

抗酸化物質の摂食が癌形成時の腸管免疫に与える機能

岡山大学大学院 ヘルスシステム統合科学研究科
増田 潤子

1. 研究の目的と背景

がんの原因になる遺伝子の変異により制御を失った細胞は、過剰な細胞分裂と増殖能と遺伝子の複製エラーの修復機能欠損を伴い、近隣の細胞との接着に関わる遺伝子変異による細胞社会性の崩壊、環境不適切なサイトカインや増殖因子の分泌など様々な遺伝子の異常発現を引き起こし、最終的に遊走能の獲得を経て周辺組織への転移能、すなわち悪性化を獲得する。腫瘍組織は、多様な遺伝子変異を伴う多数のサブクローン化したがん細胞集団により構成されており（腫瘍内不均一性）、この不均一性に富んだがん細胞が、がん関連筋線維芽細胞、血管内皮細胞、周皮細胞および免疫細胞等の多数の間質細胞と共に微小環境を構築し（がん微小環境）、がんの進展に関与している^{1,2}。

腫瘍組織に含まれる免疫細胞には、樹状細胞 (Dendritic cells: DC) やマクロファージ (Macrophages :Mφ) 等の抗原提示細胞 (antigen presenting cells: APC), ヘルパー T 細胞 (CD4 陽性 (+) T 細胞), 細胞傷害性 T 細胞 (CD8⁺ T 細胞: CTL) 等が含まれるが³, 免疫活性を抑制する骨髄由来免疫細胞 (myeloid derived suppressor cells: MDSC) や CD4⁺ 制御性 T 細胞 (regulatory T cells: Treg) の増加⁴⁻⁷ およびがん細胞を直接殺傷する CTL の機能低下により⁸, 抗腫瘍免疫は減弱している。また、がん局部だけでなく全身免疫においても、MDSC の増加による CD4⁺ T 細胞と CD8⁺ T 細胞の細胞数低下およびサイトカイン分泌の減少が生じている⁹。これらは、がん細胞の増殖が腫瘍局所のみならず全身の免疫にも大きな影響を与えることを示唆している。

一方、腸管の表層を覆う粘膜組織にも多くの免疫細胞が存在するが、腸管免疫細胞が粘膜と他組織間において何らかの作用があることは古くから示唆されてきた^{10,11}。そして近年になり行われた詳細な研究によって、炎症反応に伴って腸管に遊走される免疫細胞の解明が進みつつある。例えば、腸管での外来抗原侵入時のみならず、肺に侵入したインフルエンザウイルスの侵入によっても活性化された CD4⁺ T 細胞は腸管へ遊走し、腸内細菌の恒常性の破綻を伴う T ヘルパー (Th)-17 細胞性の粘膜障害を引き起こすことや^{12,13}、腸内細菌によって引き起こされるトル様受容体 (Toll-like receptor: TLR)-5 依存的なシグナリングにより皮下移植したがん細胞の悪性化が引き起こされることが明らかになっている¹⁴。これらの報告は、がん細胞が腸管に直接接触することがなくても活性化された T 細胞が腸管の恒常性に影響を与える可能性を示唆する。そこ

で本研究では、骨、肺、肝臓および脳などの遠隔臓器に転移する性質を持つ BALB/c 系統由来乳がん細胞株 4T1 細胞¹⁵ を同種移植したがんモデルマウスを用いて、腸間膜リンパ節における免疫細胞の質的变化および機能変化を対照群と比較することで、腸管免疫細胞に特異ながん細胞増殖との関連を探るための基礎的実験を行った。

2. 研究の方法

2-1. マウス

5 週齢 BALB/c 系統雌マウスを、チャールズリバー社より購入し、岡山大学動物資源部門津島北施設で飼育した。

2-2. 細胞培養

マウス腸間膜リンパ節から免疫細胞を抽出し、10% ウシ胎児血清および 50 μM 2-メルカプトエタノール (ナカライテスク社) 含有 RPMI-1640 培地で培養した。ウォータージャケットインキュベーター (APC-30D; アステック社) を用い、摂氏 37 度, 5% CO₂, 湿度 100% 条件下で細胞を培養した。

