

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

にしい しん

西 井 慎

(消化器病学専攻)

防衛医科大学校

令和4年度



# 目次

第1章 緒言	1
第1節 膵臓癌	1
第2節 マウス膵臓癌モデル	1
第3節 精神的ストレス	2
第4節 抗腫瘍免疫	3
第5節 本検討における仮説と目的	3
第2章 社会的敗北ストレスが膵癌進展に与える影響の検討	4
第1節 目的	4
第2節 方法	4
第1項 動物	4
第2項 膵癌株化細胞の培養	5
第3項 膵癌株化細胞の移植	5
第4項 発光性バイオプローブによる腫瘍生着確認	6
第5項 社会的敗北ストレス	6
第6項 行動試験	6
第7項 腫瘍サイズ測定	7
第8項 膵臓に浸潤したリンパ球のフローサイトメトリー解析	8
第9項 統計処理	8
第3節 結果	9
第1項 社会的敗北ストレスによる行動変容	9
第2項 社会的敗北ストレスが膵癌進展に与える影響	9
第3項 社会的敗北ストレスが腫瘍免疫に与える影響	9

第 4 節 小括	9
第 3 章 水回避ストレス（Water Avoidance Stress : WAS）が腫瘍免疫・ 膵癌の進展に与える影響の検討	10
第 1 節 目的	10
第 2 節 方法	10
第 1 項 動物	10
第 2 項 膵癌株化細胞の培養	10
第 3 項 膵癌株化細胞の移植	10
第 4 項 発光性バイオプローブによる腫瘍生着確認	10
第 5 項 水回避ストレス	11
第 6 項 行動試験	11
第 7 項 腫瘍サイズ測定	12
第 8 項 qRT-PCR 法	12
第 9 項 膵臓に浸潤したリンパ球のフローサイトメトリー解析	12
第 10 項 免疫組織化学染色	12
第 11 項 統計処理	13
第 3 節 結果	14
第 1 項 WAS による行動変容	14
第 2 項 WAS が膵癌進展に与える影響	14
第 3 項 WAS が傍腫瘍領域の IFN- $\gamma$ mRNA に与える影響	14
第 4 項 WAS が膵臓・膵癌に浸潤するリンパ球に与える影響	14
第 4 節 小括	15

第4章	水回避ストレスが傍腫瘍領域血管への脾臓リンパ球接着に 与える影響の検討	16
第1節	目的	16
第2節	方法	16
第1項	動物	16
第2項	膵癌株化細胞の培養	16
第3項	膵癌株化細胞の移植	16
第4項	発光性バイオプローブによる腫瘍生着確認	16
第5項	水回避ストレス	17
第6項	脾臓リンパ球の蛍光標識	17
第7項	共焦点顕微鏡観察	17
第8項	統計処理	18
第3節	結果 WAS が傍腫瘍領域のリンパ球接着に与える影響	18
第4節	小括	18
第5章	水回避ストレスが傍腫瘍領域血管の接着分子・脾臓リンパ球 の接着分子に与える影響の検討	19
第1節	目的	19
第2節	方法	19
第1項	動物	19
第2項	水回避ストレス	19
第3項	脾臓リンパ球のフローサイトメトリー解析	19
第4項	免疫組織化学染色	20
第5項	qRT-PCR 法	20
第6項	統計処理	20

第3節	結果	21
第1項	WASが傍腫瘍領域血管内皮の接着分子に与える影響	21
第2項	WASがリンパ球の接着分子に与える影響	21
第3項	WASが傍腫瘍領域のTNF- $\alpha$ mRNA発現に与える影響	21
第4節	小括	22
第6章	総括	23
第7章	考察	24
第8章	結論	29
	謝辞	30
	略語説明	31
	参考文献	33
	図表	38

# 第 1 章 緒言

## 第 1 節 膵臓癌

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(1). 膵臓癌は発生率が上昇しており、世界で 14 番目に多いがんであり、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(2).

膵臓癌は既存の多くの抗腫瘍治療に対して抵抗性を示す. 免疫チェックポイント阻害剤は他のいくつかの癌で標準治療になっているが、膵臓癌においては、T 細胞チェックポイント受容体 (PD-1, CTLA-4) やそのリガンド (PD-L1) を標的にした薬剤は効果に乏しく、現在まで様々な免疫チェックポイントを標的にした治療薬で成功を収めているものはない. 癌細胞、ペプチド、抗原提示細胞などを用いた腫瘍ワクチン、組換えサイトカインといった免疫を標的とした治療への様々なアプローチも臨床で行われているが、効果は限定的である(3). 膵臓癌に対する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.

## 第 2 節 マウス膵臓癌モデル

マウス膵癌株化細胞 Pan02 株をマウス膵臓に移植・生着させるマウス膵臓癌モデルは、広く用いられている同所性移植モデルであり、異所性移植モデルと比較して、膵臓本来の環境で膵癌発育の自然経過を観察できることが知られている. また、同所性腫瘍は、異

所性腫瘍に比し、速く成長して転移の広がりを示し、臨床における進行した膵臓癌により類似していることが報告されている(4).

Pan02 株を用いたマウス同所性膵臓癌モデルを使用して、腫瘍破砕物刺激樹状細胞と抗血管新生剤との併用療法の有効性、抗血管新生薬剤 TNP-470 および B7-H1 (PD-L1)または B7-DC (PD-L2)の拮抗による抗腫瘍効果などの報告がされており(5,6)、マウス同所性膵臓癌モデルは、腫瘍免疫状態をよく反映したモデルと考えられる。

### 第3節 精神的ストレス

現代社会において、精神的ストレスは身体的ストレスよりも頻度が高く、精神的ストレスの強度と持続時間が増加している(7,8)。精神的ストレスは免疫反応の異常を介して、いくつかのがん進展に影響することが報告されている(9)。臨床研究のメタアナリシスにおいて、精神的ストレスは高いがん発生率・高いがん死亡率・低い生存率と関連があると報告されている。また、がん種別研究では、精神的ストレスと肺癌の高い発生率、精神的ストレスと乳癌・肺癌・頭頸部癌・肝胆道癌・リンパ造血器がんの低い生存率に関連があると報告されている(10)。膵癌については、拘束ストレスがマウス同所性膵癌の増殖を促進し、その機序として  $\beta$  アドレナリンシグナルの関与が報告されている(11)。しかし拘束ストレスは身体的ストレスを伴うことが多く(12)、純粋な精神的ストレスが膵癌に及ぼす影響は不明である。

これまで、いくつかの精神的ストレスモデルが確立されている。社会的敗北ストレスモデル (Chronic social defeat stress : CSDS) は、マウス (居住者) が自分の縄張りに別のマウス (侵入者) が入ってきた場合に、自発的かつ自然に侵入者のマウスを攻撃する習性を利用し

ているモデルであり，行動変化や身体的な変調が生じる (13).

水回避ストレス (Water avoidance stress : WAS) は，マウスやラットなどのげっ歯類が水を忌避する習性を利用した精神的ストレスモデルであり，マウスの免疫系，神経系，内分泌系，腸内細菌叢，内臓過敏症および腸管透過性に影響を与えることが報告されている (14-17).

#### 第4節 抗腫瘍免疫

抗腫瘍免疫においては，CD4 陽性 T リンパ球，CD8 陽性 T リンパ球および IFN- $\gamma$  が重要な役割を果たすことが知られているが，中でも細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞が最も強力なエフェクターである (18,19). 臨床研究において，乳癌，肺癌，悪性黒色腫，結腸直腸癌および脳腫瘍患者の Cancer-free survival と，CD8 陽性腫瘍浸潤リンパ球に，正の相関関係があったと報告されている (19). 膵臓癌においては，CD4 および CD8 陽性 T 細胞の両者の浸潤が傍腫瘍領域に多いことは，良好な予後と相関しているとの報告がある (20).

#### 第5節 本検討における仮説と目的

本研究では，精神的ストレスが腫瘍免疫に影響を与えることにより，マウス膵臓癌の進展を促進するという仮説のもと，第2節において述べたマウス膵臓癌モデルに対して，第3節の社会的敗北ストレス (CSDS) および水回避ストレス (WAS) を負荷することで検討を行った．さらに，その作用機序を調べる目的で，共焦点顕微鏡を用いて傍腫瘍領域血管へのリンパ球接着の生態観察を中心とした解析を実施した．

## 第2章 社会的敗北ストレスが膵癌進展に与える影響の検討

### 第1節 目的

前述の通り，精神的ストレスと膵癌の進展に関する報告は少ない．本章では，マウス膵臓癌モデルに対して社会的敗北ストレス(CSDS)を負荷することで，膵癌の発育への影響を検討した．評価法は，行動試験，腫瘍サイズ測定および膵内リンパ球のサブセット解析によるものとした(図1A)．

### 第2節 方法

#### 第1項 動物

Aggressor (居住マウス)として4~6月齢のCD-1(ICR)マウス(日本SLC,静岡,日本), Intruder (侵入マウス)として5週齢のC57BL/6Jマウス(日本クレア,東京,日本)を用いた．プラスチックケージに4~6頭ずつ飼育し，温度23~24℃，湿度55%，12時間ごとの明暗サイクルの環境下で飼育した．マウスには標準実験食(日本クレア)を与え，餌と水は自由に摂取させた．実験は入荷後1週間の馴化期間を経た後に開始した．すべての実験動物は，米国立衛生研究所(Bethesda, MD, USA)が発行した「動物を用いた行動研究における方法と福祉への配慮:国立衛生研究所ワークショップの報告」のガイドラインと，防衛医科大学校の動物施設のガイドラインに従った．また，すべての実験計画は，防衛医科大学校の動物実験倫理委員会で承認を得て行った(No.18097)．

## 第2項 膵癌株化細胞の培養

膵癌細胞の Cell line は，国立癌研究所（Bethesda, MD, USA）から購入した C57BL/6 マウス由来の Pan02 を用いた．レンチウィルスを用いて発光タンパク質である Nano-Lantern 遺伝子・ピューロマイシン遺伝子を導入した（Pan02NL）．ピューロマイシン（InvivoGen；San Diego, CA, USA）を用いて Nano-Lantern 遺伝子が導入された細胞をセクションしつつ，RPMI-1640（Thermo Fisher Scientific；Waltham, MA, USA），10%熱不活化 FBS（HyClone Laboratories；UT, USA），ペニシリン，ストレプトマイシン，アンフォテリシン B（Thermo Fisher Scientific）を含む培地で 37℃・加湿・5%CO<sub>2</sub> 下に培養した．

## 第3項 膵癌株化細胞の移植

培養した Pan02NL をトリプシン処理し，マトリゲル（Corning；NY, USA）に  $1 \times 10^7$  個/mL で懸濁した．5週齢の C57BL/6J マウスを，3種混合麻酔（メデトミジン（Zenoaq；福島，日本）0.75 mg/kg，ミダゾラム（Teva Takeda Pharma；名古屋，日本）4 mg/kg，およびブトルファノール（明治；東京，日本）5 mg/kg）の腹腔内投与で麻酔した．左脇腹の毛を剃り，左腹部を小さく開腹し，脾臓と共に膵臓を腹腔内から取り出し，マトリゲル懸濁 Pan02NL 50  $\mu$ L（Pan02NL  $5 \times 10^5$  個）を 29G 1mL シリンジで膵臓に注入した（図 1 B）．4-0 ナイロンを用いて腹膜と皮膚の 2 層で閉腹し，アチパメゾール（Zenoaq）0.75 mg/kg の腹腔内投与で覚醒させた(4-6,21)．

#### 第4項 発光性バイオプローブによる腫瘍生着確認

7週齢の担癌 C57BL/6J マウスに3種混合麻酔を腹腔内投与し、左腹部を完全に剃毛した。マウスにセレンテラジン h (富士フィルム; 大阪, 日本) 2.5 mg/kg を眼窩神経叢投与し、IVIS Lumina XR システム (PerkinElmer; Waltham, MA, USA) で発光を確認して、腫瘍の生着を確認した (図 1 C)。セレンテラジン h は、ナノランタンの主成分であるレニラルシフェラーゼの化学発光基質である (22)。

