

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10544

研究課題名(和文) IL-17による腫瘍間質細胞を介した乳癌肺転移促進機構の解明と治療モデルの開発

研究課題名(英文) Elucidation of breast cancer lung metastasis by IL-17 through the modulation of stromal cells and the development of treatment model

研究代表者

齋藤 佳菜子 (Saito, Kanako)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90447871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性サイトカインであるIL-17は炎症や自己免疫疾患、癌の増殖において重要な働きを有するが、転移促進の機序は明らかでない。我々はマウス乳癌細胞株4T1を野生型(WT)およびIL-17A欠損(KO)マウス乳腺内に担癌すると、腫瘍径は両群で差はないが、IL-17KOマウスでは肺転移が著明に抑制される系を確立した。本研究ではこのモデルを用いてIL-17Aが腫瘍形成早期の時点で血管新生の増強、単球からM2型マクロファージへの分化促進、腫瘍微小環境の免疫抑制状態に寄与していることを明らかにした。引き続き両群マクロファージの遺伝子発現を解析中であり、その結果から治療モデルにつなげていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移・再発乳癌の治療は困難であり、いずれは遠隔転移から死に至る。本研究では乳癌の転移を促進する機序の一つとして炎症性サイトカインであるIL-17に着目した。我々はIL-17欠損マウスでは著明にマウス乳癌細胞株の肺転移が抑制されることを見出した。本研究でIL-17はマウス乳癌腫瘍組織において単球から抑制性マクロファージへの分化誘導作用、腫瘍血管の新生作用、腫瘍細胞の血中への流入促進、抑制性の腫瘍免疫環境の促進作用を有することが示唆された。さらに転移促進機序を解明することで、腫瘍環境を利用した治療開発につなげていきたい。

研究成果の概要(英文)：IL-17 is a proinflammatory cytokine that plays important roles in inflammation, autoimmunity and cancer. However, the role of IL-17 on tumor metastasis is not still fully understood. We previously showed that IL-17A promoted lung metastasis of mice breast cancer cell line 4T1 before the extravasation of tumor cells by using IL-17A deficient mice. In this study, we found that IL-17A contributed to the enhancement of angiogenesis, the differentiation of M2-like suppressive macrophages from monocytes, and the increase of Foxp3+Treg cells in tumor microenvironment at early stages of tumor growth, shaping in favor of promoting metastasis. The analysis of gene expression profile of IL-17-educated macrophages is ongoing. These results will allow us to establish the treatment models which targets to IL-17.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：IL-17 転移 腫瘍関連マクロファージ 乳癌 制御性T細胞 血管新生

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

IL-17と乳癌

IL-17は炎症性サイトカインであり、乾癬に代表される自己免疫疾患での研究が進み、抗IL-17抗体は既に臨床応用されている。一方IL-17は腫瘍増殖にも関与しており、腫瘍細胞のアポトーシス阻害作用（Cancer Res 2008; 68:3915）、間質の線維芽細胞を介したMMP産生亢進による腫瘍浸潤促進作用や血管新生誘導作用（Blood 2003;101:2620）を有することが報告されている。またヒト乳癌検体を用いた研究では、IL-17産生細胞は約17.8%の乳癌組織で高頻度に浸潤しており、高悪性度（Grade3）、ER/PgR陰性、Triple negative乳癌で有意に多い。さらにIL-17産生細胞の高浸潤症例は無病生存期間（DFS）が短く、術前化学療法を実施した局所進行例に限ると、その差はもっと顕著であった（5年DFS;高浸潤群38.5% vs 低浸潤群81.5%, $p<0.01$, $n=58$ ）（Histopathology 2013; 63:225）。この結果からIL-17は乳癌の進行に寄与している可能性が示唆される。

IL-17による転移促進作用

癌細胞が転移を形成するには、上皮間葉転換（EMT）、浸潤、血管内流入、血中移動、血管外脱出、転移先組織での定着といったプロセスを経る。近年これらの過程にはマクロファージや線維芽細胞、間葉系幹細胞（MSC）などの間質細胞が重要であることがわかってきた。さらに制御性T細胞（Treg）や骨髄由来抑制性細胞（MDSC）などの免疫細胞も抑制性微小環境を形成する。

