

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18210

研究課題名（和文）間質性肺炎合併肺癌で2型自然リンパ球が果たす2つの役割：線維化促進と腫瘍免疫抑制

研究課題名（英文）Role of group 2 innate lymphoid cells in the lung cancer microenvironment

研究代表者

伊藤 温志 (Ito, Atsushi)

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：80783133

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：2型自然リンパ球(ILC2)は、癌の種類や微小環境に影響されて腫瘍抑制および腫瘍促進の相反する二つの作用を有することが知られている。我々は乳癌肺転移モデルマウスを用いて、乳癌肺転移におけるILC2が果たす役割を検討した。micro-metastasis、macro-metastasisにおけるILC2の数や頻度に変化はなかったが、macro-metastasisにおいてはILC2の細胞表面マーカーやサイトカイン産生能が活性化していた。更に、ILC2から産生されるIL-13を介して骨髄由来免疫抑制細胞が活性化され、転移カスケードを通して腫瘍増殖を許容する微小環境を構築している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌治療においては免疫チェックポイント阻害薬の開発により治療成績の向上が目覚ましいが、現状ではまだその効果が得られる患者は10-30%と限定的である。本研究では乳癌肺転移モデルマウスを用いて、乳癌肺転移においては2型リンパ球と骨髄由来免疫抑制細胞の相互作用により腫瘍増殖を許容する微小環境を構築している可能性を見出した。今後、腫瘍微小環境におけるこれらの自然免疫細胞の働きの解明が進むことで、更なる免疫療法の開発や癌予防に繋げていくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：When breast cancer metastasizes to the lung, group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) are thought to promote tumor growth via the activation of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). In this study, we aimed to characterize the dynamic interactions of ILC2s and MDSCs during the course of cancer progression from the micrometastatic to the macrometastatic stages. We found that ILC2s were activated in both the micro- and macrometastatic regions, suggesting sustained activation throughout the metastatic cascades. In addition, our findings indicate that ILC2s may induce the immunosuppressive functions of MDSCs during the later stages of metastasis. Concomitantly, ILC2 may instigate extracellular matrix remodeling by polymorphonuclear (PMN)-MDSC activation during the early stages of metastasis. These metastatic-stage-specific changes may contribute to metastatic tumor growth in the microenvironment of breast cancer lung metastasis.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：2型自然リンパ球 がん 腫瘍微小環境 骨髄由来免疫抑制細胞

1. 研究開始当初の背景

自然リンパ球は、B細胞及びT細胞受容体を持たず、獲得免疫ではなく自然免疫で働く新規リンパ球集団であり、約10年前に発見され、現在精力的に研究が進められている。自然リンパ球(ILCs: innate lymphoid cells)は骨髄からの前駆体細胞が特定の臓器にホーミング後に成熟し、定住・自己増殖するレジデント細胞である。転写因子とサイトカイン産生パターンに基づき、ILC1、ILC2、ILC3に大別される。このうち、ILC2は喘息やアトピー性皮膚炎における自然型アレルギーのみならず、肺の線維化、気道の修復など多面的な機能を有していることが明らかになりつつある。病原体やアレルゲン、細胞障害により肺胞上皮細胞等からIL-25やIL-33が産生され、ILC2は獲得免疫を介さずに活性化し、Th2型サイトカインであるIL-5、IL-9、IL-13などを大量に産生する。これらのサイトカインは肺胞上皮細胞に働きかけ、粘液産生や組織修復を促進し、間質と気腔のバリア機能や恒常性を維持している。しかし、がん浸潤・転移におけるILC2の役割についてはまだ分かっていないことも多い。最近の報告では、ILC2はIL-13の産生を介して骨髄由来免疫細胞(MDSC: myeloid derived suppressor cells)の活性化やマクロファージをM2型マクロファージの分化を促進し、T細胞の働きを抑制することで腫瘍増殖を促進する微小環境を構築していることが示唆されている。一方で、ILC2から産生されるIL-5は好酸球を誘導・活性化し、好酸球が産生するMBP(major basic protein)が抗腫瘍効果を発揮するといった報告も見られる。現在のところ、ILC2の作用が腫瘍増殖を促進性または抑制性に働くかどうかは腫瘍の種類やその微小環境により異なると考えられている。

研究開始当初は間質性肺炎合併肺癌の腫瘍微小環境におけるILC2の働きを線維化促進と抗腫瘍免疫細胞抑制の観点から研究を進めていたが、間質性肺炎合併肺癌の動物モデル作成やヒトサンプルを用いたILC2の解析が技術的に困難であったため、転移性肺癌の微小環境におけるILC2の働きに注目して研究を進めることとした。

