

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16553

研究課題名(和文) 血管内皮増殖因子が免疫抑制に関わる機構～腫瘍免疫と正常免疫との差異とは？

研究課題名(英文) Mechanism of action of VEGF in immune suppression: Difference between normal and tumor immunity

研究代表者

竹之内 和則 (Takenouchi, Kazunori)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：30646758

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)：今回我々は、B細胞特異的に血管内皮成長因子(VEGF)を過剰発現するマウスを使用し、ovalbumin投与後の2次リンパ節内の病理組織について、B細胞特異的 VEGF 発現マウスと野生型マウスの4群比較を行った。その結果、リンパ節内でのCD11b+Gr1+Myeloid-derived suppressor cells (MDSC)は増加傾向にあったが、有意な差を認めなかった。また、制御性T細胞の増殖を認め、免疫寛容の一部を担っていると推察された。VEGF121,165のサブタイプを測定可能なELISA系を開発し、血中のVEGFは165よりも121が優位であることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VEGFが外来抗原に対して免疫抑制効果を示す機序をovalbumin皮下投与後のリンパ節を観察することにより探索した。VEGFの過剰が制御性T細胞の増殖を示すことは、腫瘍の免疫逃避機構の解明の一端としてVEGFが関与している可能性を示唆する内容であった。また、血中VEGFの主たるサブタイプが165よりも121であることを発見したことは、癌治療における抗VEGF戦略において重要な発見だったと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used mice overexpressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a B cell-specific manner and compared the histopathology within secondary lymph nodes of B cell-specific VEGF-expressing mice and wild-type mice in four groups after treatment with ovalbumin. The results showed that CD11b+Gr1+Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) within the lymph nodes tended to increase, but no significant differences were observed. We also observed proliferation of regulatory T cells, which were inferred to play a part in tumor evasion. We developed an ELISA system capable of measuring VEGF121,165 subtypes and found that VEGF in the blood was predominantly 121 rather than 165.

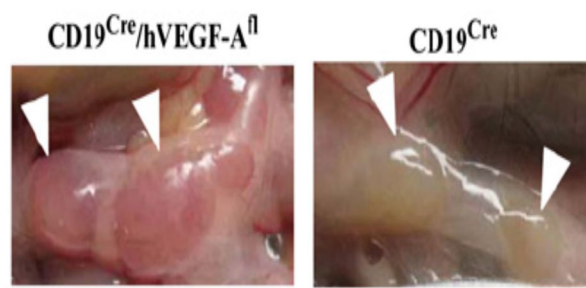
研究分野：臨床検査医学

キーワード：血管内皮増殖因子 2次リンパ節 3次リンパ節 VEGF121 VEGF165

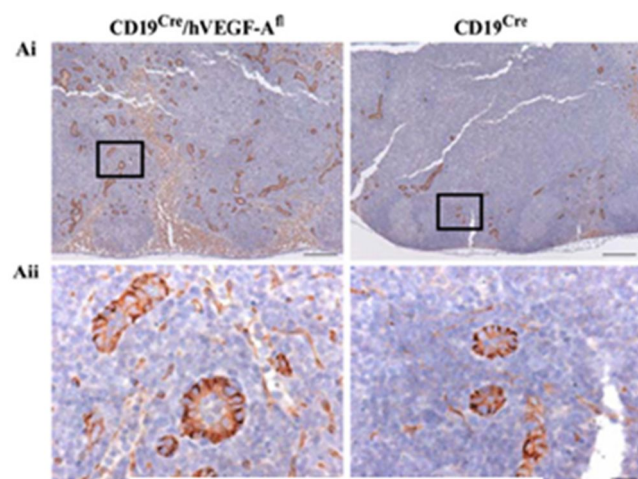
1. 研究開始当初の背景

これまで我々は、Crow-Fukase 症候群の病態解析モデルとして、B 細胞特異的に血管内皮成長因子 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) を過剰発現するマウス (CD19Cre/VEGF-Tg, CD19 は B 細胞特異的のマーカ) を作成し研究を行ってきた。その過程で B 細胞由来の VEGF は、リンパ節内で高内皮細静脈 High Endothelial Venule (HEV) を増加させ、肥満細胞を集簇し、脾臓の肥大化と赤脾髄・白脾髄の組織構造の崩れをもたらすこと、ovalbumin に対する獲得免疫・抗体産生を減弱させることを報告してきた (J Immunol. 2010)。また、2017 年以降の 2 年間で、このマウスモデルの HEV は免疫細胞をリクルートするための接着分子などは十分保持し、機能的役割を担っていること、また、VEGF が免疫機能に対して抑制的に働いていることも確認出来た。

