

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 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791529

研究課題名（和文）腹水中マクロファージとサイトカインの卵巣癌における役割の解明と分子標的治療の開発

研究課題名（英文）Analysis of functional role of interleukin-6 secreted by tumor-associated macrophage in ovarian cancer ascites

研究代表者

磯部 晶 (ISOBE AKI)

大阪大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60397619

研究成果の概要（和文）：卵巣癌患者の腹水から採取した TAM から IL-6 の分泌を認めた。卵巣癌細胞株はこの細胞との共培養により増殖能・浸潤能が著明に亢進したが、それは抗ヒト IL-6 受容体抗体により抑制された。各種卵巣癌細胞株で IL-6 受容体が正常卵巣上皮と比べて強発現していることを確認した。免疫不全マウスに SKOV3ip1 細胞を投与して作成した腹膜播種モデルに、抗ヒト IL-6 受容体抗体を投与したところ、腹膜播種病変、腫瘍重量、腹水産生が有意に抑制された。抗ヒト IL-6 抗体治療は卵巣癌治療の新たな選択肢となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Ascites were collected aseptically, and CD11b positive cells (TAMs) were purified by positive selection using magnetic-activate cell sorting (MACS) technology. Co-culture of ovarian cancer cell line, SKOV3ip1 cells, with TAMs significantly enhanced the invasive activity of cancer cells in Matrigel Boyden chamber assay. This enhancement was partially blocked by the treatment of anti-interleukin (IL)-6 receptor antibody (Tocilizumab). Since SKOV3ip1 cells did not express IL-6 in mRNA and protein level, IL-6 secreted by TAMs were considered to play a key role in ovarian cancer invasion. In vivo ovarian cancer xenografts, i.p. treatment of Tocilizumab significantly reduced peritoneal dissemination and ascites formation. Those results suggested targeting IL-6 produced by TAMs could be a promising therapy for a subset of ovarian cancer patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000 円	360,000 円	1,560,000 円
2011 年度	1,500,000 円	450,000 円	1,950,000 円
総計	2,700,000 円	810,000 円	3,510,000 円

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：①卵巣癌 ②腹膜播種 ③TAM ④IL-6 ⑤tocilizumab

1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣癌は最新の抗癌剤治療をもってしても、5年生存率40%程度と極めて予後不良である。卵巣癌患者の最大の死因は癌細胞の

腹腔内臓器への浸潤、すなわち多量の腹水産生を伴う腹膜播種であり、そのメカニズムの解析とそれに基づく新しい治療薬の開発は、卵巣癌に対する新しい分子標的治療となり

うる。

我々は、これまでに代表的な骨粗鬆症治療薬であるビスフォスフォネート製剤が卵巣癌の播種病変の形成を抑制すること、及び血管新生を抑制することを証明してきた。近年、ビスフォスフォネート製剤の使用が乳癌患者の予後を有意に改善することが報告され、この薬剤の作用機序が注目されている。そこで我々は、 C^{14} でラベルした Alendronate を卵巣癌腹膜播種モデルマウスに腹腔内投与し、その薬物動態を調べたところ、Alendronate は薬剤の主要な排泄器官である腎臓のほかに腹水中に分布し、時間の経過とともに骨へ移行するが、腫瘍そのものには殆ど移行しなかったことが判明した。このことから、ビスフォスフォネート製剤の抗腫瘍効果は腫瘍以外、特に腹水中に標的が存在することが示唆された。

癌患者腹水中には、癌細胞のほか、多くの間質系細胞、血球が含まれている。その中でも、腫瘍周辺に存在するマクロファージは腫瘍随伴マクロファージ (tumor-associated macrophage: 以下 TAM) と呼ばれ、様々な癌種で予後との相関が指摘されている。本来、免疫細胞の一種であるマクロファージは血球細胞である単球から分化するが、サイトカインや増殖因子など分化条件の違いにより性質の異なる 2 種類のマクロファージに分けられる。1つは免疫を活性化する M1 マクロファージであり、もう一つは免疫を抑制する M2 マクロファージである。TAM は M2 マクロファージとされている。卵巣癌においても、進行病変はマクロファージの集簇を伴い、その数が予後と相関すること、また腹水中の TAM が血管新生を促進する可能性などが報告されているが、卵巣癌の進展における TAM の役割はまだまだ解明されていない。