2. 研究の目的

肺転移においてILC2から産生されるIL-13の過剰な産生がMDSCやM2型マクロファージの活性を促進し、T細胞の働きを抑制して腫瘍増殖を許容する微小環境を構築しているという病態モデルの研究仮説を、乳癌肺転移モデルマウスを用いて検証することを目的とした。

3. 研究の方法

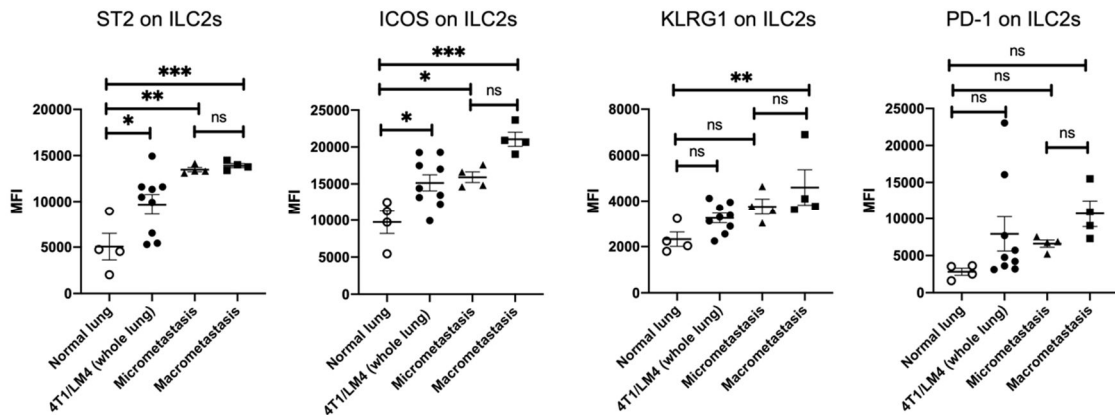
(1)8-12週齢の雌Balb/cマウスの乳腺皮下に4T1/LM4乳癌細胞を接種し、肺転移が形成される3週間後にマウスを犠牲させて転移肺を摘出した。この転移肺における転移巣をMacrometastasis、転移巣摘出後の肺実質をMicrometastasisと定義し、コントロールには野生型マウスの肺組織を用いて、ILC2の数や分布、活性化を比較した。パーコールを用いた密度勾配遠心法にて肺組織内白血球を分離し、ILC2の表面光源を多重染色してフローサイトメトリーを用いて解析した。

(2)ILC2のTh2型サイトカインであるIL-5やIL-13の産性能を細胞内染色を行い、フローサイトメトリーを用いて解析した。さらに正常肺、Micrometastasis、Macrometastasisの3領域におけるTh2型サイトカインや肺の線維化に関わる遺伝子発現をRT-PCRを用いて比較した。

(3)ILC2より産生されるIL-13がMDSCのエフェクターサイトカインであることが知られているため、正常肺、Micrometastasis、Macrometastasisの3領域におけるMDSCの数や分布をフローサイトメトリーで解析し、さらにMACS法によりMDSCを抽出し、抗腫瘍免疫抑制作用のあるArg1やiNOSなどの遺伝子発現をRT-PCRで比較検討した。

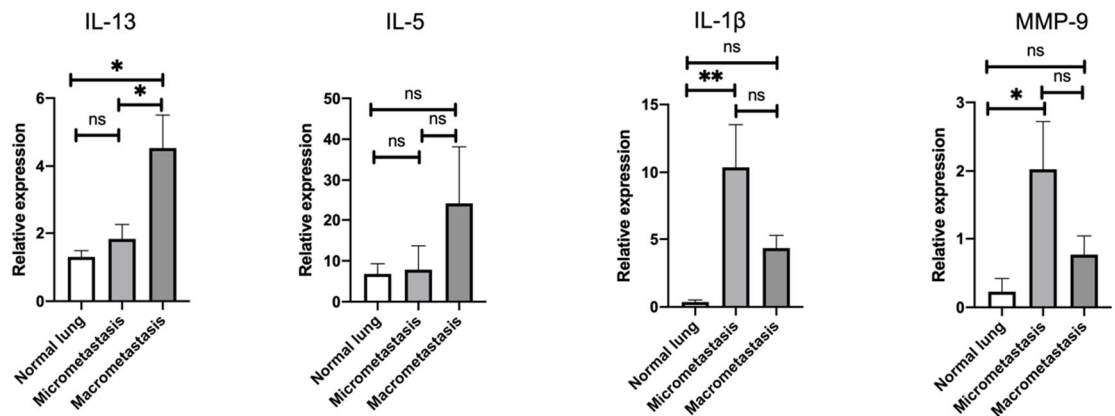
4. 研究成果

(1)肺組織4領域(正常肺、転移肺全体、Micrometastasis、Macrometastasis)のILC2の数や細胞表面マーカーの活性化を比較した。それぞれの領域におけるILC2の数やリンパ球中の割合に有意差は認めなかったが、ILC2の活性化を示唆するST2やICOS、KLRG1などの細胞表面マーカーはMicrometastasis、Macrometastasisで共に有意に上昇していた(図1)。



