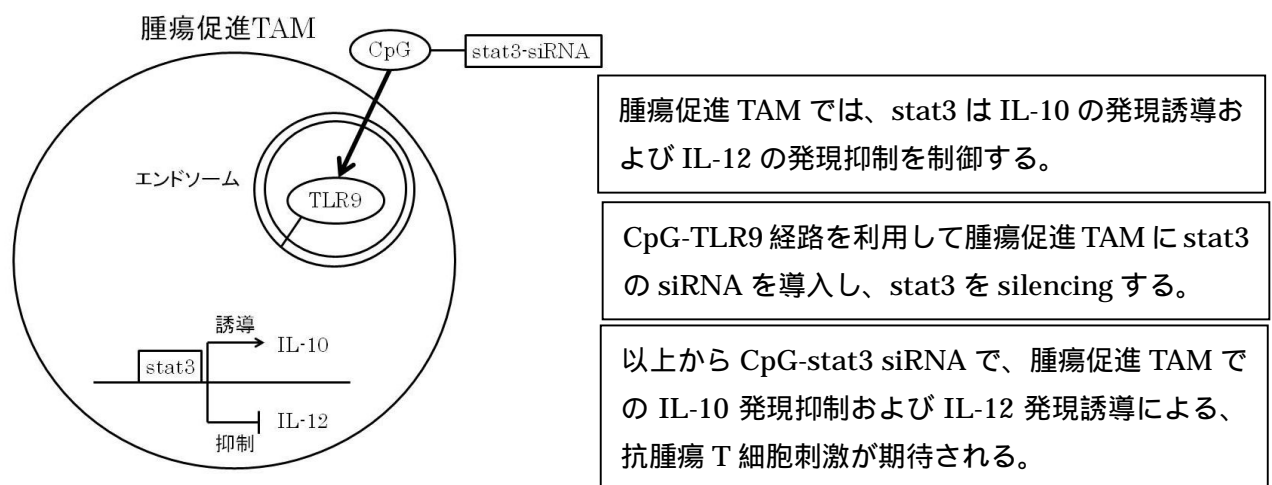


図2 . CpG-stat3 siRNA の腫瘍促進 TAM の抑制による T 細胞への影響

2. 研究の目的

本研究課題では、膵癌もしくは胆道癌患者の外科切除材料を用いて、腫瘍促進 TAM の役割および腫瘍促進 TAM 抑制下での抗腫瘍効果を明らかにする。

- (1) 膵・胆道癌患者における腫瘍促進 TAM の T 細胞への影響を明らかにする。
- (2) CpG-stat3 siRNA による腫瘍促進 TAM の抑制および T 細胞への効果を明らかにする。

3 . 研究の方法

- (1) 膵胆道癌患者の外科手術標本を用いて免疫組織学的評価を用いて、腫瘍促進 TAM と T 細胞の関連を明らかにする。
- (2) In vitro において TLR 経路の腫瘍微小環境における関与を明らかにする。

4 . 研究成果

(1) 胆道癌患者、特に肝外胆管癌 101 例の切除標本の免疫組織学的染色により、腫瘍内の腫瘍促進 TAM 高浸潤および抗腫瘍 T 細胞低浸潤 (図 3) が予後に悪影響を及ぼすことを明らかにし、TAM と T 細胞の共同作用が抗腫瘍に重要であることを示唆した、(図 4 a)。さらには術後化学療法群においても、腫瘍促進 TAM 高浸潤および抗腫瘍 T 細胞低浸潤の予後が良好になることを示し、これらの特徴による化学療法の相乗効果が期待された(図 4 b)。

