

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10633

研究課題名(和文) 消化器癌腹膜播種における腹腔内制御性B細胞の解析と化学療法の臨床応用

研究課題名(英文) Analysis of intra-abdominal regulatory B cells and clinical application of chemotherapy in peritoneal dissemination of gastrointestinal cancer

研究代表者

山本 将士 (Yamamoto, Masashi)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：20645212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌根治術後腹膜再発例は予後不良であり、腹膜再発に対する治療は効果が十分ではない。今回の研究では大腸癌細胞株を用いて、腹膜播種モデルを作成し、MDSCやB10細胞を中心とした免疫細胞の動態を明らかにした。腹膜播種モデルにおいて、病態の進行をIVISを用いて捉えることにより、腹腔内免疫細胞の時間的な変化を評価して、MDSCの蓄積を直接示すことに成功した。また、同皮下摂取モデルとの比較で、病態の進行や腹膜播種に特異的な変化をとらえることに成功した。病態の進行に直接関与するPMN-MDSCの制御とその治療の有効性を示すことができた。また、ヒト腹膜播種患者の腹水よりMDSCの存在が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化器癌患者における腹膜播種患者における腹腔内MDSCやB細胞の機能に関しては、その制御も含め、不明な点が多い。これをマウスモデルでMDSCや制御性B細胞の動態と機能を検証し、治療法を検討し、効果的な治療を開発することは学術的に意義があり、治療開発につながれば、臨床的なインパクトもある。さらに腹腔内MDSCや制御性B細胞と治療効果を解析することができれば、患者ごとの適切な治療選択が可能となるため、有用性も高い。

研究成果の概要(英文)：Cases of peritoneal dissemination of colorectal cancer have a poor prognosis because treatment for peritoneal recurrence is ineffective. In the present study, we used a colorectal cancer cell line to create a peritoneal seeding model. We clarified the dynamics of immune cells, especially MDSC and B10 cells. In a peritoneal seeding model, we used IVIS to capture the disease's progression and evaluated the temporal changes of intra-abdominal immune cells to show the accumulation of MDSCs directly. Besides, when compared with the same subcutaneous ingestion model, we were able to capture specific changes in disease progression and peritoneal dissemination. We have shown that elimination of PMN-MDSC delays the progression of the disease. We also collected ascites from a cancer patient with peritoneal dissemination and confirmed the presence of MDSC in the ascites.

研究分野：消化器外科学分野

キーワード：制御性B細胞 大腸癌腹膜播種 抗CD20抗体 分子標的薬 化学療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌根治術後の腹膜再発例は予後不良である。肝転移や肺転移に対する治療は有効なものが見いだされてきているが、腹膜再発に対する治療はいまだ十分有効なものはない。また、最近になって大腸癌の病態に抗腫瘍免疫応答が関与することが数多く報告され、免疫応答を標的とした治療介入が予後改善に貢献する可能性が示唆される。癌と免疫の関係は、cancer immunoediting という概念で説明される。癌の浸潤、転移しようとする性質とこれを抑える抗腫瘍免疫応答のバランスが破綻し、“免疫逃避”に陥り癌の進展が促進される。そのバランスの破綻は、免疫抑制機構の増強が関与しているとされ、その中心的働きを示すのが、骨髄由来免疫抑制性細胞(myeloid derived suppressor cell; MDSC)や制御性 T 細胞(regulatory T cell; Treg)である。また、PD-1-PD-L1 axis を中心とした免疫チェックポイントが注目を集め、その阻害剤は予後改善に大きく貢献する。これらのことから、癌治療の目指すべきゴールの一つとして、抗腫瘍免疫応答における免疫抑制性機構の遮断が想起される。

