

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は、その多くが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であったが、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を観察しても現実の状況とかけ離れていると言わざるを得ない。

本研究では、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においてリンパ行性転移を再現することで、その成立機序を詳細に理解することを目的としている。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、これまでに知られていないリンパ節転移の作用起点を明らかにすることを目指す。

リンパ節内では恒常的に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、各種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、LAG-3 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 および OVA 遺伝子を同時発現する

E0771 細胞を作製した。今後、OVA 特異的 T 細胞レセプターを発現する OT-I マウス由来の T 細胞との反応性、生体内への定着および生体内での OVA 特異的応答を解析に使用していく。

2) EGFP 遺伝子を導入した E0771 細胞の接種により形成されたリンパ節転移癌を二光子顕微鏡観察した結果、短時間では細胞の移動などの動態変化は認められなかった。リンパ節内での動態変化は長時間観察を試みる必要があると考えられる。

3) 乳腺皮下内に E0771 細胞を接種したマウスへの抗 PD-L1 抗体および抗 LAG-3 抗体の併用投与による原発巣への癌細胞排除能を検討した。1 週間後からの連続投与では癌抑制効果が認められ、早期投与での癌応答免疫の賦活化が示された。一方、2 週間後からの連続投与では原発巣での腫瘍増殖が抑制される個体は発生したが、対照群との有意な差は認められず、抗 PD-L1 および抗 LAG-3 抗体併用投与では、免疫抑制環境の形成が進んだ状態での抑制環境の解除は困難であることが示唆された。

さらに、併用投与による腫瘍抑制効果の認められる癌細胞接種 1 週間後からの連続投与において各阻害抗体の作用の詳細を明らかにするため、PD-L1 単独、LAG-3 単独および両阻害抗体併用による腫瘍抑制効果について検討した。抗 LAG-3 抗体単独ではほぼ腫瘍の抑制効果は認められず、併用で見られる腫瘍抑制は主に抗 PD-L1 抗体単独による抑制効果の寄与によるものと判別された。ただし、腫瘍が完全に除去される割合は抗 PD-L1 抗体単独より併用において改善が見られ、LAG-3 抗体の併用により癌制御作用を一部増強する可能性が示唆された。

[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

Kanda Y, Takeuchi A, Ozawa M, Okazaki T,

Katakai T. Involvement of stromal cells in promoting lymph node metastasis of cancer cells. 2019 年 12[1]月 13 日、第 49 回日本免疫学会・学術集会、浜松市

【4】今後の課題等

今後、生体イメージングを用いた長時間観察・細追跡による細胞動態の具体的な評価、免疫チェックポイント分子阻害効果の時期特異性、投与のタイミングなどを検討していく必要がある。