

主論文の要旨

Anti-tumor effects of anti-programmed cell death-1 antibody treatment are attenuated in streptozotocin-induced diabetic mice

抗プログラム細胞死 1 抗体投与による抗腫瘍効果は
ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスにおいて減弱する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 糖尿病・内分泌内科学分野

(指導：有馬 寛 教授)

伊藤 雅晃

【緒言】

大腸がんを含む様々な悪性腫瘍の発症リスクは、糖尿病患者において相対的に増加しており、空腹時血糖値および随時血糖値と大腸癌リスクの関連や、糖尿病と大腸がん特異的死亡率との関連が報告されている。また高血糖は T 細胞を含む免疫反応を低下させることが知られており、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病マウスで悪性黒色腫病巣への CD8 陽性 T 細胞浸潤減少が報告されていることから、高血糖による抗腫瘍免疫の低下も示唆される。実際、免疫チェックポイント阻害薬で治療した非小細胞肺癌 (NSCLC) 患者において、糖尿病と全生存期間の負の相関が報告されているが、背景にあるメカニズムは依然として不明である。そこで今回、STZ 誘発糖尿病マウスに MC38 (大腸がん細胞株) を皮下投与し、抗プログラム細胞死 1 抗体 (PD-1-Ab) 投与による抗腫瘍効果につき検討を行った。

【方法】

7 週齢 C57BL/6J マウスに STZ を腹腔内投与し、7 日後を 0 日目として MC38 を皮下投与。5 日目、8 日目、11 日目の計 3 回 PD-1-Ab を腹腔内投与する担癌糖尿病マウスの PD-1-Ab 治療モデルを作成し、14 日目に腫瘍組織と所属リンパ節 (dLN) を採取。STZ (vehicle としてクエン酸バッファー:CB) と PD-1-Ab (vehicle として rat IgG) の有無により対照群 (CB + rat IgG)、PD-1 群 (CB + PD-1-Ab)、STZ 群 (STZ + rat IgG)、STZ + PD-1 群 (STZ + PD-1-Ab) に分け、腫瘍体積増加に対する PD-1-Ab の効果を解析した。採取した腫瘍組織に対する CD8 と CD11c の免疫組織化学 (IHC) から、CD8 陽性腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) 数と CD11c 陽性腫瘍浸潤樹状細胞 (TIDC) 数の組織学的評価を行った。

また高血糖が MC38 細胞のケモカイン発現に及ぼす影響を調べるため、低グルコース (5 mM) または高グルコース (25 mM) 濃度で培養した MC38 細胞 (LG-MC38 および HG-MC38) におけるケモカインおよびケモカイン受容体 84 遺伝子の発現量を RT² Profiler PCR Array により検討した。dLN におけるケモカイン発現への影響を調べるため、4 群のマウスの dLN においても同様に PCR Array 解析を行い、さらに qRT-PCR により検討を行った。

また、PCR 解析で同定した CXCL9 と、CCL7 の受容体である CCR1 および CCR2 について免疫蛍光染色 (IF) で評価を行った。

【結果】

14 日目において、PD-1 群では対照群に比し有意に腫瘍体積が縮小した。一方、STZ + PD-1 群では、STZ 群に比し腫瘍体積の縮小は認められなかった (figure 1D-E)。

また、PD-1 群では対照群に比し CD8 陽性 TIL 数の有意な増加を認め、STZ 群は対照群に比し変化を認めなかった。一方、STZ + PD-1 群では STZ 群に比し CD8 陽性 TIL 数の増加は認めなかった (figure 2A-B)。

