

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09359

研究課題名(和文) 自然リンパ球からみた胃癌発生の分子生物学的機序の解明

研究課題名(英文) Role of innate lymphoid cell in gastric carcinogenesis

研究代表者

大谷 恒史 (OTANI, Koji)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30597555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫において自然リンパ球(ILC)の存在が明らかとなり、様々な疾患における役割が注目されている。胃癌においてもILCが深く関与すると推測されるが、ILCとその産生サイトカインの発現動態については不明である。そこで本研究は胃癌の腫瘍免疫におけるILC3の発現、インターロイキン(IL)-17、IL-22の誘導機構、その他のILCグループとの相互調節とその意義を解明することを目的として行った。その結果、ILC3産生サイトカインであるIL-17、IL-22は抗腫瘍活性をもつILC1およびILC1産生サイトカインであるインターフェロン- $\gamma$ の抑制を介して胃の炎症性発癌を促進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

自然リンパ球(ILC)と同じ自然免疫応答を担うナチュラルキラー細胞はがん細胞に対して非常に強い殺傷能をもち、ILC1にも強い抗腫瘍活性があると考えられる。今回ILC3にILC1分化の抑制を介した腫瘍形成促進作用があることが明らかになったことにより、ILC1の活性化に加えてILC3の活性を抑制することで今後のがん免疫治療や、サイトカインや転写因子を標的とした分子標的治療が大きく進展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The presence of innate lymphoid cell (ILC) has been revealed in innate immunity, and its role in various diseases attracts attention. It is guessed that ILC is also deeply involved in gastric carcinogenesis, but the expression of ILC and its producing cytokines is unknown. Therefore, we aimed to elucidate the expression of ILC3 population, the inductive mechanism of interleukin (IL)-17 and IL-22, and the mutual regulation with the other ILC groups and the significance in the tumor immunity of gastric cancer. As a result, it was suggested that IL-17 and IL-22 produced by ILC3 promote gastric carcinogenesis through the inhibition of ILC1 having anti-tumor activity and interferon- $\gamma$  produced by ILC1.

研究分野：消化器内科学

キーワード：自然リンパ球 胃癌

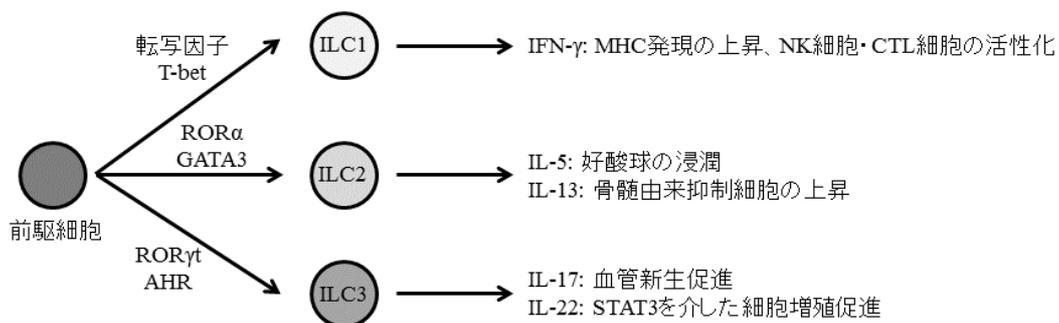
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

免疫反応は CD4<sup>+</sup> helper T (Th) 細胞のうち細胞性免疫に働く Th1 細胞と液性免疫に働く Th2 細胞の 2 つのサブセットのバランスによって調節されるが、*Helicobacter pylori* 惹起性胃炎における免疫反応は Th1 細胞産生サイトカインが優位であるとされてきた (Smythies LE et al., *J Immunol*, 2000)。その後 Th1、Th2 細胞とは別に interleukin (IL)-17 を産生する Th17 細胞が発見され、我々は以前 *H. pylori* 惹起性胃炎においては Th1 産生サイトカイン以外にも Th17 産生サイトカインである IL-17A が強く発現しており、IL-17A は Th1 細胞の interferon (IFN)- $\gamma$  産生に対して抑制的に働くことを報告した (Otani K et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2009)。