IL-17がこれらの過程でどのように転移を促進するのかは、まだ十分解明されていないが、最近の報告ではマウス乳癌モデルを用いて、IL-17が抑制活性を有する好中球を動員させ、腫瘍増殖や転移を促進する機序が報告された（Nature 2015; 522:355）。また関節炎マウスにおいて、IL-17は腫瘍細胞上のCXCR4と転移先臓器に発現するCXCL12との相互作用を増強することで乳癌の転移を促進する機序が報告された（BMC Cancer 2014; 14:225）。

研究代表者はこれらの報告とは異なり、マウス乳癌細胞4T1による肺転移モデルにおいて、IL-17KOマウスの原発腫瘍内では腫瘍形成早期の時点で抑制型M2マクロファージの頻度が低下していることを見出した（齋藤、2016年日本癌学会英語口演発表）。マクロファージなどの自然免疫系は、腫瘍排除よりも腫瘍促進的に働くことが明らかになってきている。臨床的にも、CD68陽性マクロファージが腫瘍間質に高浸潤する乳癌は、明らかに再発率が高い（BMC Cancer 2012; 12: 30）。しかし、IL-17による転移制御のためには、IL-17の作用でマクロファージなどの間質細胞が転移をどのように促進しているのか、明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

研究代表者はIL-17Aの欠損マウスではマウス乳癌自然転移株4T1の肺転移が著明に抑制される系を確立した。本研究では、このマウスモデルを用いてIL-17による肺転移促進メカニズムについて、腫瘍間質に存在するマクロファージや線維芽細胞、リンパ球などの細胞に焦点を当て、その機序を明らかにし、さらにIL-17と間質細胞を標的とした乳癌転移制御モデルを開発する。

3. 研究の方法

1) 動物モデル：BALB/cマウスおよびIL-17A欠損マウスにマウス乳癌細胞4T1にLuciferaseを挿入した細胞株を乳腺内、皮下、静脈内投与する。4T1細胞担癌後、3-4週間後に肺転移が形成される。原発腫瘍は経時的に腫瘍径を測定した。4週以降に肺転移結節を計測した。

2) フローサイトメトリー：原発腫瘍組織を摘出し、単細胞レベルに分離し、フローサイトメトリーを用いて浸潤細胞を解析した。また一部の細胞分画をソーターにて分離精製した。

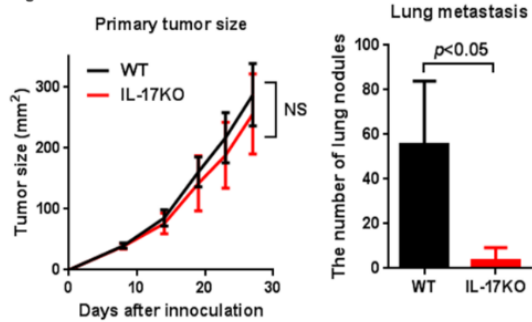
3) 免疫組織化学染色解析：原発腫瘍を摘出し、ホルマリン固定または凍結保存し、組織より切片を作成し、各種表面マーカーを染色した。

4) 遺伝子発現解析：マウス末梢血および腫瘍浸潤細胞を分離精製後にRNAを抽出しcDNAを作成し、各遺伝子発現をRT-PCRで測定した。腫瘍浸潤細胞ではシングルセルRNA解析の手法により免疫関連遺伝子の発現を検討した。

