

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02564

研究課題名(和文) 骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)の腫瘍と妊娠における機能と制御に関する包括的研究

研究課題名(英文) Investigation of the role myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in the maternal-fetal tolerance and pregnancy-complicated female cancer progression.

研究代表者

木村 正 (Kimura, Tadashi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90240845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,900,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲンがMDSC誘導に与える影響、妊娠中のエストロゲン増加が妊娠の維持および癌の進展に与える影響、MDSCの制御法の確立を目指して研究を行った。結果、エストロゲンが、造血幹細胞の増殖およびMDSCへの分化を促進すること、妊娠中エストロゲン増加が、MDSCの誘導を介して子宮頸癌・乳癌の進展を促進することが示された。また、妊娠中にMDSCが著明に増加し、そのMDSCは強いT細胞抑制能を有すること、妊娠早期からMDSCを阻害すると流産が誘導されることが確認できた。さらに、MDSCを選択的に阻害する(CD8陽性T細胞やNK細胞には影響せずに)薬剤として、新規抗癌剤PM01183を見出した。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the impact of estradiol (E2) in the induction of MDSC as well as the roles of E2-induced MDSC in maternal-fetal tolerance or cervical cancer progression during pregnancy. We have found that E2 enhanced the proliferation of bone marrow (BM) cells, and stimulated the differentiation of BM cells into MDSC. We also found that increased E2 level during pregnancy is involved in the maternal-fetal tolerance as well as cervical cancer progression, which lead to the enhanced progression of cervical/breast cancers during pregnancy. Finally we identified a novel agent PM01183, which exhibits strong inhibitory effects on MDSCs. We are conducting clinical researches to verify these preclinical findings in human.

研究分野：医歯薬学

キーワード：MDSC エストロゲン 妊娠 子宮頸癌 流産

1. 研究開始当初の背景

MDSC は好中球やマクロファージへの分化を妨げられた未熟な細胞集団であり、細胞障害性 T 細胞性の機能を抑制することで、細胞性免疫を抑制する。最近、MDSC が抗腫瘍免疫応答の抑制および血管新生の促進作用を介して癌の進展を促進することが報告され、MDSC は癌の治療標的として注目されている。我々は先行研究において、子宮頸癌細胞が産生する G-CSF によって腫瘍内に誘導される MDSC が子宮頸癌の進展を促進すること、また MDSC を阻害することで子宮頸癌の病勢制御が可能であることを世界に先駆けて報告した。その後、米国の研究グループより、エストロゲンが MDSC の誘導に関係している可能性、またエストロゲンが骨髄および脾臓における造血能を亢進し、これが妊娠中の血球増加に寄与していることが報告された。これらの知見は「女性ホルモンが造血能の亢進を介して MDSC を誘導し、悪性腫瘍の進展を促進する」可能性を示唆するとともに、「妊娠高血圧症候群、不育症などの免疫異常を背景とする病態に MDSC が関与する」可能性をも示唆する結果と解釈できる。これら二つの仮説の証明を行いつつ、最終的に「MDSC を生体内で On-Demand に制御する」手技を開発すれば悪性腫瘍など MDSC の増加が悪影響を及ぼす病態に対しては MDSC を阻害する治療を行い、免疫寛容の破綻が原因の病態（不育症や妊娠高血圧症候群など）に対しては MDSC を増加・活性化させる治療を提供することが可能になると考えた。

2. 研究の目的

女性ホルモンが造血能・MDSC 誘導に与える影響、妊娠が子宮頸癌の進展に与える影響、流産・妊娠高血圧症候群における MDSC の役割の解明、MDSC の制御法の確立とその臨床応用、を目指して研究を行うこととした。

3. 研究の方法

【研究 1】女性ホルモンが造血能・MDSC の誘導に与える影響

実験 1: ICR マウスに両側卵巣摘出または Sham surgery を行った 3 週間後に、17 β -Estradiol を投与。骨髄・脾臓・血液を採取し、血球数、HSC 数、MDSC 数を評価することにより、女性ホルモンの影響を検討する。

実験 2: マウスの骨髄から無菌抽出した造血幹細胞 (HSC) に、17 β -Estradiol を投与し、HSC から MDSC が誘導されるかを検討。また

MDSC の免疫抑制能を、T-cell suppression assay で評価する。

【研究 2】妊娠が子宮頸癌の進展に与える影響

実験 1: 非妊娠マウスおよび妊娠マウスに子宮頸癌細胞株を皮下移植した後、腫瘍進展、血球数、血中エストロゲン濃度を測定・比較を行う。分娩前に Sacrifice し、HSC 数、MDSC 数を比較することにより、妊娠が子宮頸癌の進展に与える影響を評価する。

