

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300325

研究課題名(和文)炎症性微小環境の誘導機序および腫瘍免疫制御機序の研究

研究課題名(英文)The role of inflammatory responses and tumor immunity in tumor development

研究代表者

大島 正伸 (OSHIMA, Masanobu)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：40324610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題ではマウスモデルを用いて胃がん組織の炎症性微小環境と腫瘍免疫の関連について解析した。ヒト胃がんを外挿するマウス胃腫瘍組織の微小環境では、M2型マクロファージやCD4陽性T細胞が浸潤し、免疫抑制作用のあるTGF- β シグナルが活性化し、Treg細胞の浸潤が認められたことから、炎症による発がん促進と同時に腫瘍免疫が抑制されている可能性が示された。一方で、Treg枯渇等により免疫抑制機構を阻害すると、自己免疫性胃炎を発症して炎症依存的に腫瘍形成が促進されることが明らかとなった。したがって、炎症と腫瘍免疫のバランス制御は、発がんの促進と抑制に重要に関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：It has been shown that inflammatory responses promote tumorigenesis. On the other hand, tumor immunity suppresses cancer development. In this project, we have examined characteristics of inflammatory microenvironment that was generated in gastric tumors of genetically engineered mouse model. Notably, infiltrated macrophages are polarized to M2 type, and CD4-positive T cells are infiltrated, which promotes tumorigenesis. Moreover, TGF- β signaling is enhanced and regulatory T cells are also infiltrated, suggesting that tumor immunity is suppressed in the inflammatory microenvironment. Importantly, depletion of Treg cells in tumor mouse model induced autoimmune gastritis by inhibition of immune suppression system, and such inflammatory responses further accelerated gastric tumorigenesis. Accordingly, these results suggest that regulation of the balance between inflammation and tumor immunity is important for direction of tumor promotion or suppression.

研究分野：分子病理学

キーワード：胃がん 炎症 微小環境 腫瘍免疫 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

(1) がんを促進する炎症反応

抗炎症薬の長期服用者では、発がんリスクが有意に低いことが疫学的に示され、さらにがんの20%は感染症が関与することも報告され、感染に起因する慢性炎症反応は発がんを促進すると考えられていた。炎症反応により、骨髄から浸潤したマクロファージなどの免疫細胞が炎症性微小環境を形成し、さまざまな増殖因子や生存因子などを産生し、発がんを促進すると考えられていた。

(2) がんを抑制する免疫反応

Rag2^{-/-}などの免疫不全マウスの皮膚に化学発がん物質を塗布して発生させた腫瘍組織を、同系統の野生型マウスに移植すると、生着するものと免疫的に排除されるものが存在することが示された。すなわち、腫瘍細胞は発がんの初期過程であっても免疫的に排除されている可能性があり、免疫監視機構と呼ばれている。しかし、大腸がんや胃がんなどの消化管腫瘍が免疫的に排除され得るのかは明らかにされていなかった。

(3) 炎症依存的な胃がん発生モデル

胃がん発生にはヘリコバクター・ピロリ菌感染が重要に関わっており、感染による慢性胃炎が発がんに関与すると考えられていた。我々は、*Wnt1*、*COX-2*、*mPGES-1*の3つの遺伝子発現誘導により、*Wnt*シグナル活性化と*COX-2*/*PGE₂*依存的炎症反応の相互作用により胃がんを発生するマウスモデル(*Gan*マウス)の作製に成功した。

2. 研究の目的

上記の背景を基盤とし、炎症反応と免疫反応がそれぞれ胃がん発生過程においてどのような役割を果たしているのか、*Gan*マウスを用いた研究で明らかにする事を目的として本課題を実施した。とくに、次の項目について着目して研究を実施した。

(1) 胃がん組織に浸潤する免疫細胞特定

*Gan*マウスの胃粘膜には、ヒトのがんと同様に、*COX-2*/*PGE₂*経路依存的に炎症反応が誘導され、発がん促進に作用すると考えられる微小環境を形成している。腫瘍間質に浸潤する骨髄由来細胞を特定し、どのような炎症反応および免疫反応が誘導されているか明らかにする。

(2) TGF-βシグナル遮断による影響の解析

TGF-βは免疫抑制性のサイトカインとして、腫瘍免疫の制御の役割を果たしていることが報告されている。胃がん発生におけるTGF-βの役割を、*Gan*マウスと遺伝子欠損マウスとの交配実験等により明らかにする。

(3) 免疫抑制の解除による影響の解析

FoxP3発現陽性の制御性T細胞(Treg)は免疫抑制に作用する。そこで、生後3日での胸腺摘出により*Gan*マウスのTregを枯渇させて、免疫抑制した際の腫瘍発生への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

