

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06254・19K21348

研究課題名（和文）卵巣癌化学療法における腫瘍細胞のホスファチジルセリン露出を介した免疫逃避機構

研究課題名（英文）Immune escape mechanism via phosphatidylserine exposure by tumor cells in ovarian cancer chemotherapy

研究代表者

河野 まひる（Kawano, Mahiru）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30822209

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は卵巣癌微小環境でのマクロファージによる腫瘍細胞の貪食を検討した。まず死細胞が露出するホスファチジルセリン（PS）は貪食を促すため、PS露出を担うスクランブラーゼの発現を検討したが、実験モデルの確立が困難であった。

次に、膜タンパクCD47が貪食を抑制することに着目した。ヒト卵巣癌検体の病理学的検討では、CD47強陽性群は腫瘍内マクロファージ数が有意に少なく、予後不良であった。培養条件下での貪食アッセイでは、エクソソーム阻害剤（GW4869）により、卵巣癌細胞株のCD47発現は低下し、マクロファージによる貪食が促進された。腫瘍由来エクソソームがCD47発現を制御する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、卵巣癌の免疫逃避機構を解明するため、卵巣癌微小環境でのマクロファージによる腫瘍細胞の貪食に焦点を当てた。免疫逃避機構に関する先行研究の多くが、免疫チェックポイント分子を軸にT細胞の役割を解析したものであったため、本研究で自然免疫の役割を解析した学術的意義は大きいと考えられる。

本研究成果を発展させることにより、予後不良である進行卵巣癌の新規標的の解明につながることを期待でき、社会的意義も大きい研究内容である。

研究成果の概要（英文）：This study was focused on the phagocytosis of tumor cells by macrophages in ovarian cancer tumor micro-environments. First, the expression of scramblases, which control the exposure of phosphatidylserine in apoptotic tumor cells, was examined. However, it was hard to establish the experimental models.

Second, the effect of “don't eat me” signal molecule CD47 on the phagocytosis was investigated. Ovarian cancer specimen were evaluated pathologically. As a result, strong CD47 immuno-reactivity was associated with significantly less macrophage infiltration and shorter progression free survival. In vitro phagocytosis assay, treatment with exosome inhibitor (GW4869) decreased the CD47 expression in tumor cells and promoted phagocytosis by macrophages. It is suggested that tumor-derived exosome increase the CD47 expression in tumor cells and contribute in evasion from phagocytosis.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：卵巣癌 化学療法 マクロファージ 貪食 免疫逃避

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は約半数が腹膜播種・遠隔転移を伴う進行癌で診断され、予後不良である。進行卵巣癌の標準的初回治療は腫瘍減量手術とタキサン・プラチナ系を組み合わせた抗癌剤治療である。卵巣癌は抗癌剤感受性が比較的高く、初回治療は奏功しやすいが、その多くが再発する。このような現状を打開するため、初回化学療法の効果を高め、再発率を低下させるような治療法の開発が切望される。

そこで、本研究ではマクロファージによる腫瘍細胞の貪食に着目した。先行研究では、卵巣癌とマクロファージの関連について、腫瘍進展に寄与するようなマクロファージ TAM (Tumor-associated macrophage) についての知見が蓄積されている。TAM は免疫抑制性のサイトカイン IL-10, TGF- β を放出し、制御性 T 細胞を誘導することで、抗腫瘍免疫を抑制するとされる。しかし、マクロファージの貪食作用がどのように抗腫瘍免疫を担うかは明らかにされていない。

