

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15540

研究課題名（和文）食物抗原が消化器腫瘍を抑制する機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of mechanisms for suppressing gastrointestinal tumors by food antigens

研究代表者

佐々木 崇晴（Sasaki, Takaharu）

順天堂大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：60779718

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）：食物抗原が小腸と大腸の腫瘍を抑制することを示唆するデータを得ていた。当初、DSS/AOMによる大腸腫瘍を誘導したマウスに無抗原食を与えると癌幹細胞マーカーの増加が見られたことから、食物抗原が大腸腫瘍に与える影響について解析を進めた。しかし、無抗原食を与えることによる癌幹細胞マーカーの増加に関する再現性が良好ではないことから、方向性を転換し、食物抗原が小腸腫瘍を抑制するメカニズムについて解析を実施した。その結果、食物抗原がパイエル板に存在する上皮細胞であるM細胞を介して取り込まれ、樹状細胞に受け渡されること、M細胞が小腸の1型ヘルパーT細胞の誘導に関与し、腫瘍を抑制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

本研究結果は食物抗原がどのように免疫組織に取り込まれて腸管免疫系の誘導・活性化に働き生体の恒常性維持に働くかを初めて明らかにしたものであり、今後消化器腫瘍の予防対策を考える上での基盤となる可能性が考えられる。また、本研究を通じ、食物抗原による免疫系の活性化に着目した他の疾患予防研究を推進するきっかけになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Our previous data suggested that food antigens suppress tumors in the small intestine and colon. Initially, we examined the effects of food antigens on colon tumors because an increase in cancer stem cell markers was observed when mice, induced with colon tumors by DSS/AOM, were fed an antigen-free diet. However, due to the poor reproducibility of the increase in cancer stem cell markers caused by the antigen-free diet, we shifted our focus to analyzing the mechanisms by which food antigens suppress small intestinal tumors. Consequently, it was suggested that food antigens are taken up through M cells, which are epithelial cells present on the surface of Peyer's patches, and are transferred to dendritic cells. Furthermore, M cells were found to be involved in the induction of type 1 helper T cells in the small intestine, and suppress tumors.

研究分野：免疫学

キーワード：食物抗原 消化器腫瘍 パイエル板 M細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小腸は食物の成分や腸内細菌にさらされており、これらは生体の恒常性維持や免疫系の活性化に重要である。近年、食物の成分のなかでも特に 10kDa 以上の比較的大きな分子が抗原として働き小腸の T 細胞を誘導することが分かった (Kim et al., *Science*, 2016)。研究代表者らの研究でもこのような分子が小腸の B 細胞誘導に働き、細菌感染に対する生体防御に働くことが分かっている (Hara et al., *Front Immunol*, 2019)。このような分子は抗原受容体を介して T 細胞や B 細胞といった獲得免疫系のリンパ球を誘導・活性化することから「食物抗原」と呼ばれる。

研究開始当初までに実施した研究から、食物抗原が小腸・大腸両方の腫瘍の発生・進行を抑制することが示唆されていた。食物抗原が小腸の腫瘍発生を抑制するメカニズムの解析も重要であるが、本研究ではまず世界的に見て患者数の多い大腸腫瘍に着目した研究を実施する計画を立てた。しかし、食物抗原は小腸の T 細胞、B 細胞を誘導するのに対し、大腸の T 細胞、B 細胞の数には影響を与えない。したがって、食物抗原による小腸腫瘍の抑制には T 細胞や B 細胞が直接関係するだろうと推測されるが、食物抗原が大腸の腫瘍を制御するメカニズムには免疫細胞以外の何らかの要因が関係していると考えられ、そのメカニズムは不明である。

研究開始当初、私達は、食物抗原を除去した餌 (無抗原食) をマウスに与えると、通常食を摂食させたマウスと比較して大腸腫瘍における癌幹細胞マーカーの発現が 75 倍も増加することを見出していた。さらに、T 細胞と B 細胞を欠損するマウスの腸では核内受容体 farnesoid X receptor (FXR) の発現が減少することも見出していた。既報によると、興味深いことに胆汁酸が核内受容体 farnesoid X receptor (FXR) に作用して大腸の癌幹細胞を増殖させる (Fu et al., *Cell*, 2019)。したがって、食物抗原によって誘導された T 細胞や B 細胞が胆汁酸の腸肝循環や FXR シグナルを制御することによって大腸癌の進行に影響を与える可能性があると考え研究を開始した。

