

氏 名 かど ともおぶ  
角 朝信

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 181 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程  
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 **CD8+T cell exhaustion underlies high-fat diet-induced tumorigenesis**  
(CD8+T cell 疲弊が高脂肪食による発癌促進の基礎となる)

論文審査委員

(主査) 教授 森 寿

(副査) 教授 白木 公康

(副査) 教授 齋藤 滋

(副査) 教授 北村 寛

(指導教員) 教授 戸邊 一之

# 論文内容の要旨

## [目的]

肥満は乳癌、大腸癌、子宮体癌など数種の癌リスクを増加させる。エストロゲン、インスリン、インスリン様成長因子、レプチンなどが肥満による癌リスク増加と関連することが報告されている。しかしながら、肥満がどのように癌発生に関与するか根本的な機序は十分に解明されていない。今回我々は、免疫抑制因子、血管新生因子、炎症性サイトカインなどを介してマクロファージを始めとする免疫細胞が癌微小環境を調節し癌細胞を支持していることを鑑み、肥満と癌発生をつなぐ機序を明らかにするためマクロファージやT細胞の表現型の変化に着目して検討を行った。

## [方法並びに成績]

### [方法]

乳癌自然発症マウスモデルのMMTV-PyMT (PyMT)マウスを通常食群と高脂肪食群に分け、腫瘍の発生率・数・重量・体積の評価、遺伝子発現解析および腫瘍内マクロファージ、腫瘍内CD8<sup>+</sup>T細胞についてフローサイトメトリー、免疫染色、遺伝子発現解析を行った。また、野生型同腹仔マウスを通常食群と高脂肪食群に分け、乳腺のマクロファージやCD8<sup>+</sup>T細胞についてフローサイトメトリー、免疫染色、遺伝子発現解析を行った。さらに、ジフテリアトキシンを投与することでCD206<sup>+</sup>M2-likeマクロファージを減少させることができるCD206-DTRマウスおよびCD206-DTR/PyMTマウスを用いて、CD206<sup>+</sup>M2-likeマクロファージの乳腺および腫瘍内での役割を解析した。

## [結果]

野生型同腹仔マウスの正常乳腺に常在するマクロファージは主にCD206<sup>+</sup> M2-likeマクロファージであった。PyMTマウスにおいては通常食群と比較して高脂肪食群で腫瘍発生は早まり、腫瘍の数・重量・体積が増加した。通常食群と比較して高脂肪食群の腫瘍は腫瘍増殖促進作用をもつ*Opn*の遺伝子発現が上昇していた。両群で腫瘍内では主にCD11c<sup>+</sup> M1-likeマクロファージが存在した。腫瘍内では野生型同腹仔マウスの正常乳腺と比べPD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞が増加しており、通常食群と比較して高脂肪食群で著明であった。PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞の遺伝子発現を解析するとPD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞と比較して*Opn*を高発現し、*Ifng*, *Gzmb*は低発現であった。CD206-DTRマウスではCD206<sup>+</sup> M2-likeマクロファージ減少時に乳腺のEdU<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞が増加した。CD206-DTR/PyMTマウスではCD206<sup>+</sup> M2-likeマクロファージ減少時に腫瘍発生が抑制された。

## [総括]

高脂肪食は腫瘍内でのPD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞からPD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞へのphenotypic switchを介して腫瘍発生・進展を促進することが示唆された。また、CD206<sup>+</sup> M2-likeマクロファージが抗腫瘍性のPD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞増殖を抑制し、腫瘍増殖促進的な機能を持つことが示唆された。

## 学位論文審査の要旨

### [研究目的]

肥満は乳癌、大腸癌、子宮体癌など数種の癌リスクを増加させる。エストロゲン、インスリン、インスリン様成長因子、レプチンなどが肥満による癌リスク増加と関連することが報告されている。しかしながら、肥満がどのように癌発生に関与するのか根本的な機序は充分には解明されていない。免疫抑制因子、血管新生因子、炎症性サイトカインなどを介してマクロファージを始めとする免疫細胞が癌微小環境を調節し癌細胞の発生と増殖を支持している可能性が示唆されており、本研究で角君は、肥満と癌発生をつなぐ機序を明らかにするためマクロファージやT細胞の表現型の変化に着目して検討を行った。

### [方法並びに成績]

乳癌自然発症マウスモデルのMMTV-PyMT (PyMT)マウスを通常食群と高脂肪食群に分け、腫瘍の発生率・数・重量・体積の評価、遺伝子発現解析および腫瘍内マクロファージ、腫瘍内CD8<sup>+</sup> T細胞についてフローサイトメトリー、免疫染色、遺伝子発現解析を行った。また、野生型同腹仔マウスを通常食群と高脂肪食群に分け、乳腺のマクロファージやCD8<sup>+</sup> T細胞についてフローサイトメトリー、免疫染色、遺伝子発現解析を行った。さらに、ジフテリアトキシンを投与することでCD206<sup>+</sup> M2-likeマクロファージを減少させることができるCD206-DTRマウス、およびCD206-DTR/PyMTマウスを用いて、CD206<sup>+</sup> M2-likeマクロファージの乳腺および腫瘍内での役割を解析した。

研究結果は以下のように要約される。

- 1) 野生型同腹仔マウスの正常乳腺に常在するマクロファージは、主にCD206<sup>+</sup> M2-likeマクロファージであった。
- 2) PyMTマウスは通常食群と比較して高脂肪食群で乳腺腫瘍発生は早まり、腫瘍の数・重量・体積が増加した。通常食群と比較して高脂肪食群の乳腺腫瘍では、腫瘍増殖促進作用をもつ Osteopontin (*Opn*) の遺伝子発現がCD8<sup>+</sup>T細胞で上昇していた。両群で乳腺腫瘍内には主にCD11c<sup>+</sup> M1-likeマクロファージが存在した。
- 3) 腫瘍内では野生型同腹仔マウスの正常乳腺と比べPD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞が増加しており、通常食群と比較して高脂肪食群で著明であった。PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞の遺伝子発現を解析するとPD-1<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞と比較して*Opn*を高発現し、Interferon  $\gamma$  (*Ifng*), Granzyme B (*Gzmb*)は低発現であった。
- 4) CD206-DTRマウスでは、CD206<sup>+</sup> M2-likeマクロファージ減少時に乳腺のEdU<sup>+</sup> PD-1<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞が増加した。CD206-DTR/PyMTマウスでは、CD206<sup>+</sup> M2-likeマクロファ

ージ減少時に乳腺腫瘍発生が抑制された。

5) PyMTマウスへの抗PD-1抗体の投与は、乳腺腫瘍の発生を遅延させた。

[総括]

本研究で角君は、高脂肪食は、乳腺腫瘍内でのPD-1<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞からPD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞（疲弊型T細胞）への変化を介して腫瘍発生・進展を促進している可能性を見いだした。また、CD206<sup>+</sup>M2-likeマクロファージが抗腫瘍性のPD-1<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞増殖を抑制することで、腫瘍増殖促進的な機能を持つことを示唆した。本研究は、肥満によるマクロファージを介したT細胞の疲弊が、癌微小環境を修飾して乳腺腫瘍の発生に関わることを初めて示し、また抗PD-1抗体の抗腫瘍効果を示唆した点で新規性および医学における学術的重要性が高いと考えられる。今後、T細胞の機能的側面を明らかにし、また更なる抗PD-1抗体の効果とその作用機序を解明することで将来の臨床的発展性が期待される。

以上より、本審査委員会は、本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判定した。