

<平成 30 年度助成>

抗酸化物質の摂食ががんモデルマウスの腸管免疫に及ぼす影響

増田 潤子

(東京女子医科大学 医学部)

研究目的

がんによる免疫機能の抑制はがんの特徴の一つとして考えられている。さらに、がん細胞は腫瘍微小環境のみならず、脾臓における免疫機能に影響することが示唆されている。しかしながら、がん細胞が腸内の免疫系に与える影響については未だ解明されていない。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もつ 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、脾臓および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し、がんによる全身性免疫抑制の機構を明らかにすることを目的とした。

研究手法

1. マウス

5 週齢 BALB/c 系統雌マウスを、チャールス・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. 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 μ M 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。

3. 抗体および測定セット

抗マウス CD3 ϵ (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。

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 μ L 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。

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 μ g/ml で抗 CsD3 ϵ 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。

6. 統計解析

標準誤差算出と有意差検定は、GraphPad Prism version 9 software package (GraphPad Software 社) で行った。統計解析はスチューデントの *t* 検定、ウェルチの *t* 検定または 1-way ANOVA で解析を行った。グラフ値は平均値±標準誤差で示した。P 値が 0.05 以下の時に有意差があると判断した。

結果

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 1)。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。

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中に含まれる IFN-γ 量は、対照群と比べて有意に増加した (図 2)。

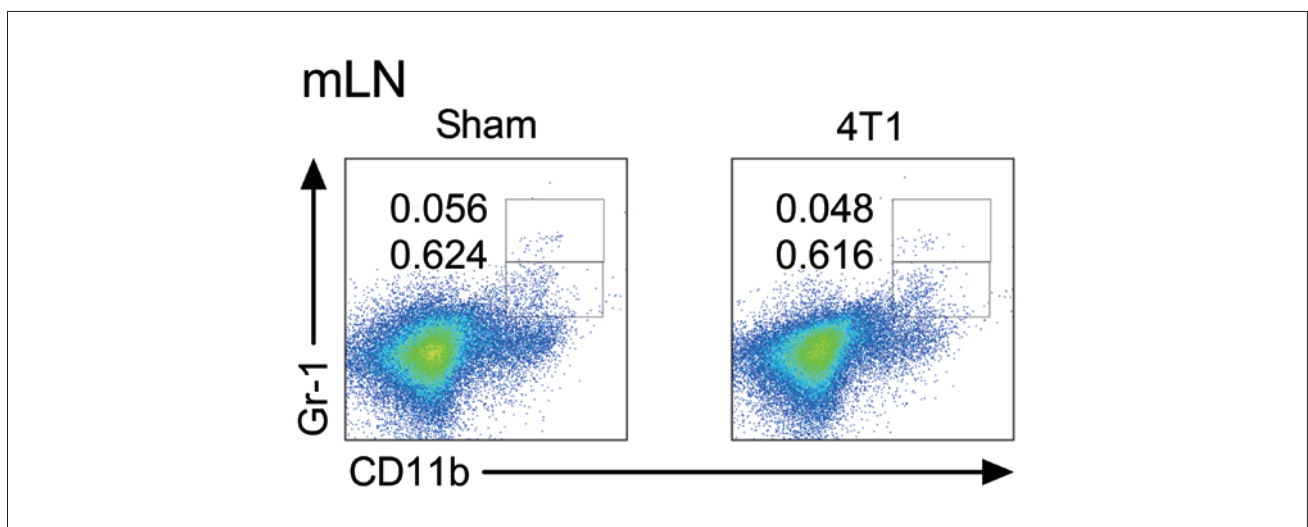


図 1 4T1 担がんマウス腸間膜リンパ節 (mLN) に MDSC は存在しない。5 × 10⁵ 個の 4T1 細胞をマウスの右脇腹に皮下移植し 14 日後に腸間膜リンパ節からリンパ球を抽出し、MDSC をフローサイトメトリーにて解析し、対照群 (Sham) と比較した。Gr-1^{hi} CD11b⁺は顆粒系 MDSC (G-MDSC) を示し、Gr-1^{intermediate} CD11b⁺は単球系 MDSC (M-MDSC) を示す。