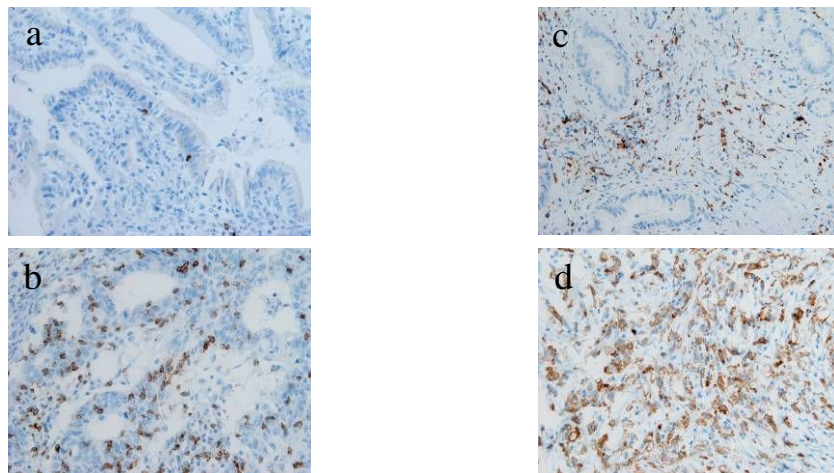


図 3 . 抗腫瘍 T 細胞 (a) 低浸潤 (b) 高浸潤 腫瘍促進 TAM (c) 低浸潤 (d) 高浸潤

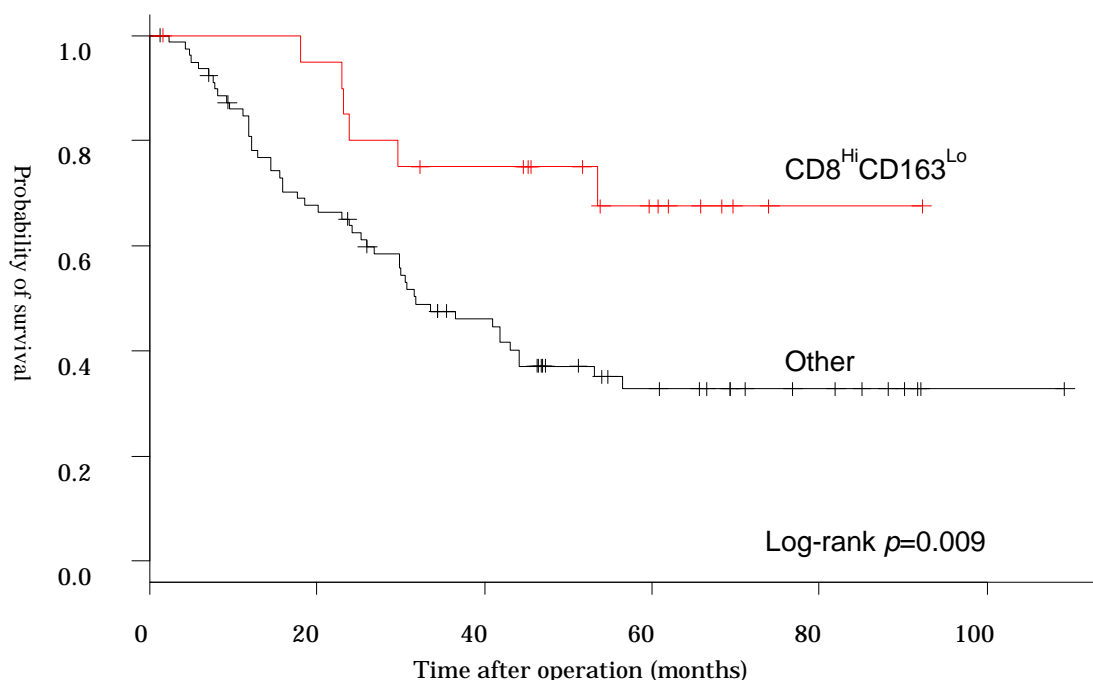


図 4 a . 腫瘍促進 TAM 高浸潤および抗腫瘍 T 細胞低浸潤が予後に悪影響を及ぼす

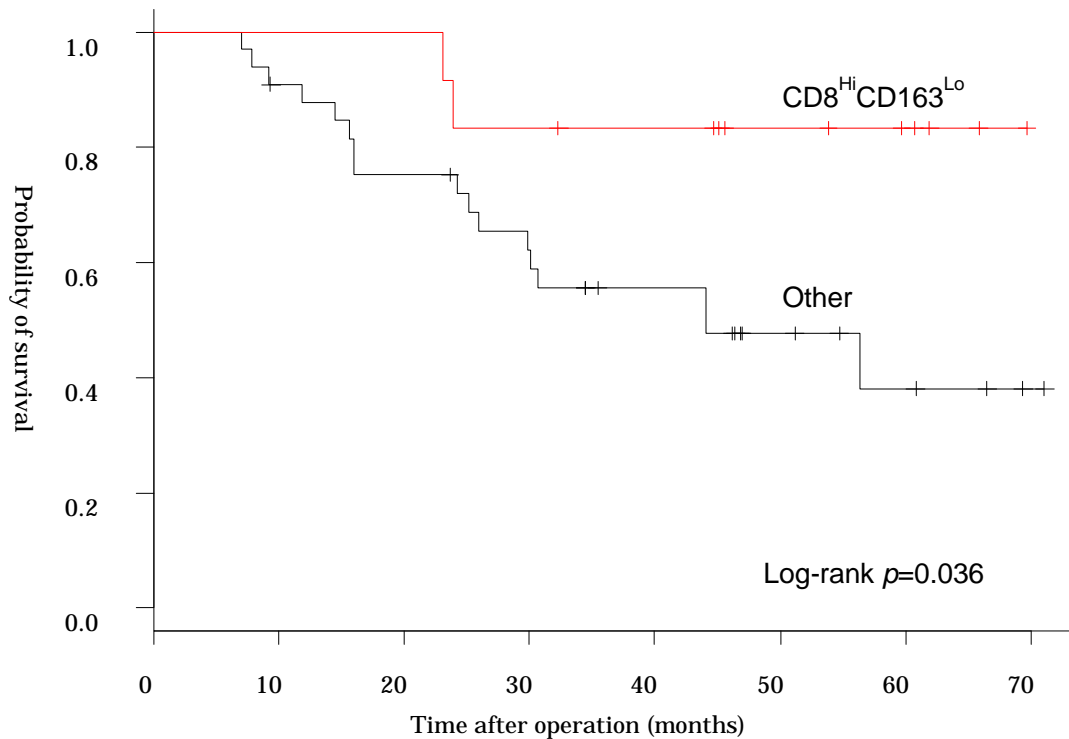


図 4 b . 補助化学療法群においても腫瘍促進 TAM 高浸潤および抗腫瘍 T 細胞低浸潤が予後に悪影響を及ぼす

(2) In vitro において TLR 経路の腫瘍微小環境における関与
 膵胆道癌患者からの腫瘍促進マクロファージ単離が成功せず、実験計画の再検討を余儀なくされた。当初検討していた CpG-siRNA の治療応用を鑑みたとき、腫瘍細胞および腫瘍微小環境間質細胞の TLR9 発現とその相互作用が重要である観点から、研究計画を再度検討した。TLR9 の発現を確認した癌細胞株に対して TLR9 agonist である CpG-ODN(ClassB)を投与し癌細胞の増殖および周囲微小環境への影響を観察した。CpG-ODN は濃度変化および時間変化で実験を行った。結果的に遺伝子発現変化が認められず、TLR-9 の発現を認めても、上皮細胞において CpG-ODN の作用が必ずしも働くとはいえないことが判明した。