

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月21日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501023

研究課題名（和文） 新規腫瘍免疫回避機構の責任分子同定と回避機序解明：奏功規定バイオマーカー探索へ

研究課題名（英文） Identification of essential molecules and elucidation of the mechanism for novel cancer immune evasion system: Research for biomarker for immunological response.

## 研究代表者

岡野 慎士 (Okano Shinji)

九州大学・大学病院・臨床助教

研究者番号：10380429

## 研究成果の概要（和文）：

腫瘍の免疫回避機構に関わるメカニズムの一つに、腫瘍免疫療法で惹起される腫瘍特異的 T 細胞応答依存性に腫瘍のクローンから腫瘍免疫を回避するクローンが新たに出現することが世界で初めて実証された。この腫瘍細胞は、MHC class I、TRP2、GP100、IFN- $\gamma$ （反応性も含む）、Fas の遺伝子発現は変化なく、Syt12、GATA1、2 の上昇、NGFR の低下などが腫瘍回避機構のバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

We firstly found that a new clone, which have acquired the immune evasion potentials, emerges from the original neoplastic clone, which is susceptible to the tumor associated antigens-specific T cell response. This emergence of neoplastic clone is dependent on the T cell response. The new neoplastic cells have no change in the expression of MHC class I, TRP2, Gp100, IFN- $\gamma$  (including functional response to IFN- $\gamma$ ), and Fas, but upregulate the expressions of sytl2, GATA1 and 2, and downregulate NGFR, suggesting that the molecules may be potential biomarkers in the immune evasion of neoplasm.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍免疫、免疫回避機構、バイオマーカー、癌

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に対する治療は、外科治療、化学

療法、放射線療法、分子標的薬などが実地の臨床で施行されており、特に近年の分子標的薬の進歩は目覚ましく、進行癌症例における予後及びQOL改善に大きく寄与している。一方で、WT1やSurvivin、NY-ESO-1といった腫瘍で高発現する腫瘍抗原を標的としたT細胞性適応免疫を誘導する特異的能動免疫療法は、腫瘍の発生抑制(Dunn GP, et al. *Immunity* 2004;137)及び拒絶効果を発揮(Xiang et al., *J Immunol.* 1999;3676)し、個体からの悪性腫瘍の根絶に威力を発揮する。この応答は、長期に続く腫瘍特異的な能動的治療力を患者に寄与し、臨床的に検出不可能な病巣を含む広汎な転移巣(細胞)並びに局所再発をも抑制することが可能で、これを集学的治療に応用することは更なる治療成績向上に寄与すると考えられる。しかし、特異的能動免疫療法において腫瘍抗原特異的T細胞応答が検出されるにも関わらず、同じ種類の癌でその治療効果が異ったり、初期の抗腫瘍効果が後に消失する症例がある。注目すべきは、同一症例で治療によって縮小する腫瘍塊と増大する腫瘍塊、または新しく病変が出現する、いわゆる「mixed response」を示す症例がみられる。この現象は同一患者に存在する個々の腫瘍塊でさえも腫瘍免疫応答に対する感受性が異なることを示している。腫瘍は、そのゲノム不安定性に起因する遺伝的多様性を有しており、その影響が免疫療法感受性に変化を与えていると考えられる。この腫瘍免疫応答回避に関わる詳細な分子機序は未だ完全に明らかでなく、この個々の腫瘍免疫回避機構の責任分子の網羅的解析と責任分子同定は、特異的能動免疫療法の効果を予測する一つのバイオマーカーとなるだけでなく、その機能解析により、その回避機構が制御可能であれば、免疫療法を増強する補助療法となりうると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまで我々が使用してきたマウスメラノーマモデルを使用し、現在まで報告のない腫瘍免疫回避機構による腫瘍特異的腫瘍免疫応答を回避する細胞株を樹立し、新規の腫瘍免疫回避機構を解明すると同時に、その責任遺伝子の解析を通して、腫瘍免疫応答回避するバイオマーカーを探索する。

## 3. 研究の方法

B16F1メラノーマ細胞株を皮下接種し7日目の生着腫瘍に対し、1週おきに2回、

LPSで活性化した骨髄由来樹状細胞を腫瘍内に投与したマウスを使用。このモデルは、生体内に生着したB16F1の固形腫瘍を50%の確率で拒絶するが、その時の腫瘍特異的細胞傷害性T細胞応答(CTL)や拒絶マウスにおける免疫学的特徴を解析する。

