

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007 -2008

課題番号：19591944

研究課題名（和文）子宮体癌の生物学的解析に基づく新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of new treatment for endometrial cancer based on the analysis of immune suppressive molecules

研究代表者

藤田 知信 (FUJITA TOMONOBU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20199334

研究成果の概要：

本研究では、子宮体癌における遺伝子異常・シグナル異常に基づいた癌細胞が作り出す免疫抑制機構の解明、その結果に基づいた新しい治療法開発の可能性を検討した。子宮体癌細胞株を用いて、免疫抑制性サイトカインと免疫抑制性膜分子の発現、子宮体癌細胞におけるシグナル経路の亢進を明らかにした。子宮体癌では IL6、VEGF、TGFβ、PD-L1 などの免疫抑制性分子が産生され、子宮体癌においても悪性黒色腫同様にこれら免疫抑制性分子を制御することによる免疫療法の開発の可能性が示された。

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：腫瘍抗原、子宮体癌、免疫抑制

1. 研究開始当初の背景

子宮体癌患者は増加傾向にあるが、進行・再発子宮体癌では化学療法の効果は限られ、放射線療法も効果は低く、予後不良であることから、新しい治療法の開発が望まれている。そのために、近年、各種癌において、癌細胞の性質の分子レベルでの解析に基づく分子標的療法の開発が盛んに試みられている。子宮体癌では、K-RAS 変異、PTEN 不活性化、β-catenin、p53 変異、P16 不活

性化、E-cadherin 変異などが認められている。また、MSI 陽性と陰性の子宮体癌の GeneChip 解析により、MSI 陽性では WNT/β-catenin シグナルの亢進などが報告されている。しかし、子宮体癌においては、これらの解析に基づいた新規治療はまだ十分に開発されていない。

我々は、これまで、悪性黒色腫を中心に、免疫療法や分子標的治療の開発を目指して、癌細胞における分子異常を DNA チップな

どの各種網羅的遺伝子発現解析や SEREX 法などの DNA クローニング法を駆使して、治療の標的となる分子の同定に成功してきた。その成果として、1) 抗原分子が癌細胞の増殖生存などに関与する場合は、比較的免疫原性が高く抗原消失が起こりにくく、分子標的治療の標的にもなること(Cancer Met Rev 2005)。2) 現在の癌ワクチンでは、十分な抗腫瘍効果は得られない主な原因は、癌細胞の免疫回避機構であることを明らかにした(Cancer Sci 2004)。3) 癌細胞の遺伝子異常・シグナル異常が、癌細胞からの複数の免疫抑制性分子の産生に関与し、RNA 干渉法や特異的阻害剤を用いて複数の免疫回避機構を同時抑えることができ、それにより、担癌生体の免疫抑制の改善や、癌細胞の免疫回避機構の解除により、免疫療法的大幅な改善が期待できることなどを示してきた。

2. 研究の目的

本研究では、子宮体癌における治療の標的分子の同定と、癌細胞の遺伝子異常・シグナル異常に基づいた癌細胞の悪性形質の分子機構の解明、その結果に基づいた新しい治療法開発の可能性を検討する。子宮体癌は、他の癌種と共通の異常と特異な異常をもつことが知られており、免疫抑制性分子においては、まだ、十分な解析がなされていないので、不明な点が多いが、他の癌種とは異なる特徴をもつ可能性がある。

3. 研究の方法

子宮体癌細胞株 Ishikawa, Hec1B, Hec108, SNG2, HHUA, HOOUA, AN3ca, SNGW, SNGS を用い、10%FCS で培養した。サイトカインは、24 時間後の培養上清を用いて ELISA 法にて測定した。IL6、IL10、TGFβ は BD 社(米国 Franklin Lakes, NJ) の OptEIA キット、VEGF は R&D Systems 社(米国 Minneapolis, MN) の DuoSet キットを用いて測定した。B7 ファミリー分子の測定は、細胞を回収後、細胞を PD-L1、PD-L2、B7-H4 は e-Bioscience 社(米国 San Diego, CA) 抗体を用いて染色し、BD 社の FACScalibur を用いてフローサイトメトリー法にて測定した。

シグナル伝達系分子の測定は子宮体癌細胞を培養後、細胞からタンパク質を lysis バッファーで抽出し、SDS-PAGE の後、ウエスタンブロット法により行った。ERK1/2、GAPDH は Santa Cruz Biotechnology 社(米国 Delaware Avenue, CA)、pTyr705、STAT3、p65、pp65、pERK、

AKT、PTEN は Cell Signaling 社(米国 Beverly, MA) の抗体を用いて発光法にて検出した。

PI3K の阻害は、子宮体癌細胞株 SNG1、Hec1b、Hec108、Ishikawa を、10nM LY24002 または 1nM wortmannin で 24 時間処理後、タンパク質を抽出し PD-L1 と pAKT を測定した。

4. 研究成果

子宮体癌における癌細胞の遺伝子異常・シグナル異常に基づいた癌細胞の悪性形質の分子機構の解明するために、子宮体癌細胞株 9 種(Ishikawa, Hec1B, Hec108, SNG2, HHUA, HOOUA, AN3ca, SNGW, SNGS) を用いて、各細胞における免疫抑制に関与する分子の発現と、シグナルを解析し、免疫抑制性分子の産生抑制する標的分子を検討した。

免疫抑制性分子の発現

免疫抑制に関与するサイトカインとして培養液中の IL6、IL10、VEGF、TGFβ を ELISA 法で、膜タンパクとして B7-H1、B7-DC、B7-H4 をフローサイトメトリー法により調べた。培養液中の IL6 は 4 株で、IL10 は 1 株で、TGFβ は 5 株で、VEGF は 3 株の細胞で分泌が認められた。VEGF はいずれの細胞株でも高い分泌が認められた。TGFβ は分泌量は細胞株により異なった。これらサイトカインに関して他の婦人科腫瘍株と比較した場合、子宮体癌に特徴的な抑制性サイトカインの産生は認められなかった。次に膜分子である B7 ファミリーについて FACS 法にて検討したところ、PD-L1 は子宮体癌 9 種のうち 7 株で発現が認められ、PD-L2、PD-L4 の発現は認められなかった。サイトカインの発現と PD-L1 の発現の間に関係は認められなかった。また、これら 9 種の細胞株での MSI は、MSI-H が 7 株、MSI-L と MSS がそれぞれ 1 株で、MSI とサイトカイン分泌、PD-L1 の発現に相関は認められなかった。この結果は、子宮体癌細胞株においても、悪性黒色腫など他の癌同様に、IL6、VEGF、TGFβ、PD-L1 などの免疫抑制性分子を産生し、がん細胞自身が免疫回避に関与していることが明らかとなった。

子宮体癌で亢進しているシグナル経路

子宮体癌で K-ras/MAPK、STAT3、PTEN/PI3K-AKT、β-catenin/WNT、NF-κB 経路のシグナル亢進について調べるために、β-catenin、NFκB、ERK、STAT3、AKT に

つて上述した 9 株についてウエスタンブロット法で検討した。RAS が関与する MAPK/ERK 経路に關する ERK1 と pERK1/2 を検討したところ、6 株で pERK1/2 が検出された。STAT3 経路の活性化については、STAT3 のリン酸化を調べたが、すべての細胞株で pSTAT3 は認められなかった。NF- κ B 経路では、NF- κ B は 7 種で観察されそのうち 3 株で高発現していたが、NF- κ B のリン酸化はすべての株で観察されず、活性化は認められなかった。 β -catenin/WNT 経路では、9 株中 7 株で β -catenin の上昇が認められた。子宮体癌では PTEN の異常が知られており、PTEN/Akt 経路について PTEN と pAKT の発現を検討したところ、Ishikawa, Hec108, Hec1b、SNG2 で両タンパクの発現が認められ、pAKT 陽性株では PTEN が検出されず、PTEN 陽性株では pAKT は検出されないことから、PTEN と pAKT 発現の逆相関が認められた。これは PTEN が PI3K を抑制することから AKT のリン酸化を抑制するとの考えと一致した。今回の子宮体癌細胞で K-ras/MAPK、PTEN/PI3K-AKT、 β -catenin/WNT 経路の活性化が認められたことはこれら報告を支持した。子宮体癌細胞において、PTEN や ras の変異が報告されており、これらシグナル経路の亢進と矛盾しなかった。

免疫抑制性分子とシグナル経路

子宮体癌における免疫抑制性の IL6、VEGF、TGF β などサイトカイン発現および免疫抑制膜分子 PD-L1 発現と、亢進しているシグナル経路について比較し、免疫抑制解除の分子標的の可能性を検討した。IL6、VEGF、TGF β の発現増強とシグナル経路の亢進一致は観察されなかった。このことから、子宮体癌におけるこれら免疫抑制性のサイトカイン発現増強には、他のシグナル経路の関与や複数のシグナルによるものと考えられた。

PTEN/AKT の系の発現が認められた 4 つの細胞株について PD-L1 の PTEN/AKT についての関連を検討すると、pAKT が認められると PD-L1 の発現が認められ、PTEN が検出された細胞では PD-L1 の発現が認められないことから、この 4 種の細胞株においては PD-L1 発現に PTEN/AKT 系の関与が示唆された。PD-L1 発現に PTEN/AKT の関与が示唆された 4 種の体癌細胞株に対して、PI3K 阻害剤および shRNA を用いて、PD-L1 発現に対する PI3K/AKT 系の関与を計画した。SNG1、Hec1b、Hec108、Ishikawa 細胞株を用いて PI3K 阻害剤であ

る wortmannin と LY294002 を用いて、PI3K を阻害し pAKT の変化をウエスタンブロット法により調べたところ、PTEN が発現している pAKT が検出されない Hec1b を除いて pAKT の減少が認められ、この阻害効果は細胞により強弱があり、Ishikawa では両阻害剤により強い pAKT の阻害が、Hec108 では LY294002 による強い阻害効果が示された。しかし、いずれの細胞でも PD-L1 発現の変化は観察されなかった。この PI3K 阻害により他の免疫抑制性分子に対する効果を検討する必要がある。腎癌をなど多くの腫瘍で PD-L1 の発現亢進が知られているが、その発現亢進機構は明らかではなく、子宮体癌における PD-L1 発現機構は PTEN/AKT 経路以外の可能性が示された。

本研究では、有効ながん免疫療法開発において最大の課題となっている免疫抑制機構の克服法を開発するために、子宮体癌細胞が産生する免疫抑制分子とその機構について検討した。その結果、子宮体癌は IL6、VEGF、TGF β 、PD-L1 などの免疫抑制性サイトカインと膜分子を産生し免疫抑制環境を構築している可能性が示され。また K-ras/MAPK、PTEN/PI3K-AKT、 β -catenin/WNT 経路の活性化が認められた。これら結果から、子宮体癌においても免疫抑制解除による免疫療法の増強の可能性が提示され、各種シグナル阻害剤や RNAi を併用した有効な免疫療法の開発が期待できる。

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 8 件)

Kawakami Y, Fujita T, Kudo C, Sakurai T, Udagawa M, Hasegawa G, Ishida A, Kitagawa Y, Tanabe M, Saito M, Izumi Y, Kawamura M, Yaguchi T, Ueda Y, Hayashi E, Wang Q, Okada S, Tsukamoto N, Matsuzaki Y, Sumimoto H, Takeuchi H, Tanikawa A, Handa M, Amagai M, Kobayashi K, Ikeda Y, Azuma I, Kitajima M. Dendritic cell based personalized immunotherapy based on cancer antigen research. Frontier in Bioscience. 13: 1952 -1958.2008 査読無
Ueda R, Kinoshita E, Ito R, Kawase T, Kawakami Y, Toda M. Induction of protective and therapeutic

antitumor immunity by a DNA vaccine with a glioma antigen, SOX6. Int J Cancer. 122(10):2274-2279, 2008 査読有

Yaguchi M, Ohta S, Toyama Y, Kawakami Y, Toda M. Functional recovery after spinal cord injury in mice through activation of microglia and dendritic cells after IL-12 administration. J Neurosci Res. 86(9):1972-1980, 2008 査読有

Yoshizawa S, Matsuoka K, Inoue N, Takaishi H, Ogata H, Iwao Y, Mukai M, Fujita T, Kawakami Y, Hibi T. Clinical significance of serum p53 antibodies in patients with ulcerative colitis and its carcinogenesis. Inflamm Bowel Dis. 13(7):865-873. 2007 査読有

Hayashi E, Matsuzaki Y, Kurihara S, Hasegawa G, Fujita T, Yaguchi T, Kageshita T, Sano M, Kawakami Y. Identification of a novel cancer-testis antigen CRT2 frequently expressed in various cancers using representational differential analysis. Clin Cancer Res. 13(21):6267-6274. 2007 査読有

6. Ueda R, Yoshida K, Kawase T, Kawakami Y, Toda M. Preferential expression and frequent IgG responses of a tumor antigen, SOX5, in glioma patients. Int J Cancer. 120(8):1704-1711, 2007. 査読有

Banno K, Yanokura M, Kawaguchi M, Kuwabara Y, Akiyoshi J, Kobayashi Y, Iwata T, Hirasawa A, Fujii T, Susumu N, Tsukazaki K, Aoki D. Epigenetic inactivation of the CHFR gene in cervical cancer contributes to sensitivity to taxanes. Int J Oncol. 31(4):713-720, 2007 査読有
Komiyama S, Aoki D, Komiyama M, Nozawa S. Local activation of TGF-beta1 at endometriosis sites. J Reprod Med. 52(4):306-312, 2007 査読有

〔学会発表〕(計 7件)

谷口智憲、木藤健二、塚本信夫、桜井敏晴、藤田知信、持丸博史、丸山正太郎、里見良輔、井田陽介、岩田卓、住本秀敏、河上裕、癌細胞における MAPK シグナル亢進による主要免疫逃避機構の解明. 第 38 回日本免疫学会. 2008/12/2. 京都

鶴田智彦, 井本逸勢, 平沢晃, 小崎健一, 阪埜浩司, 進伸幸, 青木大輔, 稲澤謙治 エピジェネティック異常により発現抑制される子宮体がん関連癌抑制遺伝子の MPA 療法における役割. 第 67 回日本癌学会総会. 2008/10/28. 名古屋

津田浩史, 西村貞子, 進伸幸, 阪埜浩司, 片岡史夫, 青木大輔 子宮体癌における hypoxia-inducible protein 2(HIG2)蛋白発現. 第 28 回日本分子腫瘍マーカー研究会. 2008/10/3. 名古屋

津田浩史, 西村貞子, 進伸幸, 阪埜浩司, 片岡史夫, 川村直樹, 青木大輔 子宮体癌における hypoxia-inducible protein 2(HIG2)蛋白発現. 第 44 回日本婦人科腫瘍学会. 2008/7/17. 名古屋

小林佑介, 阪埜浩司, 矢野倉恵, 秋好順子, 樋野牧子, 桑原佳子, 進伸幸, 塚崎克己, 青木大輔, 吉村泰典 子宮体癌における分裂期キナーゼ Aurora-A の発現と抗癌剤感受性との関連. 第 60 回日本産科婦人科学会. 2008/4/12. 横浜

末盛友浩, 進伸幸, 鶴田智彦, 市川義一, 野村弘行, 片岡史夫, 平沢晃, 富永英一郎, 阪埜浩司, 鈴木淳, 青木大輔 進行子宮体癌の再発・予後因子としての COX-2 と CD8 陽性リンパ球についての検討. 第 45 回日本癌治療学会. 2007/10/24. 京都

鈴木淳, 富永英一郎, 山上亘, 笈川文子, 徐敬用, 野村弘行, 片岡史夫, 進伸幸, 石田功, 青木大輔 ヒトモノクローナル抗体 HMMC-1 を用いた子宮体癌に対する新規治療法の開発. 第 27 回日本分子腫瘍マーカー研究会. 2007/10/2. 東京

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・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・教授
研究者番号: 50161287

青木 大輔(AOKI DAISUKE)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 30167788