2-3. 抗体および測定セット

抗マウス CD3ε (145-2C11), CD8 (53-6.7) および CD11b (M1/70) 抗体を BD バイオサイエンス社より購入した。抗マウス CD25 (PC61.5), CD16/CD32 (93), および Gr-1 (RB6-8C5) 抗体を e バイオサイエンス社より購入した。抗マウス CD4 (RM4-5), CD11c (N418) および Foxp3 (3G3) 抗体を、トンボバイオサイエンス社より購入した。IFN-γ, IL-4 および IL-10 測定セットを BD バイオサイエンス社より購入した。

2-4. 担がん原発巣モデル動物の作製

1 週間馴化後 (6 週齢) にマウス 1 匹当たり 200 μL の PBS (sham), あるいは PBS に懸濁した 4T1-luc 株 (4T1) を皮下に移植した。

2-5. 腸管免疫能の評価

マウスを安楽死させ、無菌的に摘出した腸間膜リンパ節から免疫細胞を単離した。腸間膜リンパ節の骨髄由来抑制細胞 (MDSCs), ヘルパー (CD4 陽性) T 細胞 (Th), 細胞傷害性 (CD8 陽性) T 細胞 (CTL), CD4 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞 (Tregs) の各サブセットを、蛍光染色細胞解析装置 (AccuriC6, BD バイオサイエンス

社)とFlowJoソフトウェア(ツリースター社)を用いたフローサイトメーター法(FCM法)により測定した。

また、5 µg/mlで抗CsD3ε抗体が固相化された96穴プレート上で、腸間膜リンパ節の免疫細胞(穴当たり40万細胞)を48時間培養し、培養上清中に放出されたIFN-γ、IL-4およびIL-10の濃度を、酵素結合免疫吸着法(ELISA法)にて各セット(BD OptEIA™ ELISA Sets, BDバイオサイエンス社)の説明書に従って測定した。

2-6. 統計解析

生存曲線は Kaplan-Meier 法を用い、ログランク検定で解析を行った。また2群間の統計解析はスチューデントのt検定で解析を行った。グラフ値は平均値±標準偏差で示した。これらの解析はグラフパッドプリズム(バージョン6; グラフパッドソフトウェア社)を用いた。P値が0.05以下の時に有意差があると判断した。

3. 研究内容

本研究では腸炎の治療および大腸がん予防に効果のある化合物の免疫学的検討をするための初期段階として、多くのヒト乳がんと同様に、骨、肺、肝臓および脳などの遠隔臓器に転移する性質を持つBALB/c系統由来乳がん細胞株4T1細胞を同種移植したがんモデルマウスを用いて、腸間膜リンパ節における免疫細胞の質的変化および機能変化を対照群と比較し、がんによる腸管免疫の状態の影響を明らかにした。

4. 研究の実施経過

4-1. 4T1 担がんマウス腸間膜リンパ節に MDSC は存在しない

腸間膜リンパ節(mLN)は腸管に侵入した抗原を捉え遊走したDCが、ナイーブT細胞と自然免疫および適応免疫を開始させる二次リンパ組織である。腸管上皮は比較的硬い組織で、腸管上皮および粘膜固有層から免疫細胞を抽出するには多くの時間を要し、得られる細胞数も極めて少ない。一方、腸間膜リンパ節は容易に摘出することができ、簡単に多くの免疫細胞を抽出することができる。そこで本研究では、4T1担がんマウスのmLNに存在する免疫細胞について解析を行った。

膵臓がん細胞株mPACをC57BL/6系統マウスに同種皮下移植したマウスの脾臓および腸間膜リンパ節では、有意なMDSC数の増加が報告されている。そこで本実験で作製した4T1担がんマウスは、mPAC担がんマウスと同様に腸間膜リンパ節のMDSCが増加するか確認するために、4T1担がんマウスの腸間膜リンパ節に存在するMDSC割合を測定し、対照群と比較した。マウスMDSCは、Gr-1^{hi}CD11b⁺を示す顆粒系(G-MDSC)とGr-1^{intermediate}を示すCD11b⁺単球系(M-MDSC)の