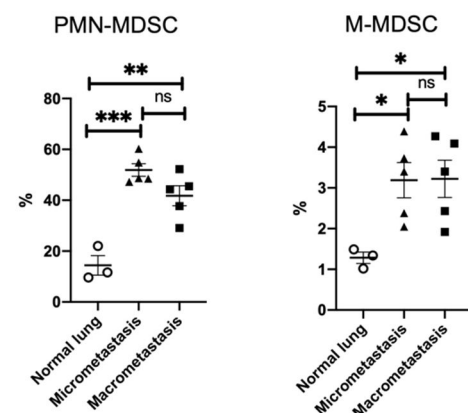
(図1) 肺組織4領域(正常肺、転移肺全体、Micrometastasis、Macrometastasis)の ILC2 の表面マーカーの比較

(2)肺組織中の ILC2 の IL-5 と IL-13 の産性能を正常肺と転移肺で比較したところ、IL-5 は明らかな差は認めなかったが、IL-13 は転移肺で有意に上昇していた。また肺組織3領域(正常肺、Micrometastasis、Macrometastasis)の遺伝子発現を RT-PCR で比較したところ、Macrometastasis で IL-13 の発現が亢進し、Micrometastasis で細胞外マトリックスのリモデリングに関わる IL-1 や MMP-9 の発現が亢進していた(図2)。



(図2) 肺組織3領域(正常肺、Micrometastasis、Macrometastasis)の遺伝子発現の比較

(3) 正常肺、Micrometastasis、Macrometastasis の3領域における MDSC の白血球中の割合を MDSC のサブタイプである PMN(polymorphonuclear)-MDSC と M(monocytic)-MDSC に分けて比較したところ、Micrometastasis、Macrometastasis で共に MDSC の割合が有意に増加していた(図3)。さらに、MDSC を MACS 法で抽出して遺伝子発現を RT-PCR で解析したところ、Micrometastasis では PMN-MDSC の IL-13 受容体や細胞外マトリックスのリモデリングに関わる IL-1 の発現が上昇し、Macrometastasis では PMN-MDSC、M-MDSC 共に抗腫瘍免疫抑制作用のある Arg1 の遺伝子発現が上昇していた。



(図3) 肺組織3領域(正常肺、Micrometastasis、Macrometastasis)の MDSC の割合

本研究により、ILC2 が産生する Th2 型サイトカインである IL-13 が MDSC に作用し、転移早期では PMN-MDSC が活性化され細胞外リモデリングが促進され、転移後期では PMN-MDSC、M-MDSC が活性化され、アルギナーゼ産生を介して抗腫瘍免疫抑制作用を発揮している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 1件）

1. 著者名 伊藤温志、赤間悠一、島岡要	4. 巻 47(2)
2. 論文標題 免疫チェックポイントと2型自然リンパ球	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 97-100.
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 無
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 伊藤温志、赤間悠一、島岡要	4. 巻 36(12)
2. 論文標題 2型自然リンパ球と癌：促進と抑制の狭間で	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 64-67.
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 無
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 Ito A., Akama Y., Satoh-Takayama N., Saito K., Kato T., Kawamoto E., Shimaoka M.	4. 巻 14(13)
2. 論文標題 Possible Metastatic Stage-Dependent ILC2 Activation Induces Differential Functions of MDSCs through IL-13/IL-13R 1 Signaling during the Progression of Breast Cancer Lung Metastasis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14133267.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤温志、篠田真里、川口瑛久、金田真吏、川口晃司、島本亮、高尾仁二
2. 発表標題 乳がん肺転移における2型自然リンパ球 (ILC2) と骨髄抑制免疫細胞 (MDSC) の役割
3. 学会等名 第63回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 伊藤温志、赤間悠一、島岡要	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 Medical Science Digest 2月号	

〔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
研究協力者	赤間 悠一 (Akama Yuichi)		
研究協力者	佐藤 尚子 (Satoh Naoko)		
研究協力者	齋藤 佳菜子 (Saito Kanako)		
研究協力者	加藤 琢磨 (Kato Takuma)		
研究協力者	川本 英嗣 (Kawamoto Eiji)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	阿栄 高娃 (Gaowa Arong)		
研究協力者	朴 恩正 (Park Fun Jeong)		
研究協力者	高尾 仁二 (Takao Motoshi)		
研究協力者	島岡 要 (Shimaoka Motomu)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関