以上の知見に基づき、今回我々は腹水中に存在する TAM が卵巣癌の進展に与える影響を図 1 に示したように腫瘍の増殖能、浸潤接着能、血管新生能に焦点をあてて解析を行う計画を立案した。

図1 腹水中のTAMが卵巣癌進展に与える影響(仮説)



(2) 腹水中の TAM を治療標的と考えたときに単球からマクロファージへの分化を誘導するサイトカインに焦点を当てることは全く新規の分子標的治療になりうる。サイトカインの中でも IL-6 は当初、活性化 B 細胞を抗体産生細胞に分化させる因子として同定されたが、現在さまざまな細胞から産生される

ことが明らかになり、多彩な生理活性が報告されている。卵巣癌においても血清 IL-6 値が卵巣癌の予後因子であること、卵巣癌細胞から産生される IL-6 が腫瘍の増殖や血管新生を強力に促進すること (が報告されている。2007年に Duluc らが健常者の血中から単離した単球を IL-6 により分化誘導したマクロファージが、卵巣癌患者の腹水から採取したマクロファージと極めて似た性質を示すことを報告しており、卵巣癌患者腹水中の IL-6 が TAM の産生を通じて、卵巣癌の浸潤に促進的な役割を果たしていることが示唆されている。以上の知見に基づき、我々は大阪大学と中外製薬が共同開発し、2008年に市販された国産初の抗体医薬である抗 IL-6 受容体抗体 (tocilizumab) に着目し、これを用いて、卵巣癌における IL-6 の役割を TAM を中心に解析し、さらに卵巣癌モデルマウスでその治療効果を検討する計画を立案した。

2. 研究の目的

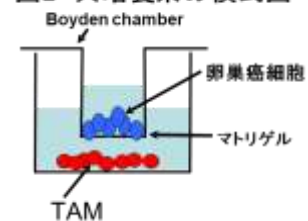
(1) 卵巣癌腹膜播種における TAM の役割の解明

腹水を有する卵巣癌患者から、文書による同意を得た上で術中に腹水を採取し、それより抗 CD11b 抗体を用いてマクロファージを抽出し、これを用いて、以下の課題を検証する。

① TAM が卵巣癌に与える影響の検証

Boyden Chamber を用いて図 2 に示したように卵巣癌細胞と TAM の共培養を行う。この系を用いて癌細胞の増殖能、浸潤接着能について検討を加える。

図2 共培養系の模式図



② TAM が血管新生に与える影響の検証

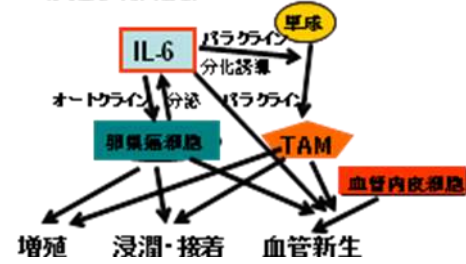
我々は既に臍帯より血管内皮細胞 HUVEC を採取培養する系を確立している。Matrigel 上の HUVEC が TAM との共培養により、tube formation をおこすか検討する。

(2) 卵巣癌腹膜播種における IL-6 の役割の解明

① 卵巣癌組織検体における IL-6 及び IL-6 受容体の発現の検討

卵巣癌における IL-6 の役割を検討すべく、組織検体における IL-6 及び IL-6 受容体の発現部位の検討を行う。我々は卵巣癌細胞そのものが IL-6 の産生源である想定しており、その IL-6 が Autocrine に腫瘍の増殖浸潤を促進し、さらに Paracrine として、単球の TAM への誘導や血管新生を誘導していると想定している (図 3)。

図3 卵巣癌の進展におけるIL-6の役割(仮説)



それを検証するべく、IL-6 と予後との関係のみならず、IL-6 と TAM や血管新生との相関関係および腫瘍における STAT3 のチロシン酸化などの検討を行う。