サブセットからなる亜集団であるが既報と異なり、BALB/c系統マウスの腸間膜リンパ節にMDSCはほぼ存在せず、4T1担がんマウスにおいても存在しなかった(図2)。この結果は、BALB/c系統マウスにおいて、腫瘍に伴って増加するMDSCが腸管免疫を制御するメカニズムがほぼ存在しないことを示唆した。

4-2. 4T1 担がんマウス腸間膜リンパ節に見られる T 細胞 依存的炎症

最後に、4T1担がんマウスの腸管免疫状態を総合的に判断するため、腸間膜リンパ節に存在するT細胞を、抗CD3ε mAbによって刺激した時のサイトカイン量を測定した。

腸炎時に、炎症性サイトカインであるIFN-γは有意な増加を認めるが、4T1担がんマウスの腸間膜リンパ節由来リンパ球刺激後の培養上清に含まれるIFN-γ量は、対照群と比べて有意に増加した。また、抗炎症性サイトカインであるIL-4は、IL-10と共に腸炎抑制を担うが、4T1担がんマウスの腸間膜リンパ節由来リンパ球刺激後の培養上清に含まれるIL-4量は、対照群と変わらなかった(図2)。

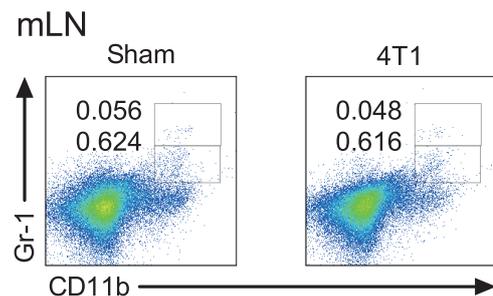


図1 4T1担がんマウス腸間膜リンパ節(mLN)にMDSCは存在しない。5 × 10⁵個の4T1細胞をマウスの右脇腹に皮下移植し14日後に腸間膜リンパ節からリンパ球を抽出し、MDSCをフローサイトメトリーにて解析し、対照群(Sham)と比較した。Gr-1^{hi}CD11b⁺は顆粒系MDSC(G-MDSC)を示し、Gr-1^{intermediate}CD11b⁺は単球系MDSC(M-MDSC)を示す。

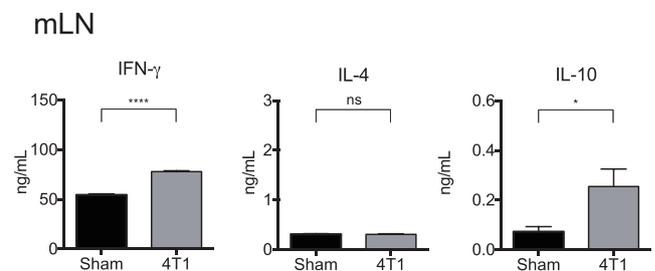


図2 4T1担がんマウスに見られる抗腫瘍活性の減弱。5 × 10⁵個の4T1細胞をマウスの右脇腹に皮下移植し14日後に脾細胞を抽出し、抗CD3ε mAb固相化プレートにて48時間培養した後、培養上清を回収した。

抗炎症性サイトカインである IL-10 は、常に食物や腸内細菌に曝露されている腸管において免疫寛容を担うために大事な役割を担っている。4T1 担がんマウスの腸間膜リンパ節由来リンパ球刺激後の培養上清中に含まれる IL-10 量は、対照群と比べて有意に増加した (図 2)。

5. 研究から得た結論・考察

本研究において、転移能をもつ乳がん細胞株 4T1 を皮下注射することで作製した担がんマウスの腸管の免疫細胞の質的および量的変化を調べた。腸間膜リンパ節では T 細胞の IFN- γ 産生能は有意に増加し、炎症状態が亢進していた。がんは局所だけでなく全身の免疫系に影響を与えるが、非常に初期の段階から腸管の免疫系においても、がん局所や全身とは異なる何らかの免疫的機能が存在する可能性が示唆された。

