

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15266

研究課題名（和文）グリオーマにおけるケモカイン受容体CCR4を介した腫瘍免疫誘導機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of induction mechanism of tumor immunity in glioma via CCR4

研究代表者

原 雄大（Hara, Yuta）

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：20803779

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、ケモカイン受容体CCR4がグリオーマに与える影響について検討した。CCR4欠損マウスでは、腫瘍の増殖が亢進し、生存日数が短縮した。また、CCR4欠損マウスでは、脳内へのCCR4陽性Th17細胞、および、グリオーマにおいて腫瘍の実質的な排除を担うM1マクロファージの浸潤が減少した。制御性T細胞やTh2細胞といった他のCCR4発現細胞の浸潤に変化はなかった。選択的CCR4阻害薬処置でも同様の結果が得られた。以上より、グリオーマにおいて、CCR4はTh17細胞の浸潤を介し、マクロファージの分極に影響することで、グリオーマの増殖を抑制する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

他のがん種に比べ、グリオーマは治療薬が極端に少なく、また手術による腫瘍の除去も困難なため、極めて難治性の癌である。また、T細胞を始めとした各種免疫細胞の役割および浸潤機序の解明が、抹消組織に発生したがんと比べ、進んでいない。本課題で見出した知見は、グリオーマにおけるTh17細胞の浸潤機序および役割の解明の一助となると考えている。

研究成果の概要（英文）：In the present study, I examined the roles of CCR4, one of the chemokine receptors, in the pathology of glioma. CCR4 deficient mice displayed the increase in tumor volume and shortened survival duration compared with wild-type mice. Flow cytometry analysis showed that CCR4 deficiency caused a decrease in Th17 cells, but not Treg and Th2 cells, in the brain. Furthermore, M1 macrophages were decreased in the brain of CCR4 deficient mice. M1 macrophages are known to kill tumor cells in glioma. Similar results were obtained from the experiments using selective CCR4 antagonist Compound22-treated mice. These results suggest that CCR4 would be involved in suppression of tumor growth via migration of Th17 cells and macrophage polarization in glioma.

研究分野：薬理学

キーワード：グリオーマ CCR4 Th17細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

強固なバリアー機構である血液脳関門が存在することより、古くから脳は、全身の免疫システムから隔離されていると考えられてきた。一方、パーキンソン病などにおいて、脳内へのT細胞サブセットの浸潤が報告されるようになってきた。しかしながら、これらT細胞の脳内への浸潤機構については不明である。また近年、脳梗塞モデルマウス脳内において、Tregが蓄積すること、さらに、これらTregは末梢とは異なる遺伝子発現パターンおよび機能を示すことが報告された。このように、脳内へと浸潤したT細胞は、末梢に存在するT細胞とは異なり、新たなサブセットを定義できる可能性が考えられる。

グリオーマは、原発性脳腫瘍の1種であり、悪性度が高い。腫瘍が正常な脳組織へと浸潤することから、手術による除去が困難であり、また、治療薬が極端に少ないことから、未だ極めて難治性のがんである。したがって、グリオーマに対する治療戦略の開発のため、より詳細な病態解明が求められている。

これまでに、がんにおける免疫系の関与が盛んに研究されている。種々の腫瘍において、各種T細胞サブセット、特に、制御性T細胞(Treg)やTh17細胞の役割の解析が進んでいる。これらT細胞サブセットには、ケモカイン受容体CCR4が発現しており、TregやTh17細胞の主要な遊走制御因子として働く。いくつかの腫瘍において、CCR4陽性Tregが宿主の免疫反応を抑制すること、また、CCR4陽性Tregの腫瘍組織への浸潤が予後の増悪と相関することが報告されている。一方、Th17細胞は、がん種ごとでその働きが異なると考えられている。

2. 研究の目的

これまでに、末梢組織に発生したがんと同様に、グリオーマ患者の腫瘍組織内においても、TregやTh17細胞が存在することが報告されている。また、CCR4リガンドであるCCL17、CCL22の発現も確認されている。しかしながら、それらの病理的意義については全く不明である。

本研究では、グリオーマにおけるCCR4の役割を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 動物

オスのC57B/6系統の野生型およびCCR4欠損マウスを用いた。SPF環境下にて、12時間の明暗サイクル、室温 $23^{\circ}\text{C}\pm 1$ で飼育した。餌・水は自由に摂取できるようにした。動物実験は、「近畿大学実験動物規程」を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施した。

(2) 細胞

Luciferase遺伝子を導入したマウスグリオーマ細胞株CT-2A(Merck)を使用した。10% FBSおよび抗生物質を添加したD-MEMを用いて、 37°C 、5% CO_2 存在下で培養した。

