

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
研究期間：2008～2009  
課題番号：20791173  
研究課題名 (和文) 子宮頸癌における免疫抑制解除の理論に基づいた新たながん免疫療法の開発  
研究課題名 (英文) Development of innovative cancer immunotherapy on the basis of release from immune evasion in cervical cancer  
研究代表者 河野 光一郎 (KAWANO KOUICHIRO)  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号：10320160

## 研究成果の概要 (和文)：

子宮頸癌におけるがん免疫療法の新たな戦略として腫瘍による免疫抑制を解除し免疫療法の効果を高める方法を思案した。本研究では、腫瘍の排除のために重要なリンパ球である CTL が癌の周囲に多い症例での予後が良好であった。一方、pSTAT3 という免疫抑制に関連した分子の発現は予後不良と関連していた。この両者の関連は認められなかったが、子宮頸癌の細胞株を用いた実験で pSTAT3 の発現が VEGF および TGF- $\beta$  などの免疫抑制物質の産生と関連していることがわかった。さらなる研究で、この新たな戦略の開発が期待される。

## 研究成果の概要 (英文)：

We proposed an innovative strategy of cancer immunotherapy which not only activated the immune response but released from immune evasion in cervical cancer. In this study, infiltration of cytotoxic T lymphocytes (CTL) which had an important role for an elimination of tumor indicated a good prognosis. On the contrary, expression of pSTAT3 which affect an immune evasion associated with a poor prognosis. Although correlation between infiltration of CTL and the expression of pSTAT3 was not observed in this study, we verified that pSTAT3 up-regulated the production of the molecule which regress immune response such as VEGF and TGF- $\beta$  in cervical cancer cell line. We expect the development of this innovative strategy for cancer immunotherapy by further investigation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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・腫瘍免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

本邦において子宮頸癌は最も頻度の高い婦人科癌であるが、子宮がん検診の普及に伴い、罹患率の減少を認めていた。しかし、近年子宮頸癌の罹患率は横ばいとなり、さらに再上昇を示しており、特に20歳台および30歳台の若年層に増加していることが問題となっている。

子宮頸癌の原因に関しては、ほとんどのケースでヒトパピローマウイルス (HPV) が関与しており、特に16および18型の感染との関連が深いこと、そして、その発癌のメカニズムとしてHPV由来蛋白E6およびE7がそれぞれ癌抑制遺伝子である*p53*もしくは*Rb*と結合し、不活化することは周知となっている。E6およびE7蛋白は子宮頸癌細胞での発現が維持されているため (Munger K et al. J Virol, 1989)、特異的腫瘍免疫における標的分子とされており、HLA-A2陽性子宮頸癌患者に対してHPVを標的とした特異的免疫療法の臨床試験が行われたが、臨床的有効性は認められなかった (Munderspach L et al. Clin Cancer Res, 2000., Nimak M et al. Cancer Res, 1997.)。

我々は、これまでに種々の腫瘍抗原遺伝子を同定し、さらにHLA-A2およびA24陽性癌患者の末梢血単核球からペプチド特異的および腫瘍反応性CTLを誘導可能な抗原ペプチドを多数同定した (Kawano K et al. Cancer Res, 2000, Itoh K et al. In: Tumor immunology Series, 2003)。そして、それらのペプチドを用いてHLA-A2もしくはA24陽性子宮頸癌患者に対し臨床試験を行った。当初は単一ペプチド投与による臨床試験を行ったが、CTLの誘導効果は乏しかった。しかし、症例によって異なるペプチド特異的CTL前駆体および抗ペプチド抗体が存在することが明らかとなったため、その後は、各症例に応じて投与ペプチドを選択することによりCTL誘導効果が上がり、全体としては十分な臨床効果は得られなかったものの、一部の症例では臨床効果が認められた (Tsuda N et al. J Immunother, 2004)。

最近、JAK/STAT伝達経路の一つであるSTAT3が各種がんにおいて恒常的に活性化されていることが明らかとされ、その発現が予後不良因子であると報告されている。

また、pSTAT3 (phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3) が細胞増殖および生存、血管新生、浸潤能、免疫抑制と関連していることが報告されており (Huang S. Clin Cancer Res, 2007)、我々はこの免疫抑制効果に注目

した。

子宮頸癌局所における免疫機構の評価として、腫瘍浸潤リンパ球 (以下、TILs) が多い症例では予後良好であると報告されていたが、近年、TILsの中でも予後良好との関連が報告されているCD8陽性であるCTL (Sato E et al. PNAS, 2005) およびCD45RO陽性であるメモリーT細胞 (Pages F et al. N Engl J Med, 2005)、一方予後不良との関連が報告されているFoxp3陽性である制御性T細胞が存在することが明らかとなった (Sato E et al. PNAS, 2005)。

