

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08590

研究課題名(和文) 膵神経内分泌腫瘍自然発生マウスモデルを用いた腫瘍免疫療法の研究開発

研究課題名(英文) A

研究代表者

菊森 豊根 (Kikumori, Toyone)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90402635

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)：高頻度に肝転移、腹膜播種を来す膵神経内分泌腫瘍自然発生マウスモデルにおいて、腫瘍免疫抑制が病勢進展に寄与し、腫瘍免疫を活性化することにより病勢進展を抑制できるか検討を試みた。このモデルマウスに生じた膵神経内分泌腫瘍の原発巣、転移巣における免疫細胞の活性化を免疫組織学的染色により検討を試みたが、染色条件等が定まらず、検討できなかった。引き続き予定していた、薬剤による腫瘍免疫の活性化についても、評価手法が定まらず、成果を出せなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵神経内分泌腫瘍は膵島細胞から発生する稀な腫瘍である。一般に緩徐な経過をたどるが、肝転移などを来し悪性の経過をたどることが多い。また近年、膵神経内分泌腫瘍に対する分子標的薬が臨床に導入されてきているが、治療効果はまだ限定的である。研究課題であるモデル動物を用いた膵神経内分泌腫瘍における腫瘍免疫の評価及び活性化はこの稀な腫瘍の病態解明の一助になりうると共に新たな治療戦略開発のモデルの一つとなり得る。

研究成果の概要(英文)：In a mouse model of spontaneous pancreatic neuroendocrine tumors that frequently cause liver metastasis and peritoneal dissemination, we investigated whether tumor immunosuppression contributes to disease progression and can suppress disease progression by activating tumor immunity. An attempt was made to examine the activation of immune cells in the primary and metastatic lesions of pancreatic neuroendocrine tumors in this model mouse by immunohistochemical staining, but the staining conditions were not determined and could not be examined. Regarding the activation of tumor immunity by drugs, which was planned to continue, the evaluation method was not determined and no results could be obtained.

研究分野：内分泌外科

キーワード：膵内分泌腫瘍 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

膵神経内分泌腫瘍(pNET)は膵島細胞から発生する稀な腫瘍である。比較的緩徐に進行することが多いとされているが、時間経過とともに肝転移を来することが多く、悪性の経過をたどることが多い。多発性内分泌腫瘍症Ⅰ型(MEN1)や von Hippel Lindau 病(VHL)などの遺伝性腫瘍症候群においてもこの pNET が生じることが知られている。近年 pNET に対する分子標的薬の効果が確認されて臨床に導入されてきているが、治療効果はまだ限定的である。稀少疾患のため、抗腫瘍薬の開発目標になりにくい状況である。

近年、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)に代表される腫瘍免疫が転移形成などに重要な役割を果たしていることが判明してきている。pNET においても、原発巣中の TIL が多いほど予後が良いこと、肝転移巣中の制御性 T 細胞(Treg)が多いほど予後が悪いこと、つまり腫瘍免疫の活性化が予後に影響を与えていることが示唆されている。腫瘍細胞側の観点からは、より悪性度の高い pNET の方が、腫瘍免疫が抑制されていることも報告されている。

pNET において、腫瘍免疫を活性化することにより、肝転移の抑制、および生命予後を改善できるかどうかはほとんど知られていなかった。

2. 研究の目的

pNET を生じる動物モデルにおいて、腫瘍免疫を活性化することにより、予後が改善できるかどうかを検討することである。

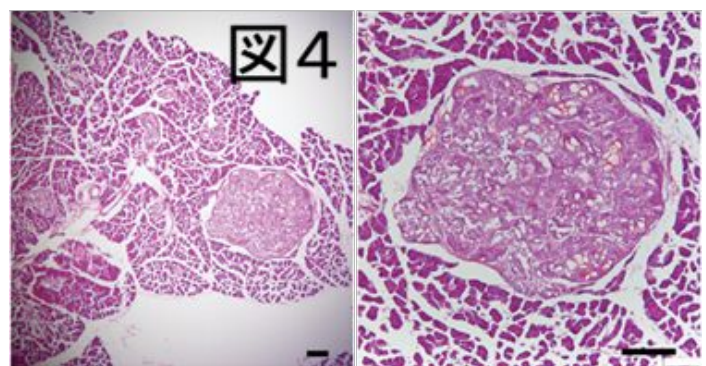
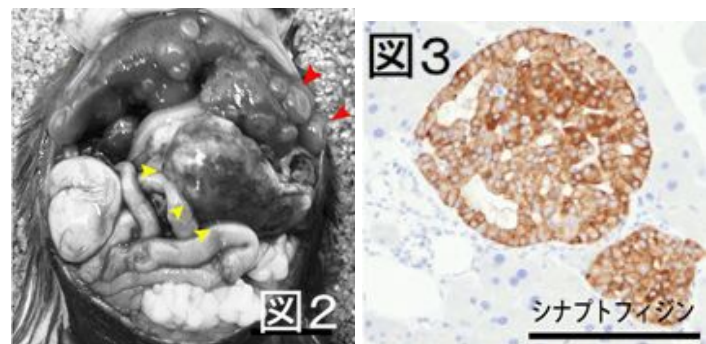
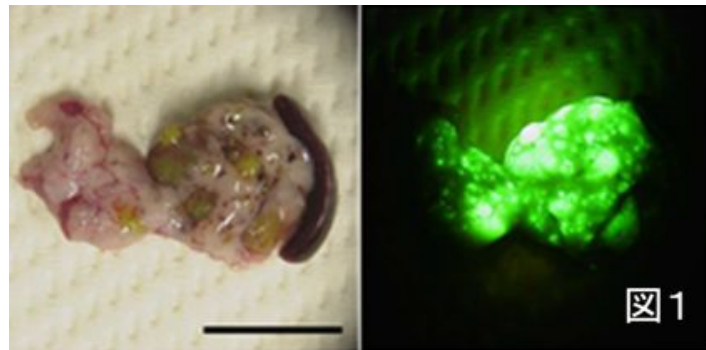
我々はグルカゴン遺伝子を緑色蛍光タンパク(GFP)遺伝子で置換したマウス(Gcggfp/gfp)を作成した。このマウスにおいては生後 1 - 2 ヶ月より膵島細胞の過形成が生じ(図 1)、原発巣、転移巣とも緑色蛍光を呈する。さらに時間経過とともに増大・肝転移・腹膜播種を来すことを報告した。(図 2、赤矢印：肝転移、黄矢印：腹膜播種)