(3) グリオーマモデルマウスの作製

3種混合麻酔で麻酔後、脳固定装置を用い、マウス頭部を固定した。視床(bregmaより1mm後方、0.8mm右側方、頭蓋骨表面より深さ3.5mm)PBSに懸濁した細胞(5×10^4)を投与した。その後、皮膚を縫合し、ゲンタマイシンおよびブプレノルフィンを腹腔内投与した。

(4) 腫瘍増殖の測定

Luciferinを腹腔内投与し、15分後、in vivo imaging system (IVIS)を用いて、化学発光強度を測定した。

(5) Real-time PCR

モデルマウスより、腫瘍組織および腫瘍周辺組織を、細胞を投与していないマウスより、脳組織を回収した。Total RNAを抽出し、cDNAを調整した。SYBR Greenを用い、目的遺伝子の発現量を測定した。

(6) ELISA

上記(5)と同様に、組織を回収後、lysis buffer(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% TritonX-100 and protease inhibitor cocktail)中でホモジナイズした。遠心分離し、上清をサンプルとして用いた。R&D Systems社のELISA kitを用い、目的分子のタンパク質量を測定した。

(7) 免疫染色

4% PFAにて灌流固定した脳を用い、凍結切片を作製した。クエン酸バッファーで抗原賦活化後、5%正常ヤギ血清もしくはBlocking One Histoにてブロッキングした。1次抗体を1晩反応させ、蛍光色素が標識された2次抗体を反応させた。封入し、共焦点顕微鏡にて画像を取得した。

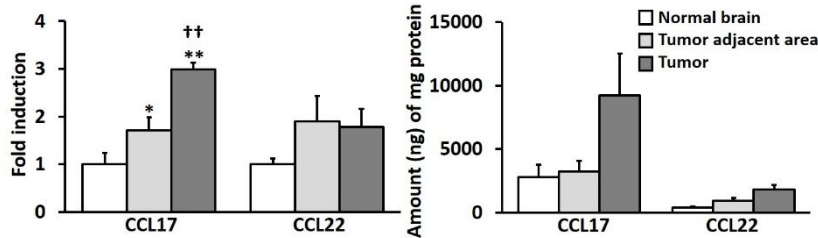
(8) フローサイトメトリー

脱血した全脳（嗅球、小脳を除く）を細かく刻み、アキュターゼ中でインキュベートした。70 μm セルストレーナーに通したのち、25%パーコールで免疫細胞を分取した。死細胞を Zombie で染色後、抗 CD16/32 抗体にて Fc 受容体を阻害した。その後、蛍光色素を標識した抗体で染色した。BD LSR Fortessa もしくは BD FACSAria にて測定を行った。

4. 研究成果

(1) モデルマウスにおける CCR4 リガンドの検出

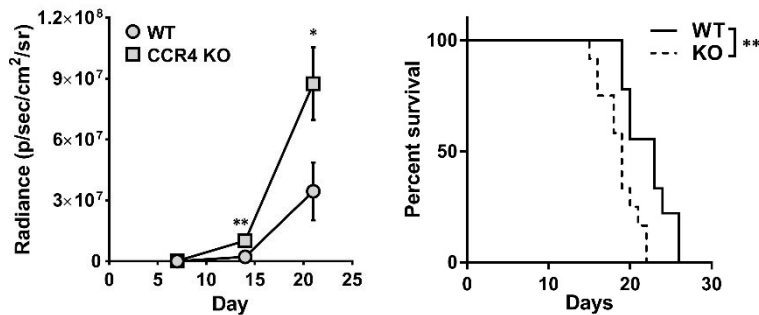
CCR4 リガンドの CCL17 が腫瘍組織において顕著に増加していた。また、CCL17 は、Iba1 陽性のミクログリア/マクロファージ、CD31 陽性の血管内皮細胞より産生されていた。一方、CCL22 の発現はあまり変化がなかった。



CCR4リガンドのmRNA (左) およびタンパク質発現 (右)

(2) CCR4 欠損がグリオーマ腫瘍増殖に与える影響

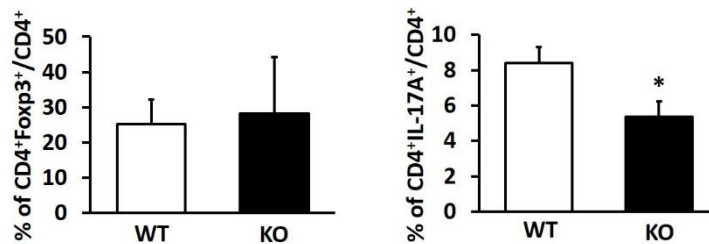
CCR4 欠損マウスを用いて、腫瘍増殖の変化について検討した。野生型マウスと比べ、CCR4 欠損マウスでは、腫瘍増殖の有意な亢進が認められた。さらに、生存日数が有意に短縮した。