生体内において、主にマクロファージにより死細胞は貪食・除去される。貪食を調節する因子には種々の報告があるが、貪食を促進する因子の代表的なものは、死細胞が細胞表面に露出するホスファチジルセリン(PS)である。細胞膜を構成するリン脂質二重膜において、生細胞で PS は内側にのみ分布する。一方アポトーシス細胞では、リン脂質を双方向に動かすスクランブラーゼ Xkr の働きにより、PS が細胞表面に露出する。露出した PS は“eat me signal”としてマクロファージに認識され、貪食を促す(Kawano M and Nagata S. Int Immunol. 2018;30:551-8)。通常、アポトーシス細胞表面の PS はマクロファージの TAM レセプターを介して、速やかな貪食を促すとともに、免疫抑制性のサイトカイン(TGF- β , IL-10)を放出させる。PS 露出が阻害されると死細胞は貪食されずに二次的ネクロシスに陥り、細胞内容をまき散らすため、マクロファージの Toll-like receptor(TLR) を介して炎症性のサイトカイン(TNF α , IL-1)が放出される。卵巣癌の化学療法時には大量の細胞死が引き起こされるが、癌細胞が露出する PS がマクロファージによる貪食を調節する因子であり、その後の免疫応答を左右する可能性がある。

一方、マクロファージによる貪食を阻害する因子には、膜タンパク CD47 があげられる。主に血球細胞には CD47 がユビキタスに発現し、マクロファージの Signal Regulatory Protein alpha(SIRP)に認識され、“don't eat me”シグナルとして貪食を抑制する。この機構は生細胞がマクロファージによる貪食を回避するため、生理的役割を担う。しかし同時に、腫瘍細胞が CD47 を強発現することでマクロファージによる貪食を逃れる機構が、主に血液腫瘍分野で報告されている(Majeti R et al. Cell 2009;138:286-99)。さらに、CD47 モノクローナル抗体はリンパ腫を対象に臨床試験が開始され、一定の効果が報告されている。CD47 を介した腫瘍の免疫逃避機構が、卵巣癌にもあてはまるのか解明できれば、新たな治療戦略につながる事が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では卵巣癌微小環境で、マクロファージによる腫瘍細胞の貪食に焦点を当てた。アポトーシスした腫瘍細胞が露出するホスファチジルセリン(PS)は“eat me”シグナルとして、マクロファージに認識され速やかな貪食を促す。一方、膜タンパク CD47 は、マクロファージの SIRP に認識され“don't eat me”シグナルとして貪食を抑制する。これらの貪食を調節する因子を検討し、新たな治療標的を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 卵巣癌における PS 露出の検討

卵巣癌細胞株での PS 露出の評価

癌細胞をシスプラチンに暴露した後、蛍光標識した Annexin V を添加し、Flow cytometry 法で癌細胞の PS 露出の程度を評価した。PS 露出が明らかな細胞株に関して、アポトーシスに際しスクランブラーゼ活性を示す Xkr4,8,9 の発現の有無を Real time-PCR 法で検証した。

卵巣癌において PS 露出を担う分子の同定

当研究室で保管されている卵巣癌組織より、レーザーマイクロダイセクション法により腫瘍組織の RNA を抽出し、スクランブラーゼの発現の有無を Real time-PCR 法で検証した。

(2) 卵巣癌における CD47 発現の検討

卵巣癌細胞株での CD47 発現の評価

当研究室に保有する、卵巣癌細胞株についてフローサイトメトリー法で CD47 の発現を検証した。発現が確認できた細胞株について、各種条件下に培養し、発現を変動させる薬剤を選定した。

卵巣癌における CD47 発現の評価

当研究室に保管する卵巣癌組織のパラフィンブロック検体を、免疫組織化学染色で腫瘍組織の CD47 発現、CD68 陽性マクロファージをスコア化した。臨床データを後方視的に検討し、染

色スコアと予後の関連を検討した。

(3) 培養条件下での貪食の検討

ヒト末梢血単球を GM-CSF 存在下に培養し、マクロファージに分化させた細胞を蛍光標識した。卵巢癌細胞株は pH 感受性色素で染色し、マクロファージと共培養後に蛍光顕微鏡で観察し、貪食を定量化した。CD47 発現の変動と貪食の関連を検討した。

4. 研究成果

まず、卵巢癌において PS 露出を担う分子として、卵巢癌細胞株および卵巢癌組織におけるスクランブラーゼ (Xkr4,8,9) の RNA 発現レベルを検討したが、細胞株・腫瘍組織により発現は一様でなかった。スクランブラーゼをタンパクレベルで解析するための有用な抗体もなく、実験モデルの確立が困難であった。

