

主論文

Regulatory T cells function at the early stage of tumor progression in a mouse model of tongue squamous cell carcinoma

(マウス舌扁平上皮早期癌における腫瘍浸潤と制御性 T 細胞の役割)

【緒言】

これまでに様々な癌種で Treg は患者の生存期間を短縮させると報告されているが、頭頸部領域の悪性腫瘍においてははっきりしていない。我々は以前予後不良な舌扁平上皮癌において予後良好群と比較し癌病巣における Treg の浸潤がより顕著であることを報告した。しかし、ヒト手術検体を用いた研究では Treg の浸潤が癌が進行した結果なのかあるいは癌の進行を促した原因なのかの判断は困難である。そこで、我々は Treg の浸潤と癌の進行を経時的に観察する必要があると考えた。

4NQO はアデノシンをグアノシンへの置換を引き起こし細胞内の酸化ストレスを誘導し、突然変異や DNA 鎖の切断を起こす。この効果はタバコ暴露による遺伝子変化に類似し、4NQO はタバコへの暴露モデルとして使用できる。4NQO は口腔・食道の癌を誘導する。

COX は炎症性メディエーター酵素であり、炎症において重要な役割を果たす。大きく COX-1 と COX-2 に分けられ、COX-1 は安定してほとんどの組織に存在し宿主の恒常性をつかさどっている。COX-2 は炎症誘導性メディエーターとして重要であり、腫瘍微小環境において PGE2 の増加を促しナイーブ CD4 細胞に Foxp3 を誘導する。結果として COX-2 は Treg の腫瘍浸潤と相関し、Treg によるエフェクター T 細胞の阻害効果は COX-2 阻害剤と選択的 PGE2 受容体抗体で抑制できると言われている。

【材料と方法】

この研究は岡山大学医歯薬大学院 (OKU-2013267) の動物実験制御委員会で承認された。6 週齢 C57/BL/6 雄マウス 60 匹には飲料水に 4NQO を含んだものを投与し、そのうち 20 匹は 4NQO のみ、40 匹には食事にセレコックス (COX-2 選択的阻害薬) を混じて与えた。セレコックス投与 40 匹のうち 20 匹はヒト常用量、20 匹には 3 倍量が与えられた。20 匹のコントロールマウスには純水と通常の食事が与えられた。倫理的見地から舌癌マウスは深部麻酔下に 30 週までに屠殺した。

4 グループ (対照、4NQO のみ、4NQO+標準量 COX-2 阻害剤、4NQO +3 倍量の COX-2 阻害剤) のそれぞれから 5 匹のマウスを 15 週~30 週に 5 週おきに屠殺した。

腫瘍進展を HE 染色で診断した。自動 Bond Max 染色機 (Leica Biosystems, Melbourne, Australia) を使用してマウス単クローンの抗 CD8 抗体 (1:200 413211; Nichirei, Tokyo, Japan) とウサギ多クローンの抗 Foxp3 抗体 (1:300 ab54501; Abcam, Cambridge, UK) で染色した。Foxp3 染色を施行した代表的な切片で CD4 (1:1000 ab183685; Abcam, Cambridge, UK) も同時に染色した。腫瘍の主要切片を選び、200 倍顕微鏡視野で陽性細胞数をカウントした。

冷凍舌組織を PowerMasher II で粉碎し、RNA 量を HighPureRNATissueKit か miRNeasyMiniKit で抽出した。cDNA には SuperScriptVILOMasterMixkit を用いた。定量的

な解析のため TaqManGeneExpressionAssays と StepOnePlusRT-PCR システムで標準的なプロトコールに従って Foxp3,IL-10,TGF- β ,CCL17,CCL20,CCR4 と β -アクチンの多重 RT-PCR を施行した。

結果を 4NQO のみ投与群と対照群、COX-2 選択的阻害薬投与量の異なる 3 群（対照、常用量、3 倍量）間、で比較検討した。解析には STATA12.1（Stata Corp,College Station,TX,USA）を用いた。

【結果】

4NQO 投与群の舌では 10～15 週で中等度～高度異形成、15～20 週で高度異形成から扁平上皮癌、25 週で 100%扁平上皮癌が認められた。舌扁平上皮癌は高～中分化癌であり低分化癌や未分化癌は認められなかった（図 1）。4NQO のみ投与群と COX-2 選択的阻害薬投与群に病理学的な違いは観察されなかった。

RT-PCR

4NQO のみ投与群の舌での Foxp3 発現は 15 週と 20 週で対照群に比較し著明に高値であったが腫瘍進行とともに減少した（図 2a b）。IL-10 のレベルは 4NQO のみ投与群で対照群マウスに比較し高い傾向があり腫瘍の進行とともに減少傾向にあった。TGF- β の発現は 15 週・20 週・30 週で 4NQO のみ投与群に比較し対照群で高値であった。発現量は変化なかった（図 2c）。COX-2 選択的阻害薬の投与は Foxp3・IL-10・TGF- β の発現レベルに影響を与えることはなかった（図 3a-c）。