腫瘍増殖 (左) および生存曲線 (右)

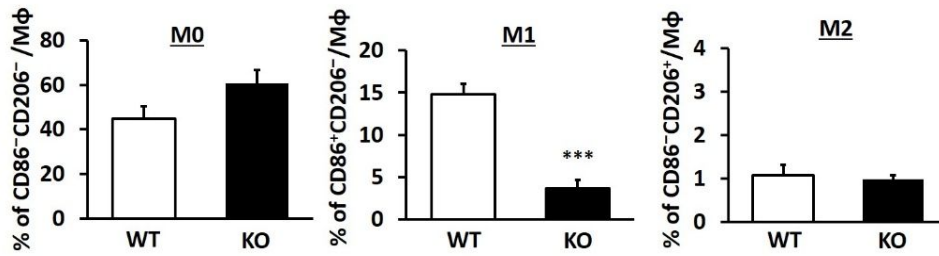
(3) 脳内への免疫細胞浸潤の変化

CCR4 欠損による脳内への免疫細胞の浸潤の変化について検討した。Treg に変化はなかったが、CCR4 欠損マウスにおいて、Th17 細胞の割合が有意に減少した。



脳内におけるTreg (左) およびTh17細胞 (右) の割合

グリオーマにおいて、実質的に腫瘍を排除するのはM1 マクロファージであると言われている。Th17 細胞からは、IL-17A などの種々のサイトカインが産生される。これらのサイトカインは、マクロファージを M1 型に分極させる働きを有する可能性が示されている。そこで、脳内のマクロファージの割合について解析したところ、M1 マクロファージの割合が CCR4 欠損マウスにおいて有意に減少した。一方、M0 および M2 マクロファージに変化はなかった。

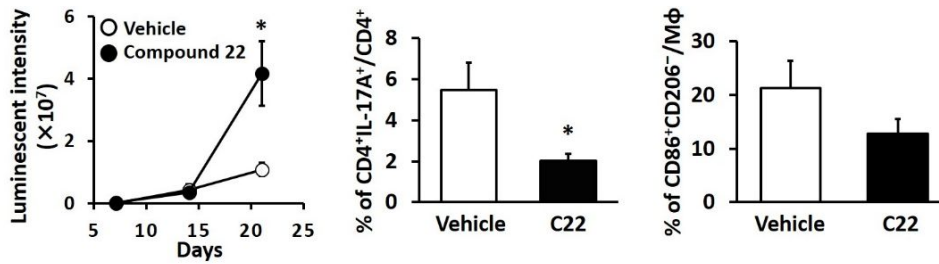


脳内におけるM0 (左) M1 (中央) およびM2マクロファージ (右) の割合

また、傷害性 T 細胞や Th2 細胞といった他の T 細胞サブセット、NK 細胞などの自然免疫細胞についても同様に検討したが、いずれの細胞も CCR4 欠損による変化は認められなかった。

(4) 選択的 CCR4 阻害薬による変化

選択的 CCR4 阻害薬 Compound22 の投与により、CCR4 欠損マウスと同様の変化認められるのか検討した。Compound22 は、0.5 mg/kg の用量にて、細胞投与前および投与翌日より 1 日おきに腹腔内投与した。まず、グリオーマ腫瘍の変化について検討したところ、Compound22 処置マウスで有意に腫瘍増殖が亢進した。また、脳内への Th17 細胞および M1 マクロファージの浸潤が、Compound22 処置により有意に減少した。



腫瘍増殖 (左) 脳内のTh17細胞の割合 (中央) およびM1マクロファージの割合 (右)

以上より、CCR4 は、グリオーマにおいて、Treg よりもむしろ Th17 細胞の脳内遊走に優先的に関与し、M1 マクロファージの分極を介することで、腫瘍増殖を抑制している可能性を見出した。今後、Th17 細胞のより詳細な脳内への浸潤機序、および脳浸潤性の Th17 細胞の特性を解析することで、グリオーマの新たな治療戦略の開発に繋げたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐野 立樹、原 雄大、松尾 一彦、中山 隆志
2. 発表標題 ケモカイン受容体CCR4がグリオーマに及ぼす影響
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野 立樹、原 雄大、松尾 一彦、中山 隆志
2. 発表標題 グリオーマにおけるケモカイン受容体CCR4を介したTh17細胞の脳浸潤の影響
3. 学会等名 第142回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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