

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10631

研究課題名(和文)炎症性腸疾患関連癌の発癌関連性因子と生物学的特性解明のための基礎的検討

研究課題名(英文)Biological Features of Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancer and the Association of Innate Lymphoid Cells

研究代表者

水島 恒和 (Mizushima, Tsunekazu)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：00527707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：手術症例切除標本より細胞を単離・採取し、大腸正常粘膜、通常型大腸癌組織、潰瘍性大腸炎(UC)炎症・非炎症粘膜、UC関連大腸癌組織に存在するヒト自然リンパ球(ILC)分画を明らかとした。NKp44+ ILC3は、大腸正常粘膜に最も豊富に存在するILC分画であり、通常型大腸癌において、三次リンパ組織(TLS)形成を介した抗腫瘍免疫誘導に関与している可能性が示された。UC関連大腸癌に関しては、頻度が少なく十分な解析は行えなかったが、UC炎症腸管のILC3はIL22を高発現しており、マウスレベルで示されているILC3ならびにIL22の腫瘍増殖促進への関与を支持する結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト通常型大腸癌や炎症性腸疾患(IBD)関連癌の腫瘍組織において、どのような免疫環境が作り出されているのか、その解析は発展途上である。ILCは腸管免疫で重要な役割を担うリンパ球であり、IBDの病因・病態への関与が示されつつあるが、大腸癌におけるILCについて解析した報告はなかった。本研究で、ヒト大腸粘膜、通常型大腸癌組織、UC粘膜に存在するILC分画を明らかとし、通常型大腸癌においてはTLS形成ならびに抗腫瘍免疫誘導への関与が示され、新規治療開発につながる結果を得た。UC関連癌に関しては、通常型大腸癌と全く異なる機序でILCが腫瘍免疫に関与している可能性が考えられ、今後更なる研究が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified distinct subsets of human innate lymphoid cells (ILCs) in normal colonic mucosa, colorectal cancer (CRC), and colonic mucosa of ulcerative colitis (UC) by isolating lymphocytes from surgically resected specimens. NKp44+ ILC3s, which were abundant in normal colonic mucosa compared to other ILC subsets, were associated with formation of tertiary lymphoid structures (TLSs) and induction of subsequent anti-tumor immunity in CRC. Although we could not conduct enough analysis due to the rarity of disease, ILC3s derived from colonic mucosa of patients with UC expressed significantly high level of IL-22. This result suggests that IL22-producing-ILC3s might contribute to the tumor growth of UC-associated colorectal cancers, as demonstrated in murine studies previously.

研究分野：消化器外科学

キーワード：自然リンパ球 大腸癌 炎症性腸疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) の内科的治療は進歩し、潰瘍性大腸炎 (UC)、クローン病 (CD) に対する手術適応は変化しつつある。従来 UC の手術適応の多くを占めていた重症、劇症、難治例に対する手術は減少し、癌/Dysplasia に対する手術が増加しつつある。CD においても癌合併例が増加している。

われわれはこれまで本邦においても CD 患者の大腸癌罹患リスクは健常人と比較して有意に高いこと (Mizushima T, et al., *Digestion*, 2010)、本邦の CD 患者に合併する大腸癌は欧米と異なり、左側結腸、特に直腸肛門周囲に好発すること (水島ら, *日消誌*, 2005)、また、その診断には各種生検を組み合わせた麻酔下の検査が有用であること (Matsuno H, Mizushima T, et al., *Digestion*, 2016) などを明らかにしてきた。UC においては、大腸癌サーベイランスが確立しており、最近では狙撃生検の有用性 (Watanabe T, et al., *Gastroenterology*, 2016) なども報告されている。しかし、依然として診断には大腸内視鏡という侵襲的検査が必要である。また、治療に関しては、リンパ節転移陽性の UC 関連大腸癌の予後は通常型大腸癌と比較して有意に不良であることが報告されている (Watanabe T, et al., *Inflamm Bowel Dis*, 2011)。原因として通常大腸癌の発癌メカニズムである adenoma-carcinoma sequence と異なる発癌メカニズムとして dysplasia-carcinoma sequence の関与が考えられている。

また IBD の発症メカニズムには、腸管免疫の異常が関連しており、これまでにわれわれは IBD モデルマウスを用いて、IBD の病因の解明 (Kishi D, et al., *J Immunol*, 2000, Kai Y, Mizushima T, et al., *Gastroenterology*, 2005, Atarashi K, et al., *Nature*, 2008) やそれに基づく新規治療法開発 (Mizushima T, et al., *Inflamm Bowel Dis*, 2004, Tamagawa H, Mizushima T, et al., *Inflamm Bowel Dis*, 2007) のために研究を行ってきた。またヒトのサンプルを用いてマウスにおいて確認された腸管免疫の異常が実際の IBD 患者でも確認できることを報告している (Ogino T, Mizushima T, et al., *Gastroenterology*, 2013, Sakurai T, Mizushima T, et al., *Cancer Res*, 2014)。