免疫系組織は胸腺・骨髄から成る 1 次リンパ組織やリンパ節・脾臓・パイエル板などの 2 次リンパ組織から成るが、近年、3 次リンパ組織の存在が注目されてきた。3 次リンパ組織は明確な隔壁を持たない、T cell zone、B 細胞濾胞と HEV から成るリンパ様組織であるが、3 次リンパ組織はがん免疫・自己免疫疾患・遷延性の腎臓病のような慢性的な免疫異常との関連が示唆されている。 2 次リンパ節研究の我々の知見と 3 次リンパ節である TME における多くのがん研究者から報告された免疫抑制現象は非常に似ているといえる。3 次リンパ組織は末梢での未知の抗原に対する一連の免疫反応の場である。このことから、我々の CD19Cre/VEGF-Tg に ovalbumin 投与を行えば、腫瘍免疫に近い状態をリンパ節内で再現できるのではないかと考えられた。



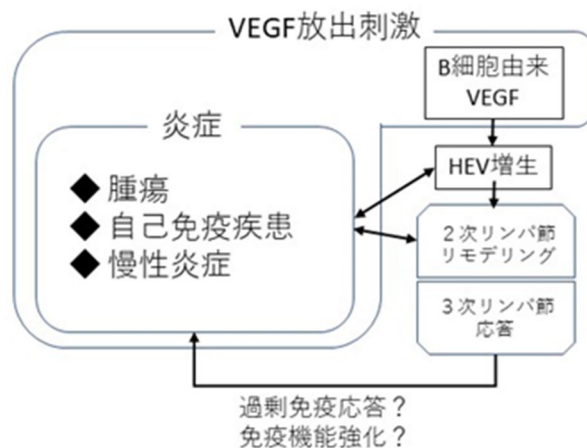
B cell-VEGF Tg でのリンパ節腫脹



B 細胞由来 VEGF により HEV が増加・拡大する。

2. 研究の目的

本来生体内に存在すべきでない抗原が出現した場合には必ず免疫系が作動し、炎症が起こる。炎症細胞による様々なサイトカインの産生により、酸素需要が増大し、結果として炎症の場では低酸素刺激により VEGF が誘導されることになる。つまり、感染症・がん細胞増殖・自己免疫疾患などの慢性疾患では VEGF の誘導が起こり、時には 3 次リンパ組織を形成して免疫系が賦活化される。我々が作成した B 細胞由来 VEGF の過剰発現モデルは無菌的炎症の一型といえ、脾臓・リンパ節のリモデリングを促すことが示されている。3 次リンパ節内と 2 次リンパ節内の HEV 発生・増殖過程は類似していることが知られており、*in vivo* モデルにおいてその後の免疫応答などを詳細に分析することで、様々な疾患の基礎となる現象を理解することが本研究の目的である。



3. 研究の方法

(1) B 細胞特異的 VEGF 発現マウスと野生型コントロールのリンパ節内において、ovalbumin (OVA) 投与群、非投与群での 4 群比較を行った。

骨髄由来免疫抑制細胞 CD11b⁺Gr1⁺ Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) の割合に変化はあるか。

VEGF によって刺激を受けた MDSC により、制御性 T 細胞 Fox3⁺Treg の比率は変わるか。

VEGF により、T 細胞、B 細胞の成熟が阻害されるか。

などの点について、病理組織とフローサイトメトリーによって分析した。

(2) 本研究では担癌マウスを作成し、過剰 VEGF の免疫に対する影響を確認する計画であったが、動物舎の移転計画に伴い、CD19Cre/VEGF-Tg の十分な個体の確保が困難だったため、ヒト大腸がん患者の血清検体を用いた研究に参画した。シノテスト社によって開発された、VEGF 121、VEGF 165 のサブタイプのみを特異的に測定できる ELISA キットを使用し、患者血清・血漿中の VEGF サブタイプ解析を行った。

