

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10731

研究課題名(和文) HNF-1 高発現により免疫抑制環境にある卵巣明細胞腺癌の免疫抑制環境の改善

研究課題名(英文) Immunomodulation of ovarian clear cell carcinoma by targeting HNF-1 beta pathway

研究代表者

藤田 知信 (Fujita, Tomonobu)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：20199334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：免疫抑制作用のあるIL-6やIL-8を高産生する卵巣明細胞腺がん(OCCC)の免疫環境の解析とその制御法の開発を行った。OCCC組織中の浸潤T細胞数は、卵巣漿液性腺がんを含む他のがん種より低値であった。次に、薬剤ライブラリーから、IL6産生を阻害する薬剤12種を同定した。その中の一つは、OCCC特異的転写因子でIL-6の産生に關与するHNF-1 の発現をエピジェネティックな機構で抑制した。この薬剤はOCCC移植担癌マウスで、血中のヒトIL6を低下させ、樹状細胞の機能を回復させた。以上より、この薬剤でOCCC患者の免疫抑制を解除でき、既存の免疫療法の効果を増強できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have evaluated immunopathology of human ovarian clear cell carcinoma (OCCC), which generally produces high amounts of immunosuppressive cytokines such as IL6 and IL8, which are correlated with poor prognoses. T cell infiltration in tumors is fewer in OCCC than that in serous ovarian cancers. We screened drug libraries and found twelve chemical compounds capable of inhibiting production of IL6 by OCCC cell lines. One of them epigenetically suppressed HNF-1, an OCCC-specific transcriptional factor which we previously identified as the upstream for the high production of IL6 and IL8 from OCCC. Some of them also showed reversal of the immunosuppressive conditions in mice implanted with human OCCC cell lines. These results indicate that inhibitors on the HNF-1 -IL6/IL8 pathway may improve immunosuppressive conditions of OCCC and useful for combination immunotherapy for patients with OCCC.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：卵巣癌 免疫療法

1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍内に浸潤している CD8⁺T 細胞が治療後の予後予測のバイオマーカーになる可能性、さらに化学療法や免疫療法への治療反応性の因子になることが示唆されている (Fridman et al, 2011)。悪性黒色腫では、培養 T 細胞を用いた養子免疫療法で 50% 以上奏効率を示し、免疫抑制機構の一つを改善する抗 PD-1 抗体投与では、卵巣癌を含む複数のがん種で進行がんに対しても持続的な抗腫瘍効果が示され、Science 誌は Cancer Immunotherapy を「免疫細胞を腫瘍を攻撃する細胞に変化させる治療法」として breakthrough of the Year に選び、現在、世界中で各種ヒトがんにおける免疫抑制機構の解明とその克服法の開発が期待されている。

卵巣癌は、手術療法と化学療法により治療が行われてきたが、5 年生存率は未だ約 20% と極めて予後不良である。中でも卵巣明細胞腺癌は、日本での発生頻度が急増しており、化学療法低感受性のために予後不良であり、多くの研究が行われてきたが、良い治療法は確立されていない。最近のがん免疫療法の発展を考慮すると卵巣明細胞腺癌の免疫病態の解明は、免疫療法だけでなく、広くがん治療の新たな治療戦略の構築につながると考えられる。例えば卵巣明細胞腺癌では glypican 3 抗原が高頻度 (約 50%) に発現するが、ペプチドワクチン療法の効果は限定的であった。この原因の一つとして、卵巣明細胞腺癌は IL-6 に代表される免疫抑制性サイトカインを高産生することがあげられるが、その産生抑制法の開発が期待される。

研究申請者らは、これまでに、卵巣明細胞癌特異的に高発現するが、その機能が十分に分かっていなかった転写因子 HNF-1 が卵巣明細胞癌において IL-6 の産生に関与し、樹状細胞などを抑制することで、免疫抑制に関与していることを報告してきた。

これらの結果から、HNF-1 を制御することにより卵巣明細胞腺癌の免疫抑制状態を解除できる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、これまでのがん細胞株を用いた *in vitro* と *in vivo* 実験結果を基に、臨床検体サンプルを用いて、卵巣明細胞腺癌と漿液性腺癌比較しながら、HNF-1 の免疫抑制病態への関与の解明を目指す。これにより、HNF-1 あるいはその関連分子が診断や治療の標的となり得るかを検討し、卵巣明細胞腺癌に対する新しい診断・治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 免疫染色