② 抗 IL-6 抗体による卵巣癌腹膜播種抑制効果の検討

Tocilizumab は大阪大学と中外製薬が共同開発した IL-6 受容体に対するヒトキメラ化抗体で、2008 年に市販された国産初の抗体医薬である。現在は関節リウマチおよびキャスルマン病にのみ適応がある。我々は中外製薬に卵巣癌腹膜播種モデルマウスへの実験への使用申請を行い、受理された。この Tocilizumab をヒト卵巣癌細胞を腹腔内移植した腹膜播種モデルマウスに投与することにより、Tocilizumab の卵巣癌細胞に対する直接的な影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) 卵巣癌患者腹水よりマクロファージの分離抽出

卵巣癌患者の文書による同意を得た上で手術時に腹水を採取し、遠心分離後、Ficoll で赤血球、血漿の除去を行い、Miltenyi Biotec 社の MACS Cell Separation Columns を用いて単球マーカーである CD11b でマクロファージを分離する。

(2) TAM が卵巣癌細胞に与える影響の解析

① TAM が卵巣癌細胞の浸潤能に与える影響の解析

図 2 の模式図で示した 24 ウェルの Boyden Chamber を用いた共培養系を用いる。卵巣癌細胞株を上層にマクロファージを下層にまき、Filter を通過する卵巣癌細胞株の細胞数を評価する。この条件下で、後述する抗 IL-6 受容体抗体などをマクロファージに前投与する抑制実験を行うことにより、抗 IL-6 受容体抗体の作用点及びマクロファージの役割の検討を行う。

② TAM が卵巣癌細胞の増殖能に与える影響の解析

本検討では、図 2 の模式図とは逆に、下層に卵巣癌細胞株、上層の Chamber にマクロファージを撒いた共培養系を用いる。我々が所有する組織型の異なるいくつかの細胞株を

使用する。増殖能は MTS アッセイで評価する。

③ TAM が血管新生に与える影響の解析

当院での分娩症例の胎盤臍帯より、患者の文書による同意を得た上で血管内皮細胞 HUVEC の初代培養を行う。これをマトリゲルでコートした 96 ウェルプレート上に 2.5×10^4 個撒く。これに TAM のみを培養した上清を添加し、腹水による血管新生促進が TAM によるものなのかを検討する。さらに我々が所有する抗 VEGF 抗体(Bevacizumab)や抗 IL-6 受容体抗体などによる抑制試験を行うことにより、TAM の血管新生に与える役割の解析を行う。

④ 卵巣癌組織検体における TAM の発現と血管新生の相関関係の検討

卵巣癌組織検体を血管内皮細胞のマーカーである抗 CD31 抗体で染色することにより、TAM が血管新生を誘導しているかの検討を行う。

⑤ 卵巣癌組織検体における IL-6 及び受容体の発現の検討

卵巣癌組織における IL-6 の産生源および作用部位を同定するべく、抗 IL-6 及びその受容体抗体を用いて、IL-6 の発現と卵巣癌の病期、予後との関連を検討する。さらに前述した TAM や血管新生との相関性を検討することにより、卵巣癌における IL-6 の果たしている役割を網羅的に検討する。

(4) 抗 IL-6 受容体抗体(Tocilizumab)による卵巣癌に対する治療効果の可能性の検討 (in vivo)

前述の in vitro の研究により、IL-6 抑制による TAM の機能抑制および卵巣癌細胞の浸潤・増殖抑制効果が明らかになれば、in vivo における抗 IL-6 受容体抗体による卵巣癌腹膜播種の治療の可能性について検討する。我々はヒト卵巣癌細胞株をヌードマウスに腹腔内投与する卵巣癌腹膜播種モデルマウスの実験系を既に確立している。

