

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18484

研究課題名（和文）腫瘍発生を促進させる自己免疫状態での新規腫瘍免疫システムの解明

研究課題名（英文）Analysis of tumor immunity in autoimmune conditions promoting tumorigenesis

研究代表者

近藤 智之（KONDO, Tomoyuki）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教

研究者番号：10782873

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：自己免疫疾患モデルマウス（B6/lprマウス）では対照群（C57/BL6マウス）と比較して、化学発がん剤によって質的に悪性度が高い腫瘍の発生に加え腫瘍増殖の亢進が認められた。B6/lprマウスでは末梢血中及び腫瘍組織中のいずれにおいても、腫瘍抑制性の腫瘍免疫の中隔を成すT細胞に対し、抑制的に働く免疫チェックポイント分子PD-1の発現が亢進していた。さらにB6/lprマウスのT細胞はコントロールと比較して、活性化刺激によってPD-1を容易に発現する事が認められた。以上から、自己免疫状態ではT細胞のPD-1発現が容易に亢進されることで、腫瘍免疫能低下により腫瘍発生が促進されると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。本研究では腫瘍発生自己免疫疾患モデルマウスの解析によって、自己免疫状態では免疫チェックポイント分子PD-1の発現がT細胞で容易に惹起される事によって腫瘍免疫が抑制され、腫瘍発生が亢進することを見出した。この結果は複雑な腫瘍免疫システムの制御への一助となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In an autoimmune disease model (B6/lpr mice), chemical carcinogenesis induced the development of qualitatively more malignant tumors and increased tumor growth compared to controls (C57/BL6 mice). The expression of the inhibitory immune checkpoint molecule PD-1 was increased in both peripheral blood and tumor tissue of B6/lpr mice. Furthermore, T cells from B6/lpr mice readily expressed PD-1 by activation-stimulus compared to controls.

These findings suggest that T cell PD-1 expression is readily enhanced in autoimmune conditions, which may promote tumorigenesis due to impaired tumor immunity.

研究分野：免疫学

キーワード：腫瘍免疫 自己免疫疾患 化学発がん

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。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。

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増殖及び発生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。

一方で、研究代表者はこれまでに自己免疫疾患モデル B6/*Ipr* 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、自己免疫では移植腫瘍の増殖が亢進することを見出した (Kondo et al. Lab invest 468-480, 2016)。

2. 研究の目的

本研究テーマにおける問題点は、自己免疫状態という言葉は「免疫が活性化した状態」では、腫瘍免疫が必ずしも腫瘍抑制効果を発揮する訳でないだけでなく、むしろ逆の働きをする可能性があるということである。

この腫瘍免疫の複雑さの新たな理解が本研究の核心となるテーマであり、腫瘍発生自己免疫疾患モデルマウスを解析することによって免疫活性化状態が腫瘍発生や増殖に与える影響やそのメカニズムを解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

自己免疫疾患モデルとして B6/*Ipr* マウスを、対照群として B6 マウスを用いた。B6/*Ipr* 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。

化学発がん剤 Azoxymethane (AOM, 10mg/kg) を発がん initiator として腹腔内に単回投与し、投与 1 週間後から大腸特異的炎症誘発剤である Dextran sulfate sodium (DSS, 2%) を発がん promoter として 7 日間自由飲水させた。図 1 に示すタイムスケジュールで、生じた大腸腫瘍の組織学的解析、末梢血及び腫瘍組織の flow cytometer を用いた解析を行った。また、7 週齢マウスの末梢血を採取し、Cell Stimulation Cocktail (eBioscience™) 0.4ul を添加した RPMI 100ul 中に 1.9×10^4 個を播種し 12 時間培養し FCM 解析を行った。

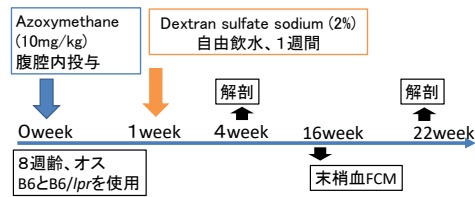


図1 タイムスケジュール

4. 研究成果

AOM 投与後 4 週ではいずれの群も肉眼的に腫瘍は観察されなかったが、組織学的には腫瘍が観察された。組織学的な腫瘍数は対照群に比べ有意に B6/*Ipr* マウスで多かった。

AOM 投与後 22 週では肉眼的な腫瘍数及び腫瘍重量は有意に B6/*Ipr* マウスで高値を示した (図 2)。組織学的には、両群で高度の細胞異型 (大型核小体、核の大小不等等) が見られるが、B6/*Ipr* マウスでのみ粘膜筋板を超え粘膜下層に至る浸潤癌を認めた。これらの結果より B6/*Ipr* マウスでは質的には悪性度が高い腫瘍が発生し、量的には腫瘍増殖が亢進している事が示唆された。