#### 第5項 社会的敗北ストレス

4~6月齢の CD-1 マウスにスクリーナーとなる C57BL/6 マウスを入れることで、攻撃者として適した CD-1 マウスであるかどうかをスクリーニングした。スクリーニングセッションは、1回3分・1日3回・3日間であり、連続する2セッションで最初の攻撃までの時間が60秒以内であれば攻撃者として使用することができる。攻撃者である CD-1 マウスのケージに、侵入者である担癌 C57BL/6J マウスを入れ、Social Defeat Session を10分間行い (図 1 D)、その後穴の開いた仕切りで分けて、24時間は存在・音・匂いでストレスを負荷した。CD-1 マウスと担癌 C57BL/6J マウスのペアを毎日変えて慣化を防ぎつつ、10日間連続で社会的敗北ストレスを負荷した。コントロール群は、担癌 C57BL/6J マウス同士を穴の開いた仕切りで分けて配置し、ペアを毎日変えて10日間飼育した (13)。

#### 第6項 行動試験

社会的敗北ストレスによりストレスが負荷されたことを確認す

るために、行動試験として社会的相互作用テスト (Social interaction test) を行った (図 1 E)。四角のボックスの壁側に小さい金網を配置する。金網の周囲を Interaction zone、金網から最も遠い 2 カ所の角を Corner zone と定義した。四角のボックスの中に担癌 C57BL/6J マウスを配置し、金網の中に CD-1 マウスを配置した場合、もしくは配置しない場合で、それぞれの Zone に滞在した時間を測定した。既報の通りに「Social interaction ratio = CD-1 マウスがいる時の Interaction zone 滞在時間 ÷ CD-1 マウスがいない時の Interaction zone 滞在時間」と定義し、Social interaction ratio が 1 未満であれば Susceptible (ストレスの影響を受けた)、1 以上であれば Resilient (ストレス抵抗性) と評価した(13)。

また、不安様行動試験としてビー玉埋込試験を実施した。不透明なケージに約 5cm の深さで床敷を敷き詰め、担癌 C57BL/6J マウスを配置してケージに慣れさせた。その後、床敷上に 15 個のビー玉を均等に配置し、担癌 C57BL/6J マウスに 30 分間自由に探索をさせた (図 1 F)。真上から観察した時に 2/3 以上床敷が覆いかぶさっているビー玉の数を測定した(23)。

#### 第 7 項 腫瘍サイズ測定

腭癌株化細胞移植から 6 週間後に、担癌マウスを 3 種混合麻酔・全採血により安楽死させ、脾臓・腭臓・腭臓癌を一塊のまま摘出し、デジタルノギスを使用して腫瘍のサイズを測定した。腫瘍体積は  $\pi/6 \times a \times b \times c$  で計算した (a は脾臓の長軸に垂直な長さ、b は脾臓の長軸に平行な長さ、c は厚さと定義した。) (図 1 G) (4)。腫瘍サイズの測定後、以降の解析のために組織を採取した。

## 第 8 項 脾臓に浸潤したリンパ球のフローサイトメトリー解析

脾臓からのリンパ球分離のため，コラゲナーゼ P (Roche Diagnostics ; Mannheim, Germany) 0.4 mg/mL, DNaseI (Roche Diagnostics) 0.1 ng/mL をハンクス平衡塩類溶液 (Thermo Fisher Scientific) に添加した溶解バッファーを用いた．脾臓組織 (脾臓癌および正常脾臓) および溶解バッファーを含むチューブを，攪拌しながら 37°C で 30 分間インキュベートした(24)．脾臓からのリンパ球分離は，機械的分散により実施した．

細胞表面抗原は，PE 標識抗 CD3 抗体 (Miltenyi Biotec ; Bergisch Gladbach, Germany), PerCP-Cy5.5 標識抗 CD4 抗体 (BD Biosciences Japan; 東京, 日本), および FITC 標識抗 CD8 抗体 (Miltenyi Biotec) を用いて染色した．FACSCantoII (BD Biosciences) を使用してデータを取得し，Diva ソフトウェア (BD Biosciences) を使用して解析した(25)．

## 第 9 項 統計処理

結果は平均値±標準誤差で示した．群間の比較には，JMP Pro ソフトウェア (SAS Institute Inc. ; NC, USA) を使用した．パラメトリックデータは，分散が等しい場合にスチューデントの t 検定，分散が等しくない場合にウェルチの t 検定を用いて統計的分析を行った．ノンパラメトリックデータは，ウィルコクソン符号順位検定を用いて統計的分析を行った．統計的有意水準は  $p < 0.05$  と設定した．

### 第3節 結果

#### 第1項 社会的敗北ストレスによる行動変容

体重は10週齢時にストレス群において有意に増加していた(図2A)。Social interaction testでは、ストレス群の7匹のうち、3匹がSusceptible、4匹がResilientであった。ストレス群とコントロール群でSI ratioに有意差を認めなかった(図2B)。ビー玉埋込試験では、ストレス群のビー玉埋込数は、コントロール群に比し、有意に減少していた( $3.1 \pm 0.6$  vs  $5.7 \pm 0.7$  個)(図2C)。

#### 第2項 社会的敗北ストレスが膵癌進展に与える影響

ストレス群とコントロール群で膵癌サイズに有意差を認めなかった( $713 \pm 160$  vs  $685 \pm 153$  mm<sup>3</sup>)(図2D)。

#### 第3項 社会的敗北ストレスが腫瘍免疫に与える影響

ストレス群とコントロール群で膵内のCD8およびCD4陽性Tリンパ球に有意差を認めなかった( $20.7 \pm 2.4$  vs  $28.8 \pm 4.8$  %,  $1.7 \pm 0.3$  vs  $1.9 \pm 0.4$  %)(図2E)。

### 第4節 小括

社会的敗北ストレスは、担癌マウスの社会的相互作用テストに影響を与えなかったが、ビー玉埋込試験ではビー玉埋込数を減少させた。一方で、膵癌サイズと、CD4およびCD8陽性細胞の膵臓・膵癌への浸潤に対する影響は認められなかった。

これらの結果より、社会的敗北ストレスは腫瘍免疫に影響を与えず、膵癌進展の促進には関与しない可能性が示された。

## 第3章 水回避ストレス (Water Avoidance Stress: WAS) が腫瘍免疫・膵癌の進展に与える影響の検討

### 第1節 目的

前述の通り，精神的ストレスと膵癌の進展に関する報告は少ない．本章では，マウス膵臓癌モデルに対して水回避ストレス (Water avoidance stress: WAS) を負荷することで，膵癌の進展への影響を検討した．評価法は，行動試験，腫瘍サイズ測定および膵内リンパ球のサブセット解析によるものとした (図3A)．

### 第2節 方法

#### 第1項 動物

5週齢の C57BL/6J マウス (日本クレア) を用いた．飼育環境は第2章 第2節 第1項と同様である．すべての実験計画は，防衛医科大学校の動物実験倫理委員会で承認を得て行った (No.18097)．

#### 第2項 膵癌株化細胞の培養

第2章 第2節 第2項のように実施した．

#### 第3項 膵癌株化細胞の移植

第2章 第2節 第3項のように実施した (図3B)．

#### 第4項 発光性バイオプローブによる腫瘍生着確認

第2章 第2節 第4項のように実施した (図3C)．

## 第5項 水回避ストレス (WAS)

担癌 C57BL/6J マウスを WAS または Sham-WAS のいずれかに振り分けた。WAS においては、水温 23°C の水を入れたプラスチック容器 (27.6×44.5×20.4 cm) の中央に丸いガラスプラットフォーム (5 cm [直径]×9 cm [高さ]) を留置した。水深はプラットフォームの高さから 1 cm 下までとした。プラットフォーム上にマウスを 1 日 1 時間配置した(図 3 D)。Sham-WAS 群のマウスのプラスチック容器には水を入れず、WAS 群と同様に中央のプラットフォーム上に 1 時間配置した (14)。以上の操作を 10 日間連続で行い、配置した 1 時間で排泄された便個数を算出した。

## 第6項 行動試験

ビー玉埋込試験では、担癌 C57BL/6J マウスを、厚さ 5 cm の床敷を敷いたテストケージ (22.5×33.8×14.0 cm) に移動し、20 分間自由探索させてケージに慣らした。次に、マウスを取り出し、15 個のビー玉 (直径 1.5 cm) を床敷の上に等間隔に配置した。マウスを再びテストケージに入れ、30 分間自由探索させた (図 3 E)。テストケージからマウスを取り出した後、埋込ビー玉数を算出した。真上から見て 3 分の 2 以上が床敷で覆われているビー玉を「埋込ビー玉」と定義した(23)。

オープンフィールド試験では、マウスを不透明なアクリルボックス製 (43.2×43.2×30.5 cm) (Med Associates Inc., St. Albans, Vermont, USA) のオープンフィールドアリーナの中央に配置し、5 分間自由に探索させた(図 3 F)。アクティビティモニターバージョン 7.0.5.10 ソフトウェア (Med Associates Inc.) を使用して、マウスの総歩行

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を分析した(26).

#### 第7項 腫瘍サイズ測定

第2章 第2節 第7項のように実施した(図3G).

#### 第8項 qRT-PCR法

移植後6週の傍腫瘍領域の組織を採取し，RNAlater溶液(Thermo Fisher Scientific)中に-20℃で保存した．Magna Lyser (Roche)を使用して組織をホモジナイズし，RNeasyキット(Qiagen; Venlo, Netherlands)を使用して総RNAを抽出した．総RNAをcDNAに逆転写し，TaqMan Universal PCR Master Mix, TaqManプローブとプライマー，およびABI PRISM 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems; Carlsbad, CA, USA)を使用して，TaqMan PCR反応により各種mRNA発現量を定量した．各種mRNA発現量はマウスGAPDH mRNA (Applied Biosystems)発現レベルで標準化した(25).

#### 第9項 脾臓に浸潤したリンパ球のフローサイトメトリー解析

第2章 第2節 第8項のように実施した．

#### 第10項 免疫組織化学染色

同所性脾臓癌，正常脾臓，および脾臓を一塊として摘出し，過ヨウ素酸・リジン・パラホルムアルデヒド溶液で固定し，10%，15%，20%サッカロース・PBS溶液で脱水した．その後，Tissue-Tek O.C.T.

Compound (Sakura Finetek ; 東京, 日本) を用いて包埋し, -85°C で凍結保存した. 凍結組織のクリオスタット切片を, Cryostar NX70 (Thermo Fisher Scientific) を使用して 12  $\mu\text{m}$  の厚さで作成した.

標識ストレプトアビジンビオチン法を用いて CD4, CD8 の免疫組織化学染色を実施した. CD4 (BioLegend ; San Diego, CA, USA), CD8 (BioLegend) の抗マウスモノクローナル抗体を一次抗体として用い, アイソタイプが一致する IgG 抗体をネガティブコントロールとして使用した. 組織切片を一次抗体とともに 4°C で一晩インキュベートし, 次にビオチン化抗 IgG 抗体 (Vector Laboratories ; Burlingame, CA, USA) を用いて室温で 90 分間処理した. ストレプトアビジン-FITC (Vector Laboratories) を使用して, 室温で 30 分間処理した(5). 蛍光顕微鏡 BZ-X810 (Keyence ; 大阪, 日本) を使用して画像を撮影し, BZ-H4C / Hybrid cell count と BZ-H4CM / Macro cell count ソフトウェア (Keyence) で解析した. 傍腫瘍領域の代表 5 点で単位面積あたりの CD4, CD8 陽性 T リンパ球数を評価した.

#### 第 1 1 項 統計処理

第 2 章 第 2 節 第 9 項のように実施した.