免疫染色 *Gan*マウス腫瘍組織に対して、F4/80、CD206、FoxP3、CD3ε、CD4等の免疫細胞マーカーに対する抗体を用いた免疫染色を行ない、浸潤細胞を特定した。

交配実験 TGF-β II 受容体遺伝子(*Tgfb2*)のコンディショナルノックアウトマウス、*Tgfb2*^{flax/flax}と、タモキシフェン(Tmx)投与により全身の細胞でCreを発現する、*Rosa26-CreER*マウスを*Gan*マウスと交配し、TGF-βシグナル遮断実験を行った。また、*Pdcd1*遺伝子欠損マウスを*Gan*マウスと交配して、免疫抑制の解除を試みた。

胸腺摘出実験 Tregを枯渇させる目的で、*Gan*マウスと交配した野生型マウスの産仔の胸腺摘出手術を生後3日目に実施し、30週齢前後で病理解剖した。

4. 研究成果

(1) 胃がん組織に浸潤する細胞の特定

*Gan*マウス胃がん組織を用いた免疫染色を行った結果、腫瘍組織間質には顕著なF4/80陽性のマクロファージ浸潤を認めた。マクロファージは、Th1およびTh2シグナルにより、それぞれM1型、M2型に分化すると考えられているが、浸潤するマクロファージの多くはM2マーカーのCD206に陽性であった。また、CD3εで染色されるT細胞が腫瘍間質に認められたため、CD4およびCD8抗体を用いて染色した結果、ほとんどがCD4陽性T細胞で、CD8陽性細胞は認められなかった(図1)。

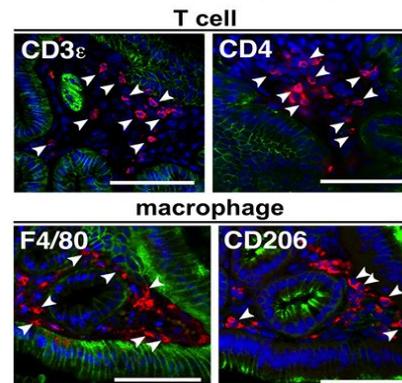


図1. *Gan*マウス胃がん組織間質に浸潤するCD3ε陽性T細胞はCD4陽性細胞(上:矢頭)。またF4/80陽性マクロファージはCD206陽性のM2型である(下:矢頭)。

さらに、CD4陽性のT細胞には、FoxP3陽性のTreg細胞も含まれていた(図2)。



図2. FoxP3抗体を用いた免疫染色。胃がん間質にFoxP3陽性T細胞が浸潤している(微分干渉撮影)。

*Gan*マウスの胃粘膜では、ヒト胃がんと同様に、*COX-2*/*PGE₂*経路に依存して炎症反応が誘導されている。したがって、以上

の結果は、COX-2/PGE₂ 経路が活性化しているヒト胃癌組織では、Th2 反応優位の免疫反応が誘導されており、浸潤するマクロファージは組織のリモデリングに作用する M2 型に分化していると考えられた。Treg の詳細な分類が必要だが、*Gan* マウス胃癌組織では、腫瘍免疫反応が抑制されている可能性も考えられた。

(2) TGF-βシグナル遮断による影響

以前実施した、網羅的遺伝子発現解析の結果、野生型マウスの胃粘膜に比較して、*Gan* マウス胃癌組織では TGF-β 遺伝子発現が約 3 倍に上昇し、TGF-β II 型受容体遺伝子発現は約 2 倍以上に上昇しており、免疫抑制性サイトカインである TGF-βシグナルが活性化していると考えられた (www.ganmouse.net)。

Tgfb2^{-/-} マウスは胎性致死のため、Tmx 投与によりコンディショナルに全身の細胞で遺伝子欠損できるように、*Rosa26-CreER* マウスを用いて *Gan* マウスとの交配実験を行った。しかし、*Rosa26-CreER Gan Tgfb2^{flx/flx}* マウスに Tmx 投与すると、約 8 週間前後で衰弱して死亡する個体が多く、報告によると造血系細胞での TGF-βシグナル欠損が原因と考えられた。衰弱した Tmx 投与 *Gan* マウスを病理解剖した結果、腫瘍細胞が粘膜下に浸潤する個体が認められた。

