

研究題目 癌リンパ節転移における免疫抑制環境の成立機序と人為的解除の可視化

研究組織

研究代表者：片貝智哉（新潟大学大学院医歯学総合研究科）

共同研究者：岡崎拓（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：神田泰洋（新潟大学大学院医歯学総合研究科）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

動物モデルを用いたこれまでの癌リンパ節転移に関する研究の多くは、ヒト由来の癌細胞株を免疫不全動物に移入する異種移植系だった。しかし、リンパ球がほとんど存在しない異常なリンパ節への異種癌細胞の転移は実際の状況とはかけ離れていると言わざるを得ない。

本研究では、多様な遺伝子改変系統が樹立されている C57BL/6 系統マウス由来乳癌細胞株 E0771 の乳腺皮下移植モデルを用い、本来の原発部位を反映するとともに、正常なリンパ節組織環境が存在する条件下でリンパ行性転移を再現し、詳細に理解することを目的とした。このモデルでは通常 4～5 週間でリンパ節転移が観察されるが、原発巣および転移巣において宿主免疫系による積極的な癌細胞排除は見られず、免疫応答を抑制する環境が形成されていると推測される。この状況に PD-1 および LAG-3 などの免疫チェックポイント分子が関与している可能性があることから、転移成立の前後に PD-1 および LAG-3 の機能を阻害し、癌細胞と免疫細胞の動態やストローマ細胞との相互作用の変化を生体イメージングにより評価する。これに

より、リンパ節転移においてこれまでに知られていない作用起点を明らかにすることを旨とする。

リンパ節内では活発なリンパ球遊走が見られるが、抗原特異的リンパ球は抗原に接触すると停止し増殖シグナルを受ける。一方、PD-1 などの抑制性受容体シグナルはこの遊走停止を阻害し、リンパ球活性化を抑制することが知られている。したがって、リンパ節内のリンパ球動態や局在、癌細胞とリンパ球、ストローマ細胞間の接触過程を生体イメージングにより観察することで、免疫チェックポイント分子阻害の作用現場をリアルタイムで可視化し、効果を検証することが可能である。

[1-2]研究の方法・経過

1) C57BL/6 マウス系統由来の乳癌細胞株 E0771 に EGFP などの蛍光タンパク質遺伝子やモデル抗原として卵白アルブミン (OVA) 遺伝子を安定導入し、同系マウスの下腹部乳腺皮下に移植、鼠径・腋下リンパ節への転移を誘導する。

2) 癌細胞が浸潤した一次転移 (センチネル)、二次転移リンパ節を回収し、組織切片やホールマウント法を用いた各種蛍光抗体染色、共焦点レーザー顕微鏡観察により、癌細胞および各種免疫細胞

サブセットの所在と組織微細構造(非血球系ストローマ細胞および細胞外マトリクス)の詳細を明らかにする。また、抑制性サイトカインなどの発現変動を定量的に評価する。

3)リンパ節転移成立前・後のマウスに、抗PD-L1抗体を投与し、原発巣増殖やリンパ節転移を評価するとともに、リンパ節の生体イメージングを行い、免疫細胞の組織内動態、癌細胞との接触過程に対する影響を観察する。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

1)EGFP遺伝子を安定発現する乳癌細胞株E0771を作成し、C57BL/6マウス下腹部乳腺皮下に移植すると、2~3週間後に固形癌巣の形成・増殖が進行することを確認した。さらに数週間のうちに所属リンパ節へ転移するものが認められた。しかし、転移の時期や規模のばらつきが大きく、個別ケースを詳細に検討する一方で、定量的に扱うために実験回数を増やし平均化することが必要と考えられた。

2)リンパ節への転移は輸入リンパ管が接続する皮膜下洞への癌細胞の定着に始まり、転移巣の拡大にともなって辺縁部の細胞がリンパ管内皮細胞層の基底膜を越えて組織実質に侵入していた。実質への侵入・移動過程には、癌細胞がストローマ細胞のネットワークに接着し、細胞体を伸長させながら前進していることが示唆された。転移巣内部では血管網が発達しており、この血管を介して遠隔転移に

移行する可能性がある。転移巣内へのマクローファージ様細胞の集積が顕著であり、その役割が注目される。

3)抗PD-L1抗体による抗癌免疫応答の賦活化と癌細胞排除能を検討した結果、E0771細胞の皮下移植直後から抗PD-L1抗体を連続投与すると、原発巣増殖が明確に抑制されたが、移植後1週間以降からの投与では抑制効果が認められず、抑制環境が早期に形成され、それが確立された後は抗PD-L1抗体単独による解除が難しいことを示している。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

免疫チェックポイント分子阻害が乳癌モデルのリンパ節転移における癌細胞・免疫細胞双方の動態に及ぼす影響を評価できる可能性があり、当該分野への波及効果と今後の発展性が見込まれる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表
なし

[3-2]学会発表
なし

【4】今後の課題等

今後、生体イメージングを用いた具体的な細胞動態評価、免疫チェックポイント分子阻害効果の時期特異性や他の分子過程との協調などを追求する必要がある。