### 第3節 結果

#### 第1項 WASによる行動変容

WASによって引き起こされた、身体的および精神的な行動の変化を評価した。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(図4A)。WASセッション中の便個数はWAS群で有意に多かった( $12.6 \pm 0.5$  vs.  $9.5 \pm 0.3$  個)(図4B)。ビー玉埋込試験では、WAS群はSham群よりも埋込ビー玉数が有意に多かった( $7.2 \pm 0.8$  vs.  $1.7 \pm 0.4$  個)(図4C)。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(図4D-G)。

#### 第2項 WASが膀胱進展に与える影響

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( $677 \pm 61$  vs.  $381 \pm 33$  mm<sup>3</sup>)(図5A)。

#### 第3項 WASが傍腫瘍領域のIFN- $\gamma$ mRNA発現に与える影響

傍腫瘍領域のIFN- $\gamma$  mRNA発現をqRT-PCR法で評価した。WAS群のIFN- $\gamma$  mRNA発現はSham群よりも有意に減少していた( $4.15 \pm 0.70$  vs.  $7.67 \pm 1.34$ )(図5B)。

#### 第4項 WASが膀胱・膀胱に浸潤するリンパ球に与える影響

膀胱・膀胱に浸潤するリンパ球をフローサイトメトリーで評価した。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( $23.7 \pm 4.0$  vs.  $37.7 \pm 4.3$  %)(図5C,D)。

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 ( $80.7 \pm 13.2$  vs.  $110.5 \pm 12.3$  個/ $\text{mm}^2$ ) (図 6 A,B). 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 ( $102.5 \pm 5.4$  vs.  $169.5 \pm 26.5$  個/ $\text{mm}^2$ ) (図 6 A,B).

#### 第 4 節 小括

WAS 負荷により，膵癌サイズの増加が認められた．また，担癌マウスのビー玉埋込試験におけるビー玉埋込数を増加させた．さらに，傍腫瘍領域の IFN- $\gamma$  mRNA 発現の抑制，および CD4，CD8 陽性細胞の傍腫瘍領域浸潤抑制が認められた．

以上より，WAS 負荷により行動変容を来たすとともに，腫瘍免疫へ影響を及ぼすことで，膵癌の進展に関与する可能性が示唆された．

## 第4章 水回避ストレスが傍腫瘍領域血管への脾臓 リンパ球接着に与える影響の検討

### 第1節 目的

第3章において WAS 負荷が膵癌進展を促進することが明らかとなり、その原因は傍腫瘍領域の IFN- $\gamma$  抑制、傍腫瘍領域の CD4, CD8 陽性 T リンパ球浸潤抑制にあると推察された。そこで、CD4, CD8 陽性 T リンパ球浸潤抑制の起因が、リンパ球のマイグレーションにあると考え、共焦点顕微鏡を用いて、WAS 負荷における傍腫瘍領域血管のリンパ球接着への影響を検討した。

### 第2節 方法

#### 第1項 動物

使用動物は第3章 第2節 第1項と同様であり、飼育環境は第2章 第2節 第1項と同様である。すべての実験計画は、防衛医科大学の動物実験倫理委員会で承認を得て行った (No.18097)。

#### 第2項 膵癌株化細胞の培養

第2章 第2節 第2項のように実施した。

#### 第3項 膵癌株化細胞の移植

第2章 第2節 第3項のように実施した。

#### 第4項 発光性バイオプローブによる腫瘍生着確認

第2章 第2節 第4項のように実施した。

#### 第5項 水回避ストレス (WAS)

担癌 C57BL/6J マウスを WAS または Control のいずれかに振り分けた。WAS 負荷は第3章 第2節 第5項のように実施し、1時間・1回の WAS を負荷した (図7A)。

#### 第6項 脾臓リンパ球の蛍光標識

7週齢の C57BL/6J マウスを WAS または Control のいずれかに振り分けた。WAS 負荷は第3章 第2節 第5項のように実施し、1時間・1回の WAS を負荷した (図7A)。マウスから脾臓を摘出し、脾臓を分散後に赤血球を溶血することで、リンパ球の分離を行った。Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (15.6 mM) (Thermo Fisher Scientific) を Dimethylsulfoxide に溶解した。30 mL の PBS 中の脾細胞を、30  $\mu$ L の CFSE 溶液とともに 37°C で 30 分間インキュベートして蛍光標識した(27)。

#### 第7項 共焦点顕微鏡観察

担癌 C57BL/6J マウスに三種混合麻酔を施し、内頸静脈ルートを確認した。続いて、Texas Red-dextran (Thermo Fisher Scientific) 25 mg/kg を静脈投与して血管を可視化し、Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) 5 mg/kg を静脈投与して細胞核を染色した (図7B)。共焦点レーザー顕微鏡 A1 (Nikon; 東京, 日本) を用いて、傍腫瘍領域と脾臓へ向かう動脈を確認し、 $2 \times 10^7$  個の CFSE 標識リンパ球を静脈投与した (図7C)。30秒以上血管に接着しているリンパ球を「接着リンパ球」と定義した(27,28)。視野 (約  $0.4 \text{ mm}^2$ ) あたりの接着リンパ球数を算出した。

## 第 8 項 統計処理

第 2 章 第 2 節 第 9 項のように実施した。

### 第 3 節 結果 WAS が傍腫瘍領域のリンパ球接着に与える影響

WAS による傍腫瘍領域リンパ球浸潤減少の原因を検証するために、  
膵癌移植後 2 週で共焦点顕微鏡を使用して傍腫瘍領域血管へのリン  
パ球接着を評価した。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  
なかつた ( $6.3 \pm 1.4$  vs.  $19.5 \pm 0.9$  個/mm<sup>2</sup>) (図 7 D)。

### 第 4 節 小括

WAS 負荷による傍腫瘍領域血管のリンパ球接着への影響を検討し  
たところ、WAS 群では傍腫瘍領域血管のリンパ球接着数が有意に減  
少していた。これより、WAS による傍腫瘍領域の CD4、CD8 陽性 T  
リンパ球浸潤減少は、リンパ球のマイグレーションに関わるリンパ  
球接着減少が関与している可能性が示された。

## 第5章 水回避ストレスが傍腫瘍領域血管の接着分子 ・脾臓リンパ球の接着分子に与える影響の検討

### 第1節 目的

第4章において、WAS 負荷により傍腫瘍領域血管のリンパ球接着数が減少することが明らかとなった。そこで、リンパ球接着が減少する作用機序の解明として、WAS 負荷によるリンパ球の接着分子および傍腫瘍領域血管の接着分子への影響を検討した。

### 第2節 方法

#### 第1項 動物

使用動物は第3章 第2節 第1項と同様であり、飼育環境は第2章 第2節 第1項と同様である。すべての実験計画は、防衛医科大学の動物実験倫理委員会で承認を得て行った (No.18097)。

#### 第2項 水回避ストレス (WAS)

7週齢の C57BL/6J マウスを WAS または Control のいずれかに振り分けた。WAS 負荷は第3章 第2節 第5項のように実施し、1時間・1回の WAS を負荷した。

#### 第3項 脾臓リンパ球のフローサイトメトリー解析

前項のマウスから脾臓を摘出し、脾臓を機械的に分散後、赤血球を溶血することでリンパ球を分離した。表面抗原染色は、PE 標識抗 CD3 抗体 (Miltenyi Biotec), PerCP-Cy5.5 標識抗 CD4 抗体 (Becton Dickinson), FITC 標識抗 CD8 抗体 (Miltenyi Biotec), APC 標識抗

CD11a/CD18 抗体 (BioLegend), APC 標識抗 CD49d 抗体 (BioLegend), APC 標識抗 CD62L 抗体 (Becton Dickinson) を用いて実施した. FACSCanto II を使用してデータを取得し, Diva ソフトウェア (BD Biosciences) を使用して解析した(25).

#### 第 4 項 免疫組織化学染色

第 3 章において WAS 群と Sham-WAS 群から摘出した検体で, 第 3 章 第 2 節 第 10 項で凍結保存した同所性膵臓癌, 正常膵臓および脾臓の組織を用いた. 第 3 章 第 2 節 第 10 項のように, 切片を作成し, ICAM-1 の抗マウスモノクローナル抗体 (BD Biosciences) を一次抗体として用い, 標識ストレプトアビジンビオチン法を用いて ICAM-1 の免疫組織化学染色を実施した. 第 3 章 第 2 節 第 10 項のように, 画像の撮影, 解析を実施して, 傍腫瘍領域の代表 5 点で単位面積あたりの血管内皮 ICAM-1 発現面積を評価した.

#### 第 5 項 qRT-PCR 法

第 3 章 第 2 節 第 8 項で保存した cDNA ライブラリーを用い, 第 3 章 第 2 節 第 8 項のように実施した.

#### 第 6 項 統計処理

第 2 章 第 2 節 第 9 項のように実施した.

### 第3節 結果

#### 第1項 WASが傍腫瘍領域血管内皮の接着分子に与える影響

WAS 負荷でも単位時間に流入するリンパ球数に変化がないため、傍腫瘍領域リンパ球接着を減少させる原因が、血管内皮の接着分子の発現減少にある可能性を検証するために、担癌 C57BL/6J 側の傍腫瘍領域血管内皮における ICAM-1 発現を評価した。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.  $123,382 \pm 23,690 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ ) (図 8 A,B)。

#### 第2項 WASがリンパ球の接着分子に与える影響

WAS が傍腫瘍領域リンパ球接着を減少させる原因を検証するために、脾臓リンパ球における接着分子の CD11a/CD18, CD49d, CD62L 発現を評価した。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 ( $99.9 \pm 0.0$  vs.  $99.8 \pm 0.0$  %) (図 8 C,D)。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 ( $58.8 \pm 3.1$  vs.  $55.2 \pm 1.8$  %) (図 8 E,F)。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 ( $89.3 \pm 0.2$  vs.  $87.7 \pm 0.5$  %) (図 8 G,H)。

#### 第3項 WASが傍腫瘍領域の TNF- $\alpha$ mRNA 発現に与える影響

血管内皮における ICAM-1 発現に影響を与える要因を精査するために、傍腫瘍領域の TNF- $\alpha$  mRNA 発現レベルを評価した。WAS 群の TNF- $\alpha$  mRNA 発現は、Sham 群よりも有意に減少していた ( $0.81 \pm 0.20$  vs.  $1.80 \pm 0.27$ ) (図 9)。

#### 第4節 小括

WAS 負荷による傍腫瘍領域血管の接着分子への影響を検討したところ、WAS 負荷により傍腫瘍領域血管内皮における ICAM-1 発現領域が、有意に減少していた。また、リンパ球側の接着分子を検討したところ、WAS 負荷によって CD3 陽性 T リンパ球における CD11a/CD18 の発現および CD62L 発現は、有意に増加していた。さらに、傍腫瘍領域の TNF- $\alpha$  mRNA 発現が有意に低下していた。

これらの結果より、WAS 負荷がリンパ球接着数を減少させる作用機序として、傍腫瘍領域血管側の接着分子 ICAM-1 発現低下が推察された。また、ICAM-1 発現低下の原因として、傍腫瘍領域の TNF- $\alpha$  発現減少が関与している可能性が考えられた。

## 第 6 章 総括

社会的敗北ストレス負荷は、腫瘍免疫に影響を与えず、膀胱癌進展の促進には関与しない可能性が示された。

水回避ストレス (WAS) 負荷により、行動変容 (埋込ビー玉数増加, 体重増加および WAS セッション中の便回数増加) が認められた。

さらに、WAS 負荷が膀胱癌進展を促進し、傍腫瘍領域の IFN- $\gamma$  mRNA 発現抑制、傍腫瘍領域の CD4, CD8 陽性 T リンパ球浸潤抑制が認められた。

また、WAS 負荷により傍腫瘍領域血管のリンパ球接着数の減少が認められた。WAS 負荷はリンパ球側の接着分子ではなく傍腫瘍領域血管側の接着分子 ICAM-1 発現面積を減少させ、傍腫瘍領域の TNF- $\alpha$  mRNA 発現を減少させた。

## 第7章 考察

精神的ストレスはがんに対する免疫応答を抑制することが報告されており(9), 精神的ストレスと乳癌・肺癌・頭頸部癌・肝胆道癌・リンパ造血器がんにおける生存率との関連性が報告されている(10). しかし, 精神的ストレスと膵癌における臨床研究はなく, 拘束ストレスと膵癌進展についての基礎研究(11)はあるものの, 純粋な精神的ストレスと膵癌進展に関する研究はない. 加えて, 膵癌において抗腫瘍免疫抑制の根底にあるメカニズムは完全には解明されていない. そこで本研究では, ストレスとして, 社会的敗北モデルと水回避ストレスモデル(WAS)を用い, マウス膵臓癌モデルは同所性膵臓癌モデルを用いて, 腫瘍の進展および腫瘍免疫に対する精神的ストレスの影響を検討した.