次にこれらの腫瘍発生亢進へ関与する免疫シ

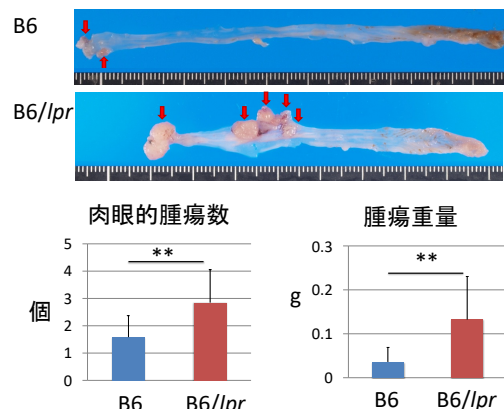


図2 大腸に発生した腫瘍数及び重量

ステムに着目し免疫細胞の flow cytometry (FCM) 解析を行なった (図3)。AOM 投与後 16 週の末梢血 FCM 解析では、対照群に比べ B6/*Ipr* マウスでは免疫チェックポイント分子である PD-1 陽性 T 細胞の割合が有意に増加し、T 細胞での PD-1 相対的 median fluorescence intensity (B6 を 1 とした) は対照群に比べ B6/*Ipr* マウスで高値を示した。また、いずれも 0 週と比較し 16 週で B6/*Ipr* マウスは有意に高値を示した。これらの結果より、B6/*Ipr* マウスでは化学発がんの過程で末梢血の T 細胞における PD-1 の発現が亢進する事により腫瘍免疫能が抑制され発がんが亢進する可能性が示唆された。

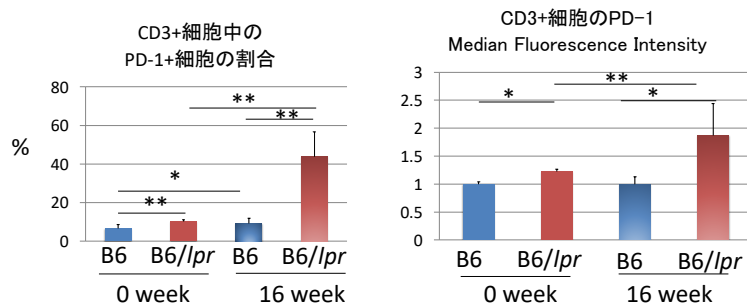


図3 末梢血T細胞のFCM解析

腫瘍組織中に存在する免疫細胞の FCM 解析を行なったところ、AOM 投与後 22 週での腫瘍組織中の PD-1+T 細胞の割合に差は無いが、T cell での PD-1 の median fluorescence intensity は B6/*Ipr* マウスで有意に高値を示した。この結果より、末梢血中のみでなく腫瘍組織中でも T 細胞で PD-1 の発現亢進によって腫瘍免疫能が抑制されている事が示唆された。

B6/*Ipr* マウスの T 細胞は末梢血中でも腫瘍組織中でも PD-1 が強発現していたので、B6/*Ipr* マウスの T 細胞は PD-1 を容易に発現するかどうかについて検討した (図4)。7 週齢マウス末梢血を PMA と ionomycin で刺激すると、対照群に比べ B6/*Ipr* マウスでは PD-1 陽性 T 細胞の割合が有意に増加していた。また、T 細胞での PD-1 の median fluorescence intensity は対照群に比べ B6/*Ipr* マウスで有意に高値を示した。これらの結果より B6/*Ipr* マウスの T 細胞では PD-1 発現が惹起されやすいことが示唆されました。

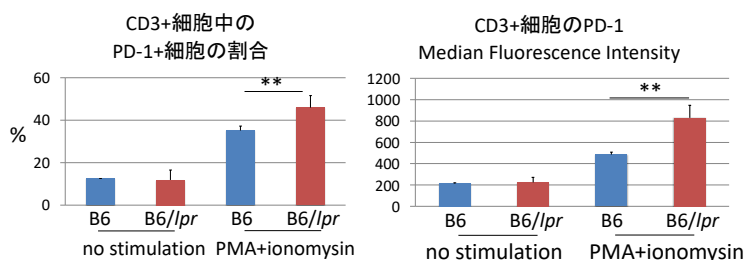


図4 T細胞刺激によるPD-1発現誘導

B6/*Ipr* マウスの T 細胞で PD-1 が発現しやすいために腫瘍免疫が抑制される事が腫瘍発生亢進に寄与しているのであれば、腫瘍組織中に PD-1 のリガンドである PD-L1 陽性細胞の存在が必須である。そのため、PD-L1 陽性細胞の腫瘍組織間質中での存在を免疫組織化学的に両群で確認した。

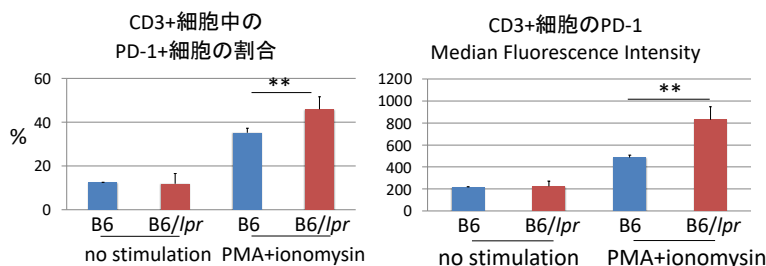


図5 T細胞刺激によるPD-1発現誘導

以上から、腫瘍発生環境下での自己免疫疾患モデルマウスにおける末梢血及び腫瘍組織中の T 細胞の免疫チェックポイント分子 PD-1 の発現亢進による腫瘍免疫能の低下が、腫瘍発生の増加を促進させた一因であると考えられる。T 細胞刺激実験の結果からは、自己免疫疾患モデルマウスでは対照マウスに比べ PD-1 発現が誘導され易い事が確認され、化学発がん剤を用いた腫瘍発生環境でも PD-1 発現が亢進しやすい状態にあると考えられる。

自己免疫疾患において腫瘍免疫が働く環境中で免疫抑制作用を有する免疫チェックポイント分子の発現亢進メカニズムの探索は今後の課題である。

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 近藤智之、嶋香織、笹平智則 |
| 2. 発表標題 自己免疫疾患モデルにおけるPD-1陽性T細胞増加による大腸化学発癌の亢進 |
| 3. 学会等名 第111回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 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 |

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|