近年発見された自然リンパ球 (Innate lymphoid cell; ILC) は粘膜バリア機能の維持や感染初期応答などにおいて重要な役割を果たしている。ILC は機能的な側面から 3 タイプに分類され、その中でも 3 型自然リンパ球 (ILC3) は大部分が腸管に存在し IL-22 を産生し IL-23 receptor を発現している細胞集団である。腸管上皮細胞 (Intestinal epithelial cells; IEC) は IL-22 receptor を高発現しており、IL-22 pathway が ILC3 と IEC のクロストークに重要な役割を果たしている事が明らかになってきた (Wolk K, et al., *Immunity* 2004)。様々なマウスモデルを用いた研究により ILC3 由来 IL-22 は上皮組織障害の早期段階で腸管上皮幹細胞を活性化し上皮再生に貢献しているが、IL-22 の過剰活性化は上皮過形成を誘導しさらに発癌へ至ることが明らかになった (Hanash AM, et al., *Immunity* 2012, Lindemans CA, et al., *Nature* 2015, Kirchberger S, et al., *J Exp Med* 2013)。また大規模な遺伝子研究により IL-23 receptor 変異が IBD 病態生理に深く関わっている事が明らかになり、ILC3 由来 IL-22 と IBD 発症の関連が指摘されている (Duerr RH, et al., *Science* 2006, Geremia A, et al., *J Exp Med*, 2011)。しかしその一方で IL-22 は IBD に対して保護的に働くという報告もあり (Sugimoto K, et al., *J Clin Invest*, 2008)、病因との関連は不明な点も多い。

2. 研究の目的

IBD 関連癌を含む大腸癌に対する自然リンパ球の関与を明らかとし、治療応用に向けた可能性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト正常大腸粘膜、通常型大腸癌組織、UC 大腸粘膜に存在する ILC 分画の分布および遺伝子発現の解析

通常型大腸癌および UC 手術症例の切除標本より粘膜および腫瘍組織を採取し、Collagenase、DNase を用いて、細胞を単離した。採取した細胞を flow cytometry にて解析し、ILC 分画の分布を評価した。Lineage マーカーとして、CD3, CD11c, CD16, CD19, CD20 を使用し、CD45⁺ Lin⁻ CD127⁺ cells を ILCs とした。これらの中で、CD117⁻ ILCs を ILC1、CRTH2⁺ ILCs を ILC2、CD117⁺ ILCs を ILC3 とした。また、ソーティングにより回収した各分画の遺伝子発現を、RT-PCR と RNA sequencing により評価した。

(2) 通常型大腸癌組織に存在する ILC3 の機能解析

大腸癌組織における NKp44⁺ ILC3 のリンパ組織誘導能は、flow cytometry を用いて単離・採取した NKp44⁺ ILC3 と間質細胞 (CD45⁺ CD31⁻ CD90⁺ cells) を共培養し、間質細胞におけるリンパ組織誘導能に関与するケモカイン (*CXCL13*, *CCL19*, *CCL21*) や接着分子 (*ICAM-1*, *VCAM-1*) の遺伝子発現の変化を RT-PCR で評価することで検討した。大腸癌組織における三次リンパ様構造 (tertiary lymphoid structure: TLS) の評価は、HE 染色ならびに抗 CD3, CD20, CD21 抗体を用いた免疫組織化学染色で行った。また、TLS における ILC3 の局在の評価は、抗 CD3, Ror γ t 抗体を用いた二重免疫組織化学染色で行った。Flow cytometry により評価した NKp44⁺ ILC3 の割合と、免疫染色により評価した TLS の割合の相関を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト正常大腸粘膜、通常型大腸癌組織、UC 大腸粘膜に存在する ILC 分画の分布および遺伝子発現の解析

正常大腸粘膜、通常型大腸癌組織、UC 大腸粘膜における ILC 分画の分布の評価

正常大腸粘膜および UC 大腸粘膜には、ILC1、NKp44⁺ ILC3、NKp44⁻ ILC3 の 3 分画が存在しており、ILC2 はこれらと比較し非常に少ない分画であった。この中で、NKp44⁺ ILC3 が正常大腸に最も多く存在する ILC 分画であり、末梢血などの他臓器にはほとんど存在しない腸管特異的な分画であることがわかった。UC 粘膜の炎症部では、非炎症部と比較し、NKp44⁺ ILC3 は減少し、ILC1、NKp44⁻ ILC3 が増加していた。大腸癌組織にも、正常粘膜と同様の 3 分画 (ILC1、NKp44⁺/NKp44⁻ ILC3) が存在していた (図 1)。これらの分画の分布は、腫瘍深達度の進行に伴い変化し、NKp44⁺ ILC3 は T1/T2 腫瘍においては豊富に存在するが、T3/T4 腫瘍では減少していた (図 2)。IBD 関連癌に関しては、頻度が少なく十分な解析が行えなかったため、手術症例数の多い通常型大腸癌における ILC の解析を中心に研究を進めた。