実験 2: 手術で摘出された妊婦・非妊婦の子宮頸癌を免疫染色することにより、妊娠中に腫瘍中の MDSC が増加することを確認する。

【研究 3】流産における MDSC の役割

実験 1: 妊娠マウス・非妊娠マウスの末梢血中・脱落膜・胎盤における MDSC を比較し、妊娠中の MDSC の増加を確認する。

実験 2: 妊娠マウスの腹腔内に MDSC 阻害薬である抗 Gr-1 中和抗体を投与し、流産が誘導されるかを検討する。

【研究 4】MDSC の制御法の確立

PhamaMar 社 (スペイン) の協力のもと、同社が開発した新規化合物 PM01183 (抗がん剤として臨床開発中) の MDSC 抑制能を検討することとした。

実験 1: In vitro において、PM01183 を MDSC (無菌的に抽出) に投与し、MDSC の増殖・生存・機能 (Arginase1 産生能・T cell 抑制能) に与える影響を検討する。また同時に、CD8 陽性 T 細胞・NK 細胞への影響を検討する。

実験 2: マウス (担癌・非担癌) に PM01183 を投与し、MDSC・CD8 陽性 T 細胞・NK 細胞に与える影響、また抗腫瘍効果を検討する。

4. 研究成果

【研究 1】女性ホルモンが造血能・MDSC の誘導に与える影響

エストロゲン投与により、マウスの骨髄細胞数、HSC 数が有意に増加することが示された。また、エストロゲン投与により、マウスの末梢血および脾臓における MDSC が有意に増加することが確認できた。さらに、HSC を無菌抽出し、Ex vivo においてエストロゲンを投与する実験により、エストロゲンが HSC の MDSC への分化を促進することを証明した。つまり、エストロゲンが、HSC の増殖および MDSC への分化を促進することが証明できた訳である。

さらに我々は、外因性のエストロゲン投与がエストロゲン受容体を持たない子宮頸癌・乳がんの進展を促進することも、マウスを用いた研究により証明している。これらの研究成

果は、エストロゲンが MDSC の誘導を介して子宮頸癌・乳がんの進展を促進している可能性を示している。エストロゲンによって誘導された MDSC がどのようにして子宮頸癌の進展を促進するかについての詳細なメカニズムは現時点で不明であるが、我々はその一端として、MDSC が血管新生促進因子 Bv8 を発現し、血管新生の促進を介して腫瘍の進展を促進している可能性を見出し報告している (Kawano M, Mabuchi S, Kimura T, et al. Sci Rep 2016)。

【研究 2】妊娠が子宮頸癌の進展に与える影響

妊娠中のマウスにおいて、エストロゲンが増加し、結果的に MDSC が著明に増加すること、増加した MDSC がエストロゲン受容体を持たない子宮頸癌の増殖を促進することが示された。また、妊娠に合併したヒト子宮頸癌症例の手術検体と非妊娠の子宮頸癌との比較では、妊娠合併子宮頸癌組織内に MDSC が増加していることが確認できた。さらに、エストロゲンによって増加した MDSC がエストロゲン受容体を持たない乳癌の増殖を促進することも確認した。これらの知見は、エストロゲンによる腫瘍進展の新たなメカニズムの存在を示しており、子宮頸癌のみならず、妊娠中に発生する全ての悪性腫瘍にもあてはまるものと考えられる (投稿準備中)。

【研究 3】流産における MDSC の役割

妊娠マウスの末梢血・子宮内に MDSC が増加してくること、その MDSC は強い T 細胞抑制能を有すること、妊娠早期から MDSC を阻害すると、流産が引き起こされることが確認できた。これらの研究成果は妊娠中のエストロゲン増加が、子宮局所の免疫寛容を誘導し、妊娠維持に重要な役割を果たしていることを強く示唆する結果である。我々は、MDSC の機能を制御することにより、流産の予防が可能となると考えており、さらに研究を進める予定である。

【研究 4】MDSC の制御法の確立

PhamaMar 社 (スペイン) との協同研究として、新規抗癌剤 PM01183 の MDSC 抑制能を検討した。その結果、PM01183 は非常に低濃度で MDSC の増殖・生存を阻害すること、PM01183 の阻害効果は MDSC に選択的である (CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞には影響しない) ことを In vitro/In vivo で確認した。また、PM01183 によって MDSC を阻害すると、マウスモデルにおいて、子宮頸癌の進展が抑制できることも確認した (Kuroda H, Mabuchi S, Limura T, et al. Immunotherapy. 2017;9:805-817.)。

PM01183 は婦人科癌に対する有望な抗がん剤として期待されており、1 年以内に Phase III 試験の結果が報告される予定である。今後、ヒト (担癌患者) を対象に MDSC に対する抑制効果を検証したいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Sasano T, Mabuchi S, Kimura T, et al. Preclinical Efficacy for AKT Targeting in Clear Cell Carcinoma of the Ovary. Mol Cancer Res. 2015;13:795-806.
2. Takahashi R, Mabuchi S, Kimura T, et al. Prognostic significance of systemic neutrophil and leukocyte alterations in surgically treated endometrial cancer patients: a monoinstitutional study. Gynecol Oncol. 2015;137:112-8.
3. Kawano M, Mabuchi S, Kimura T, et al. The significance of G-CSF expression and myeloid-derived suppressor cells in the chemoresistance of uterine cervical cancer. Sci Rep 2015;5:18217.
4. Kawano M, Mabuchi S, Kimura T, et al. Prognostic Significance of Pretreatment Thrombocytosis in Cervical Cancer Patients Treated With Definitive Radiotherapy. Int J Gynecol Cancer. 2015;25:1656-62.
5. Kakigano A, Endo M, Kimura T, et al. Drug repositioning for preeclampsia therapeutics by in vitro screening: phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil restores endothelial dysfunction via induction of placental growth factor. Reprod Sci. 2015;22:1272-80.
6. Yamashita M, Endo M, Kimura T, et al. Incidence and risk factors for recurrent spontaneous preterm birth: A retrospective cohort study in Japan. Obstetric Research Collaborative in Osaka (ORCO). J Obstet Gynaecol Res. 2015 Nov;41(11):1708-14.
7. Takahashi K, Endo M, Kimura T, et al. Immune tolerance induction using fetal directed placental injection in rodent models: a murine model. PLoS One. 2015 Apr 13;10(4):e0123712.
8. Takahashi R, Mabuchi S, Kimura T, et al. Preclinical investigations of PM01183 (lurbinctedin) as a single agent or in combination with other anticancer agents for clear cell carcinoma of the

- ovary. PLOS one 2016 11:e0151050. doi: 10.1371/journal.pone.0151050.
9. Takahashi R, Mabuchi S, Kimura T, et al. The significance of pretreatment thrombocytosis and its association with neutrophilia in patients with in surgically-treated endometrial cancer patients. *Int J Gynecol Cancer* 2017, 2017;27:1399-1407.
 10. Matsumoto Y, Mabuchi S, Kimura T, et al. The significance of tumor-associated neutrophil density in uterine cervical cancer treated with definitive radiotherapy. *Gynecol Oncol.* 2017, *Gynecol Oncol.* 2017;145:469-475.
 11. Matsumoto Y, Mabuchi S, Kimura T, et al. Prognostic significance of pretreatment leukocytosis in early-stage cervical cancer patients treated with radical hysterectomy. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2012;33:524-5.
 12. Mabuchi S, Kozasa K, Kimura T. Radical hysterectomy after radiotherapy for recurrent or persistent cervical cancer. *Int J Gynaecol Obstet.* 2017;139:185-191.
 13. Okazawa-Sakai M, Mabuchi S, Kimura T, et al. J Obstet Gynaecol Res. Predictors of distant relapse in patients with FIGO stage IIB-IVA cervical cancer treated with definitive radiotherapy. 2017;43:1743-1750.
 14. Kuroda H, Mabuchi S, Kimura T, et al. PM01183 inhibits myeloid-derived suppressor cells in vitro and in vivo. *Immunotherapy.* 2017;9:805-817.
 15. Kozasa K, Mabuchi S, Kimura T, et al. Comparison of clinical utilities of the platelet count and platelet-lymphocyte ratio for predicting survival in patients with cervical cancer: a single institutional study and literature review. *Oncotarget.* 2017;8:55394-55404.
 16. Komura N, Mabuchi S, Kimura T, et al. Comparison of clinical utility between neutrophil count and neutrophil-lymphocyte ratio in patients with ovarian cancer: a single institutional experience and a literature review. *Int J Clin Oncol.* 2018;23:104-113.
 17. Sasano T, Mabuchi S, Kimura T, et al. The highly metastatic nature of uterine cervical/endometrial cancer displaying tumor-related leukocytosis: clinical and preclinical investigations. *Clin Cancer Res* 2018 in press.
- 〔学会発表〕(計 25 件)
1. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) facilitates metastasis of uterine cervical cancer by recruiting myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) via CXCL12-CXCR4 axis. Sasano T, Mabuchi S, Kimura T, et al. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015(poster section) Pennsylvania Convention Center Philadelphia, Pennsylvania 4.18-22, 2015
 2. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) enhances stemness by inducing myeloid-derived suppressor cell (MDSC) in cervical cancer. Kuroda H, Mabuchi S, Kimura T, et al. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015(poster section) Pennsylvania Convention Center Philadelphia, Pennsylvania 4.18-22, 2015
 3. Antitumor activity of Lurbinectedin toward ovarian clear cell carcinoma. Takahashi R, Mabuchi S, Kimura T, et al. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015(poster section) Pennsylvania Convention Center Philadelphia, Pennsylvania 4.18-22, 2015
 4. <シンポジウム 2 (腫瘍) 子宮頸部腫瘍の病態に関する新知見 診断・治療法の開発に向けて > 腫瘍随伴性白血球増多を伴う子宮頸癌 ~ 発症のメカニズムの解明と個別化治療の開発 ~ **馬淵誠士** 第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会, 横浜, 4.9-12, 2015
 5. <シンポジウム 2 part 1 Clear Cell Carcinoma of the Ovary ~ the present and the future > 卵巣明細胞腺癌に対する分子標的治療 Clear cell carcinoma of the ovary: molecular insights and future therapeutic perspectives **馬淵誠士** 第 57 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 盛岡, 8.7-9, 2015
 6. <公募研究報告 > 子宮頸癌における Tumor related leukocytosis (TRL) の意義と、そのメカニズムの解明を目指した基礎研究 **馬淵誠士** 第 57 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 盛岡, 8.7-9, 2015
 7. 骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) は子宮頸癌組織中の癌幹細胞を増加させる 黒田浩正 **馬淵誠士** **木村正ら** 第 57 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 盛岡, 8.7-9, 2015
 8. 腫瘍随伴性白血球増多を伴う子宮頸癌