① 腫瘍への直接効果に焦点をあてた Tocilizumab 単独投与試験

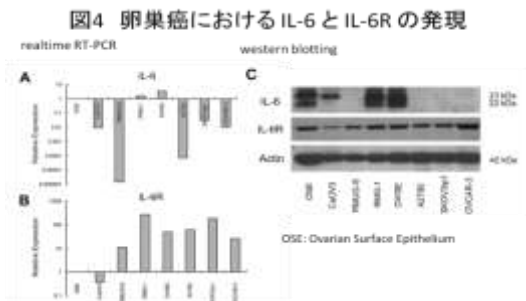
1×10^6 個の SKOV3ip1 細胞をヌードマウスに腹腔内投与し、1 週間後より、Tocilizumab 5mg/kg の週 2 回静脈投与による治療を 4 週間行う。対照として、コントロール IgG を用いる。SKOV3ip1 移植マウスは通常、移植後 35 日前後で 2ml 以上の血性腹水を伴った卵巣癌末期症状を呈する。よって、その時期にマウスを安楽死させた後、腫瘍重量、腹水量、播種病変数を両群において比較検討する。Tocilizumab 治療群 10 匹、Control 群 10 匹を予定している。Tocilizumab の効果が不十分であれば、投与量を 15mg/kg まで増量し、濃度依存による治療効果判定を検討する。また、摘出病変をホルマリン固定後、パラフィ

ン切片とし、腫瘍における直接効果として、IL-6の下流シグナルであるSTAT3のチロシンリン酸化、増殖能のマーカとしてKi67、血管新生のマーカとして、VEGF及びCD31の免疫組織染色を行い、薬剤の作用点についての検討を加える。

4. 研究成果

(1) TAMが卵巣癌細胞株に与える影響の解析
卵巣癌患者より採取した腹水からCD11bで分離したマクロファージ (TAM) は、卵巣癌予後因子の一つであるインターロイキン 6 (IL-6) を分泌していることをELISA法にて確認した。

種々の卵巣癌細胞株において IL-6 および IL-6 受容体 (IL-6R) が発現していることを western blotting 法ならびに real time RT-PCR 法にて確認した(図4)。

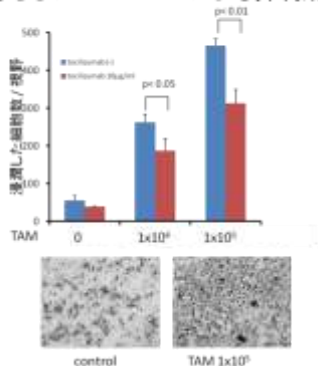


① TAMが卵巣癌細胞の増殖能・浸潤能に与える影響

MTS assayにて検討するに、SKOV3ip1はTAMとの共培養により増殖能が約1.3倍に亢進した。SKOV3ip1はTAMのない状態でIL-6刺激を加えても増殖能が約1.5倍に亢進した。

Invasion assayにて検討するに、SKOV3ip1はTAMとの共培養により浸潤能が約8.4倍に亢進した(図5)。SKOV3ip1はTAMのない状態でIL-6刺激を加えても浸潤能が約3.8倍に亢進した。

図5 TAMとの共培養による卵巣癌細胞の浸潤能亢進ならびにtocilizumabによる抑制効果



Tocilizumabにより、増殖能は約7%、浸潤能は約33%抑制された。

TAMの分泌するIL-6がSKOV3ip1の増殖能・浸潤能を亢進し、tocilizumabがこれを抑制

する可能性が示唆された。

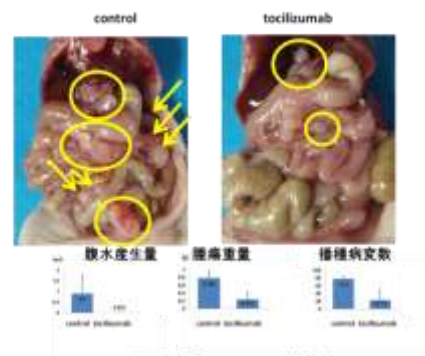
② TAMが血管新生に与える影響の解析
血管新生促進因子であるVEGFの発現をELISA法にて検討するに、SKOV3ip1はTAMより約10倍以上高濃度にVEGFを発現していた。また、SKOV3ip1はTAMのない状態でIL-6刺激を加えるに用量依存的にVEGFの発現が最高で約3倍に亢進した。また、SKOV3ip1はTAMとの共培養によってもVEGFの発現が約2倍に亢進し、tocilizumabにより約15%抑制された。

TAMの分泌するIL-6がSKOV3ip1のVEGF分泌能を亢進し、tocilizumabがこれを抑制する可能性が示唆された。

(2) 抗IL-6R抗体による卵巣癌に対する治療効果の検討 (in vivo)