## 2. 研究の目的

本研究では子宮頸癌における抗腫瘍免疫応答の状況を明らかにするため、免疫抑制に関連した分子、特に pSTAT3 の発現と免疫抑制と腫瘍浸潤リンパ球の関連を検討することを目的とした。そして、さらにがん免疫療法に免疫抑制に関連した分子を標的とした治療を併用することによりがん局所における免疫抑制を解除し、がん免疫療法の効果増強を図るための基盤的研究になることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(対象)

1996年から2005年までの間に久留米大学病院婦人科において、子宮頸癌I期もしくはII期の診断で広汎性子宮全摘術が施行された125症例を対象とした。まず、対象症例の臨床病理学的因子に関する検討を行った。臨床病理学的因子は、年齢、臨床進行期、腫瘍径、深部間質浸潤、脈管侵襲、基幹部浸潤、リンパ節転移を検討した。

(免疫組織化学)

pSTAT3、VEGF、MMP2、Bcl-xL、および腫瘍浸潤リンパ球の発現を免疫組織化学で検討した。免疫組織化学はパラフィン包埋切片を脱パラフィン後、マイクロウェーブで抗原の賦活化を行い、一次抗体での反応後、ビオチン標識した二次抗体を反応させ、その後発色を行った。pSTAT3 および Bcl-xL は核内に発現を認めたものを陽性とした。MMP2 および VEGF は細胞質で強発現したものを陽性とした。腫瘍浸潤リンパ球に関しては、腫瘍の排除に重要な役割を果たしている細胞傷害性T細胞をCD8の発現で、エフェクターT細胞をCD45ROの発現で同定した。免疫抑制に関与している制御性T細胞はFoxP3の発現で同定した。腫

瘍浸潤リンパ球は20倍対物レンズを用いて、視野内の腫瘍内に浸潤しているリンパ球を最も数が多い3視野の平均で算出した。カットオフ値は、予後の差が最も認められる点とした。

(STAT3siRNAの遺伝子導入、Western blotting および ELISA)

pSTAT3の発現が確認された子宮頸癌細胞株にSTAT3siRNAをリポフェクション法で遺伝子導入した。これにより、pSTAT3の発現抑制されることをウェスタンブロッティングで確認した。さらに、VEGF、Bcl-xLの発現も確認した。また、細胞培養液の上清を用いてTGF-βの産生をELISA法で確認した。

(統計学的解析)

pSTAT3、腫瘍浸潤リンパ球および各臨床病理学的因子の関連をカイ2乗検定で検討した。pSTAT3の発現および腫瘍浸潤リンパ球と予後の相関は、全生存期間および無病生存期間に関して生存分析をKaplan-Meier法で行い、Logrank法で検定した。また、予後因子の検定は、Cox比例ハザード解析で行った。

#### 4. 研究成果

対象症例の5年生存率および無病生存期間はそれぞれ86.1%および83.1%であった。

pSTAT3の発現は125例中54例(43.2%)に認めた。また、臨床病理学的因子との相関について検討したところ臨床進行期II期(p=0.006)、腫瘍径>4cm(p=0.001)、脈管侵襲あり(p=0.004)、およびリンパ節転移あり(p=0.007)との相関を認めた。5年生存率はpSTAT3の発現陽性群で79.2%、陰性群で95.3%であった。5年無病生存率はpSTAT3の発現陽性群で76.8%、陰性群で92.3%であった。また、pSTAT3陽性群において全生存期間(p=0.006)および無病生存期間(p=0.010)とも有意に不良であった。

次に、125例中73例で腫瘍浸潤リンパ球の免疫組織化学を行った。浸潤陽性のためのカットオフ値はCD8陽性細胞が5個/1視野、Foxp3が6個/1視野であった。CD8陽性細胞浸潤は他の臨床病理学的因子との関連は認められなかった。Foxp3陽性細胞浸潤は深部間質浸潤(>4/5)との関連を認めた。

CD8陽性細胞浸潤およびFoxp3陽性細胞浸潤ともpSTAT3発現との関連はみられなかった。また、CD8陽性細胞浸潤陽性群において全生存期間(図1A)および無病生存期間(図1B)とも有意に良好であった。Foxp3陽性細胞浸潤陽性群は全生存期間および無病生存

