

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09383

研究課題名(和文) MFG-E8による制御性B細胞を介した腫瘍免疫回避機構の解明と大腸癌治療への応用

研究課題名(英文) Avoidance of milk fat globule-epidermal growth factor-8 (MFG-E8) tumor immunity via regulatory B cells and application of mechanism for colon cancer therapy

研究代表者

川島 耕作 (kawashima, Kousaku)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・講師

研究者番号：10609267

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)：これまでに、MFG-E8 (Milk fat globule-Epidermal growth factor-8)が癌増殖を促進することを明らかとしたが、MFG-E8による制御性B細胞(Breg)を介した腫瘍免疫に関する機序は解明されていなかった。今回の申請課題で得られた知見として、MFG-E8 ノックアウトマウスにてBreg数の減少、BregのIL-10産生能低下を認め、Bregの発生や分化にMFG-E8が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。MFG-E8によるBregの活性化や機能促進は宿主の腫瘍免疫抑制を介して大腸癌の発生や進展に影響す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

今回のMFG-E8 ノックアウト(KO)マウスを用いた研究では、MFG-E8が制御性B細胞(Breg)の発生や分化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。炎症性大腸癌モデルにおける大腸発癌と癌進展抑制に関しては期待した成果は上げることは出来なかったが、MFG-E8によるBregの活性化や機能促進は宿主の腫瘍免疫抑制を介して、大腸癌の発生や進展に影響する可能性があると考えられた。今後、腫瘍に対する免疫療法の新規開発につながる可能性があると思われる。

研究成果の概要(英文)：We have reported that milk fat globule-epidermal growth factor-8 (MFG-E8) promotes tumor growth and has a high level of expression in human colon cancer cells. Furthermore, regulatory B cells (Bregs) dysfunction associated with inflammatory bowel disease was found to lead to inflammation exacerbation. However, no mechanism for avoiding MFG-E8 tumor immunity via Bregs has been elucidated. In this study, Bregs number in MFG-E8 knockout (KO) mice was decreased, while CpG DNA-induced IL-10 production was significantly reduced in B cells obtained from those mice. These results suggest an important role of MFG-E8 in Bregs development and differentiation. Unfortunately, MFG-E8 KO mice showed unfavorable reproduction, and experiments focused on tumor incidence and inhibition with colitis-associated cancer model mice did not achieve favorable results. Accelerated Bregs function induced by MFG-E8 may impact development and promotion of colon cancer by inhibiting host tumor immunity.

研究分野：消化器内科学、炎症性腸疾患

キーワード：腫瘍免疫 腸管免疫 制御性B細胞 MFG-E8

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は、本邦でも年々患者数が増加し、死亡原因の上位を占める重要な疾患である。近年、従来の化学療法に加え様々な分子標的薬が登場したものの、いまだ十分な治療効果が得られていない。

私共の研究室では、以前より腸管における生理的あるいは炎症性腸疾患 (IBD) の病態形成における機能解析を免疫学的観点から行ってきた。その中で、主にマクロファージから産生される MFG-E8 (Milk fat globule-Epidermal growth factor-8) という蛋白に着目し、アポトーシス細胞の貪食促進、②マクロファージに直接作用し細胞内シグナル調節を介する炎症性サイトカイン産生を抑制、により腸管炎症を抑制することを明らかにしてきた (J Immunol, 2009; Digestion 2012)。さらに MFG-E8 がヒト大腸癌で高発現しており、癌細胞から分泌された MFG-E8 が autocrine 的に癌細胞増殖を促進することを報告した (J Gastroenterol. 2015)。これらの研究結果では、MFG-E8 が大腸癌の発生や進展に深く関わる可能性を示唆しているが、詳細なメカニズム解明には至っていない。

さらに近年申請者らは、IBD の病態形成における制御性 B 細胞 (Breg) の機能解析を継続的に行っており、Breg が炎症を負に制御し、その機能破綻により腸管炎症が誘発されることを報告してきた (Immunology, 2010; Inflamm Bowel Dis, 2014)。一方で、Breg は腫瘍免疫にも関わる可能性も示唆されているが、現在のところ詳細不明である。