一方、TLR9 発現組織を検討した結果、手術切除組織標本において大腸癌細胞およびその浸潤先進部周囲の間質細胞に TLR9 の発現を強く認め、TLR9 を介した腫瘍細胞及び間質細胞の関連が示唆された。予後不良な転移病変においても同様な結果が得られた。以上から、今後は実行可能および意義のある実験系として、CpG 刺激下大腸癌細胞での遺伝子発現変化および周囲微小環境との相互作用を観察する方針とした。

SW480 細胞を用いて、CpG-ODN(3 μ M)を 48 時間暴露した細胞と、Ctrl-ODN で暴露した細胞の培養上清中に発現する VEGF タンパク (周囲微小環境の血管内皮細胞増殖因子) を ELISA キットで解析した。結果は差が得られず、昨年度の結果も踏まえて TLR9 の周囲微小環境への影響は in vitro では見出すことが困難と判断した。そこで細胞内に存在する他の Toll 様受容体と学内協力体制から実現可能な研究方法を考慮し、TLR3 に着目した。化学療法や放射線療法などの外的ストレスにより腫瘍細胞が necrosis を起こし、それから放出される DAMPs と呼ばれる内在性因子が腫瘍微小環境において腫瘍促進にも抑制にも働くと考えられている。TLR3+癌細胞とされる SW480 において TLR3 リガンド(poly I:C)の刺激により CCL2、CCL5、IL-8 遺伝子の発現亢進及びタンパクの発現を明らかにした (図 5)

