

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 23 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461971

研究課題名(和文) 癌リンパ節転移を惹起する免疫逃避機構メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of Tumor Immune Escape Mechanisms Promoted Lymph Node Metastasis

研究代表者

今井 一博 (Imai, Kazuhiro)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：70396555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：この研究では「腫瘍細胞自身が TGF- β 1 などの液性免疫抑制因子を放出することにより、センチネルリンパ節(SLN)を免疫抑制状態にしている」という仮説を立て、その免疫逃避機構解明を目指した。TGF- β 1 強発現癌細胞株をマウス耳介に移植、2週間後にSLN(=TDLN)を摘出し行った検討では、樹状細胞遊走に関わるCCL19、CCL21、活性化T細胞の自己分泌増殖因子であるIL-4の発現減少、各リンパ球phenotypeにおいては、樹状細胞、B細胞、またCD40L+ Tfh cellやその活性分化を示すCD4+CXCR5+CCR7-の有意な減少を認めた。以上から早期免疫記憶の障害が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Transforming growth factor (TGF)- β 1 is known to be produced by progressor tumors and to immobilize dendritic cells (DCs) within those tumors. Moreover, although TGF- β 1 has been shown to promote tumor progression, there is still no direct evidence as to whether TGF- β 1 is able to directly induce distant metastasis. To address that issue and investigate the mechanism by which TGF- β 1 suppresses DC, B cell, and T cell activity in tumor draining lymph node (TDLN), we subdermally inoculated mouse ears with squamous cell carcinoma cells stably expressing TGF- β 1 or empty vector (mock). Two weeks after inoculation, the mice were sacrificed, and the neck TDLN was excised. TDLN from mice inoculated with TGF- β 1 clone showed significantly lower levels of CCL19, CCL21, and IL-4 mRNA than mock. In addition, we found that DCs, B cells, CD40L+ Tfh cells, and CD4+CXCR5+CCR7- subset were reduced in mice inoculated with TGF- β 1 clone. These findings suggest TGF- β 1 inhibits early immunological memory.

研究分野：胸部外科学

キーワード：TGF- β 1 樹状細胞 センチネルリンパ節 リンパ節転移 がん免疫逃避機構

1. 研究開始当初の背景

近年センチネルリンパ節概念が提唱され、日欧米を中心に乳癌や悪性黒色腫に対する手術で、リンパ節郭清の省略に臨床応用されている。今までの申請者らの研究で、センチネルリンパ節が「肺癌が産生する Transforming Growth Factor- 1(以下 TGF- 1) に高濃度に暴露されていること、TGF- 1 が樹状細胞のアポトーシスを惹起すること」以上がセンチネルリンパ節での樹状細胞減少の原因であることを明らかにした。本研究において、腫瘍自身が産生する TGF- 1 が抗腫瘍免疫に与える影響を検討し、その免疫逃避機構がリンパ節転移の原因の一つであることを明らかにする。

2. 研究の目的

この研究では「腫瘍細胞自身が TGF- 1 などの液性免疫抑制因子を放出することにより、リンパ節(Tumor Draining Lymph node、以下 TDLN)を免疫抑制状態にしている。そのため通常では消去される腫瘍細胞が定着してリンパ節転移が起きる」という仮説を立てた。申請者はこれまで pIRES2-AcGFP1 vector を用いて TGF- 1 強発現扁平上皮癌細胞株を作成、腫瘍由来の TGF- 1 がセンチネルリンパ節の樹状細胞を減少、またその免疫逃避機構がリンパ節転移の原因の一つであることを証明、解析してきた。樹状細胞をはじめとした抗原提示細胞は然るべき機能を果たした後、自然消滅するが、その後の獲得免疫の主演は T 細胞、また B 細胞である。担癌状態であるがゆえに正常状態と異なる異常なサイトカイン産生が担癌個体で誘導されることがあり、その代表的な例が TGF- 1 である。T 細胞を活性化するのに必要なサイトカイン、IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-10 を減少させ、樹状細胞だけではなく、リンパ球へもその影響を直接与えていると考えられる。腫瘍細胞を攻撃し得るはずのリンパ球が豊富であるリンパ節が、なぜ腫瘍を排除できないのか？その免疫逃避機構解明のさらなる発展、詳細な検討を目指す。

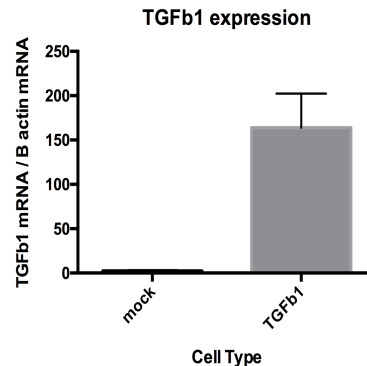
3. 研究の方法

この扁平上皮癌(SCCVII)マウス移植モデルでは AcGFP 遺伝子を用いた定量 PCR を使用して、TDLN に転移があるかどうかを高感度に検索可能である。TGF- 1 強発現扁平上皮癌細胞株と empty vector 癌細胞株を同一マウス左右耳介にそれぞれ 1×10^6 個ずつ移植する。2 週間後に安楽死させ、TDLN を摘出する。その後リンパ節から cDNA 合成を逆転写酵素によって行う。定量は Light Cycler 480 system、Universal Probe 法を用いて、評価は β -actin で標準化し Fit Points 法で行う。また同様のプロトコルでサンプリングした TDLN からリンパ球を採取懸濁した後、CD4、CD8、B220、CCR7、CCL19、CCL21、CD28 抗体などを使用し、フローサイトメトリーを