これまでの研究成果から、MFG-E8 はアポトーシス細胞処理を介して免疫寛容を誘導することから、免疫応答を抑制する Breg の機能を制御している可能性が想定される。したがって、MFG-E8 による Breg の活性化や機能促進は宿主の腫瘍免疫抑制を介して大腸癌の発生や進展に関わる可能性があると考えられる。大腸癌の病態における MFG-E8 を介した Breg の機能解析を検討することは、大腸癌の発生や進展抑制を目標とした新規の免疫治療の開発につながると考えられる。

## 2. 研究の目的

- (1) 大腸癌の発生・進展過程において、MFG-E8 が Breg の分化・活性化を誘導し腫瘍免疫を回避する分子メカニズムを明らかにする。
- (2) MFG-E8 あるいは Breg を標的とした新規の大腸癌治療法開発を目指す。

## 3. 研究の方法

- (1) MFG-E8 の Breg の発生・分化に関する検討: MFG-E8 が Breg の発生や分化を制御していることを MFG-E8 KO と野生型マウスの B 細胞機能を実験的に比較することで検証する。
- (2) 大腸癌発生・進展過程における MFG-E8 と Breg の腫瘍免疫への関与に関する検討: 野生型、MFG-E8 KO、Rag2- MFG-E8 KO マウスに大腸癌モデルを作成、同様に Rag2 マウスに野生型 T 細胞移入した系に野生型 B 細胞または IL-10 KO B 細胞を共移入し、その後大

腸癌モデルを作成する。これらの系を用いて MFG-E8 と Breg の腫瘍免疫回避機構の詳細を検証する。

(3) MFG-E8 抗体による大腸発癌と癌進展抑制を検討し腫瘍免疫の関与を明らかにする：MFG-E8 抗体投与後に、大腸癌部の Breg、Treg、CD8 陽性 T 細胞の浸潤と腫瘍免疫機能を解析する。

#### 4. 研究成果

Breg の機能や活性化に MFG-E8 が関連している可能性を踏まえ、MFG-E8 KO マウスを用いた検討を行った。MFG-E8 KO マウス(C57BL/6 background)をおよび野生型 (WT) マウスから脾臓と腸間膜リンパ節 (MLN) を摘出し、FACS によって Breg 分画 (CD1dhiCD19hi) の解析を行い、KO マウスの脾臓と MLN で Breg の総数は WT に比較して少ないことが明らかとなった。さらに、両マウスの脾臓と MLN から分離した B 細胞を培養し CpG DNA で刺激後の IL-10 産生能を評価すると、KO マウスの B 細胞において Breg に特徴的な IL-10 産生が低下することが明らかとなった。これらの研究成果は、Breg の発生や分化において MFG-E8 が重要な役割を果たすことを示唆する結果であった。これらの結果から、MFG-E8 の欠損が B 細胞の Breg への分化や誘導を低下させることが示唆され、Breg の IL-10 産生を介した腫瘍免疫制御にも影響を与える可能性があると考えられた。