2. 研究の目的

- (1) 食物抗原による大腸癌抑制機構の解明。
- (2) 特に、食物抗原によって誘導された T 細胞や B 細胞が肝臓における胆汁酸合成・分泌や小腸における胆汁酸の再吸収 (腸肝循環)、FXR シグナルに与える影響とその機構の解明。
- (3) (1), (2) がうまく進展しない場合には、食物抗原が小腸腫瘍を抑制するメカニズムについて解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 大腸腫瘍の誘導と、大腸腫瘍に対する食物抗原の影響の解析: B6 マウスにアゾキシメタン (Azoxymethane; AOM, 10mg/kg) を腹腔内投与した後、デキストラン硫酸ナトリウム (Dextran sulfate sodium; DSS) を 2% (w/v) で溶解した水を 5 日間与えてから通常水で約 1-2 週間飼育するサイクルを 3 回繰り返したのち、無抗原食を 4 週間与える実験を行った。実体顕微鏡で大腸腫瘍の数や大きさを測定するとともに、大腸腫瘍と非腫瘍部位を切り取り、qPCR による幹細胞マーカーの解析を行った。また、腸管内容物を回収して DNA を抽出し、次世代シーケンサーによる腸内細菌叢の解析を行った。

(2) 食物抗原の取り込み経路に関する解析: パイエル板上皮から食物抗原が取り込まれているか調べるため、ループアッセイを用いた。B6 マウスを 5 時間絶食させて麻酔したのち、小腸で 3-4 個のパイエル板を含む部位の両端を結紮し、FITC 標識化卵白アルブミン (FITC-OVA) 溶液を注入して結紮部位内部を満たした。1 時間後、結紮部位のパイエル板を回収し、M 細胞マーカー GP2 に対する抗体を用いたホールマウント染色を行い M 細胞と FITC-OVA の局在を共焦点顕微鏡によって調べるとともに、パイエル板樹状細胞における FITC 陽性率をフローサイトメトリーによって調べた。

(3) M 細胞が小腸の免疫細胞誘導と小腸腫瘍に及ぼす影響の解析: M 細胞を欠損する Villin-Cre Spib^{flox/flox} マウス (Kanaya et al., *Nat Immunol*, 2019) の小腸から EDTA 処理、コラゲナーゼ処理、PercolI 処理によって白血球を回収し、フローサイトメトリーによる解析を行った。また、M 細胞が小腸腫瘍に及ぼす影響については、腫瘍を自然発症する APC^{min/+} マウスを同マウスと交配させて M 細胞を欠損する Villin-Cre Spib^{flox/flox} APC^{min/+} マウスを作製し、このマウスの腫瘍の大きさと数を実体顕微鏡下で測定した。

4. 研究成果

- (1) 食物抗原が大腸腫瘍に与える影響の解析
AOM/DSS 投与によって大腸腫瘍を誘導したマウスに無抗原食を摂食させると、研究開始前に実

施した1回目の実験では腫瘍部位においてLgr5などの癌幹細胞マーカーの発現が顕著に増加することを見出していたことから食物抗原が癌幹細胞の増加させることが示唆された。本研究開始後にその再現性を確認したところ、2回目の実験では1回目の実験のような顕著なLgr5の発現増加は見られなかった。したがって、1回目の実験において見られたLgr5発現の増加は食物抗原そのものではなく、無抗原食によってもたらされる腸内細菌叢の変化によって生じるのではないかと考えた。1回目の実験で回収した大腸内容物を用いて腸内細菌の解析を行ったところ、無抗原食群ではLgr5の発現と正の相関を示す細菌が3種、負の相関を示す細菌が2種類見つかった。さらに、糞便中の水溶性代謝物の解析を液体クロマトグラフィー質量分析法によって実施したところ、腫瘍の悪化に関与することが知られる代謝物がLgr5の発現と正の相関を示した。即ち、1回目の実験では無抗原食の摂食によって増加した細菌によって産生される代謝物がLgr5の増加を促した可能性が考えられた。2回目の実験では異なる腸内細菌の組成となったことでLgr5の発現上昇が見られなかった可能性が考えられる。以上の結果は腸内細菌と腫瘍との関係性を探る研究上で重要ではあるが、食物抗原が大腸腫瘍に及ぼす影響について探る本研究課題の趣旨とは異なった研究となる為、本研究の2年目から研究の方向性を転換し、食物抗原が小腸腫瘍に及ぼす影響について解析を行うこととなった。

