

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17964

研究課題名(和文)自己免疫疾患モデルを用いた新規腫瘍発生制御免疫システムの解明

研究課題名(英文)Clarification of tumor immune system in chemical carcinogenic autoimmune model mice

研究代表者

近藤 智之(Kondo, Tomoyuki)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：10782873

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)：自己免疫疾患が腫瘍発生に関与す免疫動態を明らかにするために、自己免疫疾患モデルマウスを用い、化学発がん実験を行なった。その結果コントロールマウスと自己免疫疾患モデルマウスのいずれも大腸に腺癌の発生を認めたが、自己免疫疾患モデルマウスにのみ粘膜筋板を超え粘膜固有層に浸潤する癌細胞巣を認める明らかな浸潤癌を組織学的に確認し、腫瘍発生数も増加傾向が確認出来た。また末梢血の解析を行なった結果、自己免疫疾患モデルマウスの免疫細胞では免疫チェックポイント分子の発現が有意に増加した。これらより自己免疫疾患では腫瘍免疫は抑制された状態にあり腫瘍発生が促進される可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在腫瘍に対する免疫システムは現在大きく着目され、いわゆる免疫療法が脚光を浴び一部は臨床応用されている。しかしながらある一定の治療効果は認められているものの、根治的な治療法としては課題が多くさらなるブレイクスルーが世界的に求められている。本研究は腫瘍免疫を自己免疫と絡めた独特の視点から解析したもので、本研究で得られた結果は腫瘍免疫に対する新たな知見である。今後さらに本研究内容を発展させれば腫瘍免疫療法のブレイクスルーに繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We analyzed Azoxymethane-induced colorectal cancer model in autoimmune B6/lpr mice to clarify the basic tumor immune response in autoimmune disease.

As a result, both autoimmune model mice and control mice showed colorectal adenocarcinomas, but only autoimmune model mice showed cancer nests involved in the submucosal layer beyond the muscularis mucosa. Furthermore, the immune cell populations in peripheral blood samples were analyzed by flow cytometry. The proportions of PD-1+ T cells and CTLA4+ B cells in autoimmune model mice were significantly higher compared with that in control mice. These results suggest that tumor immunity was suppressed in autoimmune model mice.

研究分野：口腔病理学

キーワード：腫瘍免疫 自己免疫 化学発がん

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の身体は細菌やウイルスなどの外来抗原を排除する感染免疫システムによって維持されている。さらに、何らかの原因で発生した腫瘍に対しても腫瘍免疫システムが作動することによって健康が維持されている。しかし、免疫システムに異常が生じると感染症や腫瘍、アレルギー疾患等によって健康が害されてしまう。また、本来の免疫システムでは自己の細胞や組織に対して排除しようとする反応は決して生じないが、免疫システムに何らかの障害が加わることにより、自己免疫疾患を発症してしまうことが知られている。アレルギー疾患においては特定の外来抗原に対して過剰な免疫反応が生じてしまう。このように、免疫システムの制御調節異常は腫瘍や自己免疫疾患等様々な疾患に結びつき、健康な生活を害してしまうこともある。

腫瘍に対する免疫システムは着目され、がんの治療法としてがんワクチンや樹状細胞療法などのいわゆる免疫療法が長年着目され、一部は臨床応用されている。さらには新時代の免疫療法として免疫チェックポイント阻害剤(抗PD-1抗体など)を用いた治療法が期待されており、実際にある一定の治療効果があるものの、根治的な治療法としては解決すべき課題も多いのが現状である。

さらに、自己免疫疾患と腫瘍との関連として、近年、代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)や関節リウマチ(RA)の患者では、疫学的に非ホジキンリンパ腫といった血液系腫瘍や肺癌や甲状腺癌、肝癌などの固形腫瘍の発生リスクが増加することが報告されている。しかしながら、その詳細なメカニズム及び自己免疫状態がもたらす腫瘍の発生・増殖への影響は不明な点がほとんどであることが現状である。

2. 研究の目的

申請者らは自己免疫疾患と腫瘍との関連について、これまでに自己免疫疾患モデル B6/*lpr* マウスにおいて、腫瘍組織中の腫瘍関連マクロファージ TAM (Tumor-associated macrophage) における抗腫瘍 M1 マクロファージ(炎症性サイトカインなどを介して炎症反応を惹起する)と腫瘍促進 M2 マクロファージ(抑制性サイトカインを介した炎症反応の抑制及び腫瘍血管新生によって腫瘍促進性に働く)のバランス異常及び腫瘍血管新生の増加により移植腫瘍の増殖が亢進することを見出した¹⁾。一方で、自己免疫疾患患者では腫瘍発生リスクが亢進するという報告はあるものの、自己免疫状態の腫瘍発生への関与は不明な点が多いのが現状である。そこで本研究では、自己免疫疾患モデルマウスに腫瘍を発生させ、そのモデルを分析することによって自己免疫状態が腫瘍発生に与える影響やそのメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

