

令和 2 年 9 月 13 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10682

研究課題名(和文) LPSトレランスにおける抗腫瘍活性と臨床応用に向けての新技术の開発

研究課題名(英文) Anti-tumor activity in LPS tolerance and development of new technology on clinical application of tolerance

研究代表者

守屋 智之(MORIYA, TOMOYUKI)

埼玉医科大学・医学部・客員准教授

研究者番号：10531303

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)：LPSトレランスが抗腫瘍活性に影響を与えるかを検討した。BALB/cマウスを用いて、LPSを3日間連続で腹腔内投与し、LPSトレランスを誘導した。LPSトレランスを誘導したマウスでは大腸癌株 Colon 26の門脈注射による大腸癌肝転移モデルにおいて、肝での腫瘍増殖が抑制され、コントロールに比較して生存期間が有意に延長していた。LPSトレランスマウスの肝ではNK細胞及びNKT細胞の数が増加しており、これらの細胞でPerforinやGranzyme Bの発現が増強していた。Perforin / Granzyme B系の活性化により、抗腫瘍活性が上昇、生存期間を延長させていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

極微量のlipopolysaccharide (LPS)であらかじめ刺激することで生じるLPSトレランスの抗腫瘍活性に関しては、これまで報告がなく、その効果は不明なままであった。本研究で、LPSトレランスに抗腫瘍活性があり、その機序の一部が解明されたことは外科臨床・免疫分野において極めて有用な知見と考えられる。本研究の結果、LPSトレランスが消化器外科領域で新しいがん治療の一つの選択肢となる可能性が示され、治療成績のさらなる向上、予後の改善に希望がもたらされた。社会的意義のある研究成果と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effect of LPS preconditioning on antitumor activity against Colon26 tumor cells in mice. Mice were induced LPS preconditioning by intraperitoneal injections of 5 µg/kg LPS for three consecutive days, and they received intraportal inoculation of Colon26 cells. LPS preconditioning prevented liver metastasis and prolonged mouse survivals after intraportal inoculation of Colon26 cells. LPS preconditioning increased perforin and granzyme B expression in the liver natural killer (NK) and NKT cells and augmented their antitumor cytotoxicities against Colon26 cells. LPS preconditioning potently augmented antitumor cytotoxicity of liver NK cells and NKT cells, thereby improving mouse survival after intraportal inoculation of Colon26 tumor cells.

研究分野：消化器外科学

キーワード：抗腫瘍活性 免疫学 周術期管理

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

極微量の lipopolysaccharide (LPS) で予め刺激しておくことで大量の LPS 刺激に対する不応性が生じる現象を LPS トレランスという。LPS トレランスでは炎症反応は抑制されるものの殺菌活性が増強することがわかっているが、抗腫瘍効果についてはこれまで研究されていなかった。予備検討で LPS トレランスにより癌の転移抑制効果の可能性が示された。術前に LPS トレランスを誘導することで、術後の炎症反応を抑制、手術侵襲に伴う新たな転移形成の抑制が期待された。本研究は、LPS トレランスによる抗腫瘍効果を明らかにすることを目的に計画された。肝臓の単核球の抗腫瘍活性を調べ、生体での癌の転移増殖を継続的に観察できる装置を用いて抗腫瘍効果を解明する。LPS トレランスによる抗腫瘍活性の機序が明らかとなり、実臨床への応用がなされれば、がん治療のさらなる成績向上、予後改善が期待される。