(2) 食物抗原がパイエル板に取り込まれる機構の解析

既に研究代表者らは、消化器に腫瘍を自然発症するAPC^{min/+}マウスを用いて、食物抗原が小腸腫瘍の発生を抑制する結果を得ていた。また、食物抗原による腫瘍抑制効果において、小腸の免疫誘導組織であるパイエル板が関与することを示唆する実験結果を得ていた。本研究ではまず、どのように食物抗原がパイエル板に取り込まれて免疫系の誘導に働くのか調べた。パイエル板の管腔側表面は濾胞随伴上皮細胞層(FAE)におよび覆われており、ここに分布するM細胞という上皮細胞は腸内の微生物を取り込み、腸管免疫組織に受け渡して腸管免疫系を発動することが知られている。このため、食物抗原もM細胞からパイエル板に取り込まれ、小腸免疫系の誘導に働くのではないかとという仮説を検証することとした。まず、野生型マウスでループアッセイを行い、結紮部位に注入したFITC-OVAがM細胞に取り込まれるか共焦点顕微鏡を用いて調べたところ、M細胞のマーカーであるGP2とOVAが共同在することが分かった。さらに、ループアッセイを行うことによって、パイエル板に存在する樹状細胞のFITC陽性率も増加していたことから、小腸内のOVAはパイエル板に存在する樹状細胞に受け渡されていることが示唆された。この増加は、M細胞を欠損するVillin-Cre Spib^{flx/flx}マウスにおいて減少したことから、小腸内のOVAはM細胞を介してパイエル板樹状細胞に受け渡されることが分かった。即ち、食物抗原がM細胞からパイエル板に取り込まれることが示唆された。

(3) 食物抗原が小腸腫瘍を抑制する機構の解析

M細胞が腸管免疫系に与える影響について調べるため、Villin-Cre Spib^{flx/flx}マウスの小腸に存在する免疫細胞の解析を行った。その結果、腫瘍の抑制に働くサイトカインIFN γ を産生する1型ヘルパーT細胞の減少が見られた。即ち、食物抗原はパイエル板にM細胞を介して取り込まれ、腸管免疫系の誘導に働くことが示唆された。

次に、M細胞が小腸腫瘍に影響を与えるか調べるため、Villin-Cre Spib^{flx/flx} APC^{min/+}マウスを作製して解析を行った。その結果、コントロールマウスと比較して小腸腫瘍の数の増加する傾向が観察された。

以上の研究結果はM細胞を介して食物抗原が取り込まれ、M細胞を介する腸管免疫系制御が小腸腫瘍を抑制することを示唆するものである。しかし、M細胞による食物抗原取り込みによって誘導された免疫細胞がどのように腫瘍抑制に働くかについては今後の検討課題であり、さらなる研究が必要となる。

<引用文献>

(1) Kim KS, Hong SW, Han D, Yi J, Jung J, Yang BG, et al. Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. *Science*. 2016;351(6275):858-63.

(2) Hara S, Sasaki T, Satoh-Takayama N, Kanaya T, Kato T, Takikawa Y, et al. Dietary Antigens Induce Germinal Center Responses in Peyer's Patches and Antigen-Specific IgA Production. *Front Immunol*. 2019;10:2432.

(3) Fu T, Coulter S, Yoshihara E, Oh TG, Fang S, Cayabyab F, et al. FXR Regulates Intestinal Cancer Stem Cell Proliferation. *Cell*. 2019;176(5):1098-112 e18.

(4) Kanaya T, Hase K, Takahashi D, Fukuda S, Hoshino K, Sasaki I, et al. The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nat Immunol*. 2012;13(8):729-36.

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------