SKOV3ip1をヌードマウスに腹腔内投与した卵巣癌腹膜播種モデルにtocilizumabを投与し、治療効果を腫瘍重量・播種病変数・腹水産生量で検討した。tocilizumabを投与したマウス(治療群)はコントロール(非治療群)に比して、腫瘍重量・播種病変数はそれぞれ約30%に抑制され、腹水産生量はほぼ0となった(図6)。

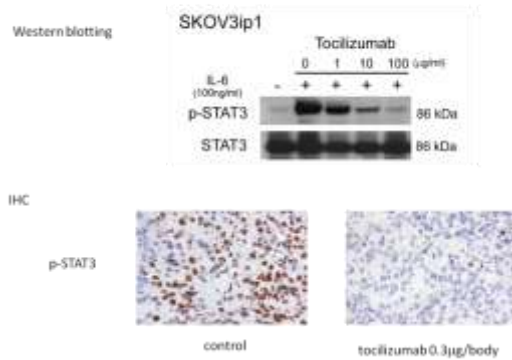
図6 抗IL-6受容体抗体による治療効果



tocilizumabはIL-6を標的とした卵巣癌の治療薬となる可能性が示唆された。

これらのマウスより摘出した標本を用いて免疫組織染色を行なった。コントロール群において、IL-6シグナリングの下流にあるStat3のリン酸化が高レベルに生じているのに対し、治療群ではStat3のリン酸化はほぼ完全に抑制された(図7)。

図7 抗IL-6受容体抗体による治療効果



また、同じ標本を用いて、増殖能の指標である Ki-67 と血管新生の指標となる CD31 の発現を免疫組織染色でそれぞれ検討するに、コントロール群に比して治療群では、Ki-67 の発現が約 30%、CD31 の発現が約 70%抑制された(図 8, 図 9)。

図8 抗IL-6受容体抗体によるKi-67発現抑制効果

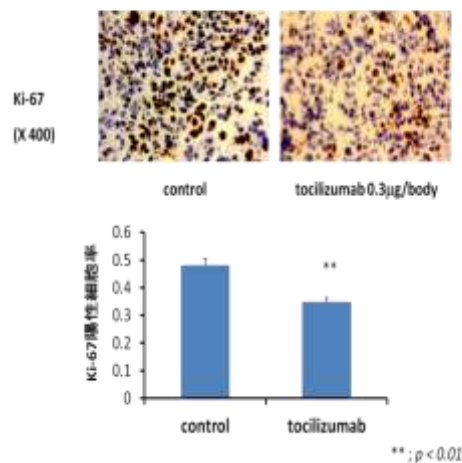
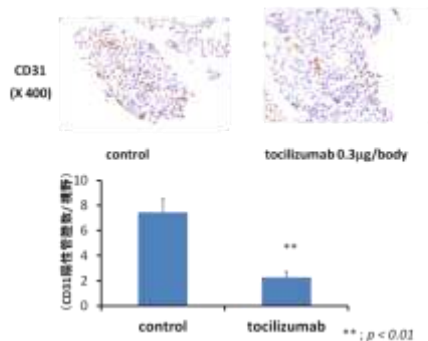


図9 抗IL-6受容体抗体によるCD31発現抑制効果



tocilizumab は IL-6 を標的とした卵巣癌の治療薬とな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)

[学会発表] (計 3 件)

①卵巣がん進展時の腹水中に大量に存在する骨髄由来細胞が果たす役割の解明
第 63 回日本産科婦人科学会 (大阪)

磯部 晶, 澤田健二郎, 大八木知史,
若林敦子, 馬淵誠士, 森重健一郎,
木村 正.

2011 年 8 月 29 日

② Analysis of functional role of interleukin-6 secreted by tumor-associated macrophages in ovarian cancer ascites
American Association for Cancer Research
102nd Annual Meeting 2011 (Orland, U.S.A.)

Isobe, A., Sawada, K. Ohyagi, C.
Mabuchi, S. Wakabayashi, A.
Morishige, K. Kimura, T.

2011 年 4 月 5 日

③ Analysis of functional role of interleukin-6 secreted by tumor-associated macrophages in ovarian cancer ascites
第 69 回日本癌学会 (大阪)

Isobe, A., Sawada, K. Ohyagi, C.
Mabuchi, S. Kimura, T.

2010 年 9 月 24 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯部 晶 (ISOBE AKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60397619