このマウスに生じた pNET は膵島ホルモン非産生、クロモグランin A、シナプトフィジンがともに陽性、Ki-67 ラベリングインデックスが数%で、いわゆるヒトの pNET G2 に相当する腫瘍と組織学的にも、生物学的態度も酷似している。(図 3)

このモデルマウスは腫瘍移植マウスと異なり液性・細胞性免疫とも正常に機能しているため、腫瘍免疫を検討する目的には非常に優れたモデルとなる。

このモデルマウスに生じた pNET にはほとんど TIL を認めない。(図 4)

おそらく腫瘍免疫が活性化されていないか、抑制されていると予想される。故に非常に高率に肝転移を来すと考えられる。故にこのモデルマウスは腫瘍免疫の評価及び薬物などによる介入効果を評価において非常に優れたモデルと考えられた。



3. 研究の方法

(1) モデルマウスに生じた pNET の原発巣および肝転移巣における腫瘍免疫機構の活性化評価

原発巣および肝転移巣を摘出し、TIL を CD3 (T リンパ球全体の表面抗原)、CD4 (ヘルパー T 細胞表面抗原)、CD8 (細胞傷害性 T 細胞表面抗原)、FoxP3 (Treg 特異的タンパク) などを認識する抗体を用いて免疫組織化学的検討を行う。この検討により、腫瘍形成から、時間経過とともに肝転移を形成する期間における経時的な TIL の増減、構成の変化を明らかにできる。また腫瘍細胞における PD-L1 の発現、TIL における PD-1 の発現を免疫組織化学的に検討することにより、免疫チェックポイント機構活性化の程度も経時的に明らかにできる。

(2) 免疫チェックポイント機構を阻害することにより、pNET に対する腫瘍免疫が活性化できるかどうかを検討する。

免疫チェックポイント阻害剤は臨床で使用可能となっているが、ヒトに対する抗体製剤であり、このモデルマウスには適用できない。代替として、腫瘍における PD-L1 発現を阻害できる小分子薬剤 (例えば、BET Bromodomain 阻害剤である JQ1) を投与することにより腫瘍免疫を活性化できるかどうかを検討する。具体的には (1) で挙げた各種表面抗原の発現が薬剤投与によりどのように変化するかを検討する。さらに腫瘍増大抑制、生存期間延長が可能かどうかを検討する。

(3) 免疫チェックポイント阻害による腫瘍免疫活性化と細胞増殖刺激抑制の相乗作用の検討
このモデルマウスに対して細胞増殖促進で重要な役割を果たしている mTOR に対する阻害剤であるエベロリムスを投与すると、腫瘍形成が抑制される。エベロリムスと PD-L1 発現阻害薬を併用することにより、腫瘍の増大、肝転移を更に抑制できるかどうかを検討する。

(4) 免疫チェックポイント阻害による腫瘍免疫活性化により、モデルマウスの生存期間が延長可能かどうかを検討する。

上記の介入により肝転移が抑制された場合、モデルマウスの生存期間が実際に延長するかどうかを検討する。また、免疫チェックポイント阻害による有害事象の発現も評価する。

(5) カロリー摂取制限が腫瘍免疫を活性化できるかどうかを検討する。

高カロリー・高脂肪食により免疫機能が抑制され、逆にカロリー摂取制限により免疫機能が活性化されることが報告されている。このモデルマウスは特別な食餌制限が不要であるため、カロリー摂取制限が可能である。上記 (2) - (3) の介入により腫瘍の増大抑制、生存期間延長が可能であった場合に、カロリー摂取制限により、さらにそれらの効果が増強できるかどうかを検討する。

4. 研究成果

モデルマウスに生じた pNET の原発巣および肝転移巣における腫瘍免疫機構の活性化評価については、摘出した原発巣および肝転移巣における、腫瘍浸潤リンパ球に対して CD3 (T リンパ球全体の表面抗原)、CD4 (ヘルパー T 細胞表面抗原)、CD8 (細胞傷害性 T 細胞表面抗原)、FoxP3 (Treg 特異的タンパク) などを認識する抗体を用いて免疫組織化学的に検討を行ったが、染色条件の設定などが定まらず、有意な結果は出せなかった。またもう一つの、免疫チェックポイント機構については、原発巣、転移巣の腫瘍細胞における PD-L1 の発現、TIL における PD-1 の発現についても免疫組織化学的に検討を試みたが、これも同様な理由により、結果を出すに至らなかった。また、その後に引き続き予定していた、薬物による介入研究も実施できなかった。

今回の研究計画では初期の段階で腫瘍免疫の評価システムの基本となる免疫組織病理学的検査が機能せず、それ以降の計画が全て進まなくなってしまった。

この動物モデルを用いて腫瘍免疫を評価すること、更に種々の手法による腫瘍免疫活性化は将来的に非常に重要な研究課題であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
連携研究者	林 良敬 (Hayashi Yoshitaka) (80420363)	名古屋大学・環境医学研究所・教授 (13901)	

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