4 . 研究成果

2020 年度においては、主として B 細胞特異的 VEGF 過剰発現マウスとコントロール群において、OVA 皮下投与群、非投与群の 4 群比較をおこなった。OVA は皮下投与にて 2 回感作後、経鼻刺激した後に、腹腔リンパ節を解析した。

その結果、リンパ節内での CD11b⁺Gr1⁺Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) は増加傾向にあったが、有意な差を認めなかった。またリンパ節内の Fox3⁺Treg 細胞は優位に増加しており、B 細胞の増殖は抑制傾向にあったが、B 細胞数に有意差は認めなかった。我々の以前の報告では、B 細胞特異的 VEGF 過剰発現マウスにおいて、OVA に対する抗体産生は優位に減弱していたが、これは細胞数の低下よりも産生量の低下の影響が大きかったのではないかと推察された。また、リンパ節内の胚中心の構造は崩れており、T 細胞による B 細胞への情報伝達が障害を受けている可能性が示唆された。全体として、VEGF の過剰発現は新たな抗原に対して抑制的に作用する傾向にあった、と結論付けた。

2021 年においては、引き続き OVA 刺激による樹状細胞、肥満細胞に対する解析を行う予定であったが、動物舎移転計画に伴い、マウス飼育数の削減を余儀なくされたことと共に、産仔の表現型が非常に偏った影響もあり、実験に使用するための Tg マウスを得るのが困難となった。産仔のバランスが回復し次第、予定ベースの実験を行い、更なる検討をする予定である。

代替として、ヒト VEGF のどのサブタイプが血中に最も多いかについて研究を進めた。VEGF のサブタイプは主として、VEGF121、VEGF165、VEGF189、VEGF206 が知られているが、VEGF189、VEGF206 については非常にヘパリンやヘパラン硫酸に対する結合性が強く、細胞外基質に対する結合性が高い。つまり、分泌されてもあまり拡散しない局所型の VEGF といえる。一方、VEGF121、VEGF165 は比較的拡散が可能な VEGF であり、血中にも多く認められる。我々はシノテスト社との共同開発により、VEGF121、VEGF165 それぞれを特異的に測定できる ELISA を開発した。これまで血中 VEGF は 165 が最も多いサブタイプと認識されていたが、今回の我々の研究では血漿、血清中共に最も多い VEGF サブタイプは 121 であることが明らかになった。拡散性に富む VEGF121 がドミナントであることは、癌研究に影響を与える知見である。また、アバスタチンを投与されたヒト大腸がん患者の血清、血漿の VEGF サブタイプの動態についても解析中であり、今後の新たな癌研究に役立つ所存である。

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 1件）

1. 著者名 Mukaihara Kosuke, Yamakuchi Munekazu, Kanda Hideaki, Shigehisa Yoshiya, Arata Kenichi, Matsumoto Kazuhisa, Takenouchi Kazunori, Oyama Yoko, Koriyama Toyoyasu, Hashiguchi Teruto, Imoto Yutaka	4. 巻 36
2. 論文標題 Evaluation of VEGF-A in platelet and microRNA-126 in serum after coronary artery bypass grafting	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 1635 ~ 1645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-021-01855-6	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 Kanda Hideaki, Yamakuchi Munekazu, Matsumoto Kazuhisa, Mukaihara Kosuke, Shigehisa Yoshiya, Tachioka Shuji, Okawa Masashi, Takenouchi Kazunori, Oyama Yoko, Hashiguchi Teruto, Imoto Yutaka	4. 巻 77
2. 論文標題 Dynamic changes in platelets caused by shear stress in aortic valve stenosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Hemorheology and Microcirculation	6. 最初と最後の頁 71 ~ 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/CH-200928	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
研究協力者	橋口 照人 (Hashiguchi Teruto)		
研究協力者	山口 宗一 (Yamakuchi Munekazu)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	大川 政士 (Okawa Masashi)		

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