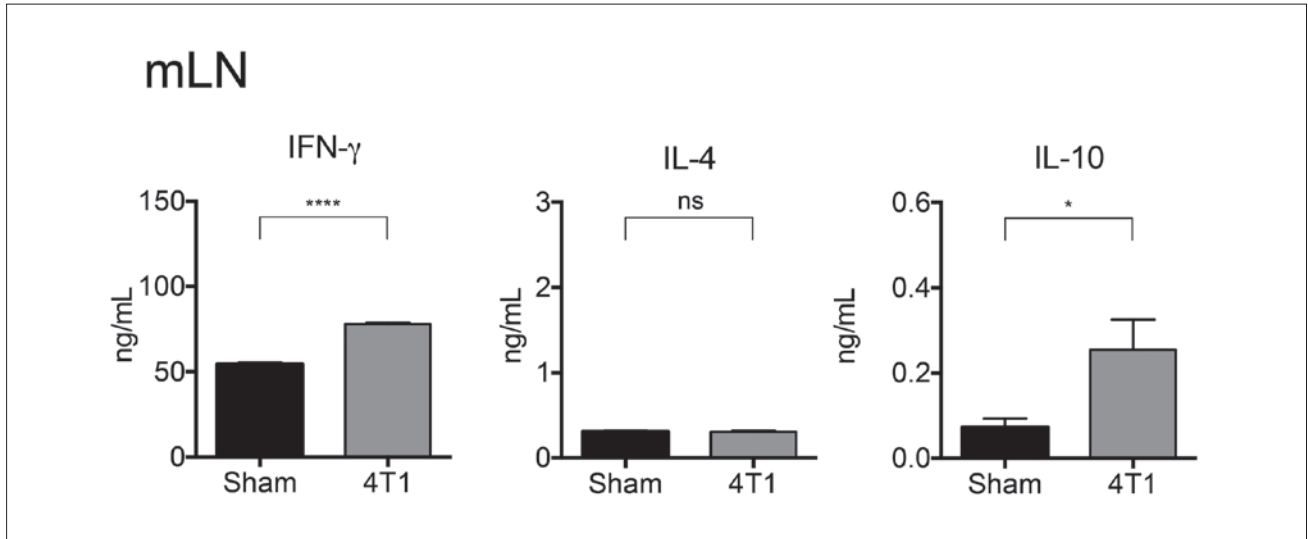


図2 4T1 担がんマウスに見られる抗腫瘍活性の減弱。5 × 10⁵ 個の 4T1 細胞をマウスの右脇腹に皮下移植し 14 日後に脾細胞を抽出し、抗 CD3 ϵ mAb 固相化プレートにて 48 時間培養した後、培養上清を回収した。

抗炎症性サイトカインである IL-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中に含まれる IL-4 量は、対照群と変わらなかった (図 2)。

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。

謝 辞

本研究は、公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団による研究助成により遂行された。ここに深く感謝いたします。

Effects of antioxidants on intestinal immunity in cancer model mice

Junko MASUDA

Tokyo Women's Medical University

Abstract

Suppression of immune functions is one of the characteristics of cancer. Furthermore, it has been suggested that cancer cells affect not only the tumor microenvironment, but also the immune functions in the spleen. However, the effects of cancer cells on the intestinal immune system have not yet been elucidated. In this study, as in many human breast cancers, metastases to distant organs such as bones, lungs, the liver, and the brain can serve as initial steps in immunologically investigating compounds that may be effective in treating enteritis and preventing colon cancer. Using cancer model mice syngeneically transplanted with BALB/c strain-derived breast cancer cell line 4T1 cells, the qualitative and functional changes of immunological cells in the spleen and mesenteric lymph nodes were compared with those of the control group. The purpose of this study was to clarify the mechanism of systemic immunosuppression caused by cancer progression.