腫瘍組織を構成する、腫瘍細胞と骨髄由来細胞のどちら側での TGF-βシグナル抑制が腫瘍悪性化に作用したかを確認するため、*Rosa26-CreER Gan Tgfb2^{flx/flx}* マウスに野生型マウスから骨髄移植を行った上で Tmx 投与した。このマウスでは造血系細胞で TGF-βシグナルが保存されているので、死亡する個体数は減少する。興味深いことに、骨髄由来細胞以外の細胞で TGF-βシグナルが抑制されても、*Gan* マウスの胃腫瘍細胞が粘膜下に浸潤することが明らかとなった。TGF-βシグナルは、腫瘍免疫の抑制により発がんを促進している可能性が考えられているが、以上の結果は、TGF-βは上皮細胞において悪性化に対して抑制的に作用している可能性を示している。

Gan マウスにおける腫瘍発生過程は 30 週間以上にわたる長期間を有するため、免疫系の細胞で TGF-βシグナルを遮断する実験の実施は困難である。骨髄細胞における TGF-βの役割を解明するため、短期間でがんを発生する複合遺伝子変異による腫瘍モデル開発の必要性が考えられた。

(3) 免疫抑制の解除による影響

Gan マウス胃腫瘍組織では TGF-βシグナルが亢進し、FoxP3 陽性 T 細胞が浸潤していることから免疫が抑制的に制御されていると考えられた。そこで、新生仔 *Gan* マウスの胸腺摘出を行い、Treg 枯渇実験を行った結果、予想とは逆に胃腫瘍は大きくなり腫瘍症状が強くなった。同時に胃粘膜には激しい炎症

反応が認められた。マウスでは胃粘膜上皮壁細胞に対する自己抗体を産生し、自己免疫性胃炎が誘導されることがある。したがって Treg 枯渇により、自己免疫性胃炎が誘導され、炎症による発がん促進作用により腫瘍形成が亢進したと考えられた。

最後に、*Pdcd1* 遺伝子欠損マウスと *Gan* マウスの交配実験を実施した。*Pdcd1* がコードする分子 PD1 は腫瘍免疫の抑制に作用することが知られており、近年の報告では、PD1 あるいはリガンドの PD-L1 の阻害が発がん治療に効果的であることが報告されている。これまでに解析した結果では、*Pdcd1* 欠損により炎症反応が激しくなり、腫瘍病変が大きくなる傾向を認めている。胃炎症状を発生している *Pdcd1*^{-/-} マウスの血清を用いて免疫染色を実施すると、壁細胞に対する自己抗体を産生していることを確認しており (図 3)、胸腺摘出実験と同様に、自己免疫性胃炎が発がんを促進する炎症反応となって腫瘍形成を亢進した可能性が考えられた。

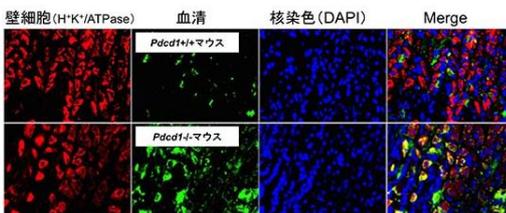


図3. *Pdcd1*^{-/-} マウスの血清を用いた免疫染色により、壁細胞に対する自己抗体産生が確認される(下)。野生型マウスでは自己抗体は認められない(上)。

当初の目的と異なる研究結果となったが、本研究成果では、免疫抑制の解除によって自己免疫性胃炎を発症してしまうと、胃癌発生が促進される可能性が示された。腫瘍免疫による治療方針を考える上でも考慮すべき重要な知見と考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. [Oshima H](#), Nakayama M, Han TS, Naoi K, Ju X, Maeda Y, Robine S, Tsuchiya K, Sato T, Taketo MM, and [Oshima M](#). Suppressing TGF-β signaling in regenerating epithelia in an inflammatory microenvironment is sufficient to cause invasive intestinal cancer. *Cancer Res*, 75: 754-765, 2015. (DOI: 1158/0008-5472.CAN-14-1301.) [査読あり]
2. Han TS, Hur K, Xu, G, Choi B, Okugawa Y, Toiyama Y, [Oshima H](#), [Oshima M](#), Lee HJ, Kim VN, Chang AN, Goel A, Yang HK. MicroRNA-29c mediates initiation of gastric carcinogenesis by directly targeting ITGB1. *Gut*, 64: 203-214, 2015. (DOI: 10.1136/gutjnl-2013-306640.) [査読あり]
3. Ju X, [Ishikawa T](#), Naka K, Ito K, Ito Y, and [Oshima M](#). Context-dependent activation of Wnt signaling by tumor suppressor RUNX3 in gastric cancer cells. *Cancer Sci*. 105:

- 418-424, 2014. (DOI: 10.1111/cas.12356.) [査読あり]
4. Oshima H, Ishikawa T, Yoshida GJ, Naoi K, Maeda Y, Naka K, Ju X, Yamada Y, Minamoto T, Mukaida N, Saya H, and Oshima M. TNF- α /TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of Nox1 and Gna14 in tumor cells. *Oncogene*, 33: 3820-3829, 2014. (DOI: 10.1038/onc.2013.356) [査読あり]
 5. Oshima H, and Oshima M. The role of PGE₂-associated inflammatory responses in gastric cancer development. *Semin Immunopathol*, 35: 139-150, 2013. (DOI: 10.1007/s00281-012-0353-5.) [査読あり]
 6. Oshima H, and Oshima M. The inflammatory network in the gastrointestinal tumor microenvironment: lessons from mouse models. *J Gastroenterol*, 47: 97-106, 2012. (DOI: 10.1007/s00535-011-0523-6.) [査読あり]
 7. Kong D, Piao YS, Yamashita S, Oshima H, Oguma K, Fushida S, Fujimura T, Minamoto T, Seno H, Yamada Y, Satou K, Ushijima T, Ishikawa T, and Oshima M. Inflammation-induced repression of tumor suppressor miR-7 in gastric tumor cells. *Oncogene*, 31: 3949-3960, 2012. (DOI: 10.1038/onc.2011.558.) [査読あり]
 8. Tye H, Kennedy CL, Najdovska M, McLeod L, McCormach W, Hughes N, Dev A, Sievert W, Ooi CH, Ishikawa TO, Oshima H, Bhathal PS, Parker A, Oshima M, Tan P, and Jenkins B. STAT3-driven upregulation of TLR2 promotes gastric tumorigenesis independent of tumor inflammation. *Cancer Cell*, 22: 466-478, 2012. (DOI: 10.1016/j.ccr.2012.08.010.) [査読あり]
- [学会発表] (計 23 件)
1. Oshima M. Malignant invasion by inflammation and TGF- β signaling suppression. 第 5 回発がんスパイラル国際シンポジウム、2015 年 2 月 26 日、「神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)」
 2. Oshima M. Chronic inflammation in promotion of gastrointestinal cancer development. 第 43 回日本免疫学会学術総会、2014 年 12 月 10 日、「国際会議場(京都府・京都市)」
 3. Oshima M. Inflammatory responses in gastrointestinal tumor development and malignant progression. 第 4 回日仏がんワークショップ、2014 年 10 月 20 日、「関西セミナーハウス(京都府・京都市)」
 4. Oshima M. Chronic inflammation in gastrointestinal cancer development and malignant progression. 第 14 回日独がんワークショップ、2014 年 10 月 15 日「ベルリン(ドイツ)」
 5. Oshima M. Chronic inflammation and tumorigenesis in gastrointestinal tract. 第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25 日、「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」
 6. Oshima M. Chronic inflammation in gastric tumor development and invasion. 7th Annual Meeting of Singapore Gastric Cancer Consortium、2014 年 7 月 24 日、「シンガポール」
 7. 大島正伸. 慢性炎症反応による消化器がん発生と悪性の誘導. 第 23 回日本がん転移学会学術総会、2014 年 7 月 10 日、「金沢市文化ホール(石川県・金沢市)」
 8. Oshima M. Prostaglandin E2 pathway in inflammation-associated cancer development. 11th Congress of the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids、2014 年 7 月 1 日、「ストックホルム(スウェーデン)」
 9. Oshima M. COX-2/PGE₂ pathway-associated inflammation in gastric tumorigenesis. 105th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (AACR). 2014 年 4 月 8 日、「サンディエゴ(米国)」
 10. Oshima M. Chronic inflammatory responses in gastric tumor development and progression. 第 4 回発がんスパイラル国際シンポジウム、2014 年 2 月 11 日、「京王プラザホテル(北海道・札幌市)」
 11. Oshima M, Oshima H. The role of COX-2/PGE₂-induced inflammation in gastric cancer development. 4th JCA- AACR Special Joint Conference: The Latest Advances in Gastric Cancer Research. 2013 年 12 月 17 日、「東京ベイ舞浜ホテル(千葉県・浦安市)」
 12. Oshima M. Inflammatory responses in gastrointestinal cancer development and malignant progression. AACR International Conference on Frontiers in Cancer Prevention Research. 2013 年 10 月 27 日、「ワシントン DC (米国)」
 13. Oshima M. The role of inflammation in gastrointestinal tumor development and malignant progression. 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 5 日、「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」
 14. Oshima H, Nakayama M, Taketo M, Oshima M. The role of inflammation in development of invasive intestinal adenocarcinoma. 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 5 日、「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」
 15. Oshima M. Inflammation-associated malignant progression in model of gastrointestinal tumors. 6th Annual Scientific Meeting of Singapore Gastric Cancer Consortium. 2013 年 7 月 25 日、「シンガポール」
 16. Oshima M. The role of inflammatory responses in promotion of gastric tumorigenesis; 99th General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology. 2nd JSGE International Topic Conference. 2013 年 3 月 23 日、「城山観光ホテル(鹿児島県・