引き続き、炎症性大腸癌 (colitis-associated cancer: CAC) モデルの作成を開始したが、MFG-E8 マウスの繁殖が停滞したこともあり、マウスから *in vitro* 実験に供給する細胞が十分でなく、*in vitro* 実験に予想以上に時間を費やすこととなった。そのため、当初想定していた CAC モデルマウスにおける大腸発癌と癌進展抑制に関する実験では、期待した成果を上げることは困難であった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6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 Mishima Yoshiyuki, Sonoyama Hiroki, Ishihara Shunji, Oshima Naoki, Moriyama Ichiro, Kawashima Kousaku, Kinoshita Yoshikazu	4. 巻 100
2. 論文標題 Interleukin-33 delays recovery of mucosal inflammation via downregulation of homeostatic ABCG5/8 in the colon	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 491 ~ 502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0329-3	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 Sonoyama H, Mishima Y, Ishihara S, Oshima N, Moriyama I, Kawashima K, Chinuki Y, Morita E, Kinoshita Y	4. 巻 13
2. 論文標題 Ten-year follow-up study of linear immunoglobulin A dermatosis complicated with ulcerative colitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 164-169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-019-01047-w	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 Sonoyama Hiroki, Kawashima Kousaku, Ishihara Shunji, Kotani Satoshi, Fukuba Nobuhiko, Oka Akihiko, Kusunoki Ryusaku, Tada Yasumasa, Mishima Yoshiyuki, Oshima Naoki, Moriyama Ichiro, Yuki Takafumi, Onishi Koji, Kinoshita Yoshikazu	4. 巻 64
2. 論文標題 Capabilities of fecal calprotectin and blood biomarkers as surrogate endoscopic markers according to ulcerative colitis disease type	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 265 ~ 270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.18-92	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 Ishihara Shunji, Tada Yasumasa, Kawashima Kousaku, Kataoka Masatoshi, Sonoyama Hiroki, Yamashita Noritsugu, Oka Akihiko, Kusunoki Ryusaku, Fukuba Nobuhiko, Mishima Yoshiyuki, Oshima Naoki, Moriyama Ichiro, Yuki Takafumi, Kinoshita Yoshikazu	4. 巻 50
2. 論文標題 Serum amyloid A level correlated with endoscopic findings in patients with Crohn 's disease?Possible biomarker for evaluating mucosal healing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Digestive and Liver Disease	6. 最初と最後の頁 553 ~ 558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dld.2017.12.010	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 Ishihara Shunji, Kawashima Kousaku, Fukuba Nobuhiko, Tada Yasumasa, Kotani Satoshi, Mishima Yoshiyuki, Oshima Naoki, Kinoshita Yoshikazu	4. 巻 99
2. 論文標題 Irritable Bowel Syndrome-Like Symptoms in Ulcerative Colitis Patients in Clinical Remission: Association with Residual Colonic Inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 46~51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000494412	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 Sonoyama H, Kawashima K, Ishihara S, Kotani S, Fukuba N, Oka A, Kusunoki R, Tada Y, Mishima Y, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Onishi K, Kinoshita Y	4. 巻 in press
2. 論文標題 Capabilities of fecal calprotectin and blood biomarkers as surrogate endoscopic markers according to ulcerative colitis disease type	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 石原俊治、川島耕作、木下芳一	4. 巻 116
2. 論文標題 ウステキヌマブによるクローン病の治療 有効性と安全性からみた位置付け	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本消化器病学会雑誌	6. 最初と最後の頁 216-223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Mishima Y, Sonoyama H, Ishihara S, Oshima N, Moriyama I, Kawashima K, Kinoshita Y
2. 発表標題 Interleukin-33 delays recovery of mucosal inflammation by down-regulation of ABCG5/8 in colon
3. 学会等名 DDW2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 園山浩紀, 川島耕作, 石原俊治, 古谷聡史, 三島義之, 大嶋直樹, 森山一郎, 木下芳一
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎の病型別にみた粘膜治療評価における各種バイオマーカーの有用性と問題点
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川島耕作, 石原俊治, 木下芳一
2. 発表標題 便中カルプロテクチン低値は臨床的内視鏡的寛解潰瘍性大腸炎の組織学的寛解を同定し, 長期的な臨床的寛解維持を予測する
3. 学会等名 JDDW2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三島義之, 古谷聡史, 川島耕作, 石原俊治
2. 発表標題 感染後過敏性腸症候群におけるTLR9の関与の検討
3. 学会等名 第16回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川島耕作, 石原俊治, 福庭暢彦, 片岡祐俊, 山下詔嗣, 園山浩紀, 多田育賢, 楠龍策, 三島義之, 大嶋直樹, 結城崇史, 木下芳一
2. 発表標題 組織学的所見に基づいた臨床的寛解潰瘍性大腸炎患者における過敏性腸症候群様症状の頻度に関する検討
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川島耕作、石原俊治、加藤輝士、片岡祐俊、古谷聡史、園山浩紀、三島義之、大嶋直樹、木下芳一
2. 発表標題 pH依存型メサラジン放出調節剤投与後に心筋炎を発症した潰瘍性大腸炎の1例
3. 学会等名 第9回日本炎症性腸疾患学会学術集会
4. 発表年 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	石原 俊治  (Ishihara Shyunji)  (80263531)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授   (15201)	

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