2. 研究の目的

LPS トレランスにおける抗腫瘍活性を検証する。

3. 研究の方法

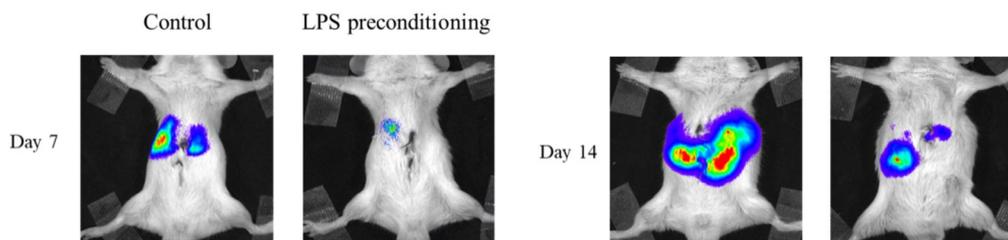
8 週齢の BALB/c マウスに LPS 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 3 日間連続で腹腔内投与して LPS トレランスを誘導した。その 1 日後にマウスを開腹して、大腸癌株 colon 26 を経門脈的に投与して大腸癌肝転移モデルを作製した。大腸癌株 colon26 転移性肝癌モデルとし、Colon 26 に Nano-lantern という高輝度発光蛋白質を安定発現させ、IVIS imaging system を用いて経時的に腫瘍の増大を観察した。また転移作成後の生存時間を検討した。LPS トレランスを誘導したマウスの肝臓及び脾臓の単核球を採取して、フローサイトメトリーで免疫担当細胞の分画をみるとともに Perforin/Granzyme の発現を検討した。

マウスの肝臓単核球を分離して colon26 と共培養し、細胞傷害活性を測定した。

4. 研究成果

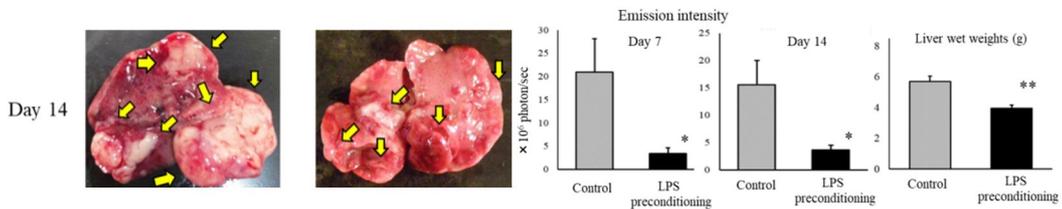
【結果と考察】

LPS トレランス群では肝転移が抑制されていた。Colon26 cells を 門脈投与し、7 日、14 日後の Nano ランタンを用いた Colon26 cells による発光を確認したところ、発光量が明らかに減少していた。発光量減少は肝転移が縮小、抑制されていたことを示している。(下図)

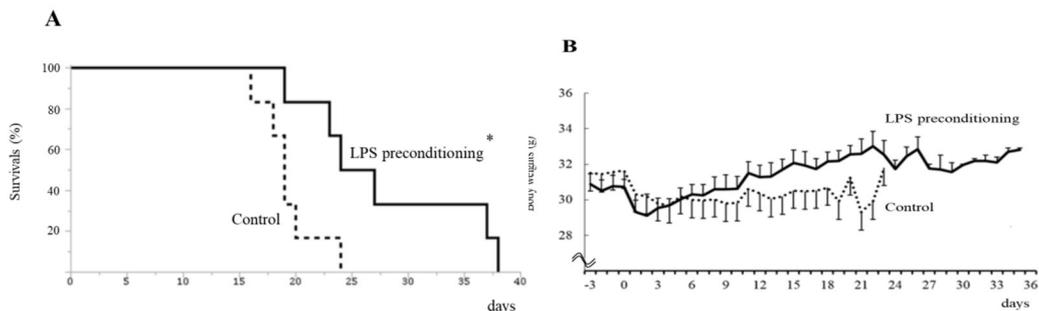


Colon26 cells 投与 14 日後の肝転移の程度をマクロで確認したところ、トレランス群ではコントロール群と比べて転移抑制が確かめられた。(次頁 矢印)

肺、腹膜など、多臓器への転移は認められなかった。IVIS system を用い、転移の程度を数値化すると、トレランス群では投与 7 日目、14 日後で減少していた。さらにトレランス群では肝臓の重量がコントロール群と比べて、軽減されていた。肝転移が抑制されたことをしめしている。(次頁右図)