当初に, ストレス負荷による精神的ストレスの影響を評価する目的で行動試験を実施したところ, ビー玉埋込試験において担癌マウスのWAS群の埋込ビー玉数が, Sham群よりも有意に多いことが認められた. ビー玉埋込試験は, げっ歯類において, 強迫や不安といった神経認知構造を反映する行動症状を評価するために, 広く使用されているスクリーニングツールであるため(23), この結果はWAS負荷が担癌マウスに対して精神的ストレスを誘発することを示している. 社会的敗北ストレスにおいてStress群の埋込ビー玉数が, Control群よりも有意に少ないという, WASとは逆の結果になったのは, Social interaction testの結果に有意差がなかったことを鑑みれば, ストレッサーの種類あるいはストレッサーに対する感受性または反応性の違いにより行動試験に与える影響が異なっていたから, と考えられる.

また, WAS群ではSham群に比し, 体重増加とWASセッション中の

便個数の増加が有意に認められた。これらは、精神的ストレスのために WAS 群のマウスが Sham 群に比し、より多くの飼料を摂取した結果と考えられる。これまでの報告では非担癌マウスに WAS を負荷しても食事量に変化したという報告はない。一方で、老齢マウスでは WAS 負荷により食事量に変化したとの報告もある(29)。今回、担癌マウスに WAS 負荷をかけるという、二重のストレスを負荷した。この特殊な環境下でのストレスが食事摂取に影響を与えた可能性があると考えられた。

さらに、前述の行動変容が身体的障害に起因しないことを証明するために、オープンフィールド試験を実施した。その結果、担癌マウスにおける WAS 群と Sham 群の間で総歩行距離に有意差はなく、WAS 負荷は身体活動に影響を与えないことが明らかとなった。

以上の結果より、WAS 負荷は担癌マウスに対して、身体活動に影響を与えることなく、純粋な精神的ストレスを反映することで、一連の行動変容を惹起するものと考えられた。

さらに本研究では、WAS 負荷によって引き起こされた精神的ストレスが、マウス膵臓癌モデルにおける同所性膵臓癌の進展を促進することが示唆された。一方で、社会的敗北ストレスは膵臓癌の進展に影響を与えなかった。このことは、ストレスの種類の違いにより、腫瘍免疫に与える影響が異なる可能性が考えられた。また、社会的敗北ストレスは、CD-1 マウスから担癌 C57BL/6J マウスに対する攻撃を伴うことから、攻撃を受けるといった身体的ストレスが腫瘍免疫に影響を与える可能性も考えられた。

また、WAS 負荷は、膵癌進展に伴い、傍腫瘍領域の IFN- $\gamma$  mRNA 発現の抑制、および傍腫瘍領域の CD4、CD8 陽性 T リンパ球浸潤抑制を惹起することが示された。

抗腫瘍免疫では、CD4、CD8 陽性 T リンパ球と、これらのリンパ球によって産生される IFN- $\gamma$  が重要な役割を果たすことが知られている(18,19)。精神的ストレスは免疫系に有害な影響を与えることが示されており、これらの影響には、リンパ球集団の変化、リンパ球増殖の低下、NK 細胞数・活性の低下、抗体反応の低下などが知られている(12)。また、慢性ストレスによって、腫瘍内と腫瘍周囲における CD4、CD8 陽性 T リンパ球の浸潤、IL-12 や IFN- $\gamma$  などの Th1 系サイトカインが抑制され、がんの進展を促進することが報告されている(30)。

したがって、CD4、CD8 陽性 T リンパ球浸潤数の減少は、IFN- $\gamma$  産生の低下をもたらし、抗腫瘍反応を弱めることで、同所性に移植されたマウス膵臓癌の進展を促進する可能性が考えられる。また、傍腫瘍領域に集積する細胞傷害性 T リンパ球が抗癌免疫応答に重要であることは古くより多くの報告がなされている(6)。WAS 負荷は、これらの重要な抗癌免疫応答を抑制する可能性が示された。

本研究ではまた、WAS 負荷による CD4、CD8 陽性 T リンパ球浸潤数の低下が、リンパ球のマイグレーション低下に起因することを、共焦点顕微鏡による生態観察で示した。加えて、WAS 負荷は、傍腫瘍領域でのリンパ球のマイグレーションに重要な役割を果たす接着分子 ICAM-1(31)の発現減少、および TNF- $\alpha$  mRNA 発現減少を誘発することも明らかにした。

TGF- $\beta$ 1 によって ICAM-1 発現が減少し、膵臓癌の肝転移を増強する(32)、結腸直腸癌細胞株への ICAM-1 トランスフェクションは腫瘍の成長と転移を阻害する(33)などの報告から、ICAM-1 は抗腫瘍免疫において重要な役割を果たすことが示唆されている。また、TNF- $\alpha$  は、血管内皮の ICAM-1 発現を誘導・増強させる炎症性サイトカインであること

はよく知られている(34). ストレスと TNF- $\alpha$  産生の関係については、慢性ストレスが交感神経系を介してベータアドレナリン作動性シグナルを活性化し(10), ベータアドレナリン作動性シグナルは単球による TNF 産生を減少させるという報告がなされている(35).

以上の事実より、WAS 負荷が接着分子 ICAM-1 の発現減少を誘導する作用機序は次のように推察される. すなわち、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- $\alpha$  産生を減少させ、それに伴い血管内皮の ICAM-1 発現が減少したと考えられる. その結果、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し、抗腫瘍免疫が抑制され腫瘍進展に繋がっていったと推察される.

その一方で、リンパ球マイグレーションにおいて、血管内皮側の接着分子と同じく重要な役割を担うリンパ球側の接着分子を検討したところ、WAS 負荷によって部分的に増加が確認されたのみであった. よって、WAS 負荷によるリンパ球マイグレーションの抑制は、ICAM-1 抑制が支配的な役割を果たす可能性が高いと考えられる.

近年のストレス社会においては、抗腫瘍免疫が抑制されることで、平均寿命の延長以外にその免疫抑制も、癌の罹患率増加に寄与している可能性が考えられる. したがって、現代社会において精神的ストレスを緩和することが、抗腫瘍免疫を回復し、健康寿命の延長をもたらし、将来の医療費減少、高齢者による社会貢献の促進に繋がる可能性が考えられる. スマートフォンの普及と、それに伴う SNS (ソーシャルネットワークワーキングサービス) の急速な広がりにより、新型コロナウイルス感染症や戦争報道などの情報が、膨大な量となって万人の元に流れ込んでいる. これらの玉石混交な情報は、精神的ストレス負荷の増大へと繋が

る恐れがあると考えられる。本研究によって、純粋な精神的ストレス負荷が重要な抗癌免疫応答をも阻害する可能性が示されたことで、膵臓癌患者における精神的ストレスの緩和が、より重要性を高めると言えよう。

## 第 8 章 結論

本研究では、水回避ストレス (WAS) 負荷が膵癌実験動物モデルに行動変容を惹起し、傍腫瘍領域の IFN- $\gamma$  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、膵癌進展の促進につながることを示唆された。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- $\alpha$  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した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、現代社会における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。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり，御指導・御高閲を賜りました 防衛医科大学 内科学講座 教授 穂苅量太博士 に衷心より感謝申し上げます。

また本研究の遂行に際し，貴重な御助言・御協力を賜りました防衛医科大学 内科学講座 助教 岡田義清博士，埼玉医科大学 消化管内科 教授 都築義和博士，防衛医科大学 生理学講座 教授 守本祐司博士，防衛医科大学 生理学講座 元実験支援員 粥川和歌子様，防衛医科大学 精神科学講座 助教 古賀農人博士，防衛医科大学 精神科学講座 実験支援員 浅井史穂様をはじめ，防衛医科大学 内科学講座の教室員諸先生に深く感謝の意を表します。

本研究の一部は，一般財団法人 防衛医学振興会 からの助成金により実施しました。この場を借りて深謝致します。

本研究の趣旨は，

Digestive Disease Week 2020 年 5 月，Chicago

第 28 回 日本消化器関連学会週間 2020 年 11 月，神戸

第 59 回 日本消化器免疫学会総会 2022 年 7 月，大阪

で発表した。

## 略語説明

APC	Allophycocyanin	アロフィコシアニン
CD	Cluster of differentiation	分化抗原群
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid	相補的デオキシリボ核酸
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte antigen 4	細胞障害性 T リンパ球抗原 4
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	蛍光活性化細胞仕分け
FBS	Fetal bovine serum	ウシ胎児血清
FITC	Fluorescein isothiocyanate	フルオレセイン イソチオシアネート
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	グリセルアルデヒド-3-リン酸 デヒドロゲナーゼ
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1	細胞間接着分子 1
ICR	Institute of cancer research	がん研究所
IFN- $\gamma$	Interferon gamma	インターフェロンガンマ
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
mRNA	Messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
PD-1	Programmed cell death 1	プログラム細胞死 1
PD-L1	Programmed cell death ligand 1	プログラム細胞死リガンド 1
PE	Phycoerythrobilin	フィコエリトロビルン
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein-Cyanin	ペリジニクロロフィルタン
Cy5.5	5.5	パク質-シアニン 5.5
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction	定量的逆転写 ポリメラーゼ連鎖反応
rpm	Revolutions per minute	回転毎分
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	ロズウェルパーク記念研究所

TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha	腫瘍壊死因子アルファ
WAS	Water avoidance stress	水回避ストレス

## 参考文献

1. Fidler MM, Soerjomataram I, Bray F. A global view on cancer incidence and national levels of the human development index. *Int J Cancer*. 2016; 139(11): 2436-2446.
2. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol*. 2018; 24(43): 4846-4861.
3. Leinwand J, Miller G. Regulation and modulation of antitumor immunity in pancreatic cancer. *Nat Immunol*. 2020; 21(10): 1152-1159.
4. Tsuzuki Y, Carreira CM, Bockhorn M, Xu L, Jain RK, Fukumura D. Pancreas Microenvironment Promotes VEGF Expression and Tumor Growth: Novel Window Models for Pancreatic Tumor Angiogenesis and Microcirculation. *Lab Invest* 2001; 81(10): 1439-1451.
5. Miyazaki J, Tsuzuki Y, Matsuzaki K, Hokari R, Okada Y, Kawaguchi A, Nagao S, Itoh K, Miura S. Combination therapy with tumor-lysate pulsed dendritic cells and antiangiogenic drug TNP-470 for mouse pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2005; 117(3): 499-505.
6. Okudaira K, Hokari R, Tsuzuki Y, Okada Y, Komoto S, Watanabe C, Kurihara C, Kawaguchi A, Nagao S, Azuma M, Yagita H, Miura S. Blockade of B7-H1 or B7-DC induces an anti-tumor effect in a mouse pancreatic cancer model. *Int J Oncol*. 2009; 35(4): 741-749.
7. Qin HY, Cheng CW, Tang XD, Bian ZX. Impact of psychological stress on irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(39): 14126-14131.