自己免疫疾患モデルとして B6/*lpr* マウスを、対照群として B6 マウスを用いた。B6/*lpr* マウスは Fas 遺伝子の突然変異により Fas によるアポトーシスが誘導されず、自己反応性免疫細胞がアポトーシスにより除去されないため、ヒト全身性エリテマトーデスに類似した自己免疫疾患を自然発症する自己免疫疾患モデルである。

化学発がん剤 Azoxymethane (10mg/kg) を発がん initiator として腹腔内に1回投与し、投与1週間後から大腸特異的炎症誘発剤である Dextran sulfate sodium (2%) を発がん promoter として7日間連続で自由飲水投与し、AOM 投与時を0週としてカウントした。生じた大腸腫瘍の組織学的解析、フローサイトメーターを用いた末梢血の各免疫細胞の構成比率および免疫チェックポイント分子 PD-1、PD-L1、CTLA-4 の陽性細胞比率及び免疫抑制細胞 Myeloid derived suppressor cell 比率を解析した。

4. 研究成果

B6/*lpr* マウスの方が、コントロール群に比べ腫瘍発生数が多い傾向にあった (Fig. 1)。組織学的には、両群で高度の細胞異型(大型核小体、核の大小不平等)が見られたが、B6/*lpr* マウスにのみ粘膜筋板を超え粘膜下層に至る浸潤胞巣を認めた (Fig. 2; B6, 3; B6/*lpr*)。いずれの群でも脱肛及び出血が認められ、腫瘍は直腸側に多く発生する傾向が認められた。また、2週(DSS投与終了時)には、B6 マウスの大腸に比較し B6/*lpr* マウスでは大腸粘膜のびらんや粘膜下

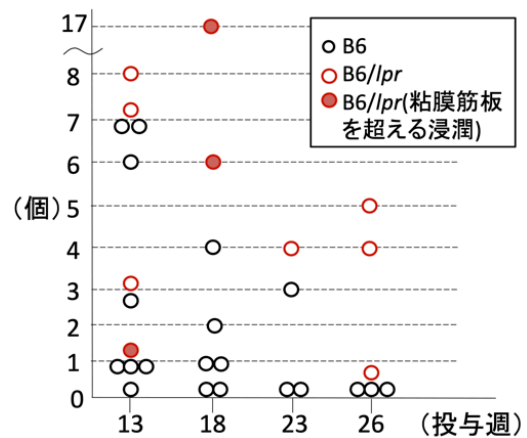


Fig. 1 発生腫瘍個数



Fig. 2 B6の腫瘍組織像

層の浮腫状変化及び炎症細胞浸潤が著明であった。

AOM 投与後 20 週での末梢血 flow cytometry 解析を行った。対照群に比べ B6/*lpr* マウスでは末梢血中の T 細胞 (CD3+CD19-) と B 細胞 (CD3-CD19+) の割合が有意に減少していた。また、T 細胞中の PD-1 陽性細胞及び PD-L1 陽性細胞の割合の有意な増加、T 細胞中の CTLA-4 陽性細胞と B 細胞中の CTLA-4 陽性細胞の割合の有意な増加を認めた (Fig. 4)。また、投与後 1 週において対照群に比べ B6/*lpr* マウスでは G-MDSC (granulocyte-like MDSC) の割合の有意な増加を認めたが、6 週では G-MDSC の割合に有意な差は認められなかった。さらに投与後 1 週においても対照群に比べ B6/*lpr* マウスでは、B 細胞中の CTLA-4 陽性細胞の割合の有意な増加、T 細胞中の PD-1 陽性細胞及び PD-L1 陽性細胞の割合の有意な増加を認めた。なお、非投与群ではこれらの差は認められなかった。