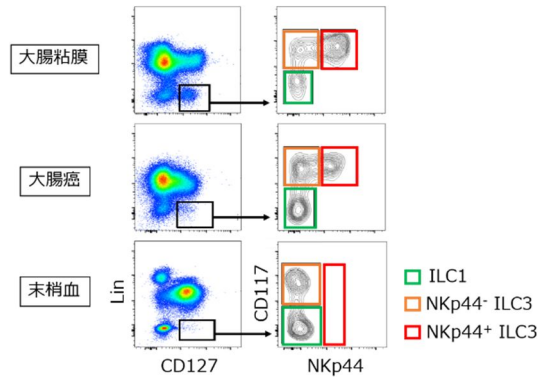


図1 ヒト大腸正常粘膜・大腸癌組織・末梢血より単離した ILC

正常大腸粘膜、通常型大腸癌組織に存在する ILC 分画の遺伝子発現の比較

腸管特異的な分画である NKp44⁺ ILC3 は、正常粘膜において既知の *IL22* に加え、リンパ組織形成に関連する遺伝子 (*LTA*, *LTB*, *TNF*, *CXCR5*, *NRP1*) を高発現する分画であることがわかった。正常部および T1/T2 腫瘍、T3/T4 腫瘍に存在する NKp44⁺ ILC3 の遺伝子発現に差がないか検討したところ、T3/T4 腫瘍に浸潤する NKp44⁺ ILC3 では、*RORC*, *IL22*, *IL17A* といった ILC3 の主要転写因子や一部のサイトカイン発現に差は見られないものの、*LTA*, *LTB*, *TNF* といったリンパ組織誘導に関与する遺伝子の発現が低下していた (図 3)。

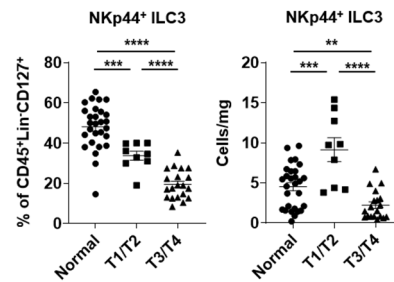


図2 大腸癌NKp44⁺ ILC3の深達度による割合・細胞数の変化

UC の炎症部に存在する ILC3 では、正常粘膜や通常型大腸癌、UC 非炎症部に存在する ILC3 と比較し、*IL22* の発現が高かった。UC 関連大腸癌の腫瘍組織に存在する ILC の採取・解析は行っていないが、マウスレベルで示されている ILC3 ならびに *IL22* の UC 関連大腸癌における腫瘍増殖促進への関与を支持する結果であった。

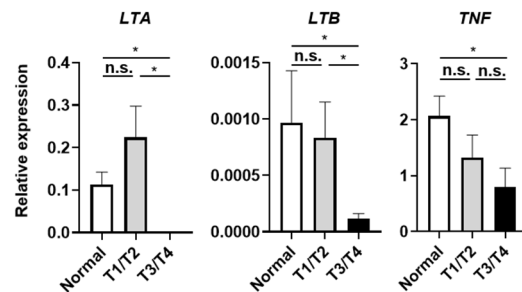


図3 正常大腸および大腸癌におけるNKp44⁺ ILC3の遺伝子発現

(2) 通常型大腸癌組織に存在する ILC3 の機能解析

大腸癌 NKp44⁺ ILC3 のリンパ組織誘導能の評価

LTA や *LTB* にコードされる lymphotoxin は、間質細胞に作用して接着分子やケモカインの発現を亢進させることで、異所性リンパ組織を誘導することが知られているため、大腸癌組織中の間質細胞を採取し解析した。T4 腫瘍の間質細胞では、T2 腫瘍の間質細胞と比較し、接着分子 (*ICAM-1*, *VCAM-1*) およびケモカイン (*CXCL13*, *CCL21*) の発現が低下していた。正常大腸の NKp44⁺ ILC3 と T4 腫瘍の間質細胞を共培養すると、間質細胞における *ICAM-1*, *CXCL13*, *CCL21* の発現亢進が見られ、NKp44⁺ ILC3 が間質細胞への作用を介してリンパ組織誘導に関与している可能性が示された (図 4)。