- の高転移性と骨髄由来免疫抑制細胞の関連の検討 笹野智之 **馬淵誠士 木村正ら** 第57回日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 盛岡, 8.7-9, 2015
9. <臓器別シンポジウム 10 卵巣がん治療のゲノム個別化を展望する> 卵巣明細胞腺癌に対する mTOR 阻害治療: 開発の現状と課題 **馬淵誠士** 第53回日本癌治療学会学術集会, 京都, 10.29-31, 2015
 10. [Symposium] Clear cell carcinoma of the ovary: molecular insights and future therapeutic perspectives. **Mabuchi S.** 54th Annual Congress of Taiwan Association of Obstetrics and Gynecology. Taiwan 3.4-6, 2016
 11. [Invited lecture] Targeting infiltrating immune cells in the treatment of uterine cervical cancer: special focus on myeloid derived suppressor cells. **Mabuchi S.** 102nd Annual Congress of Korean Association of Obstetrics and Gynecology. Seoul, Korea 9.23-24, 2016
 12. [Symposium] Clear cell carcinoma of the ovary (CCC): molecular insights and future therapeutic perspectives. **Mabuchi S.** 21st Seoul International Symposium. Seoul, Korea 9.23-24, 2016
 13. The role of G-CSF-induced myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in the induction of cancer stem-like cells in cervical cancer. Kuroda H. **Mabuchi S. Kimura T, et al.** 第68回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 4.21-24, 2016
 14. 17-estradiol promotes cervical cancer progression by stimulating the production of myeloid derived suppressor cells from hematopoietic stem cells. Kozasa K. **Mabuchi S. Kimura T, et al.** 第68回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 4.21-24, 2016
 15. A novel of biomarker profiles in experimental aged maternal mouse with pregnancy induced hypertension. **Kumasawa K, Kimura T, et al.** 19th Congress of the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies (FAOPS 2016) Taipei, Taiwan 12.1-4/'16
 16. Immune tolerance induction using fetal directed placental injection in rodent models. **Endo M.** 12th Congress of International Academy of Perinatal Medicine and 32nd Meeting of "Fetus as a Patient" Society Tirana, Albania 5.27-29/'16
 17. シンポジウム「骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) を標的とした癌治療」婦人科悪性腫瘍における骨髄由来抑制細胞 (MDSC) の重要性 **馬淵誠士** 第34回日本ヒト細胞学会学術集会, 奈良, 7.16-17, 2016
 18. シンポジウム「骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) を標的とした癌治療」骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) は子宮頸癌組織中の癌幹細胞を増加させる 黒田浩正 第34回日本ヒト細胞学会学術集会, 奈良, 7.16-17, 2016
 19. Prognostic significance of pretreatment leukocyte alterations in patients with epithelial ovarian cancer. Komura N. **Mabuchi S. Kimura T, et al.** 25th Asian&Oceanic Congress of Obstetrics and Gynecology. Hong Kong 6.15-18, 2017
 20. [Symposium6 Update of Therapeutic Strategy for Ovarian Cancer] Therapeutic strategy for ovarian clear cell carcinoma. **Mabuchi S.** The 5th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology. 東京, 11.20-12.2, 2017
 21. 平成28年度学術奨励賞 受賞講演; 腫瘍随伴性白血球増多を伴う子宮頸癌~発症のメカニズムの解明と個別化治療の開発~ **馬淵誠士** 第69回日本産科婦人科学会学術講演会, 広島, 4.13-16, 2017
 22. Prognostic significance of pretreatment leukocyte alterations in patients with epithelial ovarian cancer. Komura N. **Mabuchi S. Kimura T, et al.** 第69回日本産科婦人科学会学術講演会, 広島, 4.13-16, 2017
 23. The significance of tumor associated neutrophils in uterine cervical cancer treated with definitive radiotherapy. Matsumoto Y. **Mabuchi S. Kimura T, et al.** 第69回日本産科婦人科学会学術講演会, 広島, 4.13-16, 2017 広島
 24. 17-estradiol promotes cervical cancer progression by stimulating the production of myeloid derived suppressor cells. Kozasa K. **Mabuchi S. Kimura T, et al.** 第69回日本産科婦人科学会学術講演会, 広島, 4.13-16, 2017
 25. [シンポジウム I: 最新の分子標的薬・免疫療法と臨床試験] 婦人科癌に対する血管新生阻害治療: その臨床開発の現状と効果予見のバイオマーカーに関する新知見 **馬淵誠士** 第59回日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 熊本, 7.27-29, 2017
- [図書](計6件)
1. **Mabuchi S, Wakabayashi A, Kimura T.** VEGF Targeting Agents in Ovarian

- Cancer. In: Farghaly SA, eds. Ovarian Cancer - Basic Science Perspective. Croatia: InTech, 2012: Chapter 17.
2. **Mabuchi S.**, Kawano M, Takahashi R, Kuroda H. Management of Metastatic and Recurrent Cervical Cancer. Handbook of Gynecology, Springer 2016. doi:10.1007/978-3-319-17002-2_5-1.
 3. Kuroda H, **Mabuchi S.**, Kozasa K, **Kimura T.** Fertility-Sparing Treatment for Early-Stage Cervical Cancer. Handbook of Gynecology, Springer 2016. doi:10.1007/978-3-319-17002-2_6-1.
 4. **Mabuchi S.**, Kawano M, Matsumoto Y, **Kimura T.** Cervical Cancer: General Overview. Handbook of Gynecology, Springer 2016. doi:10.1007/978-3-319-17002-2_36-1.
 5. **Mabuchi S.**, Kawano M, Sasano T, Kuroda H. Management of Early-Stage and Locally Advanced Cervical Cancer. Handbook of Gynecology, Springer 2016. doi:10.1007/978-3-319-17002-2_34-1.
 6. 笹野智之, 松本有里, 熊澤恵一, **馬淵誠士**. もう困らない! プライマリ・ケアでの女性の診かた[分担], 井上真智子編, 羊土社, 東京, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 正 (Kimura Tadashi)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 90240845

(2)研究分担者

馬淵 誠士 (Mabuchi Seiji)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 00452441

遠藤 誠之 (Endo Masayuki)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号: 30644794

熊澤 恵一 (Kumasawa Keiichi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 90444546

(3)連携研究者: なし

(4)研究協力者

松本 有里 (Matsumoto Yuri)
高橋 良子 (Takahashi Ryoko)
笹野 智之 (Sasano Tomoyuki)
黒田 浩正 (Kuroda Hiromasa)
小笹 勝巳 (Kozasa Katsumi)
横井 恵理子 (Yokoi Eriko)
甲村 奈緒子 (Komura Naoko)