その免疫抑制機構の一端を担う機能が B 細胞に存在することが示され、治療介入すべき問題となっている。B 細胞欠損マウスでは CD4<sup>+</sup>T 細胞の反応や CD8<sup>+</sup>T 細胞の細胞傷害性が増強し、種々の癌細胞に対して、より強力な抗腫瘍効果が発揮される。その抑制機構の中心的役割を果たすのが、制御性 B 細胞のサブセットであるとされる。また、Breg はさまざまな phenotype を有するが、CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>B220<sup>low</sup> で定義される集団は B10 細胞とされ、IL-10、IL-35 の産生を特徴とする。特に IL-35 は、未熟 B 細胞に作用し、転写因子である STAT1 および STAT3 を活性化し、Breg への分化を誘導する重要な因子とされる。以上のようにマウスモデルでは、各癌腫に対する制御性 B 細胞による抗腫瘍免疫応答の抑制とその抑制機能の解除・遮断による腫瘍増殖抑制が報告されている。CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>B220<sup>low</sup> の細胞は血液中のみならず、腹腔内に局在するとされ、これを解析対象の中心として、B 細胞の動態や機能を解析し、これがどのように免疫抑制機構として関与しているかを検証する。

### 2. 研究の目的

本研究は、大腸癌腹膜播種症例における骨髄由来免疫抑制性細胞(myeloid derived suppressor cell; MDSC)及び腹腔内制御性 B 細胞の機能と動態を解明し、治療効果及び予後との関連を明らかにする。第一にマウス担癌/腹膜播種モデルを作成し、MDSC とともに制御性 B 細胞の動態を明らかにする。マウス同モデルでの抗体を用いた MDSC 及び制御性 B 細胞を標的とした治療を検討する。大腸癌腹膜播種患者/大腸癌手術患者の腹水を採取し、MDSC 及び B 細胞の表現型の解析と機能解析を行い、その治療効果と予後につき検討を行う。

### 3. 研究の方法

マウス担癌皮下接種・腹膜播種モデルを作成して、骨髄由来免疫抑制性細胞(myeloid derived suppressor cell; MDSC)及び生 B 細胞(Breg)の動態を明らかにする。同モデルにおいて、腹腔洗浄液中における、各種免疫細胞群の変化をフローサイトメトリーで測定した。腫瘍は大腸癌細胞株 CT26 を用いて、腹腔内注射を行い、腹膜播種モデルを作成し、解析を行い、予備実験とした。さらに、モデル比較として腫瘍は大腸癌細胞株 MC38 を用いて、各皮下接種及び腹腔内注射を行い、皮下腫瘍モデルと腹膜播種モデルを作成した。腹腔内腫瘍マウスモデルの腫瘍体積測定には、MC38-luc 細胞を用いて、IVIS を用いて画像的に評価を行った。サイトカインについては、サイトメトリービーズアレイ(CBA)アッセイを用いて、血漿及び腹腔洗浄液を測定した。顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )、IFN- $\gamma$ 、インターロイキン 1(IL-1)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、および IL-13 を用いて分析した。また、抗原特異的 T 細胞抑制アッセイとして、OT-1 C57BL/6 トランスジェニックマウスからの脾臓細胞を用いて、ペプチド刺激を行い、CFSE 染色にて陽性細胞を検出し、その抑制効果を評価した。ヒト大腸癌腹膜播種患者より採取した腹水中の MDSC 検出を試みた。

### 4. 研究成果

CT26 腹膜播種モデルでは、末梢血及び腹腔洗浄液において、時間と共に、腹膜播種は進展していくが、これとともに、その割合が上昇していくことが確認された。また、その分画の解析では PMN-MDSC が著明に上昇していくことが確認された(図 1.、図 2.)。

腹膜播種はその進展と共に、血性へと変化していくが、その血性の程度と結節の個数において、相関性がある可能性が示唆された(図 3.)。このモデルでは、特に M-MDSC が早期に変動することが示すことができた(図 4.)。

図.1

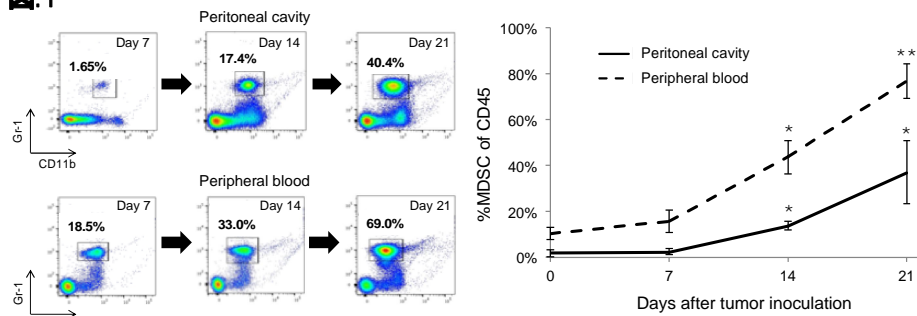


図.2

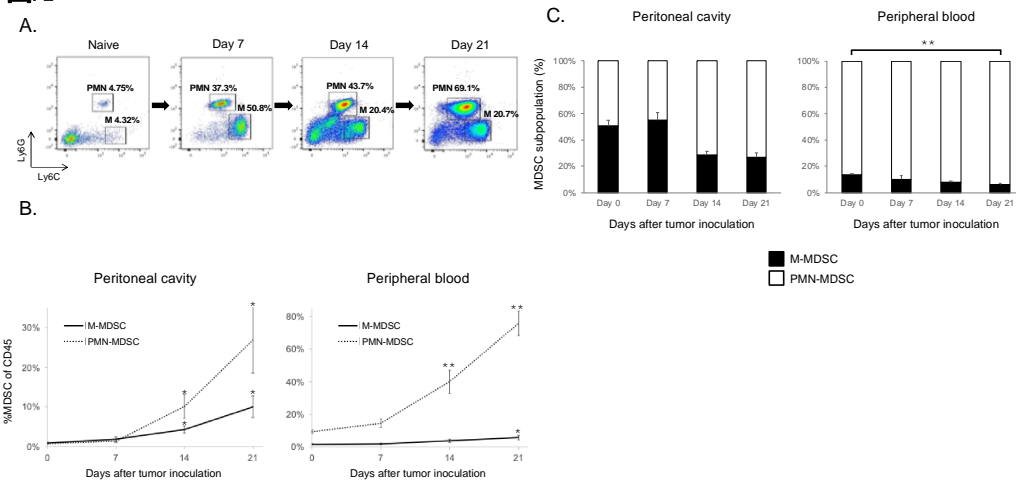


図.3

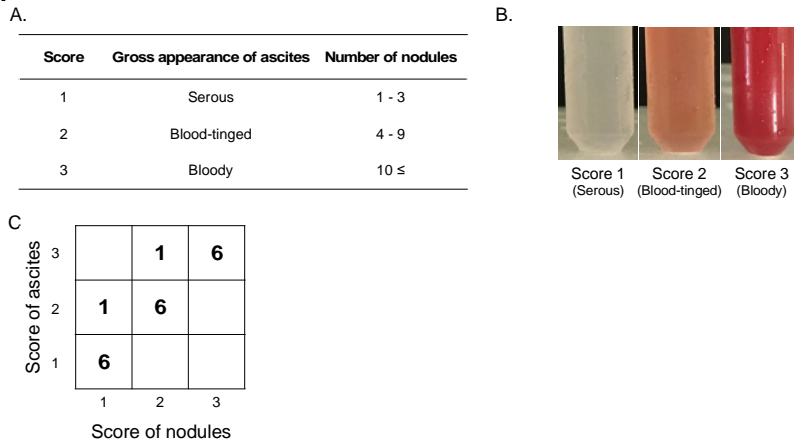
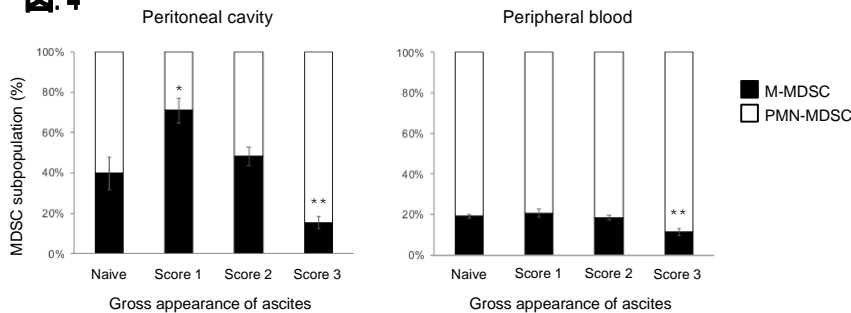


図.4



次に MC38 腹膜播種モデルを作成して、腹膜播種及び皮下摂取モデルの免疫細胞の分画を明らかにした。腹膜播種モデルでは、MDSC の両サブセットが癌の進行と関連して有意に増加した。PMN-MDSC は、MDSC の 2 つのサブセットで優勢に増加した。B 細胞分画の変化は乏しく、特に B10 細胞の変化は病態に關与する形では捉えられなかった (図.5)。また、サイトカイン では、G-CSF 及び IL-6 が著明に増加を示し、病態を反映するものと考えられた。IL-10 は産生促進を認めた。

抗体治療としては、Ly6G 抗体で行うと、腹膜播種の進行を抑制した。IVIS を用いた腫瘍の進展を見ても、明らかに抑制されていることが確認された (図.6)。

図.5

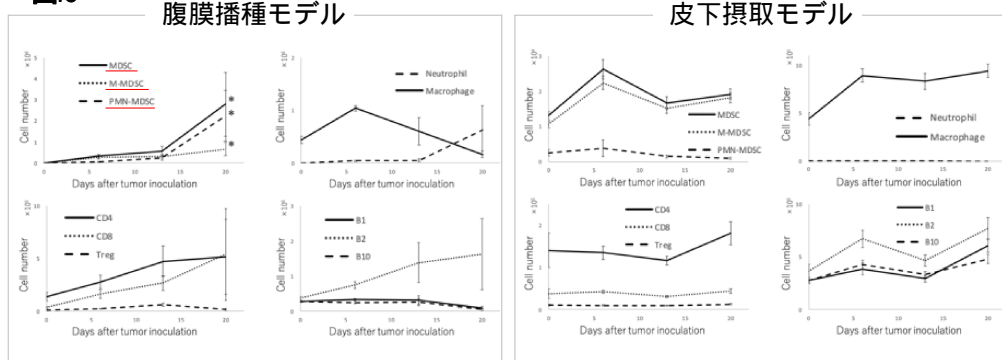
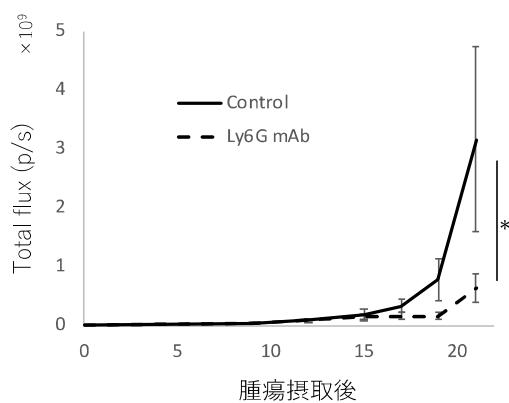
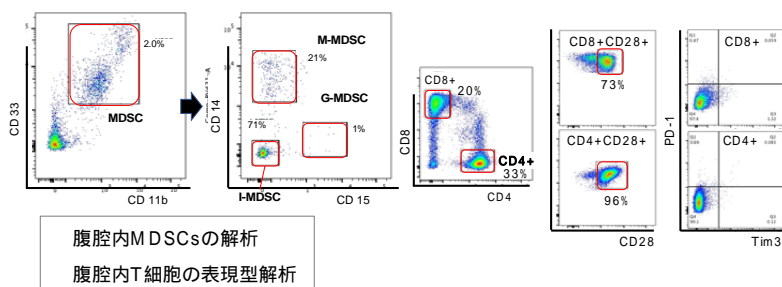


図.6



ヒト検体における採取は検体数の集積が十分でなく、腹腔内 MDSC の存在や T 細胞の状況を確認するにとどまった。さらに症例を重ねて免疫抑制細胞を中心に解析を進めたい。今回の研究では、B 細胞の機能解析にまでは到ることはできなかったが、MDSC を中心に腹膜播種モデルの解析を進めることができた。

図.7 胃癌腹水由来免疫細胞



腹腔内MDSCsの解析

腹腔内T細胞の表現型解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Arimoto A, Yamashita K, Hasegawa H, Sugita Y, Fukuoka E, Tanaka T, Suzuki S, Kakeji Y.	4. 巻 38
2. 論文標題 Immunosuppression Induced by Perioperative Peritonitis Promotes Lung Metastasis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 4233-4239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12733.	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 -