MC38 細胞に対する PCR array の結果、HG-MC38 群に比して LG-MC38 群で 1.5 倍

以上の mRNA 発現を示す唯一の遺伝子として CCL7 を同定した (figure 3A)。CCL7 は樹状細胞 (DC) の移動に関与することが知られており、IHC の結果から、対照群に比して STZ 群で CD11c 陽性 TIDC 数の有意な減少を認めた (figure 3B-C)。IF での評価から、対照群の腫瘍で、CCR1 および CCR2 を発現する CD11c 陽性 TIDC を認めた (figure 3D-E)。

dLN に対する PCR array の結果、PD-1 群では対照群に比して 1.5 倍以上発現が上昇し、STZ + PD-1 群では STZ 群に比して発現が上昇しない遺伝子として、CXCL9 と CCR6 を同定した (figure 4B)。さらに qRT-PCR の解析から、STZ + PD-1 群では PD-1 群に比して CXCL9 の mRNA 発現が有意に減少しており (figure 4C)、一方で CCR6 の mRNA 発現は 4 群間で有意差を認めなかった (figure 4D)。IF での評価から、対照群の dLN において CXCL9 を発現する CD11c 陽性 DC を認め、CD8 陽性 T 細胞では CXCL9 発現を認めなかった (figure 4E-F)。

【考察】

今回、正常血糖値マウスにおける抗 PD-1 抗体投与後の腫瘍増殖抑制と CD8 陽性 TIL 数の増加が STZ 誘発糖尿病マウスでは認められないことを明らかにし、STZ 誘発糖尿病が CD8 陽性 T 細胞の MC38 腫瘍への移動を阻害した結果、PD-1-Ab の腫瘍増殖に対する効果が損なわれたことが示唆された。

CXCL9 は抗腫瘍免疫、特に活性化 T 細胞のリクルートにおいて重要な役割を持つことが知られており、リンパ球性絨毛膜炎ウイルス感染マウスにおいて、セントラルメモリー T 細胞をリンパ節周辺にリクルートし、CD8 陽性 T 細胞反応を誘導するのに必須の役割を果たすことが報告されている。今回の結果から、CXCL9 は CD11c 陽性 DC で発現するが CD8 陽性 T 細胞では発現しないことが示され、本モデルにおいて STZ 誘発糖尿病状態が CD11c 陽性 DC における PD-1-Ab 投与後の CXCL9 発現増加を阻害し、PD-1-Ab の腫瘍増殖抑制効果と CD8 陽性 TIL 数の低下を来す可能性が示唆された。

今回、高グルコース濃度で培養した MC38 細胞で CCL7 の発現量が低下し、STZ 誘発糖尿病マウスにおいて CD11c 陽性 TIDC 数が減少したことから、CD11c 陽性 TIDC において CCR1、2 が発現していることを明らかにした。CCL7 は様々な白血球への作用が知られているが、肥満細胞腫細胞株移植マウスモデルにおいて CCL7 をコードする遺伝子導入により DC の腫瘍周囲組織の集積と T 細胞依存性の抗腫瘍免疫が活性化、腫瘍増殖抑制が報告され、また、CCL7 欠損マウス肺がんモデルにおいて、腫瘍組織への DC 浸潤減少と、CD8 陽性 T 細胞の抗腫瘍効果減弱が報告されている。同様に CCL7 遺伝子誘導した肺がんマウスモデルにおいて PD-1-Ab の抗腫瘍効果増強や、NSCLC 患者においても腫瘍の CCL7 高発現と TIDC 数増加と全生存期間との正相関が報告されている。

以上のことから、高血糖により MC38 細胞の CCL7 発現低下が誘導され、DC の腫瘍浸潤が減少し、その結果、dLN における CD11c 陽性 DC によるがん抗原提示に負の

影響が生じた結果、CD8 陽性 T 細胞の腫瘍浸潤が減少した可能性が示唆された。

本研究にはいくつかの **limitation** があり、STZ 誘発糖尿病マウスの結果が糖尿病患者における病態を完全に反映しているとは限らないこと、CD11c 陽性 T1DC の減少が CD8 陽性 TIL の減少につながる機序は不明であること、高血糖に対する治療で PD-1-Ab の抗腫瘍効果が改善するかは不明であることなどが挙げられる。

【結語】

STZ 誘発糖尿病マウスでは PD-1-Ab による抗腫瘍効果が減弱していることが判明し、その背景に CD11c 陽性 T1DC や CD8 陽性 TIL の減少、CCL7 や CXCL9 の発現の減少を伴っていることが明らかとなった。