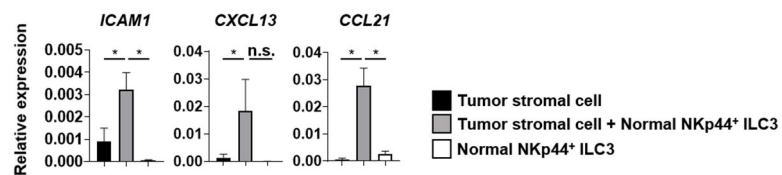


図4 NKp44⁺ ILC3による間質細胞の接着分子およびケモカイン発現促進

大腸癌組織に存在する TLS の評価

大腸癌組織に存在する異所性リンパ組織として、TLS が知られている。これらと NKp44⁺ ILC3 の関連を評価するために、まず、免疫組織化学染色により大腸癌に存在する TLS を評価

した。腫瘍組織の単位面積あたりの TLS の量は、Tis/T1 腫瘍で最も多く ($0.25 \pm 0.05 / \text{mm}^2$)、T3/T4 腫瘍においては大きく減少していた (T3: $0.05 \pm 0.01 / \text{mm}^2$, $P < 0.0001$) (T4: $0.03 \pm 0.15 / \text{mm}^2$, $P < 0.0001$) (図 5.6)。また、二重染色を用いた免疫組織化学染色にて、TLS 内に CD3 陰性 Ror γ t 陽性である ILC3 が存在することを確認した (図 7)。

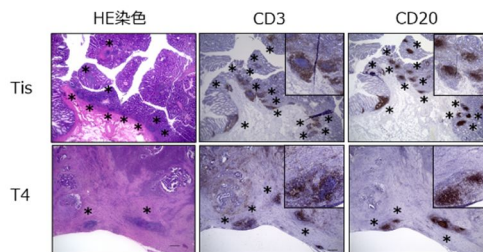


図5 大腸癌に存在するTLS

大腸癌 NKp44⁺ ILC3 と TLS の相関の評価

大腸癌腫瘍組織における TLS と NKp44⁺ ILC3 の相関を検討した結果、TLS 密度は腫瘍 ILC における NKp44⁺ ILC3 の割合 ($R = 0.62$; $P < 0.005$) および NKp44⁺ ILC3 の腫瘍単位重量あたりの細胞数 ($R = 0.64$; $P < 0.005$) と有意な相関を示した (図 8)。

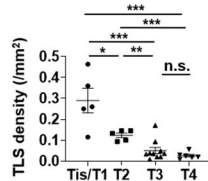


図6 腫瘍進行に伴うTLS分布の変化

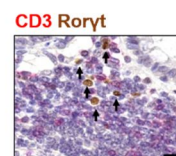


図7 大腸癌に存在するILC3

(3) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

ヒト通常型大腸癌や IBD 関連癌の腫瘍組織において、どのような免疫環境が作り出されているのか、その解析は発展途上である。また、ILC は腸管免疫応答において重要なリンパ球であり、IBD の病態・病因への関与が示されつつあるが、ヒト大腸および大腸癌における ILC について詳細に解析した報告はなかった。本研究では、ヒト大腸粘膜、通常型大腸癌組織、UC 大腸粘膜に存在する ILC 分画を明らかとし、通常型大腸癌においては ILC3 の TLS 形成ならびに抗腫瘍免疫誘導への関与の可能性が示された。

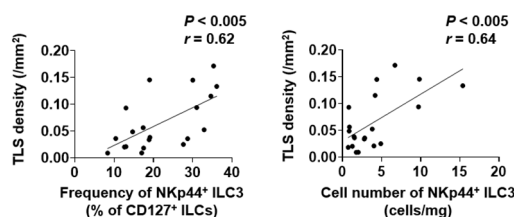


図8 大腸癌組織におけるNKp44⁺ ILC3とTLSの相関

(4) 今後の展望

大腸癌における ILC3 による TLS 形成ならびに抗腫瘍免疫誘導が明らかとなれば、TLS を賦活し、腫瘍局所で効率的に抗腫瘍免疫を促進させることで、既存の免疫チェックポイント阻害剤などの併用による治療効果の増大が期待できる。本研究では、UC 関連癌に関しては、異なる機序で関与している可能性が示された。ヒト大腸癌組織より免疫細胞を採取し機能解析する手法を確立したので、今後 IBD 関連癌の症例を蓄積し、発癌に関わる因子や治療標的の模索を継続する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ikeda Atsuyo, Ogino Takayuki, Kayama Hisako, Okuzaki Daisuke, Nishimura Junichi, Fujino Shiki, Miyoshi Norikatsu, Takahashi Hidekazu, Uemura Mamoru, Matsuda Chu, Yamamoto Hirofumi, Takeda Kiyoshi, Mizushima Tsunekazu, Mori Masaki, Doki Yuichiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Human NKp44+ Group 3 Innate Lymphoid Cells Associate with Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures in Colorectal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 724 ~ 731
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2326-6066.CIR-19-0775	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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	松田 宙 (Matsuda Chu) (00379207)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	