また、この時、拒絶されなかった腫瘍を採取し、細胞株を作製、親株と比較することによって、その生物学的特性を解析する(in vitro及びin vivo)。

親株よりクローンを作製し、このクローンのin vivoでの特徴を解析し、この腫瘍免疫回避機構を検討する。

また、これらの親株(クローン)と腫瘍免疫回避機構を獲得した腫瘍株を用いて、その遺伝的变化をアレイCGH、マイクロアレイ、次世代シーケンス、リアルタイムPCRなどを用いて検討する。

免疫応答耐性腫瘍細胞株よりcDNAを作製し、それを親株に導入することによって各遺伝子の機能を解析する。

## 4. 研究成果

腫瘍の免疫回避機構に関わる詳細な分子機序解明のために、B16F1メラノーマ腫瘍内樹状細胞投与モデルを用い、特異的腫瘍免疫応答を回避する細胞株・クローンを樹立した。

B16F1メラノーマ細胞株の皮下接種、樹状細胞療法モデルにおいて、50%のマウスは完全拒絶をするも、残りの約50%のマウスでは生着した腫瘍は、一旦縮小した後に、再増殖する免疫応答を回避する腫瘍細胞を得ることができた。生着したB16F1腫瘍塊を拒絶せず再増殖を許容するマウスの特徴は、以下に示すものであった。

- ・ 脾臓には、生着腫瘍塊を拒絶したマウスと同等のメラノーマ特異的(TRP-2等)細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答が検出された。
- ・ 再増殖する腫瘍を切除したマウスは、生着腫瘍塊を拒絶したマウスと同じく、再接種B16F1の親株細胞を拒絶した：誘導された腫瘍免疫応答は十分で、その状況下で再増殖してくる免疫回避腫瘍株が得られたこととなる。

一方、拒絶した免疫マウスは、再接種されたB16F1は100%拒絶するが、EL4は拒絶しなかった。拒絶応答はCD4 T細胞、CD8 T細胞依存性(46回の腫瘍再接種実験で確認)であった。

上記の免疫療法で拒絶せず再増殖してきた腫瘍から腫瘍細胞株(B16DCと命名)を樹

立。免疫マウスに親株の B16F1 と同時に再接種すると、親株の B16F1 は拒絶されるが、B16DC は拒絶を免れ、腫瘍が形成された。

親株の B16F1 のクローンを樹立し、上述と同様な樹状細胞療法を施行した。この場合も、同様な腫瘍の拒絶の確立、CTL 応答、再接種における拒絶応答を観察された。更に、免疫応答回避腫瘍クローンを樹立し、それを免疫マウスに再接種したところ、親株のクローンは拒絶されるが、腫瘍免疫耐性の出現クローンは拒絶されず腫瘍塊を形成した。クローンの内訳は以下のとおりである。

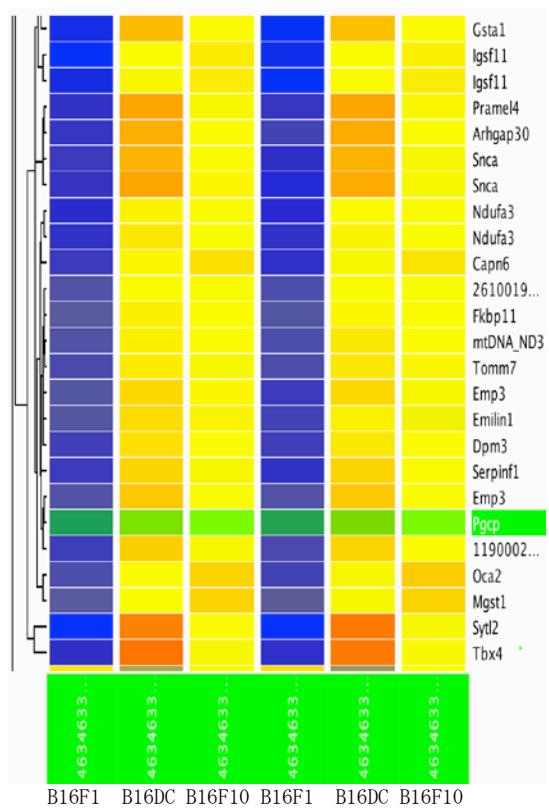
B16F1 より 10 クローンのうち 5 個のクローンは、naive マウスで生着、免疫マウスで拒絶されるもので、うち 4 クローンに関して、マウスの皮下に接種し、同様の樹状細胞療法を施行、うち少なくとも 2 つのクローン由来の腫瘍塊は、1-3 割の確率で、親株で観察された腫瘍増殖パターンを示した。この再増殖した腫瘍塊より、腫瘍株、更にはそのクローンを樹立、拒絶マウスに再接種したところ、拒絶されずに腫瘍塊を形成した。PBS で治療した群からのクローンは全て免疫マウスで拒絶された。

