

令和元年5月30日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16554

研究課題名(和文)胃癌腹膜播種に対する抗腫瘍免疫応答の解明

研究課題名(英文)Anti-cancer immune response to intraperitoneal dissemination of gastric cancer

研究代表者

有本 聡 (Arimoto, Akira)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20778766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：腹膜播種モデルマウス作成に着手した。腹腔内の免疫応答破綻のメカニズムを解明するために、経時的に進行が観察可能なモデルが望ましいと考えた。肉眼的に確認する以外に腹膜播種を確認する方法がないため、適切な細胞数、解析時期を決定するのに難渋した。BALB/cマウスに大腸癌細胞株であるMC-38を腹腔内投与し、経時的に安定して評価可能な系を確立した。大網内、腹腔内のT細胞の分布をフローサイトメトリーを用いて評価した。大網からリンパ球を抽出し評価する系が安定せず、T細胞の詳細な評価にまでは至らなかった。腹膜播種モデルで腹腔内のCD8 T細胞は腹膜播種の進行に関わらず、ほぼ一定の割合を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌腹膜播種成立には、大網を含む腹腔内の抗腫瘍免疫の破綻が大きな要因であると考えられる。抗腫瘍免疫破綻のメカニズムを明らかにすることは、新規治療開発の重要な鍵になる。これまで、病勢が進行する時期ごとに評価可能な、消化器癌の細胞株を用いた腹膜播種モデルは確立されていなかった。本研究ではこのモデルを確立し、腹腔内T細胞の評価が可能であった。大網内のT細胞の評価には抽出方法などの改善が必要であるが、今後のモデルマウスを用いた腹膜播種成立の免疫学的メカニズム解明の礎になったと考える。

研究成果の概要(英文)：We started to create a peritoneal-dissemination mouse model. We needed a mouse model in which we could observe the disease progression chronologically for the investigation about the mechanism of intraperitoneal immune response failure. We had a hard time to decide an appropriate cell number and timing for analysis because the only way to evaluate the disease progression precisely is to observe the mice directly by opening the abdomen. We finally succeeded in establishing the steady system in which peritoneal dissemination progressed chronologically by injecting MC38, colon cancer cell line, intraperitoneally into BALB/c mice. We evaluated the distribution of T cells in the omentum and peritoneal cavity by flow cytometry. We couldn't make a detailed analysis of T cells due to the difficulty in stable extraction of them from omentum. In peritoneal dissemination model mice, the proportion of CD8 T cells in the peritoneal cavity showed less change even though the disease progressed.

研究分野：癌免疫

キーワード：腹膜播種 CD8+細胞 milky spot

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胃癌は外科手術が根治治療の中心となるが、術後再発形式として、最も高率な因子は腹膜播種である。実際、死因の約60%は腹膜播種に伴う癌性腹膜炎とされる(Yonemura Y, et al. Ann Surg Oncol. 2009)。胃癌の治療成績の向上には、腹膜播種の病態解明と治療戦略の確立が急務であると言える。

腹膜播種は、腫瘍自体より遊離した癌細胞(peritoneal exfoliated cancer cell; PECC)の微小転移から形成され、進展していく。PECCは足場として、大網や腹膜に表面に局在する milky spot と呼ばれる原始的なリンパ組織に、他の臓器に先んじて接着する(Hagiwara A, et al. Cancer Res.1993, Elizabeth W, et al. Immunol Res. 2009)。milky spot は主に B 細胞やマクロファージの集簇から成り、一部に T 細胞を含み、その周囲を CXCL13+マクロファージがカップ状に囲む構造となっている。さらに milky spot は腹腔内の二次リンパ組織として機能していることが明らかとなった(Rangel-Moreno, et al. Immunity 2009)。具体的には、経腹的に投与された抗原に対し、獲得免疫応答が通常の二次リンパ組織とほぼ同様に引き起こされ、抗原特異的応答を引き起こされていること、さらに抗原及び免疫細胞は milky spot と腹腔内を行き来していることが明らかとなり、同時に CXCL13+が milky spot を維持するために必須であることが示された。すなわち、腹腔内の免疫防御装置として機能していることが明らかとなった。担癌宿主内の癌と免疫の関係は、cancer immunoediting theory (Duun GP, et al. Nat Immunol. 2009)としてその関係性とメカニズムが論じられるが、腹腔内大網と癌細胞にも同様のことが予測される。すなわち PECC と milky spot 構成細胞のバランスは、癌細胞の除去(Elimination)、免疫均衡(Equilibrium)、免疫破綻(Escape)で説明される。また、進行癌の免疫逃避機構により T 細胞は疲弊状態となる。つまり、腫瘍抗原の連続的な刺激と微小環境内の慢性的な炎症により、T 細胞の機能は減弱し、癌を排除できなくなる。この T 細胞の特徴は、(1)PD-1、LAG-3、Tim-3、CD160 などの阻害性補助刺激受容体の高い発現があること、(2)増殖能の低下、(3)サイトカイン産生能の低下、(4)特徴的な転写因子の発現や代謝の変化(Wherry EJ, et al. Nat Immunol. 2011)、が挙げられる。

最近になり、慢性ウイルス感染のモデルを用いた、抗 PD-L1 抗体に関するさらなる重大な報告がなされた。このモデル内の CD8+T 細胞は、heterogeneity があり、機能的に異なる集団が CXCR5 の発現により分画されることが示された。すなわち CXCR5+CD8+T 細胞は、実際にウイルスに対して細胞障害性機能を発揮するエフェクター細胞の供給源であり、幹細胞メモリー様の特徴を持つことが明らかとなった (Im S J, et al. Nature 2016, He R, et al. Nature 2016, Leon A Y, et al. Nat Immunol. 2016)。

具体的には、(1)PD-1、Tim3 などの阻害性補助刺激因子の発現、(2)エフェクター細胞への分化能、(3)高い増殖能、(4)高いサイトカイン産生能、(5)(CXCR5- CD8+ と比較して)細胞障害性物質の分泌能が低い、(6)(メモリー細胞の様な)抗原非依存的な細胞の維持、自己複製能が示された。解剖学的な局在は脾臓やリンパ節を中心とした二次リンパ組織の T 細胞領域に局在することが明らかとなった。さらに驚くべきことに、抗 PD-L1 抗体投与により CXCR5+CD8+T 細胞が増殖することが判明した。即ち抗 PD-L1 抗体の効果に直接関与している集団が同定された。担癌宿主内でも、持続する抗原刺激により CD8+T 細胞が exhaustion をきたし、慢性ウイルス感染と同様の病態が形成されていると考えられる。milky spot を含む二次リンパ組織の構成細胞が発現する CXCL13 は CXCR5 のリガンドであり、上記特徴を有する CXCR5+CD8+T 細胞は milky spot に集簇し、腹腔内抗腫瘍免疫応答において重要な役割を担うと強く推測される。

### 2. 研究の目的

milky spot は、腹膜播種の癌細胞の足場形成部となり、同時に腹腔内の腫瘍特異的免疫応答に関わる二次リンパ組織である。本研究の目的は、この2つの特徴を利用し、細胞障害性 T 細胞の供給源である、幹細胞メモリー様 T(stem cell-memory-like, Tscm-like)細胞の局在を同定すること、また腹膜播種の抗腫瘍免疫機構のメカニズムを解明し、同時に治療の可能性を探求することである。

### 3. 研究の方法

本研究では、腹膜播種マウスモデルを作成し、CXCR5+CD8+T 細胞の局在を明らかにし、大網 milky spot 内の腫瘍反応性 CXCR5+CD8+T 細胞の機能解析を行い、腹膜播種における免疫応答とその破綻のメカニズムを解明する。同時にマウスモデルでの抗 PD-L1 抗体腹腔内投与による効果を検証する。また、進行胃癌患者の大網と洗浄腹水を採取し、milky spot における CXCR5+CD8+T 細胞の存在と機能、及び腹腔内細胞の解析をすすめ、臨床的な適用を模索する。

### 4. 研究成果

腹膜播種モデルマウスの作成に着手した。milky spot での免疫応答の破綻のメカニズムを解明するために、経時的に進行が観察可能なモデルが望ましいと考えられた。腹腔内に投与する腫瘍細胞の細胞数の過多により早期にマウスが死亡するが、少量であれば腹膜播種が樹立しない。

肉眼的に確認する以外に腹膜播種を確認する方法がないため、適切な細胞数、適切な解析時期を決定するのに難渋した。いくつかのマウスと細胞株の組み合わせを検討し、BALB/c マウスに大腸癌細胞株である MC-38 を腹腔内投与し、経時的に安定して評価可能な系を確立した。大網内、および腹腔内の T 細胞の分布をフローサイトメトリーを用いて評価した。大網に関しては、ナイーブマウスの大網からリンパ球を抽出し評価する系が安定せず、T 細胞の詳細な評価にまでは至らなかった。腹膜播種モデルで腹腔内の CD8 T 細胞は腹膜播種の進行に関わらず、ほぼ一定の割合を示した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1.著者名 Arimoto A, Yamashita K, Hasegawa H, Sugita Y, Fukuoka E, Tanaka T, Suzuki S, Kakeji Y.
2.論文標題 Immunosuppression Induced by Perioperative Peritonitis Promotes Lung Metastasis.
3.雑誌名 Anticancer Res.
4.巻 38
5.発行年 2018 年
6.最初と最後の頁 4333-4338
掲載論文の DOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.12733.
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
査読の有無 有
国際共著 -

〔学会発表〕(計 2 件)

1.発表者名 有本 聡、山下 公大、西 将康、杉田 裕、福岡 英志、田中 智子、掛地 吉弘
2.発表標題 腫瘍抗原導入DCGによる抗原特異的抗腫瘍免疫活性化
3.学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4.発表年 2018年

1.発表者名 <sup>[SEP]</sup> Arimoto A, Nishi M, Yamashita K, Sugita Y, Fukuoka E, Tanaka T, Kamigaki T, Takimoto R, Kakeji Y
2.発表標題 <sup>[SEP]</sup> Electroporation as a feasible method for antigen delivering into vectors loaded with NKT cell ligand
3.学会等名 <sup>[SEP]</sup> AACR Annual Meeting 2018(国際学会)
4.発表年 2018年

〔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。