8. Marshall GD, Tull MT. Stress, mindfulness, and the allergic patient. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2018; 14(12): 1065-1079.
9. Reiche EMV, Nunes SOV, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol*. 2004; 5: 617-625.
10. Chida Y, Hamer M, Wardle J, Steptoe A. Do stress-related psychosocial factors contribute to cancer incidence and survival? *Nat Clin Pract Oncol*. 2008 Aug; 5(8): 466-475.
11. Kim-Fuchs C, Le CP, Pimentel MA, Shackelford D, Ferrari D, Angst E, Hollande F, Sloan EK. Chronic stress accelerates pancreatic cancer growth and invasion: a critical role for beta-adrenergic signaling in the pancreatic microenvironment. *Brain Behav Immun*. 2014; 40: 40-47.
12. Webster Marketon J.I., Glaser R. Stress hormones and immune function. *Cell. Immunol*. 2008; 252: 16-26
13. Golden SA, Covington HE, 3rd, Berton O, Russo SJ. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat Protoc*. 2011; 6(8): 1183-1191.
14. Chen BR, Du LJ, He HQ, Kim JJ, Zhao Y, Zhang YW, Luo L, Dai N. Fructo-oligosaccharide intensifies visceral hypersensitivity and intestinal inflammation in a stress-induced irritable bowel syndrome mouse model. *World J Gastroenterol*. 2017; 23(47): 8321-8333.
15. Watanabe Y, Arase S, Nagaoka N, Kawai M, Matsumoto S. Chronic Psychological Stress Disrupted the Composition of the Murine Colonic Microbiota and Accelerated a Murine Model of Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One*. 2016; 11(3).

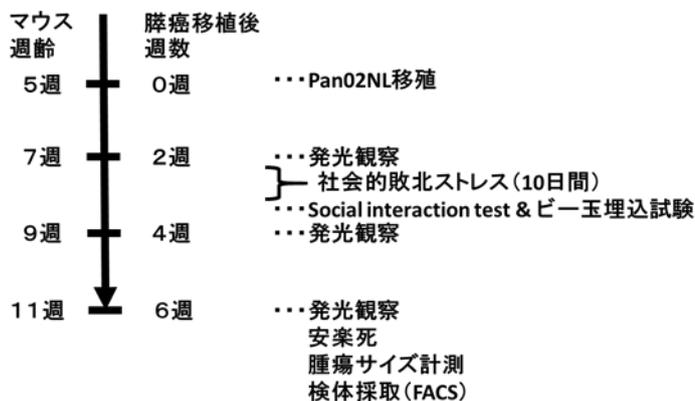
16. Guerrero-Alba R, Valdez-Morales EE, Jimenez-Vargas NN, Lopez-Lopez C, Jaramillo-Polanco J, Okamoto T, Nasser Y, Bunnett NW, Lomax AE, Vanner SJ. Stress activates pronociceptive endogenous opioid signaling in DRG neurons during chronic colitis. *Gut*. 2017; 66: 2121-2131.
17. Nozu T, Miyagishi S, Nozu R, Takakusaki K, Okumura T. Altered colonic sensory and barrier functions by CRF: roles of TLR4 and IL-1. *Journal of Endocrinology*. 2018; 239: 241-252.
18. Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gogenur I. Cytotoxic CD8(+) T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer*. 2021; 124(2): 359-367.
19. Reiser J, Banerjee A. Effector, Memory, and Dysfunctional CD8(+) T Cell Fates in the Antitumor Immune Response. *J Immunol Res*. 2016; 2016.
20. Hall M, Liu H, Malafa M, Centeno B, Hodul PJ, Pimiento J, Pilon-Thomas S, Sarnaik AA. Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) from human pancreatic tumors. *J Immunother Cancer*. 2016; 4: 61.
21. Chai MG, Kim-Fuchs C, Angst E, Sloan EK. Bioluminescent orthotopic model of pancreatic cancer progression. *J Vis Exp*. 2013(76).
22. Nishikawa M, Kinoshita M, Morimoto Y, Ishikiriya T, Nakashima M, Nakashima H, Ono T, Seki S, Moriya T, Yamamoto J, Kishi Y. Lipopolysaccharide preconditioning reduces liver metastasis of Colon26 cells by enhancing antitumor activity of natural killer cells and natural killer T cells in murine liver. *J Gastroenterol Hepatol*. 2020.
23. de Brouwer G, Wolmarans W. Back to basics: A methodological perspective on marble-burying behavior as a screening test for psychiatric illness. *Behav Processes*. 2018; 157: 590-600.

24. Epshtein A, Sakhneny L, Landsman L. Isolating and Analyzing Cells of the Pancreas Mesenchyme by Flow Cytometry. *J Vis Exp*. 2017(119).
25. Okada Y, Tsuzuki Y, Takeshi T, Furuhashi H, Higashiyama M, Watanabe C, Shirakabe K, Kurihara C, Komoto S, Tomita K, Nagao S, Miura S, Hokari R. Novel probiotics isolated from a Japanese traditional fermented food, Funazushi, attenuates DSS-induced colitis by increasing the induction of high integrin  $\alpha$ v/ $\beta$ 8-expressing dendritic cells. *J Gastroenterol*. 2018; 53(3): 407-418.
26. Koga M, Toda H, Kinoshita M, Asai F, Nagamine M, Shimizu K, Kobayashi Y, Morimoto Y, Yoshino A. Investigation of the impact of preconditioning with lipopolysaccharide on inflammation-induced gene expression in the brain and depression-like behavior in male mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2020; 103.
27. Shirakabe K, Higashiyama M, Furuhashi H, Takajo T, Maruta K, Okada Y, Kurihara C, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Nagao S, Miura S, Saruta M, Hokari R. Amelioration of colitis through blocking lymphocytes entry to Peyer's patches by sphingosine-1-phosphate lyase inhibitor. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018.
28. Inoue T, Tsuzuki Y, Matsuzaki K, Matsunaga H, Miyazaki J, Hokari R, Okada Y, Kawaguchi A, Nagao S, Itoh K, Matsumoto S, Miura S. Blockade of PSGL-1 attenuates CD14<sup>+</sup> monocytic cell recruitment in intestinal mucosa and ameliorates ileitis in SAMP1/Yit mice. *J Leukoc Biol*. 2005; 77(3): 287-295.

29. Yamada C, Mogami S, Hattori T. Psychological stress exposure to aged mice causes abnormal feeding patterns with changes in the bout number. *Aging (Albany NY)*. 2017 Nov 9; 9(11): 2269-2287.
30. Antoni MH, Dhabhar FS. The impact of psychosocial stress and stress management on immune responses in patients with cancer. *Cancer*. 2019 May 1; 125(9): 1417-1431.
31. Ishibashi M, Miyanaga Y, Matsuoka S, Kozuka J, Togashi Y, Kinashi T, Ueda M. Integrin LFA-1 regulates cell adhesion via transient clutch formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 464(2): 459-466.
32. Sawada T, Kimura K, Nishihara T, Onoda N, Teraoka H, Yamashita Y, Yamada N, Yashiro M, Ohira M, Hirakawa K. TGF-beta1 down-regulates ICAM-1 expression and enhances liver metastasis of pancreatic cancer. *Adv Med Sci*. 2006; 51: 60-65.
33. Reina M, Espel E. Role of LFA-1 and ICAM-1 in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2017; 9(11).
34. Hong L, Imeri L, Opp MR, Postlethwaite AE, Seyer JM, Krueger JM. Intercellular adhesion molecule-1 expression induced by interleukin (IL)-1 beta or an IL-1 beta fragment is blocked by an IL-1 receptor antagonist and a soluble IL-1 receptor. *J Neuroimmunol*. 1993 May; 44(2): 163-170.
35. Dimitrov S, Hulteng E, Hong S. Inflammation and exercise: Inhibition of monocytic intracellular TNF production by acute exercise via beta2-adrenergic activation. *Brain Behav Immun*. 2017; 61: 60-68.

# 図 表

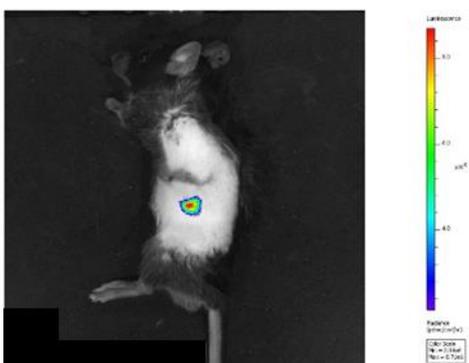
## A 実験プロトコール



## B 膵癌移植



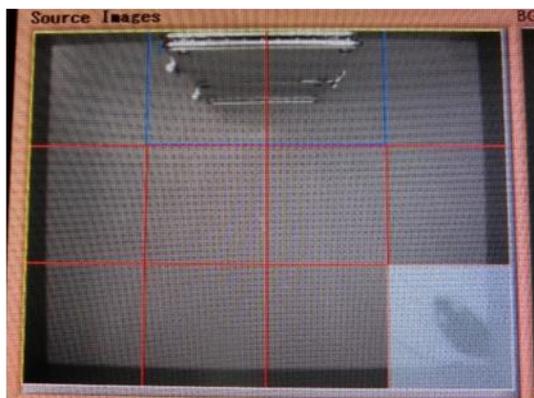
## C 膵癌発光



## D 社会的敗北ストレス



## E Social interaction test



## F ビー玉埋込試験



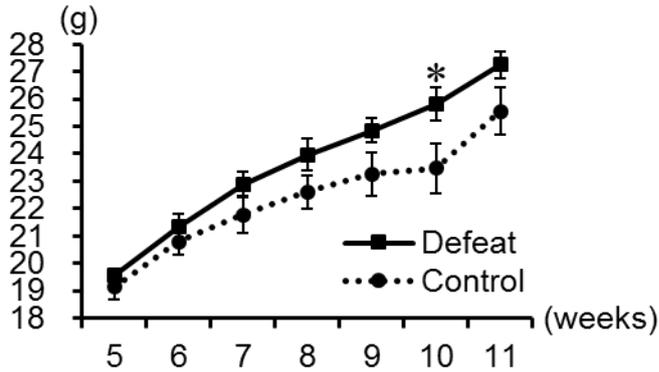
## G 膵癌サイズ計測



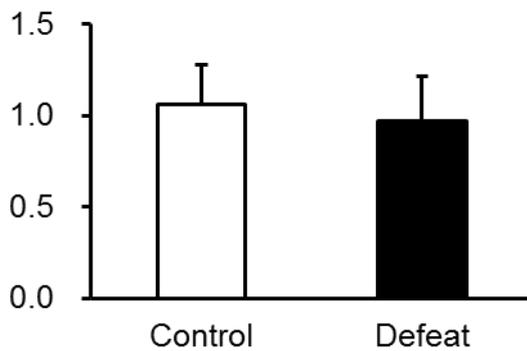
図1 膵癌と社会的敗北ストレス

- 実験プロトコール.
- マトリゲルに懸濁した $5 \times 10^6$ 個のPan02NLをC57BL/6Jマウスの膵臓に同所性移植した.
- 膵癌移植後2週にIVISを用いてセレンテラジンh静注で膵癌の発光を観察して生着を確認した.
- 引き続き10日間の社会的敗北ストレスを負荷した.
- E, F WASもしくはSham-WASに引き続き行動試験としてSocial interaction testとMarble burying testを実施した.
- 膵癌移植後6週に膵癌サイズを計測し, 腫瘍体積を $\pi/6 \times a \times b \times c$ で計算した (aは脾臓の長軸に垂直な長さ, bは脾臓の長軸に平行な長さ, cは厚さと定義した.) .