獲得された免疫回避機構の責任分子の同定の目的に、免疫マウスで拒絶されないクローン及び PBS 投与群の拒絶されるクローンのトランスクリプトーム解析をマイクロアレイ、次世代シーケンスで解析した。

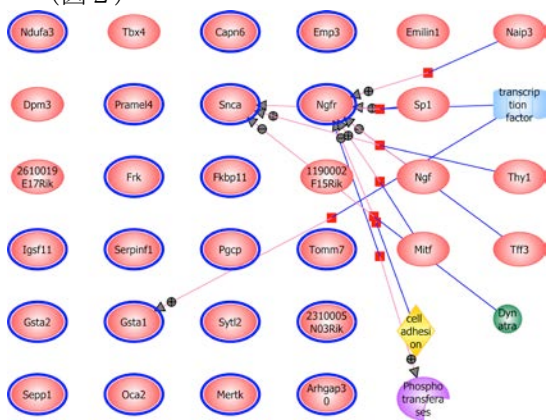
その結果、MHC class I、TRP2、GP100、IFN- $\gamma$  (反応性も含む)、Fas の遺伝子発現は変化なかった。

遺伝子発現パターン解析 (K-means、階層的クラスタリング解析及び fold 解析) 及び real time PCR データーから、B16F1 に低発現で、B16F10 (既に確立された腫瘍免疫に耐性の株) 及び B16DC 両者に 6 倍以上の発現増強を認める IgSF、Syt12、GATA1、2 などの遺伝子を 12 個、逆に発現が低下する NGFR 等が検出された。以下に、高発現遺伝子に関するヒートマップ (図 1) 及び pathway map (図 2) を図示した。上記因子が腫瘍回避機構のバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

(図 1)

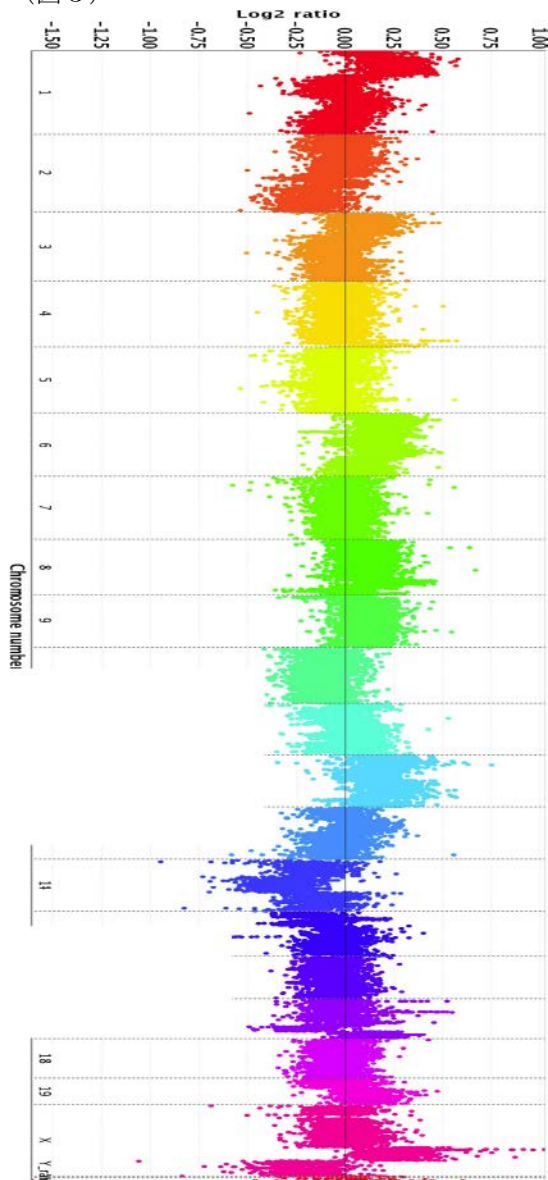


(図 2)



アレイ CGH (Comparative genomic hybridization) にて、増加する 12 遺伝子のうち最大の発現を示す遺伝子について 1 コピー数増加を認めた。残りの 11 遺伝子についてはコピー数の差を認めなかった (図 3)。

(図 3)



各遺伝子について、B16 DC あるいは B16F10 の mRNA より PCR で標的遺伝子を増幅し、CAG プロモーターを有する発現プラスミドベクターに挿入、クローニングした。このプラスミドを用いて B16F1 に遺伝子導入し、安定細胞株を作製した。IgSF に関しては発現上昇を認めるも、遺伝子導入では明らかな拒絶耐性の形質を示さなかった。

以上、腫瘍の免疫回避機構に関わるメカニズムの一つに、腫瘍免疫療法で惹起される腫瘍特異的 T 細胞応答依存性に腫瘍のクローンから腫瘍免疫を回避するクローンが新たに出現することが世界で初めて実証された。この腫瘍細胞は、MHC class I、TRP2、GP100、IFN- $\gamma$  (反応性も含む)、Fas の遺伝子発現は

変化なく、Syt12、GATA1、2 の上昇、NGFR の低下などが腫瘍回避機構のバイオマーカーとなり得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 17 件)

- (1) Kayashima H, Toshima T, Okano S, Taketomi A, Harada N, Yamashita Y, Tomita Y, Shirabe K, Maehara Y: Intratumoral neoadjuvant immunotherapy using IL-12 and dendritic cells is an effective strategy to control recurrence of murine hepatocellular carcinoma in immunosuppressed mice. J Immunol 査読有 185 (1): 698-708, 2010
- (2) Kondoh H, Okano S, Yoshida K, Yonemitsu Y, Tomita Y, Yoshikai Y, Wake N, Sueishi K: Semi-allogeneic dendritic cells injected via the intratumoural injection route show efficient antitumour effects in cooperation with host-derived professional antigen-presenting cells. Scand J Immunol 査読有 72 (6): 476-490, 2010
- (3) Okano S, Yonemitsu Y, Shirabe K, Kakeji Y, Maehara Y, Harada M, Yoshikai Y, Inoue M, Hasegawa M, Sueishi K: Provision of continuous maturation signaling to dendritic cells by RIG-I-stimulating cytosolic RNA synthesis of Sendai virus. J Immunol 査読有 186 (3): 1828-1839, 2011
- (4) Harashima N, Inao T, Imamura R, Okano S, Suda T, Harada M: Roles of the PI3K/Akt pathway and autophagy in TLR3 signaling-induced apoptosis and growth arrest of human prostate cancer cells. Cancer Immunol Immunother 査読有 61 (5): 667-676, 2012
- (5) 岡野慎士 アジュバントとしてのセンダイウイルス 月刊臨床免疫・アレルギー科査読無 57, 2012 87-94.
- (6) Inao T, Harashima N, Monma H, Okano S, Itakura M, Tanaka T, Tajima Y, Harada M: Antitumor effects of cytoplasmic delivery of an innate adjuvant receptor ligand, poly(I:C), on human breast cancer. Breast Cancer Res Treat 査読有 134 (1): 89-100, 2012
- (7) Chou B, Hiromatsu K, Okano S, Ishii K, Duan X, Sakai T, Murata S, Tanaka K, Himeno K: Antiangiogenic tumor therapy by DNA vaccine inducing aquaporin-1-specific CTL based on ubiquitin-proteasome system in mice. J Immunol 査読有 189 (4): 1618-1626, 2012
- (8) 土方 康基, 村橋 (伊賀) 睦了, 岡

崎 利彦, 田中 芳浩, 大平 公亮, 岡野 慎士, 久野 晃聖, 高橋 淳, 丸本 朋稔, 井上 博之, 谷 憲三朗: 固形腫瘍に対する新規免疫療法の開発

-当科における第 I 相臨床試験の現状- 臨床血液 査読無 53 (5): 487-492, 2012

- (9) Okano S., Kondoh H, Toshima T, Nakagawara H, Yoshizumi T, Soejima Y, Shirabe K, Harada M, Yoshikai Y, and Maehara Y: Fas-deficient fully allogeneic dendritic cells administered via an intratumoral injection route show efficient antitumor effects in murine models. Fukuoka Igaku Zasshi 査読有 104 (1): 15-26, 2013
- (10) Okano S., Matsumoto Y, Yoshiya S, Yamashita Y, Harimoto N, Ikegami T, Shirabe K, Harada M, Yoshikai Y, and Maehara Y: CD4 T cell-mediated masking effects of the immunogenicity of tumor-associated antigens are qualitatively and quantitatively different depending on the individual antigens. Fukuoka Igaku Zasshi 査読有 104 (1): 1-14, 2013

[学会発表] (計 17 件)

- (1) 岡野慎士ら 能動免疫療法による免疫回避機構獲得細胞の出現に関する免疫病理学的検討 第 99 回日本病理学会総会平成 22 年 4 月 27 日東京
- (2) Okano S. et al. RIG-1-stimulating cytosolic RNA synthesis of Sendai virus (rSeV) is a novel stimulant for human dendritic cells (DC) 第 14 回日本がん免疫学会総会平成 22 年 7 月 22 日熊本
- (3) 岡野慎士ら腫瘍内樹状細胞 (DC) 投与療法における宿主抗原提示細胞 (hAPC) と投与 DC の役割に関する免疫病理学的検討第 7 回日本病理学会カンファレンス平成 22 年 8 月 6 日岡山
- (4) Okano S. et al. Provision of continuous maturation signaling to dendritic cells (DC) by RIG-1-stimulating cytosolic RNA synthesis of recombinant Sendai virus (rSeV) 第 14 回国際免疫学会議平成 22 年 8 月 26 日神戸
- (5) Okano S. et al. RIG-1-stimulating cytosolic RNA synthesis of Sendai virus (rSeV) is a novel stimulant for human dendritic cells (DC) 第 69 回日本癌学会学術総会平成 22 年 9 月 22 日大阪
- (6) Okano S. The roles of host-derived antigen presenting cells (hAPC) and injected dendritic cells (iDC) in intratumoral activated DC therapy (ITADT). 「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ平成 22 年 2 月 3 日大津
- (7) 岡野慎士ら移植後肝細胞癌再発制御における IL12 と樹状細胞を用いた術前

補助免疫療法の抗腫瘍効果の分子病理学的検討第 100 回日本病理学会総会平成 23 年 4 月 28 日横浜

- (8) Okano S. et al. Neoadjuvant immunotherapy using IL12/DC for control of recurrent hepatocellular carcinoma in immunosuppressed mice 第 15 回日本がん免疫学会総会平成 23 年 7 月 1 日大阪
- (9) 原嶋奈々江, 岡野慎士ら乳癌細胞に発現するアジュバント受容体を利用した immunogenic cancer cell death の誘導第 15 回日本がん免疫学会総会平成 23 年 6 月 30 日大阪
- (10) Okano S. et al. Neoadjuvant immunotherapy using IL12/DC for control of recurrent hepatocellular carcinoma in immunosuppressed mice 第 40 回日本免疫学会総会平成 22 年 11 月 27 日千葉
- (11) Okano S. et al. Neoadjuvant immunotherapy using IL12/DC for control of recurrent hepatocellular carcinoma in immunosuppressed mice 第 70 回日本癌学会学術総会平成 23 年 10 月 5 日名古屋
- (12) Okano S. Neoadjuvant immunotherapy using IL12/DC for control of recurrent hepatocellular carcinoma in immunosuppressed mice. 平成 23 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ平成 22 年 1 月 19 日大津
- (13) Yamaguchi S, Okano S. et al. Characterization of embryonal carcinoma cells emerged in the process of IPSC generation from common marmoset fibroblasts. 第 70 回日本癌学会学術総会平成 23 年 10 月 5 日名古屋
- (14) Inao T, Okano S. et al. Anti-tumor effect and autophagy in human breast cancer cells after the transfection with poly(I:C) 第 70 回日本癌学会学術総会平成 23 年 10 月 5 日名古屋
- (15) 岡野慎士, 居石克夫. 能動免疫療法による免疫回避機構獲得細胞の出現に関する免疫病理学的検討第 101 回日本病理学会総会 2012 年 04 月 26 日~2012 年 04 月 28 日東京
- (16) Okano S. Cancer cells to evade T-cell-response emerge de novo during dormant state after cancer. Immunotherapy 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 09 月 19 日~2012 年 09 月 21 日北海道
- (17) Harashima Nanae, Inao Touko, Okano Shinji, Harada Mamoru. Inhibition of autophagy augments cancer cell death

induced by an adjuvant receptor ligand,  
poly(I:C). 第 71 回日本癌学会学術総会  
2012 年 09 月 19 日～2012 年 09 月 21 日北  
海道

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/pathol1/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡野 慎士 (Shinji Okano)

九州大学病院・病理部・臨床助教

研究者番号：10380429