Th 細胞をはじめとする T 細胞が主に獲得免疫において機能するのに対して、自然免疫において抗原特異的受容体を発現していない自然リンパ球 (innate lymphoid cell: ILC) の存在が近年明らかとなり、様々な疾患の病態生理における役割が注目されている。ILC は Th サブセットの Th1、Th2、Th17 に対応する 3 つのグループである ILC1、ILC2、ILC3 に分類される。ILC の研究とその応用分野は現在飛躍的に発展しており、ILC の炎症やアレルギーにおける関与はこれまで研究されてきたが、ILC の腫瘍免疫における発現や役割は技術的制約や実験モデルが少ないことから十分に解明されておらず、主にその産生サイトカインに焦点が当てられてきた。これまでの報告では ILC1 の産生する IFN- $\gamma$  は炎症性サイトカインとして働く他、腫瘍細胞への Major Histocompatibility Complex (MHC) 分子の発現、ナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) や細胞傷害性 T 細胞 (CTL 細胞) の活性化を介して抗腫瘍効果を発揮すると考えられている (Ikeda S et al., *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002)。ILC2 の産生する IL-5 は好酸球の浸潤を起こし、IL-13 は骨髄由来抑制細胞を動員する (Gabitass RF et al., *Cancer Immunol Immunother*, 2011)。ILC3 の腫瘍免疫における役割は不明な点が多く一定の見解が得られていないが、ILC3 から産生される IL-17 は血管内皮細胞に作用して血管新生を促進し (Numasaki M et al., *Blood*, 2003)、腸管上皮細胞の IL-17 受容体を刺激すると炎症発癌を促進すると考えられている (Grivennikov SI et al., *Nature*, 2012)。IL-22 は腸管上皮細胞の IL-22 受容体に結合すると STAT3 シグナルを介して細胞増殖促進作用を示す (Kirchberger S et al., *J Exp Med*, 2013)。

胃癌においてもその免疫反応において ILC が深く関与しているものと推測されるが、ILC とその産生サイトカインの発現動態や機能については、極めて報告が少ない状況であった。



## 2. 研究の目的

ILC と同じ自然免疫応答を担う NK 細胞はがん細胞に対して非常に強い殺傷能をもち、ILC1 にも強い抗腫瘍活性があると考えられている。ILC3 に ILC1 分化の抑制を介した腫瘍形成促進作用があることが明らかになれば、ILC1 の活性化に加えて ILC3 の活性を抑制することで今後のがん免疫治療や、サイトカインや転写因子を標的とした分子標的治療が大きく進展する可能性があ

ると期待される。そこで本研究は ILC3 を中心とした胃癌発生の分子生物学的機序の全体像を解明し、胃癌発生における ILC3 の発現、IL-17、IL-22 の誘導機構やその他の ILC グループとの相互調節やその意義について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト胃癌検体を用いた検討

胃癌患者および健常人の末梢血を採取して遠心後血漿を -80℃ に保存し、末梢血中の単核球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) を Percoll によって密度勾配遠心分離して単離した。同様に上部消化管内視鏡検査時に生検によって採取した胃癌組織および健常人の正常組織を collagenase 処理し、粘膜組織中の単核球 (lamina propria mononuclear cells: LPMC) を Percoll によって密度勾配遠心分離して単離した。PBMC、LPMC 中の ILC3 細胞集団の発現については、フローサイトメトリーを用いて解析を行い、PBMC、LPMC 中の転写因子、細胞表面マーカー、サイトカイン受容体、サイトカインの発現については、定量的 real-time RT-PCR 法および enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法によって測定した。

#### (2) マウス胃癌モデルを用いた検討

マウスの胃癌モデルは Nam らの方法に従い (Nam KT et al., *Clin Can Res*, 2004)、4 週齢の C57BL/6J マウスに N-methyl-N-nitrosourea 200 ppm 1 週間経口投与を隔週で計 5 回繰り返し、その後 *H. pylori* (SS-1 株) を 3 回経口感染させて作成した。また対照として胃炎単独群を 4 週齢の C57BL/6J マウスに *H. pylori* (SS-1 株) を 3 回経口感染させて作成した。*H. pylori* 感染 56 日後に胃炎群および胃癌群のマウスを屠殺して胃を取り出し、胃組織を採取する。collagenase 処理後、粘膜組織中の LPMC を Percoll によって密度勾配遠心分離して単離した。LPMC 中の ILC3 細胞集団の発現については、フローサイトメトリーを用いて解析を行い、胃癌発生におけるサイトカイン、ケモカイン、プロスタグランジン、血管新生因子の発現については定量的 real-time RT-PCR 法および enzyme immunoassay (EIA) 法によって測定した。

次に *IL-17*<sup>-/-</sup>マウスと *IL-22*<sup>-/-</sup>マウスを使用して胃癌を発生させ、野生型マウスを対照群として一匹当たりの発生腫瘍数、腫瘍径を比較検討した。腫瘍部位における細胞増殖能については Ki67 の免疫組織化学染色によって、アポトーシスについては TdT-mediated dUTP nick end labeling 法によって評価した。ILC の機能については、本来 Th 細胞ではなく ILC 単独に由来するサイトカインの解析を行うことが望ましい。しかし個々の ILC 単独の遺伝子改変マウスの作成は、発生・分化に必要な転写因子やサイトカイン受容体発現パターンが重複するため技術的に困難である。そこで T 細胞が発現せず ILC のみを発現する *recombination activating gene (Rag)* 1<sup>-/-</sup>マウス (Sawa S et al., *Nat Immunol*, 2011) を使用して胃癌を発生させ、ILC1、ILC3 の発現レベルをフローサイトメトリーによって解析し、Th 細胞ではなく ILC1 に由来する IFN- $\gamma$  と ILC3 に由来する IL-17、IL-22 の発現レベルを定量的 real-time RT-PCR 法によって測定した。さらに *Rag1*<sup>-/-</sup>マウスを使用して炎症発癌過程に抗 IL-17 中和抗体または抗 IL-22 中和抗体を腹腔内投与し、ILC1 と IFN- $\gamma$  の発現の変化、マウス血液中の NK 細胞および CTL 細胞活性の変化の測定を行い、IL-17、IL-22 の ILC1 分化に及ぼす影響について検討した。