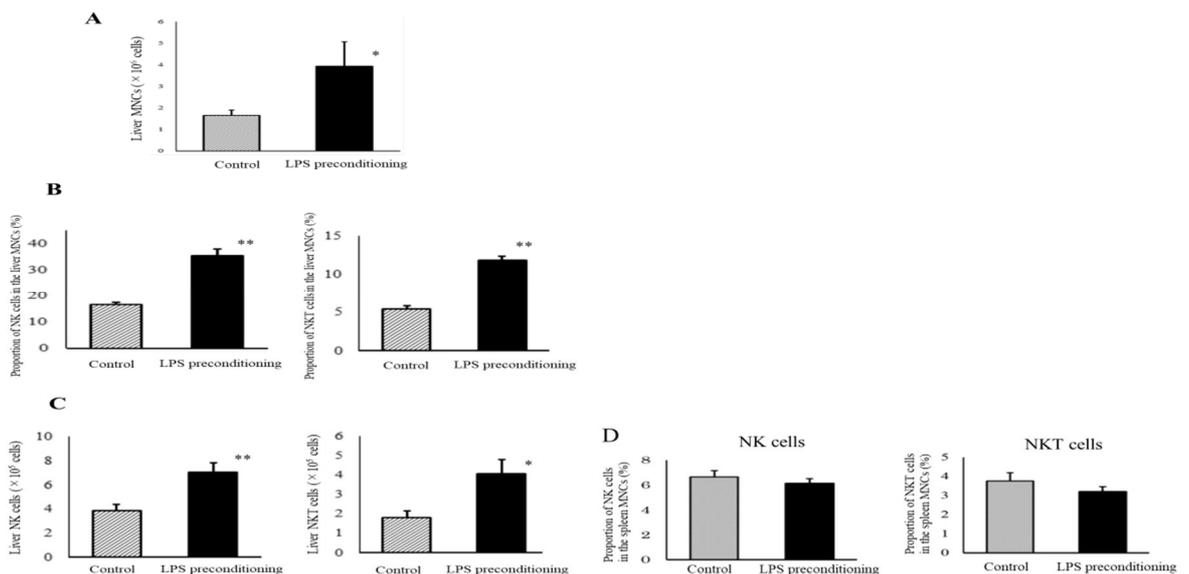


トランス群では、生存期間の延長がみられた。平均生存時間はコントロール群では19日であったが、トランス群では26日であった。肝転移の抑制が体重減少を予防、生存期間の延長をもたらしたと考えられる。(下図 A) また、トランス群では体重増加がみられたが、コントロール群ではそのような増加は見られなかった。(下図 B)