卵巣明細胞腺癌 41 例、卵巣漿液性腺癌 57 例を用いて CD3, CD4, CD8, FOXP3 の発現を免疫組織染色し、画像解析ソフト (Tissue studio: Definiens 社) を用いて定量的解析を行った。

(2) 細胞株

ヒト卵巣明細胞腺癌細胞株は Dulbecco 's Modified Eagle 's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham + 10% 牛胎児血清 (FCS) + ペニシリン/ストレプトマイシン培地を用いて 37 °C、5%CO₂ で培養した。

(3) ドラッグスクリーニング

ヒト卵巣明細胞腺癌細胞株 ($3 \times 10^3/100 \mu\text{l}$) を 96well プレートに撒布し、薬剤を $1 \mu\text{M}$ の濃度で添加し、24 時間培養した後の上清中の IL-6 濃度を ELISA を用いて測定した。また、同一 well において、細胞増殖を WST-1 (Premix WST-1 cell proliferation Assay System, TakaRa 社) を用いて、評価した。

(4) マウスモデル

ヒト卵巣明細胞腺癌細胞株 5×10^6 を生後 6~8 週の BALB/c-nu/nu マウスの皮下に移植した。細胞移植の 8 日後から、1 日 1 回 1 薬剤または DMSO を腹腔内投与した。腫瘍径はノギスを使用して、 $0.5 \times$ 長径 (mm) \times 短径 (mm) \times 短径 (mm) で測定した。薬剤投与開始から 27 日後に安楽死させた後、腫瘍とリンパ節から樹状細胞を単離した。また、生後 6~8 週の BALB/c マウスの脾臓から T 細胞を単離した。単離された樹状細胞と T 細胞に抗 CD3 抗体を加え 96well プレートに散布し、24 時間培養した後、上清の IFN 産生量を ELISA を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト卵巣明細胞腺癌 (OCCC) 組織における免疫細胞の解析

OCCC 手術検体 41 例を用いて CD3, CD4, CD8, FOXP3 免疫組織染色し、画像解析ソフトを用いて定量的解析を行い予後との関連を検討した。その結果、CD4、CD3、CD8

陽性細胞間には強い相関が認められた。また Mann-Whitney U test, Kaplan-Meier analysis でも CD3, CD4, CD8 高値は予後良好、FOXP3 高値は予後不良の傾向を認めたがいずれも有意では無かった。また NF- κ B, IL6 陽性細胞の染色状態は病理医によるスコアリングを行い、陽性細胞が多いと予後不良の傾向を認めたが同様に有意では無かった。

これら腫瘍内浸潤リンパ球数は大腸がん、非小細胞肺癌、子宮頸がんと比較すると圧倒的に低値であった。さらに卵巣漿液性腺癌でも検討すると、漿液性腺癌では CD3, CD4, CD8, FOXP3 浸潤数は大腸がん等と同等であり、卵巣がんでも OCCC のみが低値で有ることが示され、他の癌種と異なり HNF-1 亢進により IL6 高値の免疫抑制環境が既に構築されているためと考えられた。

(2) ヒト卵巣明細胞腺癌の IL6 産生を抑制する薬剤の探索

これまでの解析より、HNF-1、および IL-6 は、卵巣明細胞腺癌において、免疫抑制を解除するための治療標的となると考えられたので、1492 種の薬剤を含む既存薬および抗がん剤ライブラリーを用いて IL6 産生と細胞増殖能を指標 (図 1 a) にして、薬剤スクリーニングを 2 種の OCCC 細胞株を用いて実施した。その結果、細胞増殖能に影響なく IL6 産生能を減少させる薬剤 12 種が同定された。

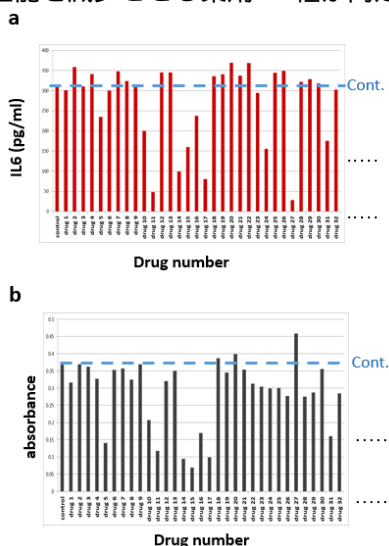


図 1 ドラッグスクリーニングの結果の例。a) 各薬剤がヒト卵巣明細胞腺癌細胞株における IL-6 の産生に与える影響を評価している。水色の点線はコントロールの IL-6 産生量を示している。b) 各薬剤がヒト卵巣明細胞腺癌細胞株の細胞増殖能に与える影響を wst1 により評価している。水色の点線はコントロールを表している。