### 4. 研究成果

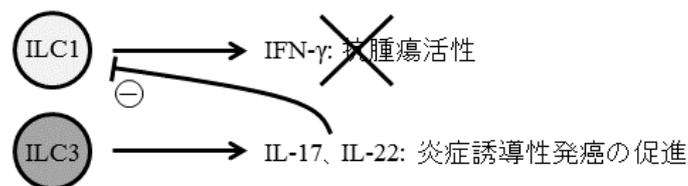
ヒト胃癌検体および健常人検体から PBMC、LPMC を単離し、ILC3 を構成する細胞傷害誘発受容体 (natural cytotoxicity triggering receptor: NCR) をもつ NCR<sup>+</sup> ILC3、NCR をもたない NCR<sup>-</sup>

ILC3、リンパ組織誘導細胞 (lymphoid tissue inducer cell: LTi 細胞) の発現についてフローサイトメトリーを用いて解析を行った結果、胃癌検体においていずれの細胞集団も高度に発現がみられ、また ILC3 の転写因子である ROR  $\alpha$  t、aryl hydrocarbon receptor (AHR)、ILC3 の細胞表面マーカーおよびサイトカイン受容体である CD117、CD127、NKp44、NKp46、IL-1R、IL-23R、ILC3 産生サイトカインである IL-17、IL-22 の発現について定量的 real-time RT-PCR 法および ELISA 法によって測定した結果、胃癌検体における ROR  $\alpha$  t、AHR、IL-17、IL-22 の発現は健常人に比較して有意に上昇していた。

マウスを用いて胃炎炎症性発癌の実験動物モデルを作成し、ILC3 を構成する NCR<sup>+</sup> ILC3、NCR<sup>-</sup> ILC3、LTi 細胞の発現についてフローサイトメトリーを用いて解析を行った結果、同様に胃癌部においていずれの細胞集団も高度に発現がみられ、また ILC3 産生サイトカインである IL-17、IL-22、ケモカインである KC、MIP2、血管新生因子である bFGF、HGF、VEGF の発現とプロスタグランジン (PGE<sub>2</sub>) 含有量について定量的 real-time RT-PCR 法および EIA 法によって測定した結果、胃癌部においては IL-17、IL-22、KC、VEGF の発現およびプロスタグランジン含有量が非癌部と比較して有意に上昇がみられ、ILC3 産生サイトカインである IL-17、IL-22 がケモカイン、プロスタグランジンを誘導し、腫瘍の血管新生を促進したと推察された。

次に *IL-17*<sup>-/-</sup>マウスと *IL-22*<sup>-/-</sup>マウスを使用して同様に胃癌を発生させた結果、*IL-17*<sup>-/-</sup>マウスと *IL-22*<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスと比較してアポトーシスの誘導がみられるとともに細胞増殖能が低下し、胃癌の発症は抑制された。*Rag1*<sup>-/-</sup>マウスを使用して同様に胃癌を発生させ、ILC3 の発現レベルをフローサイトメトリーによって、また ILC3 に由来する IL-17、IL-22 の発現レベルを定量的 real-time RT-PCR 法によって測定した結果、胃癌部において ILC3 を構成する細胞集団は高度に発現しており、ILC3 由来 IL-17、IL-22 の発現レベルも有意に上昇がみられた。*Rag1*<sup>-/-</sup>マウスを用いた炎症発癌過程に抗 IL-17 中和抗体または抗 IL-22 中和抗体を腹腔内投与した結果、これら中和抗体の投与によって ILC1、IFN- $\gamma$  の発現レベルは上昇し、NK 細胞および CTL 細胞の活性亢進がみられるとともに、胃癌の発症を抑制した。

以上の結果により、ILC3 産生サイトカインである IL-17、IL-22 は抗腫瘍活性をもつ ILC1 および ILC1 産生サイトカインである IFN- $\gamma$  の抑制を介して胃の炎症誘導性発癌を促進することが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	瀬谷 祐二  (NADATANI Yuji)  (00634007)	大阪市立大学・大学院医学研究科・講師    (24402)	
研究分担者	谷川 徹也  (TANIGAWA Tetsuya)  (70423879)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授    (24402)	
研究分担者	渡邊 俊雄  (WATANABE Toshio)  (50336773)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授    (24402)	
研究分担者	藤原 靖弘  (FUJIWARA Yasuhiro)  (40285292)	大阪市立大学・大学院医学研究科・教授    (24402)	