6. 残された問題、今後の課題

近年免疫チェックポイント阻害剤など、がん免疫を増強させるための分子標的薬開発が活発に行われている^{16,17}。代表的な薬剤であるオプジーボにおいて、ステージ IV の患者を劇的に改善する効果が示される一方で¹⁸、有効な術前診断が存在しないばかりか副作用も強く、わずか 2 割の患者にしか有効でない。その理由は腫瘍内不均一性と、局所および全身の免疫細胞の機能低下にあると考えられる。本実験で示したように、MDSC はがん局所だけでなく全身に増加するため、T 細胞の機能低下が起こるだけでなく、腫瘍と同様にグルコース要求性の高い活性化 T 細胞は腫瘍局所において低栄養状態による疲弊を起こし、抗腫瘍性サイトカインの分泌能低下を引き起こす^{8,19}。ところが本研究で示したとおり、腸管免疫系は腫瘍や MDSC による T 細胞の機能低下を起こさないのならば (図 6)、そして腸間膜リンパ節 T 細胞ががん局所に動員するような作用や腸管免疫を介した全身免疫への改善機能などが存在すれば、腸管に存在する免疫系に働きかけるための経口抗癌剤の開発が将来的には可能になるかもしれない。

7. 参考文献

- 1 Quail, D. F. & Joyce, J. A., Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis., *Nat. Med.*, **19**, 1423-1437 (2013)
- 2 Orimo, A. *et al.*, Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion., *Cell*, **121**, 335-348 (2005)
- 3 Junttila, M. R. & de Sauvage, F. J., Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response., *Nature*, **501**, 346-354 (2013)
- 4 Ostrand-Rosenberg, S. & Sinha, P., Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer., *J. Immunol.*, **182**, 4499-4506 (2009)
- 5 Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R. & Johansson, C. C., Regulatory T cells in cancer., *Adv. Cancer Res.*, **107**, 57-117 (2010)
- 6 Fichtner-Feigl, S. *et al.*, Restoration of tumor immunosurveillance via targeting of interleukin-13 receptor-alpha 2., *Cancer Res.*, **68**, 3467-3475 (2008)
- 7 Sagiv, J. Y. *et al.*, Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer., *Cell Rep.*, **10**, 562-573 (2015)
- 8 Eikawa, S. *et al.*, Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **112**, 1809-1814 (2015)
- 9 Masuda, J. *et al.*, Tumor growth limited to subcutaneous site vs tumor growth in pulmonary site exhibit differential effects on systemic immunities., *Oncol. Rep.*, **38**, 449-455 (2017)
- 10 McDermott, M. R., Clark, D. A. & Bienenstock, J., Evidence for a common mucosal immunologic system. II. Influence of the estrous cycle on B immunoblast migration into genital and intestinal tissues., *J. Immunol.*, **124**, 2536-2539 (1980)
- 11 McDermott, M. R. & Bienenstock, J., Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory, and genital tissues., *J. Immunol.*, **122**, 1892-1898 (1979)
- 12 Hart, A. L. *et al.*, Homing of immune cells: Role in homeostasis and intestinal inflammation., *Inflamm. Bowel Dis.*, **16**, 1969-1977 (2010)
- 13 Wang, J. *et al.*, Respiratory influenza virus infection induces intestinal immune injury via microbiota-mediated Th17 cell-dependent inflammation., *J. Exp. Med.*, **211**, 2397-2410 (2014)
- 14 Rutkowski, M. R. *et al.*, Microbially driven TLR5-dependent signaling governs distal malignant progression through tumor-promoting inflammation., *Cancer Cell*, **27**, 27-40 (2015)
- 15 Tao, K., Fang, M., Alroy, J. & Gary, G. G., Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer., *BMC Cancer*, **8**, 228 (2008)
- 16 Immunotherapy: combine and conquer., *Nat. Med.*, **21**, 415 (2015)
- 17 Couzin-Frankel, J., Cancer Immunotherapy., *Science*, **342**, 1432-1433 (2013)
- 18 Topalian, S. L. *et al.*, Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in

- Cancer., *N. Engl. J. Med.*, **366**, 2443-2454 (2012)
- 19 Kunisada, Y. *et al.*, Attenuation of CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment by Metformin, a Type 2 Diabetes Drug., *EBioMedicine*, **25**, 154-164 (2017)