



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	大腸がん肝転移におけるIL-6の作用機序解明に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	豊島, 雄二郎
Description	配架番号 : 2545
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14080号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77922
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yujiro_Toyoshima_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 豊島雄二郎

学 位 論 文 題 名

大腸がん肝転移における IL-6 の作用機序解明に関する研究
(Studies on the effect of IL-6 on liver metastasis of colorectal cancer)

【背景と目的】

本邦において、大腸がんは罹患率が年々増加し、その主な死因の一つとなる肝転移を制御することは重要な課題である。近年、新たながんの治療法としてがん免疫治療が着目されているが、大腸がんの肝転移と宿主免疫系との関連については、未だ詳細は明らかになっていない。一般に、担がん状態での免疫抑制状態を改善する免疫チェックポイント阻害治療は、良好な抗腫瘍効果を得ているが、全てのがん患者に対して有効ではないことから、がん患者生体内には複数の免疫抑制機構が存在していると考えられている。これまで炎症性サイトカインの一つである IL-6 は、がん患者における血清値が高いと予後やがんの治療効果が悪いという報告がなされ、また最近、大腸がん患者の腫瘍組織において、ミエロイド系免疫担当細胞から IL-6 が産生されるとともに、STAT3 依存的に樹状細胞の成熟・活性化と抗腫瘍エフェクター T 細胞の免疫応答性を抑制する作用効果をもつことが明らかとなった。

本研究において、大腸がんの肝転移における IL-6 の作用機序を明らかにすることを目的として、大腸がん肝転移マウスモデルを作出し、担がん生体で産生される IL-6 について、抗腫瘍免疫応答と肝転移巣の形成に及ぼす効果を精査した。

【材料と方法】

野生型 BALB/c マウスあるいは同系の IL-6 欠損マウスを使用し、GFP を導入したマウス大腸がん CT26 細胞株を脾臓内に移植する大腸がん肝転移マウスモデルを作出した。CT26 細胞の移植 14 日後における肝転移巣の形成について、肝臓組織の HE 染色および *in vivo* イメージング法により、解析・評価した。また肝臓組織に浸潤している免疫担当細胞について、抗 CD11c 抗体および抗 CD3 抗体を使用した免疫組織化学染色による評価を行うとともに、肝臓組織より免疫細胞群を回収し、フローサイトメトリーにより解析を行った。肝臓内の CD11c 陽性樹状細胞をセルソーターを使用して単離し、IL-12p35、IL-12p40 及び IFN- α/β の遺伝子発現レベルについて定量 PCR 法によって、また CD8 陽性 T 細胞を単離し、Perforin 及び Granzyme B の細胞内発現レベルについてフローサイトメトリーによって、それぞれ解析・評価した。さらに *in vitro* 実験にて、CT26 細胞をターゲット細胞、肝転移巣から回収した免疫担当細胞をエフェクター細胞として共培養した後に、ターゲット細胞における 7AAD 陽性細胞をフローサイトメトリーにより解析し、エフェクター細胞の細胞傷害活性を評価した。次に大腸がん肝転移マウスモデルに対して、樹状細胞・マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞を除去する試薬あるいは抗体を投与し、大腸がんの肝転移巣形成に関与するエフェクター細胞の探索と同定を行った。また IL-12 に対する中和抗体、IFN- α/β の受容体 (IFN-AR1) に対するアンタゴニスト抗体を投与し、大腸がんの肝転移における各サイトカインの関与を検証した。最後に大腸がん患者の原発および肝転移切除検体を用いて IL-6 および PD-L1 の発現について免疫組織化学染色法にて解析、評価するとともに、無病生存率との関連を検討した。

【結果】

大腸がん肝転移モデルにおいて、野性型マウスに比べ IL-6 を欠損したマウスでは肝転移巣の形成が著しく抑制されるとともに、有意に生存が延長した。また IL-6 欠損マウスの肝転移巣において、MHC class II を高発現する成熟型 CD11c 陽性樹状細胞およびエフェクターメモリー型の CD8 陽性 T 細胞が高度に浸潤していることを見出した。さらに IL-6 欠損マウスの肝臓内から単離した CD11c 陽性樹状細胞において、IL-12p35、IL-12p40、IFN- α 及び IFN- β の遺伝子発現レベルが高いこと、CD8 陽性 T 細胞において Perforin 及び Granzyme B の発現レベルが高いこと、肝臓由来のリンパ球の細胞傷害活性が高いことを確認した。また IL-6 欠損マウスにおける肝転移巣形成の抑制は、クロドロン酸リポソームの投与による樹状細胞やマクロファージの除去および抗 CD8 抗体投与による CD8 陽性キラーT 細胞の除去によって増悪し、本モデルにおける抗腫瘍エフェクター細胞である可能性が示された。さらに IL-6 欠損マウスに対する抗 IL-12 抗体及び抗 IFN-AR1 抗体の投与により肝転移巣の形成が増悪し、大腸がんの肝転移の抑制に関与する可能性が示唆された。本研究において、IL-6 欠損マウスの肝転移巣を形成している CT26 細胞について精査したところ、MHC class I の発現が上昇する一方で、免疫抑制性 PD-L1 分子の発現レベルも有意に上昇することを見出した。そこで IL-6 欠損マウスに対する抗 PD-L1 抗体を投与したところ、肝転移巣の形成がさらに抑制されるとともに、生存率も著しく延長されることが確認された。最後に大腸がん患者の臨床検体を用いた検討で、原発腫瘍組織における IL-6 発現が低値である症例は、PD-L1 の発現が陰性あるいは陽性に関わらず、無病生存率が有意に延長し、IL-6 の発現の有無が大腸がん患者の独立した予後因子であることが分かった。

【考察】

本研究結果より、担がん生体内で産生される IL-6 が、樹状細胞および抗腫瘍キラーT 細胞の誘導および機能を抑制し、大腸がんの肝転移巣の形成を促進する新たな作用メカニズムの存在が考えられた。また本研究で IL-6 欠損マウスを使用した大腸がん肝転移モデルにおいて、抗 PD-L1 抗体投与による抗腫瘍効果がさらに亢進したことから、IL-6 は PD-1/PD-L1 とは異なる機序で免疫抑制を誘導している可能性が示唆された。従って IL-6 シグナル伝達経路は、大腸がん患者の抗腫瘍免疫を介した大腸がん細胞の肝転移を制御する新しいターゲットになることが考えられた。さらに患者臨床検体を用いた検証結果から、大腸がん原発腫瘍組織における IL-6 発現の有無が独立した予後予測因子であることが明らかとなり、初回切除後の免疫チェックポイント阻害治療を含む術後がん治療の最適化に資する可能性も考えられた。

本研究で得られた知見により、大腸がん肝転移において新しい制御法の確立に繋がる可能性があり、今後、大腸がん患者に対し、より効果の高い治療法の開発への貢献も期待されるところと考えられる。

【結論】

本研究において、大腸がん肝転移マウスモデルを使用した検討により、担がん生体内で産生される IL-6 が宿主樹状細胞やキラーT 細胞の機能を抑制し、大腸がん細胞の肝転移巣形成を促進する新たな作用メカニズムが明らかとなった。またヒト臨床検体を用いた検証により、大腸がん原発巣における IL-6 の発現が、肝転移を含めた大腸がんの再発や生存率に関連することが示された。

本研究結果から、担がん環境下での IL-6 を標的とし、抗腫瘍エフェクター細胞を効率よく導入、活性化することで大腸がんの肝転移を抑制する新たな治療法の確立に繋がる可能性が期待される。