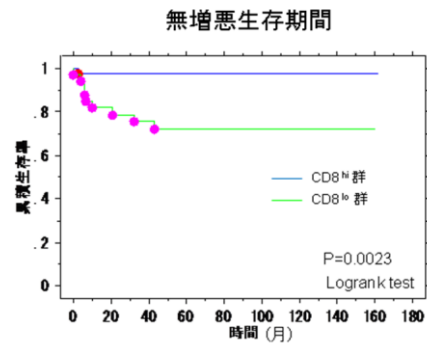


図 1A

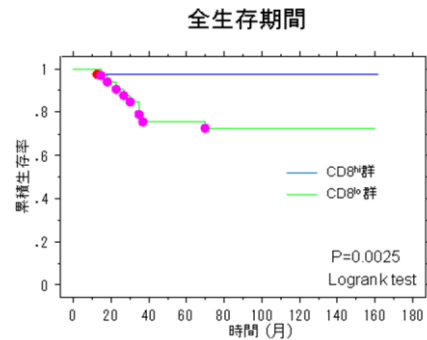


図 1B

期間とも差を認めなかった。

次に予後因子の検討を単変量解析で行ったところ、全生存期間および無病生存期間とも腫瘍径>4cm、深部間質浸潤、基幹部浸潤、CD8陽性細胞浸潤陽性であった(表1)。

表1 臨床病理学的因子および腫瘍浸潤リンパ球と予後の単変量解析

因子	無病生存期間 P 値	全生存期間 P 値
年齢(<47, ≥47)	0.692	0.559
臨床進行期(I期, II期)	0.219	0.214
腫瘍径(≤4cm, >4cm)	0.036	0.039
脈管侵襲	0.082	0.080
深部間質浸潤(≤4/5, >4/5)	0.047	0.047
骨盤リンパ節転移	0.251	0.723
基幹部浸潤	0.030	0.028
CD8陽性細胞浸潤	0.018	0.018
Foxp3陽性細胞浸潤	0.240	0.232

これらの項目で多変量解析を行ったところ全生存期間および無病生存期間においてCD8陽性細胞浸潤陽性のみが独立した予後良好因子であった(表2)。

表2 臨床病理学的因子および腫瘍浸潤リンパ球と予後の多変量解析

因子	無病生存期間 P 値	全生存期間 P 値
腫瘍径(≤4cm, >4cm)	0.514	0.513

深部間質浸潤 (≤4/5, >4/5)	0.050	0.051
基膜浸潤	0.255	0.251
CD8 陽性細胞浸潤	0.019	0.021

STAT3 の下流因子である VEGF、MMP2、Bcl-xL の発現と pSTAT3 および TILs の比較検討を免疫組織化学で行ったが、いずれも相関を認めなかった。次に pSTAT3 発現陽性子宮頸癌細胞株に STAT3siRNA を導入することにより、pSTAT3 の発現が抑制されることを Western blotting 法で確認するとともに、VEGF および Bcl-xL の発現が抑制されていることも確認できた。また、pSTAT3 と免疫抑制の関連を検討するため、STAT3siRNA を導入した子宮頸癌細胞株における TGF-beta 産生を ELISA 法で検討したところ、TGF-beta の産生低下を認めた。

以上の結果から、細胞傷害性 T 細胞による抗腫瘍免疫応答は早期子宮頸癌において予後良好因子であると考えられ、抗腫瘍免疫応答の重要性が確認された。また、残念ながら pSTAT3 の発現と細胞傷害性 T 細胞浸潤との関連はみられなかったものの、免疫抑制との関連は少なからず認めることが示唆された。免疫応答の増強を図るがん免疫療法において免疫抑制から解除を促す治療を併用することは理論的ではあるが、どのような戦略が望ましいかはさらなる研究が必要である。

#### 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 1 件)

Takemoto S, Ushijima K, Kawano K, Yamaguchi T, Terada A, Fujiyoshi N, Nishio S, Tsuda N, Ijichi M, Kakuma T, Kage M, Hori D, Kamura T. Expression of activated signal transducer and activator of transcription-3 predicts poor prognosis in cervical squamous-cell carcinoma. Br J Cancer. 2009, 101:967-72.

[学会発表] (計 1 件)

子宮頸部扁平上皮癌における活性化 Stat3 (Signal transducer and activator of transcription 3) の発現は予後不良因子である 竹本 周二、牛嶋 公生、津田 尚武、河野 光一郎、大田 俊一郎、村上 文洋、駒井 幹、藤吉 啓造、嘉村 敏治 日本産婦人科学会 2008 年 4 月 横浜

[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]

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

河野 光一郎 (KAWANO KOUICHIRO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10320160

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし