

平成 21 年 04 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591932  
 研究課題名(和文) 免疫賦活遺伝子を導入した血管内皮前駆細胞を用いた婦人科腫瘍の新生血管標的治療  
 研究課題名(英文) Activated local immunity by chemokine CCL19-transfected embryonic endothelial progenitor cells suppresses metastasis of murine ovarian cancer  
 研究代表者  
 万代 昌紀 (MANDAI MASAKI)  
 京都大学・医学研究科・講師  
 研究者番号：80283597

研究成果の概要：本研究は卵巣癌の転移巣や播種巣において、局所における腫瘍の免疫環境を積極的に改善することで免疫療法の効果を高めることを目的としている。近年、腫瘍において末梢中の血管内皮前駆細胞が取り込まれて血管新生に利用されていることが知られてきているが、我々はこれをキャリアとして利用し、免疫活性化因子を導入し病巣にターゲティングすることで、効果的に局所の腫瘍免疫を活性化するという新しい免疫標的治療のモデルを開発した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科腫瘍学・腫瘍免疫

## 1. 研究開始当初の背景

婦人科悪性腫瘍の多くは化学療法に対する感受性を有しており、集学的治療によって寛解となる例が多い。しかし、このうち、多くが再発し治療抵抗性を示して不幸な転帰を取るため、長期的予後は不良であり、新しい治療法の開発・導入が必要である。腫瘍免疫療法は以前から注目・期待されてきたが、いまだに確実な効果を示す方法が確立されていない。我々は、これまでに、子宮頸癌(Chen et al, 2006)・卵巣癌(Hamanishi et al, 2007)において、宿主の免疫状態を反映する腫瘍組織内 CD8T 細胞数が、他の免疫学的諸因子と

関連しつつ、従来の進行期や組織型とは独立した有意な予後因子となりうることを見出した。すなわち、腫瘍の免疫療法においては、全身的な腫瘍免疫の活性化を図るとともに、局所における免疫環境を積極的に改善することが治療効果を得るためには重要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

今回我々は、比較的早期に広がりやすい卵巣癌に対し、転移巣や播種巣においても、局所の免疫環境を活性化できるような標的治療を開発することを目標として研究を行なう。

近年、腫瘍において、末梢中の血管内皮前駆細胞が取り込まれて血管新生に利用されていることが知られてきており、これをキャリアとして利用することが考えられる。すなわち、血管内皮前駆細胞に免疫活性化因子を導入し、病巣にターゲティングすることで、効果的に局所の腫瘍免疫を活性化するという新しい免疫標的治療法のモデルを開発することが今回の目的である。

### 3. 研究の方法

(1) マウスの卵巣癌細胞の肺転移・腹膜播種モデルの確立：マウス卵巣癌細胞株 HM-1 を尾静脈から注入することで、肺転移を起こす肺転移モデル・腹腔内に注入することで腹膜播種モデルを作成した。

(2) マウスの胚性血管内皮前駆細胞株が効率的に腫瘍病巣に分布することの確認：マウスの胚性血管内皮前駆細胞株 eEPC を入手し、これを蛍光マーカーでラベルしたのち、1) の肺転移モデルで尾静脈から注入し、これが腫瘍病巣に存在するかどうかを確認する。さらに、eEPC に蛍光遺伝子 EGFP を導入し、どのくらいの期間、eEPC が腫瘍病巣に留まるか？腫瘍の新生血管に取り込まれるか？といったことに関しても検討した。腹膜播種モデルでも同様の検討を行なった。

(3) マウスの胚性血管内皮前駆細胞株への免疫活性化遺伝子、ケモカイン CCL-19 の導入と、腫瘍病巣に対する縮小効果の検討：ケモカイン CCL-19 遺伝子をレトロウイルスベクターに組み込み、上記 eEPC に遺伝子導入したのち、その発現を RT-PCR 法、ELISA 法を用いて確認した。