用いて、NK 細胞、主な T 細胞、B 細胞を含めた各リンパ球 phenotype を検討した。

4. 研究成果

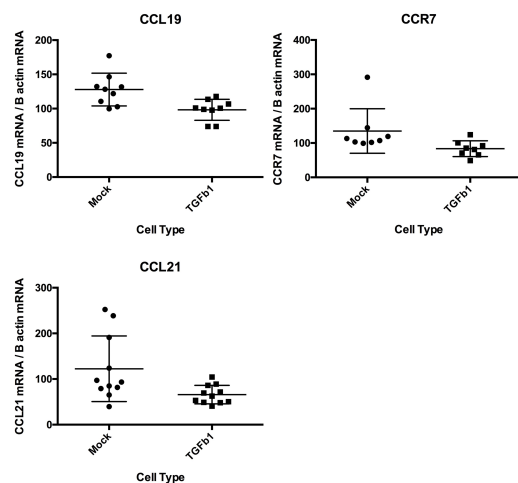
(1) 遺伝子導入細胞における TGF- 1 発現確認



凍結保存、融解、また継代を繰り返しても TGF- 1 発現を失わなかった。

(2) リンパ球ホーミングに関わるケモカインレセプターの検討

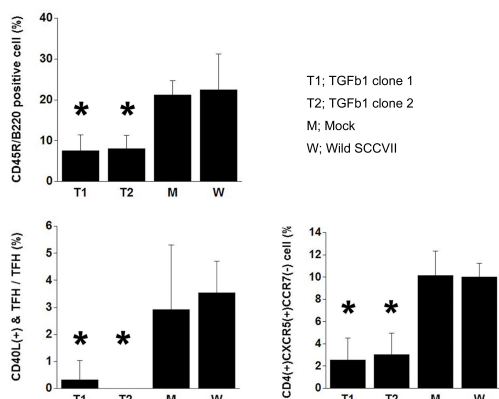
癌細胞移植後 14 日目に摘出サンプリングした TDLN から合成した cDNA を使用し、Light Cycler 480 system、Universal Probe 法を用いた定量 PCR での検討では、樹状細胞遊走に関わる CC chemokine receptor (CCR) 7 においては有意差を認めなかったものの、CCR7 のリガンドである Chemokine (C-C motif) ligand (CCL) CCL19、CCL21 の検討で、TGF- 1 遺伝子導入細胞を移植した TDLN において有意に減少していた(評価は β -actin で標準化し Fit Points 法で行った)。注目していた B7-H1/PD-1 axis であるが、統計学的に有意な差を認めなかった。



(3) 抗腫瘍免疫に関わるサイトカインの検討

それぞれの癌細胞移植後 14 日目に摘出サンプルした TDLN から合成した cDNA を使用し、まずは各サイトカインを網羅的に解析した。Interleukin (IL)-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IFN- γ 、IL-4 を定量 PCR にて検討したが、「IL-4」のみが TGF- β 1 遺伝子導入細胞を移植した TDLN において有意に減少していた。IL-4 は主に Th2 phenotype の活性化 T 細胞や、マスト細胞、抗原提示細胞の一部などの多様な細胞において産生されるため、この意味を説明するのは現状では難しいが、活性化 T 細胞の自己分泌増殖因子であり、また休止期の B 細胞の活性化に関与するため、活性化 T 細胞、B 細胞への影響が示唆された。

(4) TDLN におけるリンパ球 phenotype の検討



それぞれの癌細胞移植後 14 日目に摘出サンプルした TDLN を、懸濁後各抗体を使用し、フローサイトメトリーを用いて、各リンパ球 phenotype を検討した。

- (a) TDLN 内の樹状細胞数は明らかに減少しているが、Annexin V を用いた検討から、樹状細胞減少の原因は「Apoptosis」とは言えなかった。今までの実験結果からは、ケモカインレセプターへの作用による遊走能障害が最も考えられる。
- (b) TDLN 中の NK (Natural Killer) 細胞数に関しては、統計学的に有意な差を認めなかった。抗腫瘍効果を示すと考えられる CD49b+NKG2D+ NK 細胞も検討したが、同様の結果であった。
- (c) T 細胞、B 細胞それぞれの phenotype 検討の中で、B 細胞数 (B220 陽性細胞) 中でも BrdU 陽性 B 細胞の減少が顕著であり、その増殖が阻害されていることが示唆された。また B 細胞の活性化、germinal center の形成に重要である CD40L+ T follicular helper (Tfh) cells やその活性化を示す CD4+CXCR5+CCR7-subset の有意な減少を認めた。

以上から early immunological memory の

障害が示唆されたが、TGF- β 1 がサイトカインとして直接作用するのか、それとも間接的に作用するのか？そのメカニズムを解明するにはさらなる実験追加、詳細な検討が必要である。

TGF- β 1 による抗腫瘍免疫逃避機構がリンパ節転移メカニズムの一因とすれば、外科治療後の補助治療としての TGF- β 1 阻害薬が、手術の局所治療効果を高めることができる。TGF- β 1 阻害薬併用によりがん細胞自身によるこの免疫逃避を減弱させ、抗がん剤や放射線治療の効果を飛躍的に高めることができると予想している。今後は、TGF- β 1 阻害薬の治療効果の観点から、さらなる全容解明を目指したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計1件)

Joint International Oncology (Sentinel Node & Cancer Metastasis) CONGRESS, San Francisco, California, USA
2013年5月27日～5月29日
Imai K, Minamiya Y, Koyota S, Kudo S, Kawaharada Y, Sato Y, Saito H, Motoyama S, Sugiyama T, Ogawa J
Transforming growth factor- β 1 enables tumors to escape the dendritic cell-mediated immune response, and increases tumor-draining lymph node metastasis

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井一博 (IMAI, Kazuhiro)
秋田大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：70396555

(2) 研究分担者

南谷佳弘 (MINAMIYA, Yoshihiro)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30239321