4NQO のみ投与群の舌における CCL20 の発現は対照群より高値であった。CCL17 と CCR4 の量は 4NQO のみ投与群と対照群間に違いは認めなかった。COX-2 選択的阻害薬の投与は投与しなかった群と比較し CCL17・CCR4 の発現レベルに影響を与えることはなかったが、人標準量の 3 倍量の投与は CCL20 を抑制する傾向があった（図 5a-c）。

CD8 陽性細胞は殆ど確認できなかったため結果に記載していない。殆どの Foxp3 陽性細胞が CD4 も陽性であることを確認した（図 6a）。Foxp3 陽性細胞が最も豊富に分布する 5 視野のなかで、陽性細胞の数は対照群や 4NQO+COX-2 阻害剤群に比較し 4NQO のみ投与群の腫瘍発生早期において高かった（図 6 b）。4NQO のみ投与群の Foxp3 陽性細胞数は腫瘍進行とともに減少したがその他の 3 群では変化はなかった。Foxp3 陽性細胞数は対照群と COX-2 阻害薬投与群の間で違いは認めなかった。Foxp3 陽性細胞は腫瘍巣よりも腫瘍浸潤先端部に観察された（図 6c-e）。COX-2 選択的阻害薬は癌の進行を抑制することはなかったが浸潤部先端での Treg の浸潤を抑制する傾向があった。

【考察】

Treg は口腔扁平上皮癌に対する癌免疫を抑制するとされており、免疫抑制は Treg から産生される IL-10 と TGF- β によって生じ、Treg と癌細胞の直接の接触を必要としない。IL-10 や TGF- β のような阻害性サイトカインの役割にはまだ不明な点が多いが、Treg の発生や Tr1 細胞の機能に大きな役割を果たす。本研究では、マウスの舌扁平上皮癌発生初期における Treg 量は対照マウスの 10 倍以上であった。我々は Treg は主として舌癌発生初期における役割が大きいと

予測した。

腫瘍における抗原提示細胞の MHC クラス I の発現低下や腫瘍細胞での MHC クラス II の発現低下を誘導する IL-10 は腫瘍の免疫回避を促す。本研究では腫瘍進行とともに IL-10 レベルが低下する傾向があったが、Foxp3 の発現の低下傾向ほど明確ではなかった。その理由は、IL-10 が腫瘍細胞と Treg 両方によって産生されるからかもしれない。つまり、腫瘍は増大していくが本研究で Treg は減少していくことがわかったからである。腫瘍発生進行過程における IL-10 の役割はまだ議論の余地があるが、我々は癌微小環境下の IL-10 は主として癌発生初期において進行を促す働きがあるのではないかと考えた。

我々は TGF- β のレベルは IL-10 のレベルと同調していると推測したが、TGF- β の発現レベルは対照マウスよりも舌癌マウスで低く、特に癌発生初期ではその傾向が顕著であった。実際、TGF- β は腫瘍の発生段階やタイプによって進行を促すこともあれば抑制することもあるとされている。扁平上皮癌においては、癌発生初期には進行を妨害する役割を、進行期にはさらに進行させる働きがある。TGF- β の細胞増殖抑制効果は腫瘍進行とともに失われ、癌進行期では腫瘍浸潤や遠隔転移を引き起こす。我々は、TGF- β の発現は舌扁平上皮癌発生には不都合のため進行の初期段階では何らかの機序でダウンレギュレーションされ、今回の実験期間の 30 週よりも長く観察すると TGF- β の発現増強を観察できたかもしれないと考えた。

我々は COX-2 選択的阻害薬は Treg を減少させ、その結果舌扁平上皮癌の進行を抑制するのではないかと予想した。Treg の抑制効果は主として COX-2 により誘導される PGE2 産生に依存しており、IL-10 や TGF- β ではないという報告もある。COX-2 選択的阻害薬は肺癌患者において生存率を向上させた。本研究では COX-2 選択的阻害薬は舌扁平上皮癌の進行を抑制せず、舌組織における Treg 量を減少させることもなかった。しかしながら Treg は腫瘍のなかの浸潤部先端に豊富に存在し COX-2 選択的阻害薬には同部位での浸潤を抑制する効果があると思われた。

Treg は化学受容体の CCR4 と CCR8 を発現し、CCR4 と CCR8 は Treg を抗原が提示される部位や炎症のあるエリアに T 細胞の活性化を抑制するために誘導する。CCL17 は CCR4 のリガンドであり Treg は CCL17 と CCL20 に反応して誘導される。本研究では、CCL17 と CCL4 の発現量の変動はなかったが、CCL20 は標準マウスに比較し 4NQO 投与群マウスの舌で増加していた。また、COX-2 選択的阻害薬は CCL17 や CCR4 の発現量には影響しなかったが、高容量の COX-2 選択的阻害薬は CCL20 の発現を抑制した。COX-2 選択的阻害薬には舌扁平上皮癌の局所浸潤をある程度抑制する効果があるのではないかと考えられた。

【結論】

本研究では COX-2 選択的阻害薬が明らかに Treg の浸潤を抑制したわけではなく、Treg が必ずしも舌癌腫瘍免疫にとって不利に働くとは言い切れなかった。しかし、本研究で示された Treg の動態は、舌癌発生進行における基本モデルとして考えることができ、今後の研究に役立つ可能性があると思われた。