そこで次に、ヒト卵巢癌における腫瘍細胞の CD47 発現の意義を検討すべく、当院で治療を受けた 26 例の高悪性度漿液性腺癌検体と臨床データを解析した。腫瘍組織の CD47 の染色強度は年齢・ステージ等の背景因子と有意な関連は認めなかった。しかし、CD47 陽性群は腫瘍内の CD68 陽性マクロファージ数が有意に少なく ($p < 0.05$)、予後不良であった (図 1. 3 年 PFS 22.0% vs 71.0%, $p = 0.047$)。この結果より、腫瘍細胞の発現する CD47 はマクロファージによる貪食を阻害し、腫瘍進展に関わるのではないかと考えた。

培養条件下での貪食アッセイでは、ヒト末梢血単核球由来マクロファージを用い、卵巢癌細胞株 SKOV3 を貪食させた。各種条件での検討の結果、エクソソーム阻害剤 (GW4869) により、細胞株の CD47 発現は低下し、マクロファージに貪食されやすくなることを見出した (図 2)。そこで腫瘍細胞の CD47 発現を調節する因子として、腫瘍由来エクソソームに着目した。卵巢癌細胞株 SKOV3 の培養上清より、超遠心法でエクソソームを回収し、透過電子顕微鏡およびウェスタンブロット法でその存在を確認した。今後、その内容分子について検討し、研究を進展させる予定である。

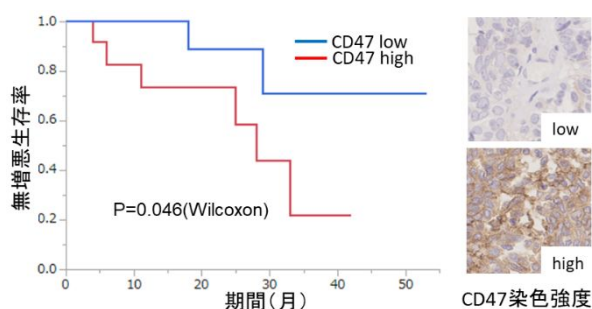


図1. CD47染色強度と無増悪生存率

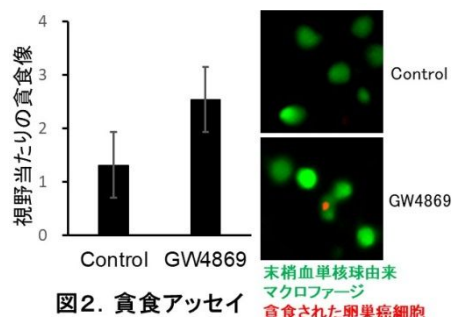


図2. 貪食アッセイ

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Aasa Shimizu, Kenjiro Sawada, Masaki Kobayashi, Mayuko Miyamoto, Kyoso Ishida, Mahiru Kawano, Michiko Kodama, Kae Hashimoto, Seiji Mabuchi, Tadashi Kimura
2 . 発表標題 CD47, a “don’ t eat me signal” expression in ovarian cancer cells were regulated by circulating exosomes and targeting exosomes enhanced the phagocytosis.
3 . 学会等名 International Society for Extracellular Vesicles 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Aasa Shimizu, Kenjiro Sawada, Masaki Kobayashi, Mayuko Miyamoto, Kyoso Ishida, Mahiru Kawano, Michiko Kodama, Kae Hashimoto, Seiji Mabuchi, Tadashi Kimura
2 . 発表標題 CD47, a “don’ t eat me signal” expression in ovarian cancer cells were regulated by circulating exosomes and targeting exosomes enhanced the phagocytosis.
3 . 学会等名 日本産婦人科学会学術集会
4 . 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	澤田 健二郎 (Sawada Kenjiro) (00452392)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	
研究協力者	志村 宏太郎 (Shimura Kotaro)	大阪大学・医学系研究科・大学院生 (14401)	