(4) マウスの皮下腫瘍モデルを用いての免疫活性化遺伝子導入 eEPC の抗腫瘍効果の検討：マウスの皮下に卵巣癌細胞株 HM-1 を注入すると皮下腫瘍が形成される。そこで、HM-1 注入時に同時に CCL-19 遺伝子導入 eEPC を混合して投与し、皮下腫瘍の大きさの経時変化を比較した。

(5) 腫瘍免疫が確立されたかどうかの検証：① 上記 (4) で認められた抗腫瘍効果に関して、それが本当に特異的な腫瘍免疫によるものであるか否かを検証した。まず、マウスの脾臓から免疫細胞(樹状細胞・CD8T 細胞)を採取し、適宜、MACS(マグネットビーズ)等を用いて分離・培養した。次に、これらに *in vitro* で卵巣癌細胞株 HM-1 を加え、細胞性免疫を ELISPOT アッセイによる IFN- $\gamma$  発現量の測定により検討した。

② マウスの皮下腫瘍切片を作成し、腫瘍局所における免疫系の細胞浸潤に関して免疫組織染色にて検討し、eEPC 群とコントロール群で比較した。

(6) マウスの肺転移モデルを用いての免疫活性化遺伝子導入 eEPC の抗腫瘍効果の検

討：マウスの尾静脈から卵巣癌細胞株 HM-1 を注入すると 3-4 日後には微小播種巣が形成される。そこで、これ以降に、同じく尾静脈から CCL-19 遺伝子導入 eEPC を投与し、マウスの生存期間に及ぼす影響を解析した。また、肺における転移巣の状態(数・大きさ)等の評価し、効果を検証した。

(7) マウスの腹膜播種モデルを用いての免疫活性化遺伝子導入 eEPC の抗腫瘍効果の検討：マウスの腹腔内に卵巣癌細胞株 HM-1 を注入し、これ以降に、尾静脈から CCL-19 遺伝子導入 eEPC を投与し、マウスの生存期間に及ぼす影響を解析した。また、CCL-19 遺伝子導入 eEPC を腹腔内投与したときの抗腫瘍効果についても検討した。

### 4. 研究成果

(1) マウスの卵巣癌細胞の肺転移・腹膜播種モデルの確立とマウスの胚性血管内皮前駆細胞株が効率的に腫瘍病巣に分布することの確認：マウス卵巣癌細胞株 HM-1 を用いて肺転移モデル・腹膜播種モデルを作成し、これらにおいて、マウスの胚性血管内皮前駆細胞株 eEPC を蛍光マーカーでラベルしたのち尾静脈から注入したところ、腫瘍病巣に分布することが確認された。

(2) マウスの胚性血管内皮前駆細胞株への免疫活性化遺伝子、ケモカイン CCL-19 の導入と、腫瘍病巣に対する縮小効果の検討：ケモカイン CCL-19 遺伝子をレトロウイルスベクターに組み込み、上記 eEPC に遺伝子導入したのち、その発現を RT-PCR 法、ELISA 法を用いて確認した。

(3) マウスの皮下腫瘍モデルを用いての免疫活性化遺伝子導入 eEPC の抗腫瘍効果の検討と腫瘍免疫が確立されたかどうかの検証：マウスの皮下に卵巣癌細胞株 HM-1 を注入する際に、同時に CCL-19 遺伝子導入 eEPC を混合して投与した群では、皮下腫瘍の大きさが有意に小さかった。また、この群では、腫瘍内に、有意に多くに CD8T 細胞・CD4T 細胞・樹状細胞が浸潤していた。さらに、この群のマウスの脾細胞は HM-1 刺激に対して有意に高い IFN- $\gamma$  産生能を示し、全身性の抗腫瘍免疫の成立が示唆された。