4. 研究成果

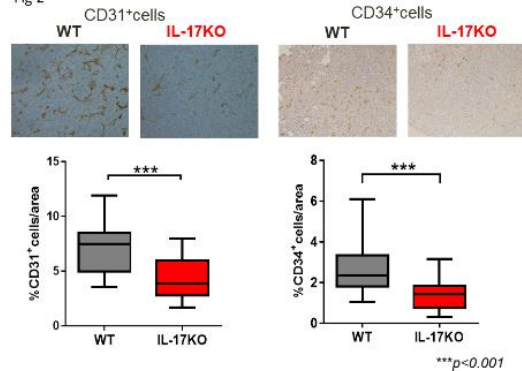
1) マウス乳癌細胞 4T1 に Luciferase (4T1/Luc) を挿入した腫瘍株を野生型および IL-17A 欠損(KO)マウス乳腺内に担癌すると、腫瘍径は両群で有意な差は認めないが、IL-17KO マウスでは野生型に比べて肺転移が有意に抑制される (Fig. 1)。一方、4T1/Luc を両群マウスに静脈内投与すると、両群マウスで肺転移は同程度であった。次に、4T1/Luc 細胞を担癌したマウス血中の循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell: CTC) を Luciferase を指標に経時的に測定したところ、CTC は IL-17KO マウス血中と比較して、野生型マウスの血中で多く検出された。この結果より IL-17A は転移形成の初期の相、すなわち 4T1 細胞が腫瘍局所から血中に入るまでを促進することで肺転移を促進することが示唆された。

Fig 1



2) IL-17 による肺転移促進の機序として、血管新生に着目した。腫瘍形成初期 (day14) での腫瘍局所での血管新生の違いを免疫組織化学染色によって比較した。その結果、IL-17KO マウスの担癌腫瘍は野生型マウス腫瘍にくらべ、血管 (CD31+, CD34+細胞) が有意に減少していた (Fig. 2)。この結果より IL-17A は転移形成前の初期の時点で既に腫瘍血管の増強作用を有していることが示唆された。

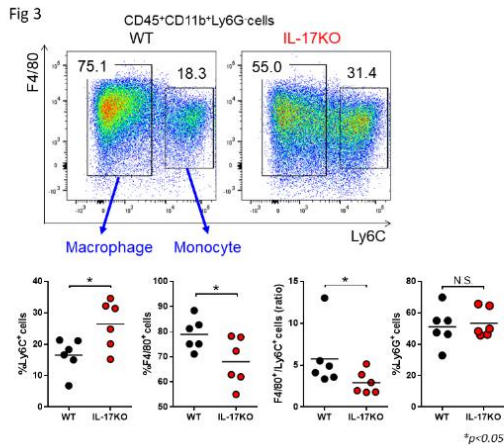
Fig 2



3) 転移の形成には腫瘍関連マクロファージ (Tumor associated macrophage: TAM) や癌関連線維芽細胞 (Cancer associated fibroblast: CAF) などの間質細胞の存在が重要である。これらの間質細胞に対する IL-17A の影響を解析するために、両群マウスに担癌した 4T1 腫瘍を摘出し、フローサイトメトリーおよび免疫組織化学染色によって、浸潤細胞を比較した。その結果、TAM (CD45+CD11b+Ly6G-Ly6C-F4/80+細胞) は野生型に比べて IL-17KO マウスで有意に減少しており、かつ M2 型マクロファージ (CD206-high, MHC class II-low) が有意に減っていた (Fig. 3)。腫瘍浸潤リンパ球では、IL-17KO マウスでは野生型と比べ、CD8+T 細胞の増加と、FOXP3+制御性 T 細胞の低下が認められた。一方、IL-17 は好中球遊走作用があるが、腫瘍局所では好中球数には両群で差を認めなかった (Fig. 3)。CAF (αSMA+) についても、両群において有意な差は認めなかった。

この結果より、IL-17A は腫瘍組織において単球から M2 型マクロファージへの分化を促進すること、さらに分化した M2 型マクロファージを介して肺転移を促進している可能性が示唆された。さらに野生型腫瘍では腫瘍形成の初期から免疫抑制状態が形成されていることが示唆された。

Fig 3



4) IL-17 の作用を受けた TAM の遺伝子発現および機能を検討するため、野生型および IL-17KO マウスに担癌した腫瘍から CD45+CD11b+Ly6G-細胞を cell sorter にて分離精製し、RT-PCR およびシングルセル RNA 解析の技術を用いて、IL-17A の有無による単球・マクロファージの遺伝子発現の違いを解析している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 齋藤佳菜子
2 . 発表標題 IL-17Aによる間質細胞修飾を介した乳癌肺転移促進作用
3 . 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4 . 発表年 2017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
研究 分 担 者	加藤 琢磨 (Kato Takuma) (60224515)	三重大学・医学系研究科・准教授 (14101)	