鹿児島市)」

17. Oshima M. PGE₂-associated inflammation and bacterial infection in gastric tumorigenesis. 第3回発がんスパイラル国際シンポジウム、2013年1月24日、「東急ホテル(石川県・金沢市)」
18. Oshima M. Inflammatory responses that accelerate gastric tumorigenesis. 2012 Annual Meeting of Korean Society of Molecular and Cellular Biology. 2012年10月10日、「ソウル(韓国)」
19. Oshima M. The role of inflammatory responses in gastric cancer development. 第71回日本癌学会学術総会(JCA-Mauvernay Award lecture)、2012年9月20日、「ロイトン札幌(北海道・札幌市)」
20. Oshima M. Infection and inflammatory responses in mouse gastric tumorigenesis. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月20日、「さっぽろ芸文館(北海道・札幌市)」
21. Oshima M. Recent progress in tumor microenvironment. 第16回日本がん免疫学会総会、2012年7月26日、「北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市)」
22. Oshima M. SPEM and early changes in gastric cancer. 5th Annual Scientific Meeting of Singapore Gastric Cancer Consortium. 2012年7月12日、「シンガポール」
23. Oshima M. Gastric cancer model by Wnt activation and inflammation. The 10th Stem Cell Research Symposium、2012年6月1日、「淡路夢舞台(兵庫県・淡路市)」

〔図書〕(計9件)

1. Oshima H., Oshima M. PGE₂-associated inflammation and gastrointestinal tumorigenesis. In Inflammation and Immunity in Cancer, Eds by Seya T, Matsumoto M, Ueda K, and Sato N. Springer, pp13-23, 2015 (DOI: 10.1007/978-4-431-55327-4.)
2. 大島正伸. 特集「がん・免疫・代謝・発生における M1/M2 分類を超えたマクロファージの機能」監修 細胞工学(秀潤社) Vol.33, No.12, 2014. (43頁)
3. 大島正伸. がんの新規治療を目指した基礎研究「免疫・炎症とがん」日本臨床(日本臨床社) Vol.72, No.2, pp73-77, 2014.
4. 大島正伸. 「炎症反応によるがんの発生と悪性化促進」実験医学(羊土社) Vol. 31, pp1910-1915, 2013.
5. 大島正伸. 「炎症とマクロファージによるがんの発生・進展機構」医学のあゆみ(医歯薬出版) Vol. 244, pp733-738, 2013.
6. 大島正伸. 「発がんにおける腫瘍随伴マクロファージの役割」細胞工学(秀潤社) Vol. 31, pp1237-1241, 2012.
7. 大島正伸. がんモデルマウス・ラットライブラリ第1回「胃がんモデル」細胞工学(秀潤社) Vol. 31, pp942-946, 2012.
8. 大島正伸. 腫瘍性疾患1)「胃がん発生の分

- 子機序解明と創薬研究を目的としたマウスモデルの開発」遺伝子医学 MOOK(メディカルドゥ) Vol. 22, pp236-241, 2012.
9. 大島正伸. 消化管(胃・腸管)「疾患モデルマウス表現型解析指南(中山書店), pp175-180, 2012.

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称: がんの予防用または治療用物質のスクリーニング方法
発明者: 大島浩子、石川智夫、大島正伸
番号: 特願 2013-30503
出願年月日: 2013年2月20日
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ:
<http://genetics.w3.kanazawa-u.ac.jp>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
大島 正伸 (OSHIMA Masanobu)
金沢大学・がん進展制御研究所・教授
研究者番号: 40324610
- (2) 連携研究者
大島 浩子 (OSHIMA Hiroko)
金沢大学・がん進展制御研究所・助教
研究者番号: 80362515

石川 智夫 (ISHIKAWA Tomoo)
金沢大学・がん進展制御研究所・助教
研究者番号: 70322162
[平成24~25年度]

中山 瑞穂 (NAKAYAMA Mizuho)
金沢大学・がん進展制御研究所・助教
研究者番号: 20398225
[平成26年度]