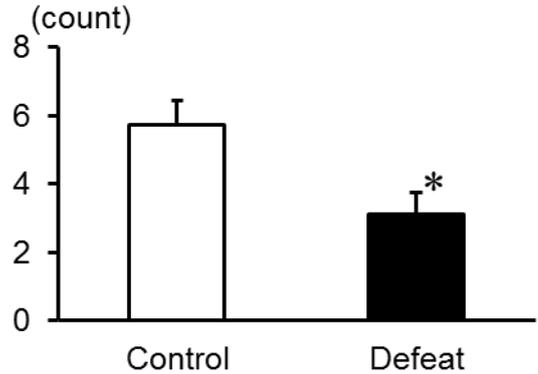
A 体重の推移



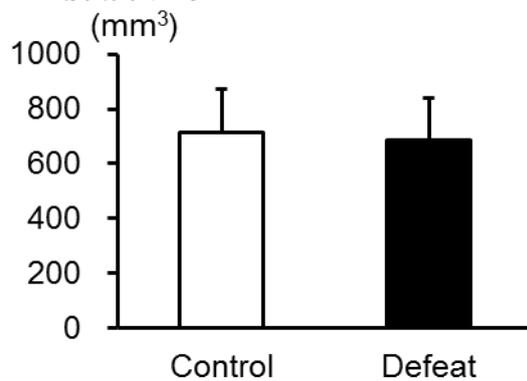
B SI ratio



C 埋込ビー玉数



D 脾臓サイズ



E フローサイトメトリー結果

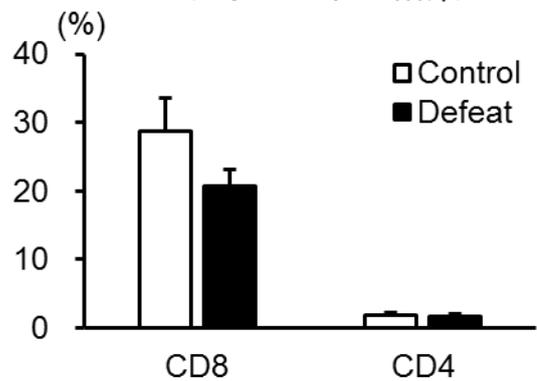
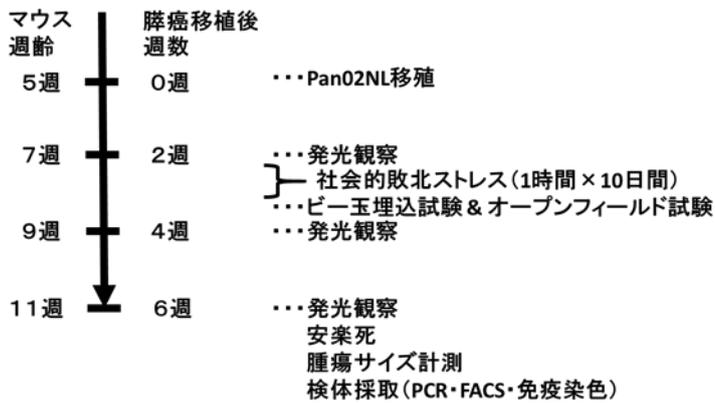


図2

- A 担癌C57BL/6Jマウスの体重の推移。\* $p < 0.05$ : Control群との比較。Control,  $n=8$ ; Defeat,  $n=7$ 。  
 B Social interaction testにおけるSocial interaction ratio。Control群とDefeat群でSI ratioに有意差を認めなかった。Control,  $n=8$ ; Defeat,  $n=7$ 。  
 C ビー玉埋込試験における埋込ビー玉数。\* $p < 0.05$ : Control群との比較。Control,  $n=8$ ; Defeat,  $n=7$ 。  
 D 脾臓移植から6週間後の脾臓サイズ。Control群とDefeat群で脾臓サイズに有意差を認めなかった。Control,  $n=8$ ; Defeat,  $n=7$ 。  
 E 脾臓内リンパ球のフローサイトメトリー。Control群とDefeat群でCD8, CD4陽性リンパ球ともに有意差を認めなかった。Control,  $n=8$ ; Defeat,  $n=7$ 。

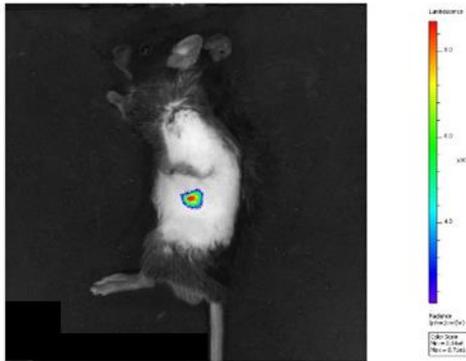
## A 実験プロトコール



## B 膵癌移植



## C 膵癌発光



## D 水回避ストレス



## E ビー玉埋込試験



## F オープンフィールド試験



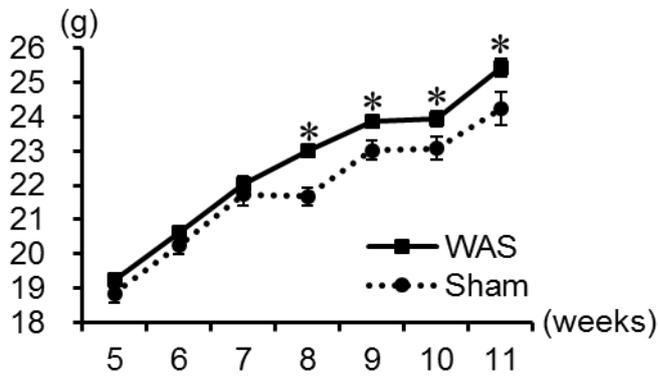
## G 膵癌サイズ計測



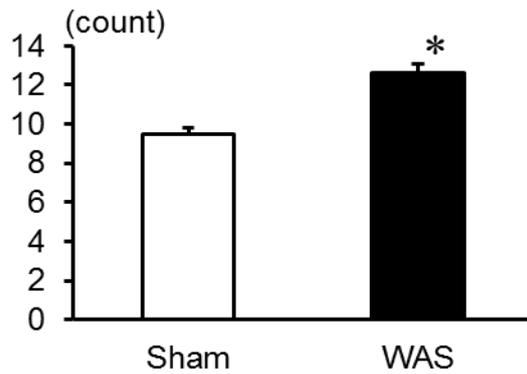
図3 膵癌と水回避ストレス

- A 実験プロトコール.  
 B マトリゲルに懸濁した $5 \times 10^6$ 個のPan02NLをC57BL/6Jマウスの膵臓に同所性移植した.  
 C 膵癌移植後2週にIVISを用いてセレンテラジン<sup>h</sup>静注で膵癌の発光を観察して生着を確認した.  
 D 引き続き10日間の水回避ストレスを負荷した.  
 E, F WASもしくはSham-WASに引き続き行動試験としてMarble burying testとOpen field testを実施した.  
 G 膵癌移植後6週に膵癌サイズを計測し、腫瘍体積を $\pi/6 \times a \times b \times c$ で計算した (aは脾臓の長軸に垂直な長さ, bは脾臓の長軸に平行な長さ, cは厚さと定義した.) .

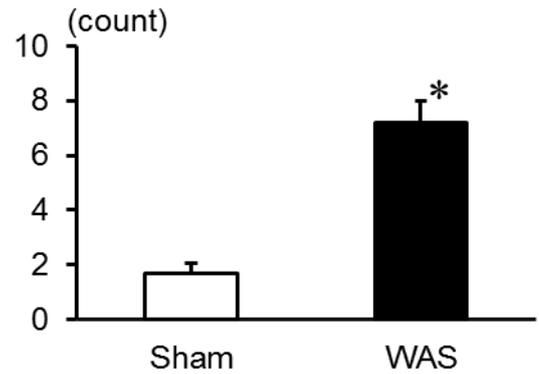
### A 体重の推移



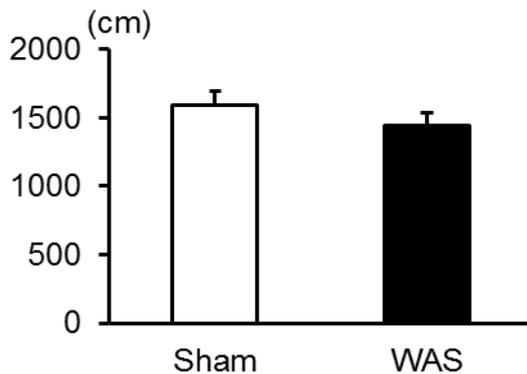
### B WAS中の便回数



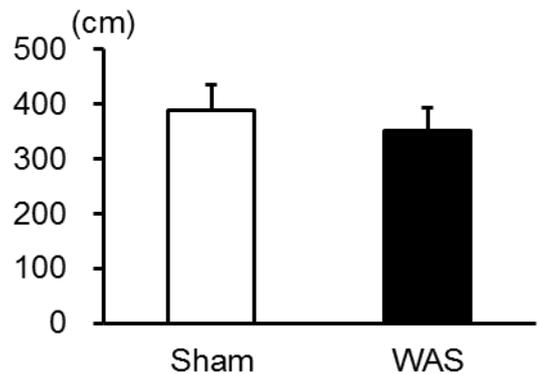
### C 埋込ビー玉数



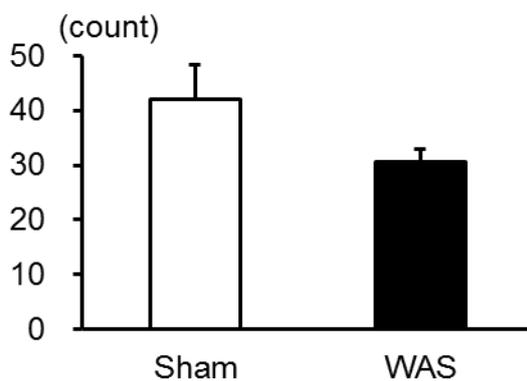
### D 総歩行距離



### E 中心ゾーンの総歩行距離



### F 中心ゾーンエントリー回数



### G 中心ゾーン滞在時間

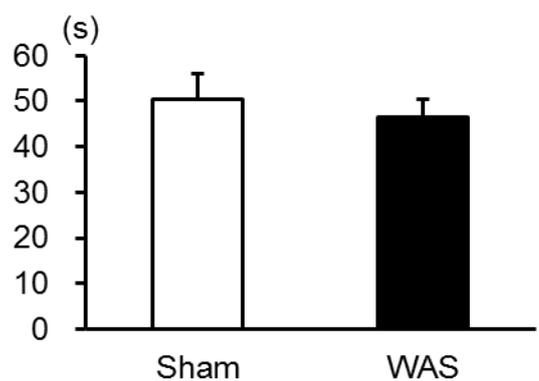
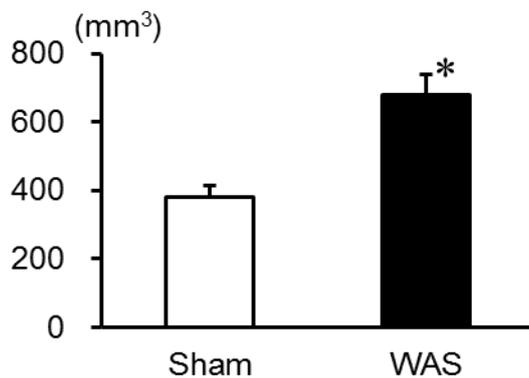


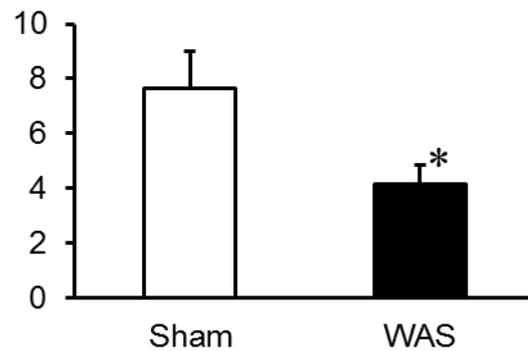
図4

A 担癌C57BL/6Jマウスの体重の推移. \* $p < 0.05$ : Sham群との比較. Sham,  $n = 20$ ; WAS,  $n = 21$ .  
 B ShamもしくはWASセッション中の便回数. \* $p < 0.05$ : Sham群との比較. Sham,  $n = 20$ ; WAS,  $n = 21$ .  
 C ビー玉埋込試験における埋込ビー玉数. \* $p < 0.05$ : Sham群との比較. Sham,  $n = 20$ ; WAS,  $n = 21$ .  
 D-G オープンフィールド試験結果. Sham群とWAS群で総歩行距離・中心ゾーンの総歩行距離・中心ゾーンエントリー回数・中心ゾーン滞在時間に有意差を認めなかった. Sham,  $n = 20$ ; WAS,  $n = 21$ .