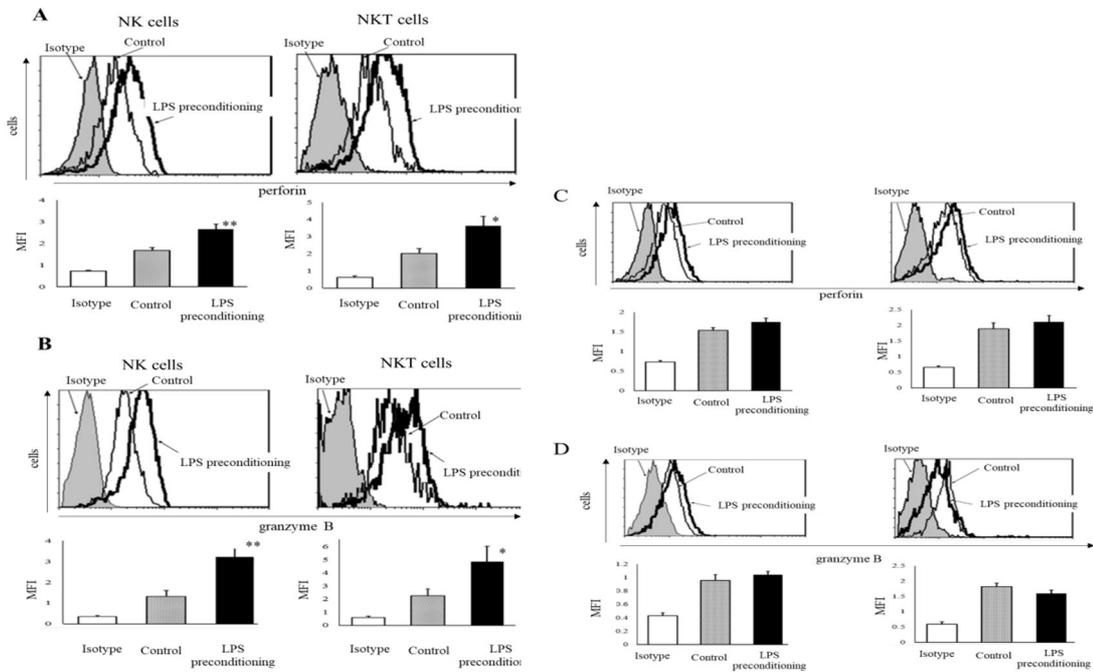


細胞障害活性を有する肝臓内のNK(Natural killer) 細胞及びNKT 細胞について検討を行った。トランスマウスの肝臓では免疫を担当する肝単核球数が増加していた。(下図 A)

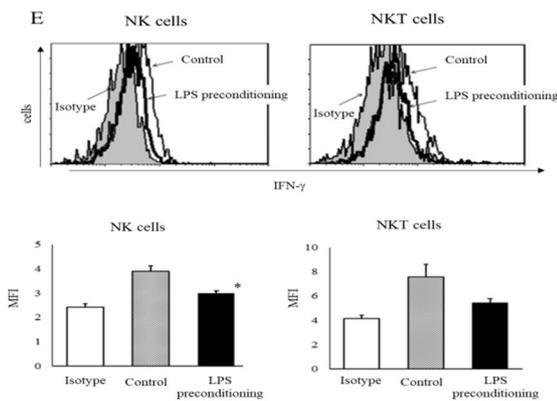
中でもNK 細胞及びNKT 細胞の割合が増加、結果として細胞数の増加をもたらしていた。(下図 B・C) 対照的に、脾臓中のNK 細胞及びNKT 細胞の割合は両群とも同程度であった。(下図 D)また、肝臓・脾臓いずれもCD8⁺ T cells の割合に影響を与えていなかった。



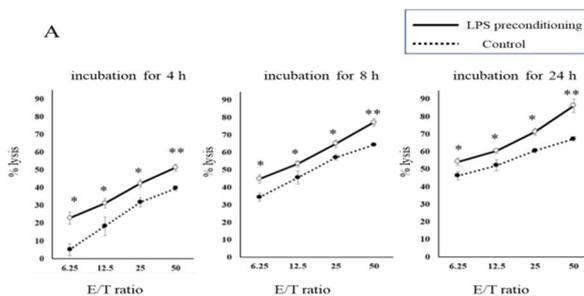
NK 細胞及びNKT 細胞の抗腫瘍効果を検討したところ、トランス群ではPMAで刺激した際のNK・NKT細胞のPerforin、Granzyme Bの発現が亢進していた。(次頁図 A, B). 一方で、脾臓では肝臓で見られたNK・NKT細胞のPerforin、Granzyme Bの発現亢進が観察されなかった。(次頁図 C, D)



トランス群で、NK 細胞、NKT 細胞が有する IFN- γ 産生能を測定した。Perforin、Granzyme B とは異なり、PMA や ionomycin による刺激を行っても、肝臓内の NK 細胞では IFN- γ の細胞内発現が有意に減少しており、NKT でも同様の傾向を示すことが明らかとなった。脾臓中の NK・NKT 細胞にはこのような変化見られなかった。(下図 E)

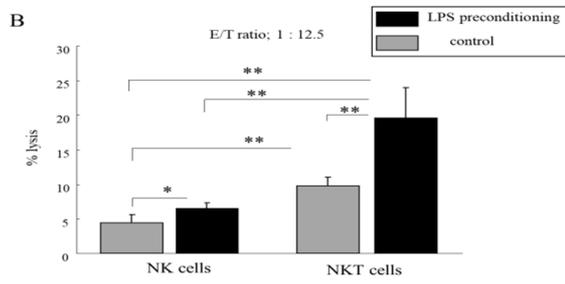


TerraScan assay を用いて、肝単核球の Colon26 への抗腫瘍細胞障害活性を測定した。その結果、トランス群では肝単核球の細胞障害活性は Incubation 後 4 時間で有意に増強しており、その後、24 時間にわたり持続することが明らかとなった。(下図 A)

