

令和 2年 11月 16日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成31年度

受付番号 20960035

氏名 岡知徳

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：ポストン（国名：アメリカ合衆国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
TSLPの日光角化症に対する抗腫瘍効果の機序に関する研究
3. 派遣期間：令和 1年 5月 17日 ～ 令和 3年 11月 16日（915日間）
4. 受入機関名及び部局名
受入機関名：ハーバード医科大学
部局名：Cutaneous Biology Research Center

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記

入も可)

【記載事項】

- ・ 研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等
 - ・ 新型コロナウイルス感染症の影響にかかる特例措置のうち、国内採用開始・採用期間延長・翌年度渡航のいずれかの適用を受けた場合は、当該措置の適用による影響等
- (注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

TSLP の日光角化症に対する抗腫瘍効果の機序に関する研究として、まずランダム化比較臨床試験により得られた calcipotriol plus 5-FU での治療前後の日光角化症の組織を用いて、腫瘍関連シグナルの発現を調べた。具体的には TSLP と協調して CD4 陽性 T 細胞を病変部に誘導、活性化させるシグナルとして damage-associated molecular patterns (以下 DAMPs) の発現を、蛍光免疫染色を用いて腫瘍細胞の発現の変化を調べた。代表的な DAMPs として HMGB1, calreticulin, annexin A1, S100A9, S100A8 の病変部での発現の変化を調べたところ、HMGB1, calreticulin, annexin A1 の発現が治療前後で上昇していることがわかった。これらの DAMPs のうち HMGB1 は TLR4 が受容体となり、免疫応答を誘導することが報告されていることから、マウスモデルでの TLR4 の antagonist として MyD88 inhibitor を用いた in vivo での実験を計画、実行したが、有意な差を見られなかった(詳細は後述する)。我々はランダム化比較臨床試験とは別にその機序の解明を目的として open clinical trial も実行した。18名の日光角化症患者を対象に全例に calcipotriol plus 5-FU 療法を用い、治療前後の生検を行って組織学的検討を行った。まず TSLP が日光角化症病変部において発現が上昇していることを確認した。次に病変部に浸潤する免疫細胞の評価を行ったところ、CD4 陽性 T 細胞が真皮において有意に増加し、その多くが GATA3 陽性の Th2 polarized CD4 陽性 T 細胞であることが確認された。他の転写因子も確認したが、Foxp3 陽性 T 細胞が一部確認されるのみで、Tbet, RORgt 陽性はほぼ存在せず、cytotoxic CD4 T cell も確認されず、perforin, granzyme B などの cytotoxic molecule も確認されなかった。

また臨床試験の検体より、calcipotriol での治療群において病変部に Th2 細胞が優位に増加していることが確認されており、TSLP による抗腫瘍効果に Th2 細胞が主要な役割を果たしていることが示唆されている。マウスモデルでの TSLP の抗腫瘍効果への Th2 細胞の役割を検討するため、以下の動物実験を計画した。まず K14-TSLPtg マウスという表皮での TSLP の発現が恒常的に上昇しているマウスと Rag1^{-/-} という mature な T 細胞、B 細胞ともに存在しないマウスを掛け合わせた。K14-TSLPtg, Rag1^{-/-} マウスに Rag1^{+/-} マウスから CD4 陽性 T 細胞を cell sorter を用いて purify し、adoptive T cell transfer を行った。陽性コントロールとして K14-TSLPtg, Rag1^{+/-}, 陰性コントロールとして Rag1^{-/-} マウスに adoptive T cell transfer を行った群、Rag1^{+/-} マウス (transfer なし) を用いた。これらのマウスに DMBA/TPA による発がんモデルを行ったところ、K14-TSLPtg, Rag1^{-/-} マウスに CD4 陽性 T 細胞を adoptive T cell transfer したグループにおいて陰性コントロール群よりも腫瘍の新生が抑制された結果を得た。またこれらのマウスにおいて表皮、リンパ節から免疫細胞を回収し、フローサイトメトリーで解析したところ、transfer した CD4 陽性 T 細胞が transfer から約 5 か月後も残存しており、これらの T 細胞の多くが Th2 細胞であったことから、TSLP による刺激により transfer した T 細胞が Th2 細胞となっていることが確認された。これらの細胞が TSLP による抗腫瘍効果で重要な役割を果たしていることがマウスモデルでも確認された。またこの実験により CD4 陽性 T 細胞が TSLP の抗腫瘍効果を発揮するうえで十分であることがわかった。

また別のマウスモデルとして、TSLP による抗腫瘍効果が Th2 細胞を必要としていることを確認するため以下の動物実験を行った。K14-TSLPtg マウスと Il4ra^{-/-} マウスを掛け合わせた。Il4ra^{-/-} マウスは Th2 系の免疫応答を誘導するのに必須なサイトカインである IL-4 の受容体を欠損したマウスで、Th2 系の免疫応答を誘導できない。よって TSLP による抗腫瘍効果が減弱、ないしは消失することが期待された。Test 群として K14-TSLPtg, Il4ra^{-/-}、陰性コントロールとして Il4ra^{-/-} 群、Rag1^{+/-} 群を用いて、DMBA/TPA による発がんモデルを

行った。結果として K14-TSLPtg, Il4ra^{-/-}群、Il4ra^{-/-}群共に Rag1^{+/-}群よりも腫瘍の新生が早まり、それらに K14-TSLPtg の有無は関係なかった。つまり IL4 の受容体の欠損は TSLP に関わらず、腫瘍の新生を早め、TSLP の抗腫瘍効果は IL4 を必要としていることが確認された。つまり IL4 シグナルにより Th2 polarization が TSLP の抗腫瘍効果において重要な役割を果たしていると考えられた。

また別のマウスモデルとして、K14-TSLPtg マウスよりもよりヒトでの臨床治験に近いモデルとして、calcipotriol と 5-FU を併用する外用治療の腫瘍細胞への効果を確認する実験を行った。従来マウスにおいてはヒトで臨床的に用いられている 5-FU の濃度では抗腫瘍効果が大きすぎるため、TSLP を誘導する作用のある calcipotriol の上乗せないし相乗効果が確認できなかった。そのため、マウスではヒトで臨床的に用いられている 5%ではなく、0.1%、0.5%の 5-FU の外用に加えて calcipotriol を併用した群、ethanol を併用した群（コントロールとして）に分けた。結果として 0.5% 5-FU と calcipotriol は 0.5% 5-FU に比べて優位に腫瘍の新生を抑制する効果が確認された。この 0.5% 5-FU と calcipotriol の併用療法を用いて以下の追加実験を行った。TSLP による抗腫瘍効果に必要な免疫担当細胞、特に CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の役割を検討するため、CD4/8 knockout マウスを用いた以下の実験を行った。マウスをまず以下のグループに分けた。CD4/8 knockout 群、CD4/8 knockout に加えて WT マウスから CD4 陽性細胞の adoptive transfer を行った群、CD8 陽性細胞の adoptive transfer を行った群、WT マウスに分け、これらのマウスに DMBA/TPA による腫瘍モデルを行い、DMBA 投与から 5 週が経過したところで adoptive transfer を行い、その 1 日後に calcipotriol と 5-FU の併用療法を週 3 回、合計 9 回行った。その後腫瘍の新生を観察しているが、CD4/8 knockout マウスは WT マウスに比べて腫瘍の新生が多く認められているが、CD4 ないし CD8 陽性細胞の adoptive transfer 群では CD4/8 knockout 群と変わらないため、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞が calcipotriol と 5-FU の併用において、

必要であることが示唆されたが、CD4 陽性細胞単独、ないし CD8 陽性細胞単独では calcipotriol と 5-FU の併用療法の効果は十分に発揮されないことが示唆された。

また別のマウスモデルとして、DAMPs が calcipotriol と 5-FU の併用療法における役割を検討するため、多くの DAMPs が toll like receptor 特に TLR4 を介して作用することから、TLR4 の構成要素である MyD88 の inhibitor を用いた実験を行った。同時に CD4 陽性細胞の役割も検討するため CD4 depletion も行った。具体的には WT マウスに MyD88 inhibitor を投与する群、WT マウス群、CD4 depletion を行った群に分けて、これらのマウスに DMBA/TPA による腫瘍形成を行い、DMBA から 5 週経過したところで MyD88 inhibitor ないし CD4 depletion、または control peptide、IgG control を腹腔投与し、その 1 日後から calcipotriol と 5-FU 併用療法を週 3 回、合計 9 回行った。治療期間中は MyD88 inhibitor は週 3 回継続し、CD4 depletion は週 1 回継続した。Control 群には control peptide、IgG control を投与した。MyD88 inhibitor の投与のある、なしで腫瘍新生に目立った変化はなく、少なくとも TLR4 シグナルのみのブロックで calcipotriol と 5-FU の効果に大きな影響はないことが示唆される。CD4 depletion を calcipotriol, 5-FU 併用療法と同時に行ったところ、calcipotriol, 5-FU 併用療法の治療効果が減弱したことから、CD4 陽性 T 細胞が併用療法において必要であることが示唆された。

Calcipotriol plus 5-FU 併用療法において腫瘍細胞がいかにして死亡したかを確認するために、Cleaved gasdermin D, TUNEL stain, Cleaved caspase 3, Cleaved caspase 7, LC3b の染色を行ったところ、LC3b、Cleaved caspase 7 が陽性であることが確認された。これにより toxic autophagy, apoptosis が腫瘍細胞の死の機序であることが推察された。ランダム化比較臨床試験のサンプルを用いて RNA seq analysis をしたところ、炎症に関わる遺伝子の発現が上昇していたが中でも IL-24 が特に発現が上昇していた。IL-24 は腫瘍を特異的

に toxic autophagy, apoptosis を起こして細胞死を起こすことが広く知られているため我々は IL-24 に focus した。Open clinical trial のサンプルを用いたところ IL-24 の発現が治療後に上昇していることを確認した。また有棘細胞癌の cell line である SCC-12, SCC-13 を用いて、どのサイトカインや薬剤が IL-24 の発現を誘導するかを検討したところ、IL-4、IL-13 が IL-24 の発現を誘導することが確認できた。次に IL-24 を過剰発現させる adenovirus vector を IL-24 についての論文を多数発表している Virginia commonwealth university の Paul B Fisher 博士の研究室より頂き、有棘細胞癌の cell line に用いた。5-FU と併用し、5-FU 単独と比べて IL-24 を過剰発現させた際に apoptosis が起こり、同時に autophagic flux も上昇していることから、toxic autophagy により apoptosis が起こっていることが示唆された。同じ実験系で autophagy inhibitor である 3-methyladenine を併用し、細胞死が抑えられたこと、autophagic flux が抑えられたことより細胞死の機序に toxic autophagy が関わることを示された。

以上の結果より calcipotriol plus 5-FU 併用療法の機序として以下のように考えられた。

1. Calcipotriol により表皮に TSLP の発現が誘導され、Th2 type immunity が誘導される。
2. 同時に calcipotriol plus 5-FU により DAMPs の発現が誘導され、免疫応答がさらに強化される。
3. Th2 polarized CD4 により産生される IL-4、IL-13 などの Th2 derived cytokine により表皮の日光角化症 keratinocyte に IL-24 の発現が誘導される。
4. IL-24 の発現により toxic autophagy, apoptosis が起こり、細胞死が起こる。

以上の結果を現在まとめて論文投稿を予定している。マウスモデルで IL-24 ノックアウトマウスを作成しており、K14-TSLPtg マウスと掛け合わせることで、TSLP が過剰発現している状態で IL-24 が欠損して TSLP の抗腫瘍効果が消失、ないし減弱していれば IL-24 が TSLP の下流で抗腫瘍効果を発揮している可能性をさらに示すことができると考え、実験を計画している。

・ 新型コロナウイルス感染症の影響にかかる特例措置のうち、国内採用開始・採用期間延長・
翌年度渡航のいずれかの適用を受けた場合は、当該措置の適用による影響等
新型コロナウイルス感染症に伴うラボの閉鎖、マウス実験系の中止などにより甚大な影響を受
けたものの、当該措置の適用により以上の研究を遂行できた。論文投稿には至っていないも
のの、ほぼすべてのデータは出そろっており、近日論文投稿できるものと考えている。