自己免疫疾患モデルにおける末梢血リンパ球の免疫チェックポイント分子の発現亢進及び MDSC の増加による腫瘍免疫機能の低下は浸潤がん発生を促進させた一因であると推測された。これらの反応の一部は投与後 1 週、すなわちプロモーターである DSS の投与前から生じており、発がんイニシエーションに対する免疫反応も自己免疫状態では抑制されている可能性がある。PD-1 や CTLA-4 といった免疫チェックポイント分子に加え免疫抑制性細胞である MDSC の反応も見られたことから自己免疫状態では複合的に腫瘍発生に対し免疫抑制性の反応が生じていると考えられた。

また、B 細胞の割合の変化量が大きく、B 細胞は腫瘍の抑制・亢進のいずれにも働くことが知られており、本実験系でも腫瘍発生に重要な役割を果たしている可能性がある。さらに B 細胞中の CTLA-4 陽性細胞の割合の有意な増加を認めたが、その機能は B 細胞のホメオスタシスの維持など²⁾の報告はあるが不明な点が多く、本実験系での意義は今後の課題である。

<引用文献>

- 1) Kondo T et al. Acceleration of tumor growth due to dysfunction in M1 macrophages and enhanced angiogenesis in an animal model of autoimmune disease. *Lab Invest.* 2016 Apr;96(4):468-80.
- 2) Wang CJ, et al. CTLA-4 controls follicular helper T-cell differentiation by regulating the strength of CD28 engagement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Jan 13;112(2):524-9

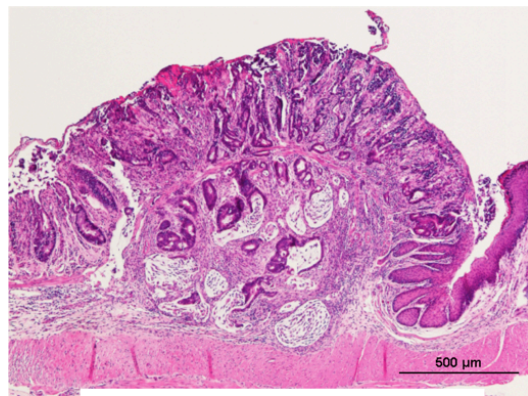


Fig. 3 B6/*lpr*の腫瘍組織像

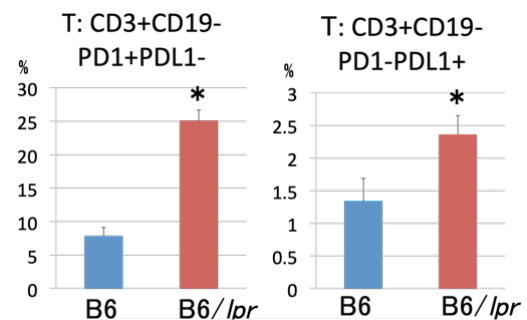


Fig. 4 末梢血中のFCM解析

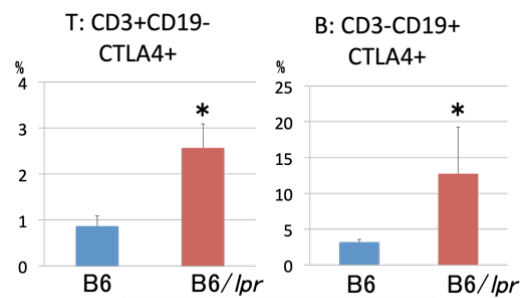


Fig. 4 末梢血中のFCM解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikeda M, Shima K, Kondo T, Semba I	4. 巻 62
2. 論文標題 Atypical immunohistochemical patterns can complement the histopathological diagnosis of oral premalignant lesions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of oral biosciences	6. 最初と最後の頁 93-98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 0.1016/j.job.2020.01.003.	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 -

1. 著者名 Okubo A, Fujii K, Kondo T, Semba I, Higashi Y, Kanehara T	4. 巻 44
2. 論文標題 Kimura's disease in the oral cavity: A rare manifestation of immunoglobulin G4-related disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of dermatology	6. 最初と最後の頁 e357-358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.14021.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤智之、嶋香織、仙波伊知郎
2. 発表標題 自己免疫疾患・化学発がんモデルマウスにおけるT細胞の免疫チェックポイント分子の発現亢進
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤智之、嶋香織、仙波伊知郎
2. 発表標題 化学発癌自己免疫疾患モデルにおける免疫チェックポイント分子発現の亢進
3. 学会等名 第38回分子病理研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤智之、嶋香織、池田幹人、仙波伊知郎
2. 発表標題 化学発癌自己免疫疾患モデルにおける免疫チェックポイント分子発現解析
3. 学会等名 第1回南九州歯学会
4. 発表年 2019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