1. 著者名 掛地 吉弘、原田 仁、三浦 晋、松田 佳子、山本 将士、金治 新悟、鈴木 知志	4. 巻 64
2. 論文標題 胃癌膜播種に対する化学療法	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 癌の臨床	6. 最初と最後の頁 15-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Tanaka T, Fujita M, Hasegawa H, Arimoto A, Nishi M, Fukuoka E, Sugita Y, Matsuda T, Sumi Y, Suzuki S, Kakeji Y, Yamashita K	4. 巻 37
2. 論文標題 Frequency of Myeloid-derived Suppressor Cells in the Peripheral Blood Reflects the Status of Tumor Recurrence.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 3863-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.11766	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11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 杉田 裕、山下 公大、福岡 英志、渡部 晃大、瀧口 豪介、裏川 直樹、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、松田 武、押切 太郎、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 腹膜播種における腹腔内腫瘍免疫微小環境の解析
3. 学会等名 第30回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福岡 英志、山下 公大、有本 聡、瀧口 豪介、裏川 直樹、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、松田 武、押切 太郎、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 食道扁平上皮癌術前化学療法によるPD-L1発現とCD8陽性腫瘍浸潤リンパ球の誘導
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前原 律子、松田 武、山下 公大、長谷川 寛、有本 聡、瀧口 豪介、裏川 直樹、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、押切 太郎、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 下部進行直腸癌に対する術前化学放射線療法と選択的側方郭清の治療成績
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田 太郎、西田 満、山本 将士、掛地 吉弘、南 康弘
2. 発表標題 間葉系間質細胞由来のCXCL16は胃癌細胞においてRor1の発現を誘導し増殖と遊走を促進する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sugita Y, Yamashita K, Takimoto R, Tanaka T, Arimoto A, Fukuoka E, Yamamoto M, Nakamura T, Suzuki S, Kakeji Y
2. 発表標題 Intraperitoneal myeloid-derived suppressor cells in peritoneal dissemination mouse model
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉田 裕、山下 公大、田中 智子、福岡 英志、有本 聡、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、松田 武、押切 太郎、角 泰雄、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 腫瘍再発モデルにおける末梢血中の骨髄由来抑制細胞(MDSC)の推移
3. 学会等名 第6回がんと代謝研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉田 裕、山下 公大、田中 智子、福岡 英志、有本 聡、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、松田 武、押切 太郎、角 泰雄、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 腫瘍再発モデルにおける末梢血中の骨髄由来抑制細胞(MDSC)の推移
3. 学会等名 第39回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉田 裕、山下 公大、福岡 英志、田中 智子、有本 聡、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、松田 武、押切 太郎、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 腹膜播種モデルにおける腹腔内骨髄由来抑制細胞(MDSC)の推移
3. 学会等名 第29回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉田 裕、山下 公大、福岡 英志、田中 智子、有本 聡、瀧口 豪介、高瀬 信尚、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、松田 武、押切 太郎、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 マウス腹膜播種モデルにおける腹腔内骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)の推移
3. 学会等名 第22回バイオ治療法研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 智子、山下 公大、有本 聡、西 将康、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、押切 太郎、松田 武、角 泰雄、 中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 胆嚢状態における腫瘍誘導性骨髄由来抑制細胞 (MDSC) を与える影響
3. 学会等名 第38回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉田 裕、田中 智子、山下 公大、福岡 英志、有本 聡、西 将康、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、松田 武、 押切 太郎、角 泰雄、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 腫瘍再発モデルにおける末梢血中の骨髄由来抑制細胞 (MDSC) の推移
3. 学会等名 第28回日本消化器癌発生学会
4. 発表年 2017年

〔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	山下 公大  (Yamashita Kimihiro)  (80535427)	神戸大学・医学部附属病院・特命准教授   (14501)	
研究分担者	鈴木 知志  (Suzuki Satoshi)  (30457080)	神戸大学・医学研究科・特命教授   (14501)	
研究分担者	掛地 吉弘  (Kakeji Yoshiro)  (80284488)	神戸大学・医学研究科・教授   (14501)	