

論文の内容の要旨

1 申請者

防衛医科大学校 西井 慎

2 論文題目

水回避ストレスが腫瘍免疫・膵癌の進展に与える影響の検討

3 論文の内容の要旨（博士：2,000 字程度）

（1）背景

がん患者の数は、人口増加と高齢化により大幅に増加している。膵臓癌の発生率は上昇しており、世界で7番目に多いがん関連死の原因である。膵臓癌のほとんどの症例は、進行した段階で診断され、治療の進歩にもかかわらず、5年生存率は2～9%であり、全てのがんの中で最も予後が悪い。化学療法及び免疫チェックポイント阻害剤などの内科治療の発展は目覚ましいが、予後改善にはまだ不十分な治療成績である。

一方、現代社会では精神的ストレスが増大している。精神的ストレスは免疫反応の異常を介して、いくつかの悪性新生物の進展に影響を及ぼすと報告されている。また慢性的ストレスは細胞障害性 T 細胞の活動性、Th1 細胞による Interferon-gamma (IFN- γ) および Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) といった炎症性サイトカイン産生を抑制する。

本研究では、精神的ストレスがマウス膵臓癌の進展を促進するという仮説のもと、マウス膵臓癌モデルに対して、精神的ストレスの一種である水回避ストレス (Water avoidance stress : WAS) 負荷の膵臓癌進展への影響に関する検討を行った。さらに、その作用機序を調べる目的で、傍腫瘍領域血管への脾臓リンパ球接着に着目し、共焦点顕微鏡を用いる生態観察を中心とした解析を実施した。

(2) 方法

Nano-lantern 遺伝子組換え後の 5×10^5 個のマウス膀胱癌細胞 (C57BL/6 マウス由来の膀胱癌細胞 : Pan02 株) を, 5 週齢の C57BL/6J マウスの膀胱に同所性に移植した. 2 週間後にセレンテラジン h の静脈内投与による発光を観察して, 腫瘍の生着を確認した. 続いて, 毎日 1 時間を連続 10 日間, WAS または Sham-WAS 負荷を実施した. その後, 行動試験としてビー玉埋込試験とオープンフィールド試験を実施した. 膀胱移植から 6 週間後に腫瘍体積を測定した. 傍腫瘍領域の組織を用いて IFN- γ , TNF- α の mRNA 発現量を quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) 法で測定した. 膀胱に浸潤しているリンパ球を分離し, フローサイトメトリーで解析した. CD4, CD8 陽性リンパ球の傍腫瘍領域浸潤, 傍腫瘍領域の血管内皮における細胞間接着分子 1 (Intercellular adhesion molecule 1 : ICAM-1) の発現を, 免疫組織化学染色で評価した. 膀胱移植の 2 週間後に, 担癌マウスに WAS を負荷し, Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) 標識リンパ球を注射して, 共焦点顕微鏡を用いた生態観察により, 傍腫瘍領域に接着したリンパ球の数を解析した. 7 週齢の健常マウスに WAS を負荷し, 脾臓リンパ球の接着分子発現をフローサイトメトリーで評価した.

(3) 結果

WAS 後 4 週間にわたって, WAS 群は Sham 群に比し, 有意に体重が増加していた. WAS セッション中の便個数は WAS 群で有意に多かった (12.6 ± 0.5 vs. 9.5 ± 0.3 個). ビー玉埋没試験では, WAS 群は Sham 群よりも埋没ビー玉数が有意に多かった (7.2 ± 0.8 vs. 1.7 ± 0.4 個). オープンフィールド試験では, WAS 群と Sham 群の間で, 総歩行距離, 中央ゾーンの総歩行距離, 中央ゾーンエントリー回数, および中央ゾーン滞在時間に有意差を認めなかった.

WAS 群の腫瘍体積は Sham 群の腫瘍体積に比し, 有意に増大していた (677 ± 61 vs. 381 ± 33 mm³).

脾臓に浸潤しているリンパ球のフローサイトメトリー解析では、WAS 群の CD8 陽性 T リンパ球の比率は Sham 群よりも有意に低かった (23.7 ± 4.0 vs. 37.7 ± 4.3 %) .

免疫組織化学染色では、WAS 群の傍腫瘍領域 CD8 陽性細胞の浸潤数は、Sham 群よりも有意に少なかった (80.7 ± 13.2 vs. 110.5 ± 12.3 個/mm²) . また、WAS 群の傍腫瘍領域 CD4 陽性細胞の浸潤数は、Sham 群よりも有意に少なかった (102.5 ± 5.4 vs. 169.5 ± 26.5 個/mm²) .

共焦点顕微鏡による生態観察では、WAS 群における CFSE 標識リンパ球静脈投与 15 分後の傍腫瘍領域の接着リンパ球数は、Control 群よりも有意に少なかった (6.3 ± 1.4 vs. 19.5 ± 0.9 個/mm²) .

免疫組織化学染色において、WAS 群の ICAM-1 発現面積は、Sham 群よりも有意に減少していた ($61,261 \pm 9,507$ vs. $123,382 \pm 23,690$ μm²/mm²) .

脾臓リンパ球における接着分子のフローサイトメトリー解析では、WAS 群の CD3 陽性 T リンパ球における CD11a/CD18 の発現は、Control 群よりも有意に増加していた (99.9 ± 0.0 vs. 99.8 ± 0.0 %) . WAS 群と Control 群の間で CD3 陽性 T リンパ球における CD49d 発現に有意差はなかった (58.8 ± 3.1 vs. 55.2 ± 1.8 %) . WAS 群の CD3 陽性 T リンパ球における CD62L 発現は、Control 群よりも有意に増加していた (89.3 ± 0.2 vs. 87.7 ± 0.5 %) .

傍腫瘍領域組織の qRT-PCR 法による解析では、WAS 群の TNF-α mRNA 発現は、Sham 群よりも有意に減少していた (0.81 ± 0.20 vs. 1.80 ± 0.27) .

(4) 考察

本研究では、WAS 負荷が脾癌実験動物モデルに行動変容を惹起し、傍腫瘍領域の IFN-γ mRNA 発現抑制、傍腫瘍領域の CD4, CD8 陽性 T リンパ球浸潤抑制などを介して、脾癌進展の促進につながることを明らかにした. その作用機序は、WAS 負荷による精神的ストレスが慢性的ストレスとして認識され、交感神経系を介して TNF-α 産生を減少させ、それに伴い血管内皮の ICAM-1 発現が減少し、細胞傷害性 T リンパ球を含むリンパ

球の傍腫瘍領域へのマイグレーションが減少することによると推察される。

膵臓癌の治療抵抗性の根底にある正確なメカニズムは不明である。しかし、本研究により、傍腫瘍領域の血管内皮における ICAM-1 などの接着分子の発現増加、細胞傷害性 T 細胞浸潤の増強を誘発するような介入が、精神的ストレス下の膵臓癌の新しい治療法の開発につながる可能性があると考えられた。

4 キーワード（5 個程度）

「膵癌」，「水回避ストレス」，「精神的ストレス」，「細胞間接着分子」，
「CD8 陽性 T リンパ球」