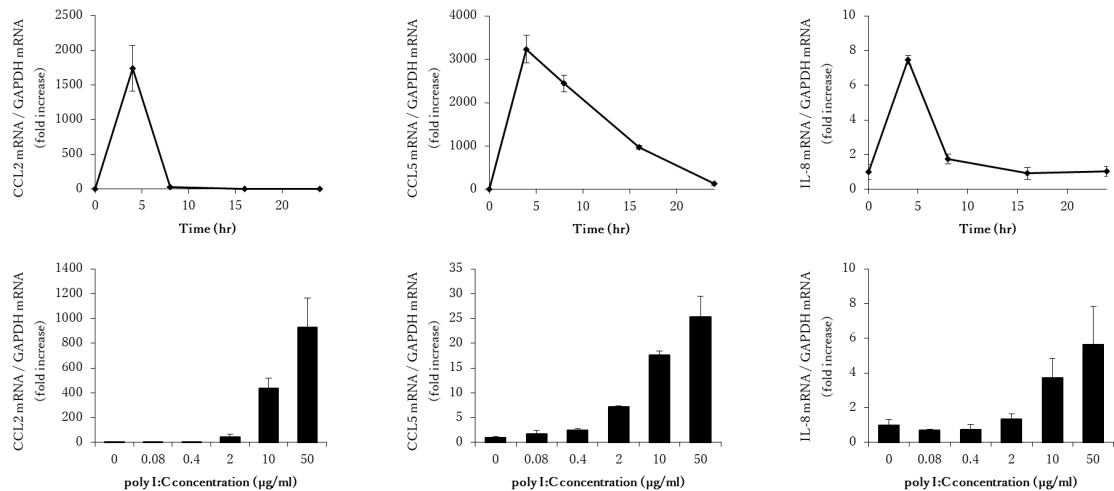


図5 . TLR3 リガンドによる CCL2、CCL5、IL-8 遺伝子発現亢進

また、siRNA を用いた TLR3 ノックダウン大腸癌細胞を作製し、同様に poly I:C で処理した際に、先の実験で誘導された chemokine について PCR 及び ELISA を行った。Poly I:C により誘導される CCL2、CCL5 及び IL-8 は TLR3 ノックダウン大腸癌細胞では、それらの mRNA 及びタンパクの発現が抑制された。また CCL2 及び CCL5 は顕著に誘導が抑制され、TLR3 依存性があると考えられた (図 6)

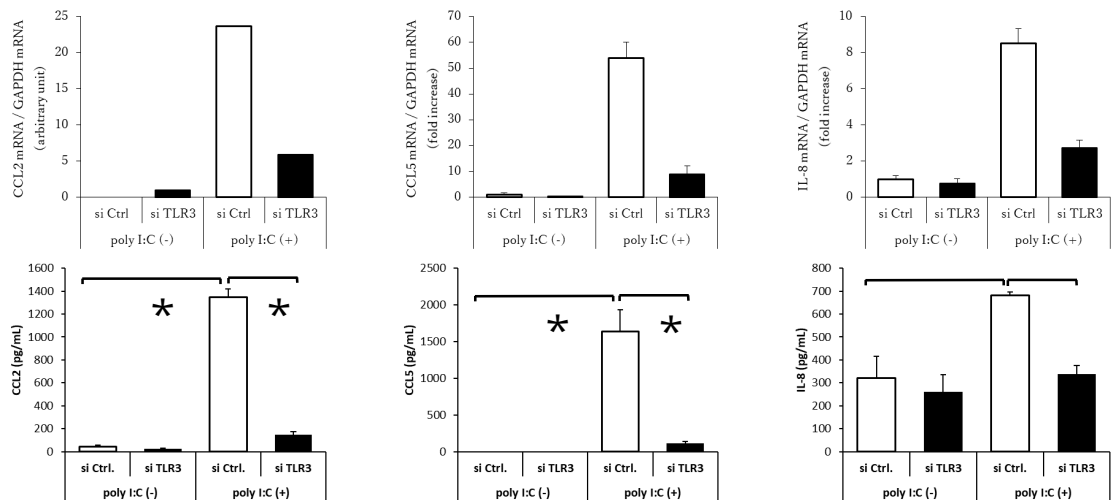


図6 . TLR3 ノックダウン大腸癌細胞における CCL2、CCL5、IL-8 の遺伝子発現変化
CCL2 及び CCL5 はマクロファージを腫瘍微小環境に誘導し、腫瘍抑制的に作用するとされ、さらに IL-8 は腫瘍の免疫原性を高め、抗腫瘍免疫応答を高めるとされており、TLR3 経路は腫瘍微小環境に影響を与える因子であることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Miura T, Yoshizawa T, Hirai H, Seino H, Morohashi S, Wu Y, Wakiya T, Kimura N, Kudo D, Ishido K, Toyoki Y, Kijima H, Hakamada K. Prognostic Impact of CD163+ Macrophages in Tumor Stroma and CD8+ T-Cells in Cancer Cell Nests in Invasive Extrahepatic Bile Duct Cancer. Anticancer Res. 査読あり. 2017;37(1):183-90.

〔学会発表〕(計2件)

吉田 達哉、三浦 卓也、坂本 義之、諸橋 一、黒瀬 顕、今泉 忠淳、袴田 健一、
Toll like receptor3 は大腸癌の進展に関与する、第 119 回日本外科学会定期学術集会、2019
吉田 達哉、三浦 卓也、坂本 義之、諸橋 一、今泉 忠淳、袴田 健一、大腸癌腫瘍
微小環境の探索、第 73 回日本消化器外科学会総会、2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。