(3) HNF-1 発現機構の解析

上記スクリーニングで同定した 12 種の薬剤のうちの一つは、HNF-1 の発現を抑制できることが分かった。さらに、この薬剤の標的分子である分子を siRNA を用いて、OCCC 細胞株でノックアウトすると HNF-1 発現が低下することが分かった。また、この分子が HNF-1 のプロモーターに結合していることがクロマチン免疫沈降法で示された。

これらのことより、本研究で同定された薬剤を用いて、HNF-1 の発現に直接関わっている分子を標的として、HNF-1 の発現を制御できること、それにより下流の IL-6 産生を抑制できる可能性が示唆された。

(4) 薬剤を用いた *in vivo*での卵巣明細胞腺癌の免疫抑制解除

ヌードマウスに OCCC 細胞株を移植した担癌マウスモデルでは、リンパ節、および腫瘍中の樹状細胞の機能が低下するが、本研究で同定されたひとつの薬剤の投与で、腫瘍体積は変化無かったが、血中のヒト IL6 が低下し (図 2)、さらに樹状細胞の T 細胞刺激能が回復した。

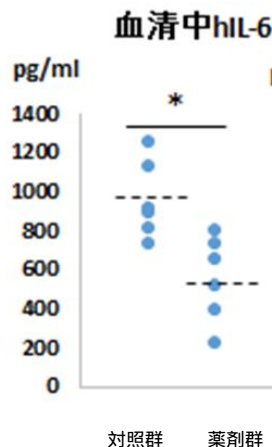


図 2 ヒト卵巣明細胞腺癌細胞株をヌードマウスの皮下に移植して 8 日後から薬剤の投与を行った。投与開始から 9 日後のマウス血清の移植細胞由来ヒト IL-6 の血中濃度を ELISA で測定した。

以上より、本研究で同定された薬剤の標的分子は、OCCC の HNF-1、IL-6 の発現を介して免疫抑制を誘導しており、その薬剤によってそれを解除でき、既存の免疫療法の効果を増強できる可能性が示唆された。

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 12 件)

1. Pagès F, Fujita T (98 人中 74 番目),

- Kawakami Y (98人中93番目), Galon J. International validation of the consensus Immunoscore for the prognostic classification of colon cancer, *Lancet* in press (査読あり)
2. Matsuda T, Takeuchi H, Sakurai T, Mayanagi S, Booka E, Fujita T, Higuchi H, Taguchi J, Hamamoto Y, Takaishi H, Kawakubo H, Okamoto M, Sunamura M, Kawakami Y, Kitagawa Y. Pilot study of WT1 peptide-pulsed dendritic cell vaccination with docetaxel in esophageal cancer *Oncology letters*. in press. (査読あり)
 3. Kinoshita T, Kudo-Saito C, Muramatsu R, Fujita T, Saito M, Nagumo H, Sakurai T, Noji S, Takahata E, Yaguchi T, Tsukamoto N, Hayashi Y, Kaseda K, Kamiyama I, Ohtsuka T, Tomizawa K, Shimoji M, Mitsudomi T, Asamura H, Kawakami Y. Determination of poor prognostic immune features of tumour microenvironment in non-smoking patients with lung adenocarcinoma. *Eur J Cancer*. 2017 ;86:15-27. doi: 10.1016/j.ejca.2017.08.026. Epub 2017 Sep 23. PubMed PMID: 28950145. (査読あり)
 4. Fukuda K, Funakoshi T, Sakurai T, Nakamura Y, Mori M, Tanese K, Tanikawa A, Taguchi J, Fujita T, Okamoto M, Amagai M, Kawakami Y. Peptide-pulsed dendritic cell vaccine in combination with carboplatin and paclitaxel chemotherapy for stage IV melanoma. *Melanoma Res*. 2017 ;27(4):326-334. doi: 10.1097/CMR.0000000000000342. PubMed PMID: 28263240. (査読あり)
 5. Shindo Y, Hazama S, Suzuki N, Iguchi H, Uesugi K, Tanaka H, Aruga A, Hatori T, Ishizaki H, Umeda Y, Fujiwara T, Ikemoto T, Shimada M, Yoshimatsu K, Takenouchi H, Matsui H, Kanekiyo S, Iida M, Koki Y, Arima H, Furukawa H, Ueno T, Yoshino S, Fujita T, Kawakami Y, Nakamura Y, Oka M, Nagano H. Predictive biomarkers for the efficacy of peptide vaccine treatment: based on the results of a phase II study on advanced pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017;36(1):36. doi: 10.1186/s13046-017-0509-1. PubMed PMID: 28241889; PubMed Central PMCID: PMC5329922. (査読あり)
 6. Miyazaki J, Ito K, Fujita T, Matsuzaki Y, Asano T, Hayakawa M, Asano T, Kawakami Y. Progression of Human Renal Cell Carcinoma via Inhibition of RhoA-ROCK Axis by PARG1. *Transl Oncol*. 2017 ;10(2):142-152. doi: 10.1016/j.tranon.2016.12.004. Epub 2017 Jan 26. PubMed PMID: 28131798; PubMed Central PMCID: PMC5284488. (査読あり)
 7. Kinoshita T, Muramatsu R, Fujita T, Nagumo H, Sakurai T, Noji S,