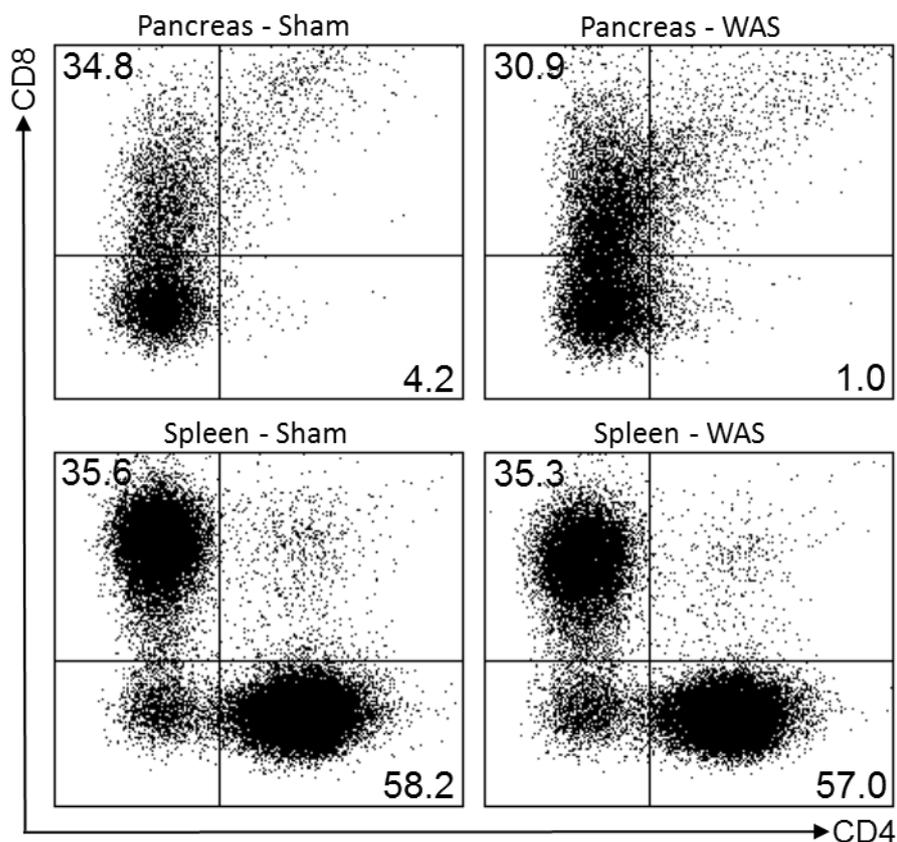
### A 膵癌サイズ



### B IFN-γ mRNA発現



### C フローサイトメトリー画像



### D フローサイトメトリー結果

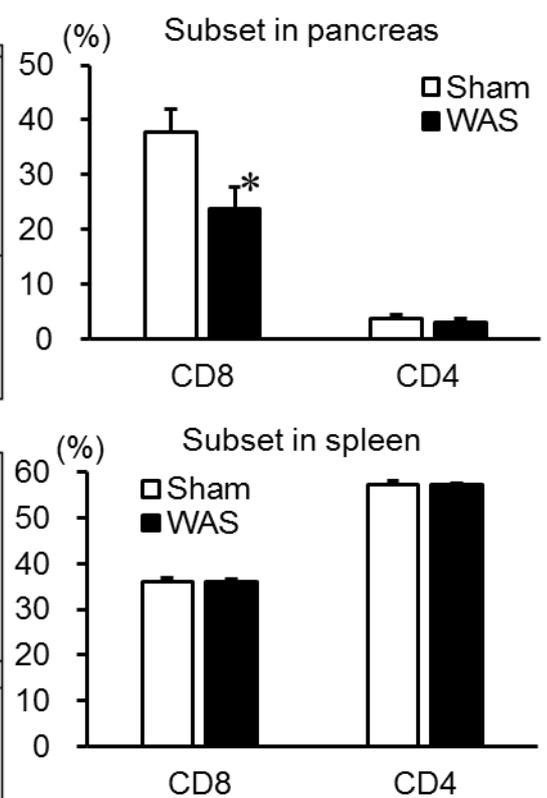
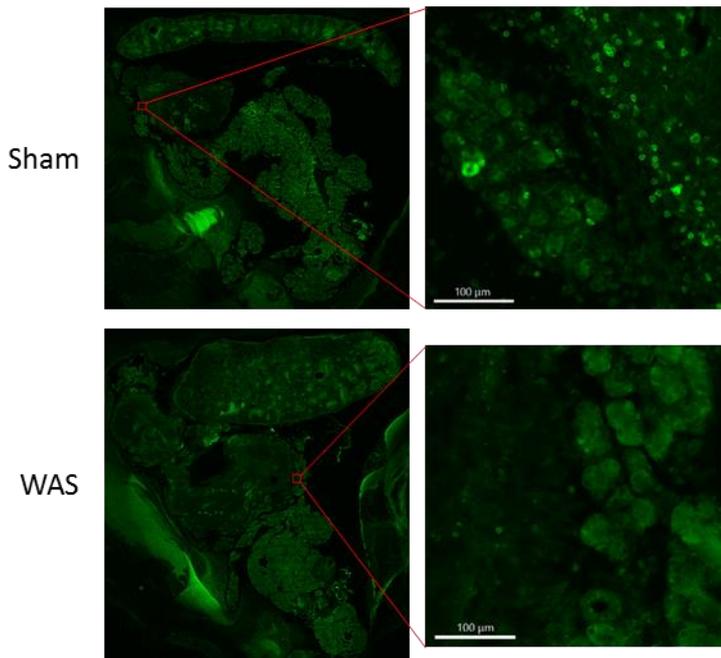


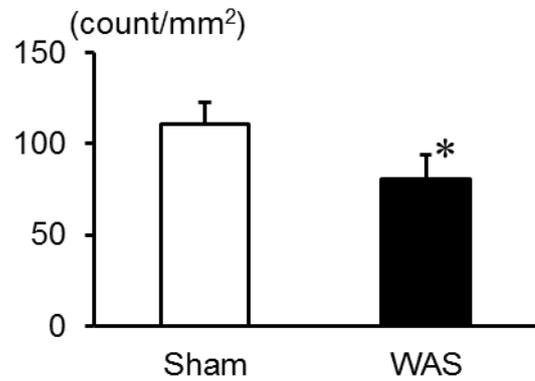
図5

- A 膵癌移植から6週間後の膵癌サイズ. \* $p < 0.05$ : Sham群との比較. Sham,  $n = 20$ ; WAS,  $n = 21$ .  
 B 定量的PCR検査による相対的IFN- $\gamma$  mRNA量. RNAは膵癌移植から6週間の時点で傍腫瘍領域から抽出した.  
 \* $p < 0.05$ : Sham群との比較. Sham,  $n = 12$ ; WAS,  $n = 13$ .  
 C 膵臓と脾臓におけるCD8, CD4陽性Tリンパ球サブセットをフローサイトメトリーで解析したデータ.  
 D 膵臓と脾臓におけるCD8, CD4陽性Tリンパ球の割合. \* $p < 0.05$ ; 対応するSham群との比較. 各群 $n = 8$ .

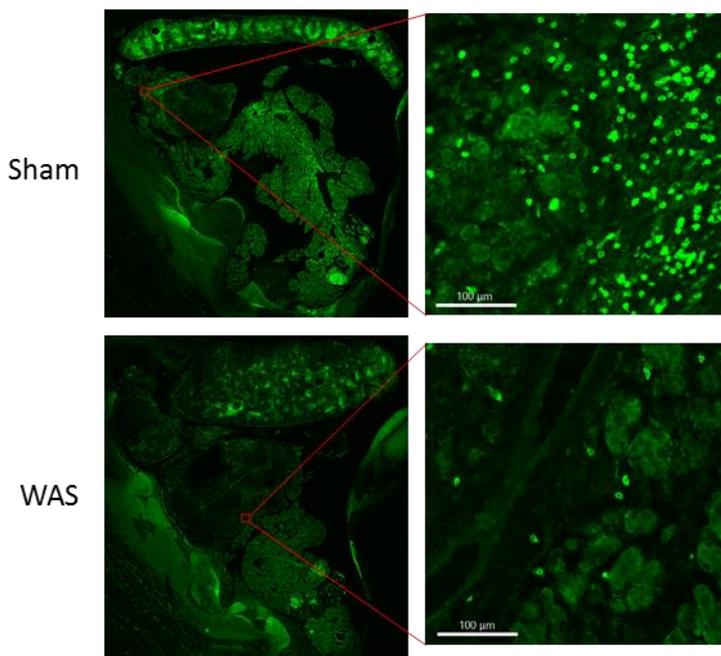
### A CD8陽性Tリンパ球の免疫染色



### B CD8陽性Tリンパ球数



### CD4陽性Tリンパ球の免疫染色



### CD4陽性Tリンパ球数

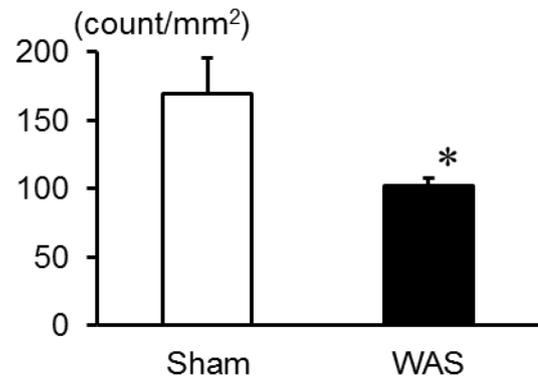


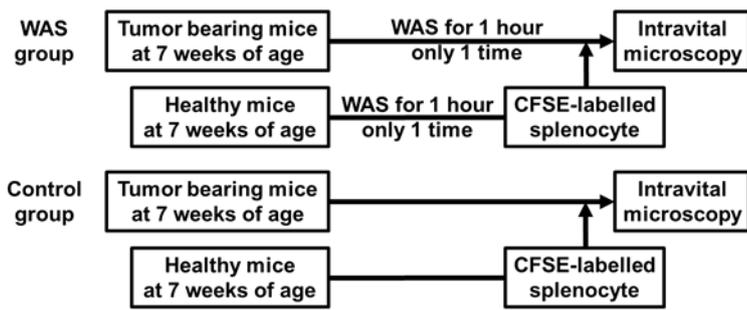
図6

A 脾癌・脾臓・脾臓の免疫染色画像. 上段の4つがCD8陽性Tリンパ球の免疫染色画像で, 下段の4つがCD4陽性Tリンパ球の免疫染色画像.

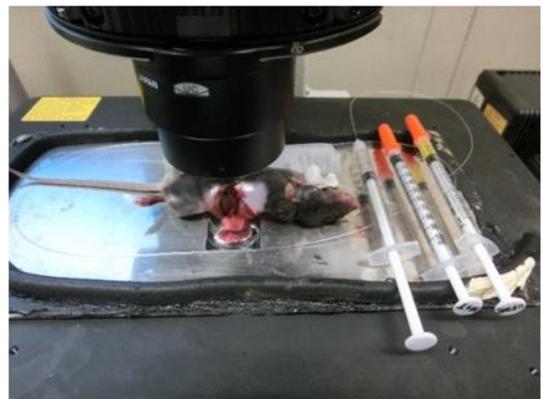
B Keyence BZ-X810 fluorescence microscopeとBZ-H4C/Hybrid・BZ-H4CM/Macro cell countソフトウェアを用いて, 免疫染色されたCD8, CD4陽性Tリンパ球数を傍腫瘍領域の代表5点で解析した.