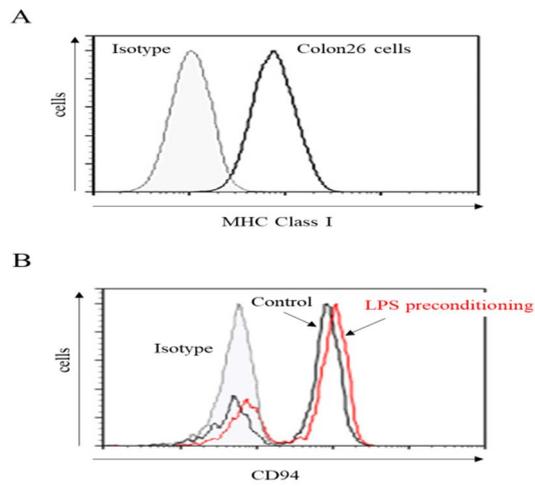


次に、NK 細胞と NKT 細胞をセルソートし、各々の Colon26 への抗腫瘍細胞障害活性をみた。NKT 細胞はトランス群でコントロール群に比べ有意に高い細胞障害活性があった。一方、Colon26 は MHC I 陽性のため、NK 細胞は細胞障害活性を示さない

が、トレランス群では障害活性が認められた。(下図 B)



NK 細胞の CD94 (MHC I ligand)発現はトレランス群で変化していなかった。(下図.B)



【結論】

LPS トレランスは肝臓のNK, NKT 細胞の抗腫瘍活性を増強させ、その結果、Colon26 による大腸癌肝転移の予後を改善する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Moriya T, Fukatsu K, Noguchi M, Nishikawa M, Miyazaki H, Saitoh D, Ueno H, Yamamoto J.	4. 巻 222
2. 論文標題 Effects of semielemental diet containing whey peptides on Peyer's patch lymphocyte number, immunoglobulin A levels, and intestinal morphology in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Surg Res.	6. 最初と最後の頁 153-159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jss.2017.10.015.	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 Kinoshita M, Nakashima M, Nakashima H, Seki S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Immune mechanisms underlying susceptibility to endotoxin shock in aged hosts: implication in age-augmented generalized Shwartzman reaction. (review)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 E3260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20133260	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 Kinoshita M, Nakashima H, Nakashima M, Koga M, Toda H, Koiwi K, Morimoto Y, Miyazaki H, Saitoh D, Suzuki H, Seki S	4. 巻 9
2. 論文標題 The reduced bactericidal activity of neutrophils as an incisive indicator of water-immersion restraint stress and impaired exercise performance in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 4662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1038/s41598-019-41077-5	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 Kinoshita M, Miyazaki H, Nakashima H, Nakashima M, Nishikawa M, Ishikiriyama T, Kato S, Iwaya K, Hiroi S, Shinomiya N, Seki S.	4. 巻 9
2. 論文標題 In vivo LPS tolerance recruits CD11b+ macrophages to the liver with enhanced bactericidal activity and low TNF-releasing capability, resulting in drastic resistance to lethal septicemia.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Innate Immun.	6. 最初と最後の頁 493-501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000475931	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Moriya T
2. 発表標題 Endotoxin tolerance reinforces anti-tumor activity of hepatic immune cells in mice
3. 学会等名 2019 ASPEN Nutrition Science & Practice Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Tomoyuki Moriya
2. 発表標題 Effects of semi-elemental diet containing whey peptides on peyer patch lymphocyte number, immunoglobulin A levels and intestinal morphology in mice
3. 学会等名 2018 ASPEN Nutrition Science & Practice Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018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	山本 順司 (YAMOMOTO Junji) (40342654)	東京大学・医学部附属病院・登録研究員 (12601)	
研究分担者	木下 学 (KINOSHITA Manabu) (70531391)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・免疫・微生物学・准教授 (82406)	
研究分担者	守本 祐司 (MORIMOTO Yuji) (10449069)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・生理学・教授 (82406)	

6. 研究組織（つづき）

	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	青笹 季文 (AOSASA Suefumi) (40649034)	防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・外科学・准教授 (82406)	辞退
研究分担者	野呂 拓史 (NORO Takuji) (10385346)	獨協医科大学・医学部・講師 (32203)	