Takahata E, Yaguchi T, Tsukamoto N, Kudo-Saito C, Hayashi Y, Kamiyama I, Ohtsuka T, Asamura H, Kawakami Y. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes differs depending on histological type and smoking habit in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2016 ;27(11):2117-2123. doi: 10.1093/annonc/mdw319. Epub 2016 Aug 8. PubMed PMID: 27502728. (査読あり)

8. Mayanagi S, Kitago M, Sakurai T, Matsuda T, Fujita T, Higuchi H, Taguchi J, Takeuchi H, Itano O, Aiura K, Hamamoto Y, Takaishi H, Okamoto M, Sunamura M, Kawakami Y, Kitagawa Y. Phase I pilot study of Wilms tumor gene 1 peptide-pulsed dendritic cell vaccination combined with gemcitabine in pancreatic cancer. *Cancer Sci*. 2015;106(4):397-406. doi: 10.1111/cas.12621. Epub 2015 Mar 9. PubMed PMID: 25614082; PubMed Central PMCID: PMC4409883. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 2 件)

1. Yutaka Kawakami, Tomonori Yaguchi, Taeko Hayakawa, Kinya Tsubota, Juri Sugiyama, Hiroshi Nishio, Takashi Iwata, Tomonobu Fujita, Daisuke Aoki, Immunobiology and immunotherapy for gynecological cancers, The 5th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology, 2017

2. 谷口智恵、藤田知信、河上裕、癌微小環境における免疫回避抑制機構とその克服法、第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会、2017 年

3. Kagawa Masaki, Yaguchi Tomonori, Morii Kenji, Takise Yoshiaki, Nishio Hiroshi, Sugiyama Juri, Iwata Takashi, Fujita Tomonobu, Kawakami Yutaka, Immunomodulation of ovarian clear cell carcinoma by targeting HNF-1 -NH-kB-IL6 pathway enhances anti-tumor immunity. 第 46 回日本免疫学会学術集会、2017 年

4. Sayem Mohammad A, Yaguchi Tomonori, Noji Shinobu, Iwata Takashi, Fujita Tomonobu, Kawakami Yutaka, IL-8 has a negative role on tumor infiltrating CD8+T cells in various cancers. 第 46 回日本免疫学会学術集会、2017 年

5. 河上裕、藤田知信、谷口智恵、症例ごとの免疫状態評価に基づいた個別化がん免疫療法、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年

6. 藤田知信、野路しのぶ、南雲春奈、岡本正人、桜井敏晴、中面哲也、松枝智子、伊藤恭悟、竹之内寛子、裕彰一、岡正朗、河上裕、がん免疫療法の血液バイオマーカー、第 20 回日本がん免疫学会総会、2016 年

7. 河上裕、木下智成、Boryana Popivanova, Sunthamala Nusupha, Mohammad Abu Sayem、杉山重里、西尾浩、谷口智恵、藤田知信、Identification of biomarkers for immune-checkpoint blockade、第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2016 年

8.藤田知信、野路しのぶ、南雲春奈、早川妙香、西尾浩、杉山重里、坪田欣也、中村謙太、岡本正人、桜井敏晴、松枝智子、伊藤恭悟、竹之内寛子、碓彰一、岡正朗、谷口智憲、河上裕、がんワクチン後の予後を予測する血液バイオマーカーの道程とその制御、第43回日本臨床免疫学会、2015年

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 知信 (FUJITA, Tomonobu)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教
研究者番号：20199334

(2)研究分担者

河上 裕 (KAWAKAMI, Yutaka)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授
研究者番号：50161287

岩田 卓 (IWATA, Takashi)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師
研究者番号：30296652