\* $p < 0.05$ ; Sham群と比較. 各群 $n = 6$ .

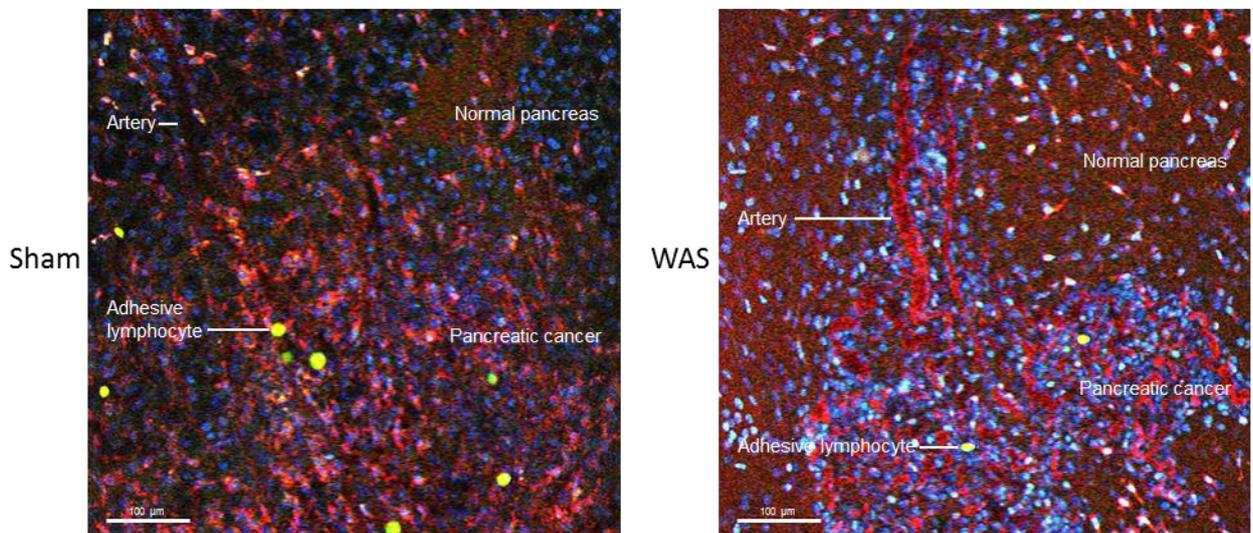
### A 実験プロトコール



### B 共焦点顕微鏡



### C 生体顕微鏡画像



### D 接着リンパ球数

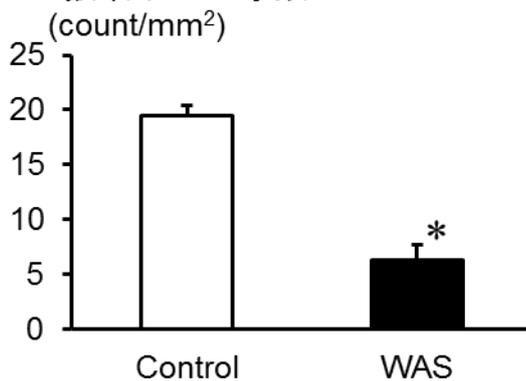
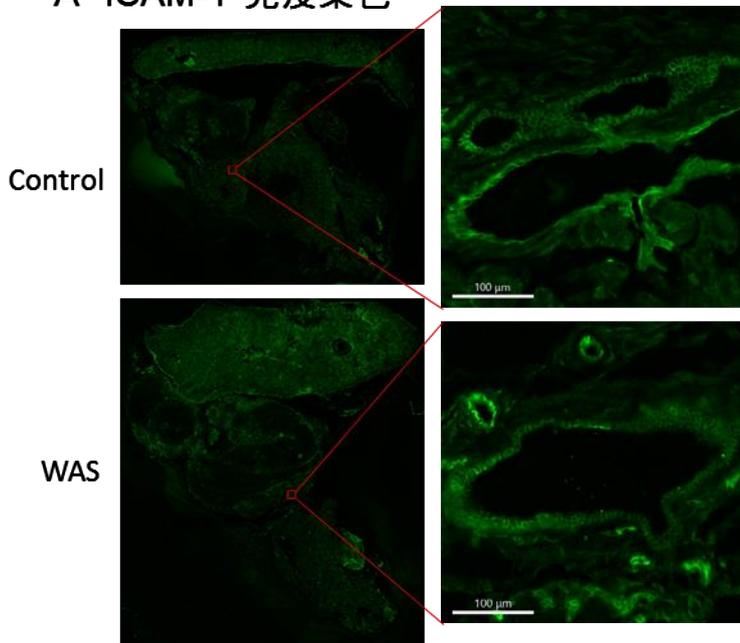


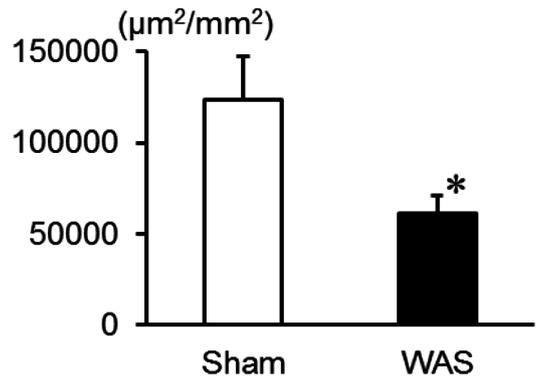
図7

- A 接着リンパ球観察の実験プロトコール.
- B 共焦点顕微鏡への担癌C57BL/6Jマウスのセッティング.
- C 傍腫瘍領域におけるリンパ球動態の共焦点顕微鏡画像. CFSEラベルされたリンパ球は緑色の球体として観察される.
- D CFSEラベルされたリンパ球を静脈投与してから15分後に傍腫瘍領域に接着しているリンパ球数を評価した. \* $p < 0.05$ ; コントロール群と比較. Control,  $n=5$ ; WAS,  $n=6$ .

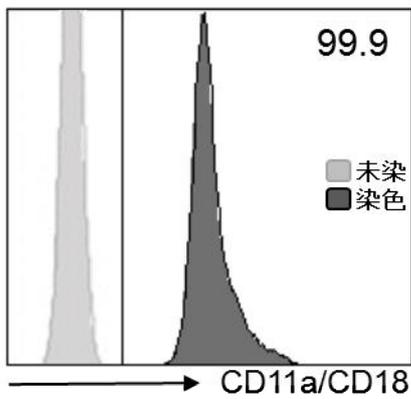
### A ICAM-1 免疫染色



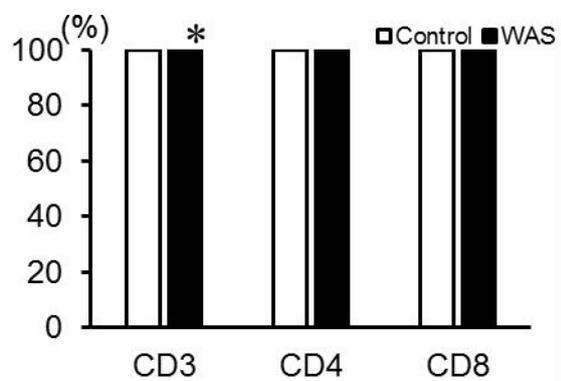
### B ICAM-1 発現面積



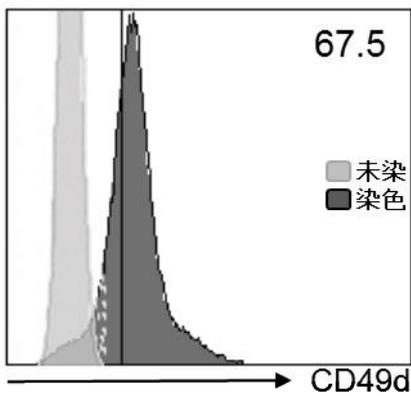
### C CD11a/CD18 (Gate: CD3)



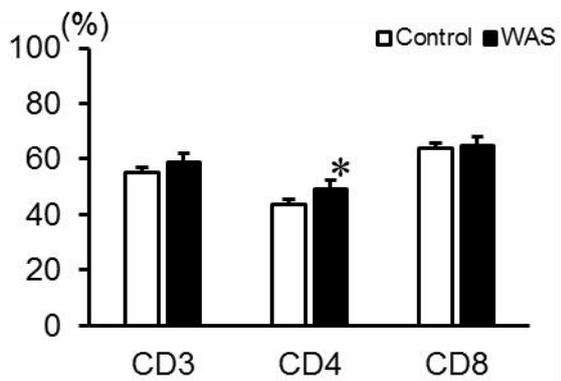
### D CD11a/CD18 発現



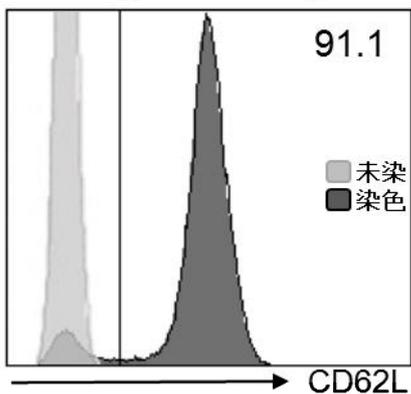
### E CD49d (Gate: CD3)



### F CD49d 発現



### G CD62L (Gate: CD3)



### H CD62L 発現

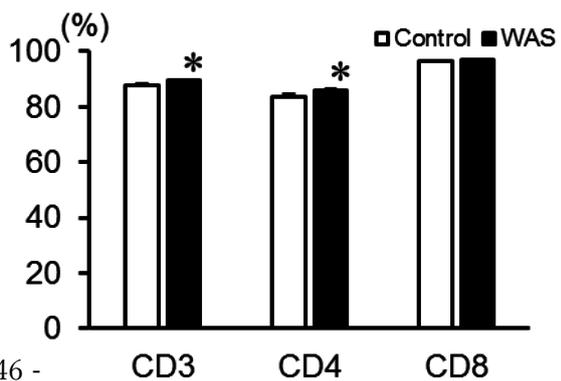


図8

- A 血管内皮細胞のICAM-1免疫染色を行った脾癌・脾臓・脾臓の免疫染色画像。
- B Keyence BZ-X810 fluorescence microscopeとBZ-H4C/Hybrid・BZ-H4CM/Macro cell countソフトウェアを用いて、免疫染色されたICAM-1発現領域の面積を傍腫瘍領域の代表5点で解析した。  
\* $p < 0.05$ ; Control群と比較. 各群 $n=6$ .
- C, E, G CD3陽性脾臓Tリンパ球でCD11a/CD18, CD49d, CD62L発現をフローサイトメトリーで解析したデータ。
- D, F, H CD3, CD4, CD8それぞれのサブセットにおける, CD11a/CD18, CD49d, CD62L陽性細胞の割合を解析した。\* $p < 0.05$ ; Control群と比較. 各群 $n=8$ .

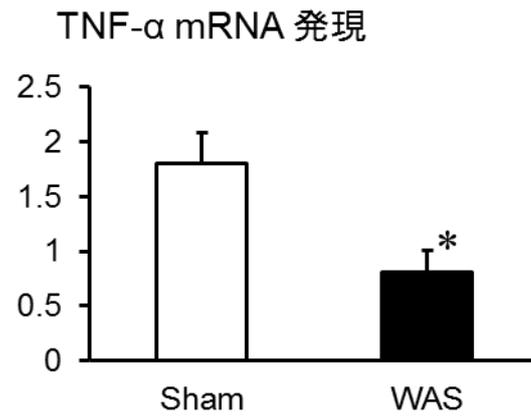


図9

定量的PCR検査による相対的TNF- $\alpha$  mRNA量. RNAは脾癌移植から6週間の時点で傍腫瘍領域から抽出した.

\* $p < 0.05$ ; Sham群と比較. Sham,  $n = 12$ ; WAS,  $n = 13$ .