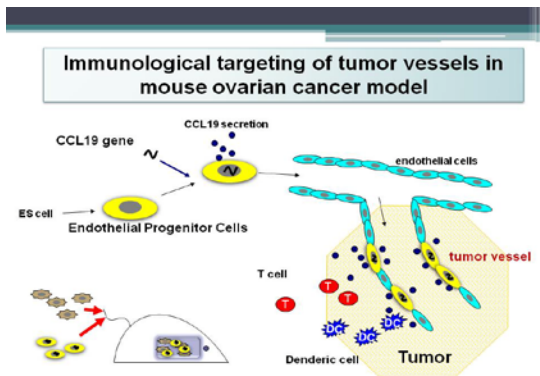
(4) マウスの肺転移モデルを用いての免疫活性化遺伝子導入 eEPC の抗腫瘍効果の検討：マウスの尾静脈から卵巣癌細胞株 HM-1 を注入し、3 日後から、同じく尾静脈から CCL-19 遺伝子導入 eEPC を投与した群では、コントロール群に比べて、有意にマウスの生存期間が延長し、かつ、肺における転移巣の数も有意に少なかった。

(5) マウスの腹膜播種モデルを用いての免疫活性化遺伝子導入 eEPC の抗腫瘍効果の検討：マウスの腹腔内に卵巣癌細胞株 HM-1 を注入し、これ以降に、尾静脈から CCL-19 遺

伝子導入 eEPC を投与した群では、マウスの生存期間は有意に延長した。一方、CCL19 遺伝子導入 eEPC を腹腔内投与しても、マウスの生存期間は延長しなかった。すなわち、CCL19 遺伝子導入 eEPC は静脈内投与でのみ、腫瘍に取り込まれ、抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。

以上をまとめると、胚性血管内皮前駆細胞株 eEPC は静脈内投与で効率的に転移巣に分布し、eEPC に免疫活性化遺伝子であるケモカイン CCL19 を導入し、担癌マウスに投与したところ、肺転移・腹膜播種のモデルにおいても腫瘍の縮小効果や生存の延長を認めた。すなわち、我々は当初、目標とした、卵巣癌の転移巣や播種巣においても局所免疫環境を活性化できるような標的治療の開発に成功した。

#### 【治療概念図】



#### 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 2 件)

① Liu M, Matsumura N, Mandai M, et al. Classification using hierarchical clustering of tumor-infiltrating immune cells identifies poor prognostic ovarian cancers with high levels of COX expression. Mod Pathol. 2009 Mar;22(3):373-84. 査読あり

② Li K, Mandai M, Hamanishi J, et al. Clinical significance of the NKG2D ligands, MICA/B and ULBP2 in ovarian cancer. Cancer Immunol Immunother. 2009

May;58(5):641-52. 査読あり

〔学会発表〕(計 14 件)

① 濱西潤三、万代昌紀、樋口壽宏、山口建、高倉賢二、藤井信吾、小西郁生  
卵巣癌腹膜播種の新生血管を標的として、ケモカイン遺伝子(CCL19)導入胚性血管内皮前駆細胞を用いて 局所免疫賦活を目指した新規免疫療法開発の基礎的検討  
第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会 平成 21 年 4 月 5 日 於 京都

② Hamanishi J, Mandai M, Higuchi T, Yamaguchi K, Takakura K, Fujii S, Konishi I  
Activated local immunity by chemokine CCL19-transduced embryonic endothelial progenitor cells suppresses lung metastasis of murine ovarian cancer  
40th Annual Meeting of Women's Cancer, Feb 6, 2009 in San Antonio, Texas

③ Hamanishi J, Mandai M, Higuchi T, Yamaguchi K, Takakura K, Fujii S, Konishi I  
Activated local immunity by CCL19-transduced endothelial progenitor cells suppresses lung metastasis  
第 67 回日本癌学会学術総会 平成 20 年 10 月 於 名古屋

④ 濱西潤三、万代昌紀、樋口壽宏、山口建、高倉賢二、藤井信吾、小西郁生  
卵巣癌の新生血管を標的としてケモカイン遺伝子(CCL19)導入血管内皮前駆細胞を用いた局所免疫賦活療法  
第 44 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 平成 20 年 7 月 19 日 於 名古屋

⑤ 濱西潤三、李奎、万代昌紀、樋口壽宏、山口建、高倉賢二、藤井信吾  
卵巣癌における NK 細胞活性化受容体のリガンド発現とその意義  
第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会 平成 20 年 4 月 13 日 於 横浜

⑥ 濱西潤三、万代昌紀、樋口壽宏、山口建、高倉賢二、藤井信吾  
卵巣癌の新生血管での局所免疫賦活を目指した胚性血管内皮前駆細胞によるターゲティング療法  
第 59 回日本産科婦人科学会学術講演会 平成 19 年 4 月 17 日 於 京都

⑦ 濱西潤三、万代昌紀、樋口壽宏、山口建、

高倉賢二、藤井信吾  
免疫抑制性補助シグナル分子 PD-L1 発現は  
卵巣癌の予後と相関する  
第 59 回日本産科婦人科学会学術講演会  
平成 19 年 4 月 17 日 於 京都

⑧濱西潤三、万代昌紀、樋口壽宏、山口建、  
高倉賢二、藤井信吾  
卵巣癌の新生血管での局所免疫賦活を目指  
した胚性血管内皮前駆細胞によるターゲ  
ティング療法  
第 12 回 生殖医療フォーラム  
平成 19 年 6 月 13 日 於 奈良

⑨ 濱西潤三、万代昌紀、岡崎拓、本庶佑、  
藤井信吾  
卵巣癌における Programmed cell death -  
Ligand 1 (PD-L1) 蛋白の発現  
21 世紀 COE コロキウム 京都大学大学院  
医学研究科「病態解明における基礎・臨床連  
携の進捗」  
平成 18 年 1 月 21 日 (土) 於 京都

⑩濱西潤三、樋口壽宏、福原健、由良茂夫、  
万代昌紀、刈谷方俊、高倉賢二、藤井信吾  
婦人科癌再発症例に対する拡大手術の試み  
～難治性子宮頸癌再発症例に対する骨盤半  
截術の経験～  
第 58 回日本産科婦人科学会学術講演会  
平成 18 年 4 月 25 日 於 横浜

⑪濱西潤三、万代昌紀、樋口壽宏、刈谷方俊、  
高倉賢二、藤井信吾  
卵巣癌における免疫抑制性補助シグナル分  
子 PD-L1 発現と予後との相関  
第 40 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会  
シンポジウム  
平成 18 年 7 月 21 日 於 岐阜

⑫Junzo Hamanishi, Masaki Mandai, Taku  
Okazaki, Tasuku Honjo, Shingo Fujii  
Prognostic significance of programmed cell  
death-1 ligand and tumor-infiltrating  
CD8+ lymphocytes in human ovarian  
cancer  
21century COE Colloquium on  
Immunology 2006 4th November 2006 in  
Kyoto

⑬ Junzo Hamanishi, Masaki Mandai,  
Shingo Fujii  
Targeting of tumor vessels and activation  
of local tumor immunity using embryonic  
endothelial progenitor cells (eEPCs) lead to  
tumor suppression in lung metastatic  
model of ovarian cancer  
21century COE Colloquium on

Immunology 2006 4th November 2006 in  
Kyoto

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕  
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
万代昌紀 (MANDAI MASAKI)  
京都大学・医学研究科・講師  
研究者番号: 80283579  
(2) 研究分担者  
福原 健 (FUKUHARA KEN)  
京都大学・医学研究科・講師  
研究者番号: 00362533  
八木治彦 (YAGI HARUHIKO)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 70402857  
鈴木彩子 (SUZUKI AYAKO)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 90378696  
(3) 連携研究者