

## 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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791544

研究課題名（和文） 子宮体癌の免疫抑制分子の同定と発現解析

研究課題名（英文） Identification and expression analysis of the immunosuppressive molecule of endometrial cancer

研究代表者

平尾 薫丸 (HIRAO NOBUMARU)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：80327593

研究成果の概要（和文）：子宮体癌細胞株由来ファージライブラリーを腫瘍移植 SCID マウス由来の血清でスクリーニングし、15 種の抗原を同定した。このうち MYEOV は多くの癌細胞株で発現が高く、正常組織で低かった。体癌組織における qPCR を用いた検討では MYEOV 高発現群では無病再発期間が有意に短く、浸潤深度が有意に深い傾向を示した。siRNA による MYEOV の発現が抑制された SNG-2 は有意な浸潤能の低下を認め、増殖能も低下した。MYEOV は子宮体癌において高発現する腫瘍抗原であるとともに、その発現は浸潤や予後と関連すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Myeloma overexpressed gene (MYEOV) was identified as a potential cancer antigen that was expressed frequently in cancer tissues. A high expression level of MYEOV was positively correlated with deep myometrial invasion and negatively correlated with disease-free survival in endometrial cancer. Recurrence rates were 7/17 in patients with high MYEOV expression and 0/28 in those with low expression ( $p=0.027$ ). siRNA knockdown of MYEOV significantly inhibited migration and invasion of endometrial cancer cells, but had no significant effect on proliferation. High expression of MYEOV is associated with deep myometrial invasion and poor prognosis in endometrial cancer, and promoted tumor cell migration significantly. These results may suggest that MYEOV is a tumor-promoting factor with promising therapeutic potential for endometrial cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学臨床医学・婦人科腫瘍学

キーワード：子宮体癌 免疫抑制 MYEOV

## 1. 研究開始当初の背景

婦人科腫瘍委員会報告によると、1983 年に 976 例であった子宮体癌は 2007 年には 5005 例と急激に増加しており、浸

潤癌で子宮癌全体に占める割合も約 50%に上昇している。子宮体癌の発癌は、p53 変異ならびにマイクロサテライト不安定性(MSI)の関与が指摘されている。

このような腫瘍では遺伝子変異が多発し、多くの変異タンパクが産生されて免疫系に認識されていると考えられ、免疫療法の標的となる有利な条件が整っている。我々は MSI 陽性患者において特異的免疫応答が生じていることを報告し(Iwata T, Hirao N, et al. Clin Cancer Res. 11; 3949-57, 2005.)、免疫応答が予後に関与している可能性を示した。

遺伝子変異が多発する癌である子宮体癌は、免疫療法の良い適応となると考えられる。一方、最も免疫療法が有効とされるメラノーマにおいてさえ、免疫療法で PR,CR を得られたものは 1.5%とされてきた(Rosenberg, S.A. et al.:Nature Med.,10:909-915,2004.)が、Dudly らは放射線療法で骨髄抑制を行った後、養子免疫療法を行なうことで RECIST 基準で奏効率 72%という劇的な奏効率をメラノーマで報告している(Dudley ME et al. J Clin Oncol 26 5233-9 2008)。この機序として、骨髄抑制により抑制性 T 細胞(Treg)などが抑制され、腫瘍の免疫逃避機構が解除されたためと考えられている。これらのことから、免疫療法においては免疫逃避の解除が劇的な奏効率向上をもたらす重要なカギであると認識されている。

こうした背景の中、癌細胞自身にも免疫から逃避する能力を備えていることがわかってきた。癌細胞自身が免疫を逃避する機序として、以下のものが挙げられる。

1) 免疫抑制性サイトカイン: 癌細胞自身が IL6 や TGF- $\beta$ 、VEGF などの免疫抑制性サイトカインを分泌するなどによって、T reg を誘導したり、樹状細胞を抑制型に分化させる。

2) 代謝酵素: 腫瘍細胞が分泌する indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)や arginase などの代謝酵素は CTL や樹状細胞の働きを抑制する。

3) B7 タンパク: CTL が癌細胞に到達したとしても、癌細胞表面に B7 タンパク (PD-L1,B7-DC,B7-H2,B7-H3, B7-H4) が発現していると、これらが CTL 表面の PD-1 タンパクと結合し、CTL のアポトーシスを誘導する。

子宮体癌においても 2007 年に子宮体癌組織での IDO の発現が腫瘍浸潤 CTL を抑制し、予後悪化因子であることが報告され(Ino K, Yamamoto N. et al. Clin Cancer Res. 14:2310-2317. 2008)、また、B7 タンパクである B7-H4 についても同様に予後不良因子であること(Miyatake T, Tringer E. et al. Gynecol Oncol. 106:119-127. 2007.)が相次いで示され

た。このように子宮体癌細胞が免疫から自身を逃避させ予後に関する証拠が示されてきた。しかしその他の免疫抑制性分子の発現については報告がなく、これらの分子がどのような伝達系によって発現制御されているかは未だ不明である。この解明が免疫療法の奏効率向上に必須であると考えられる。研究代表者は予備実験として子宮体癌細胞株での①の免疫抑制性サイトカインのうち、IL-6 が高発現する体癌細胞株が存在することを確認している。また、③の B7 ファミリーを検討し、体癌細胞株で PD-L1 が発現することが判明した。本研究では、このような免疫抑制性分子うち子宮体癌の予後に関する因子を明らかとする。さらにその発現がどの細胞内シグナル伝達系で制御されるのかを明らかとし、これらの結果をもとに免疫逃避状況の解除、ひいては免疫療法の奏効率向上を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究では、子宮体癌における免疫抑制の分子機構の解明と これらの研究成果に基づいた新規治療法の可能性を追究する。具体的には、まず子宮体癌で高率に生じる PTEN 発現抑制ならびに PI3K/Akt カスケードに着目し、その亢進と免疫抑制性分子の発現に関連があるかを検討する。すでに研究代表者は、子宮体癌細胞株で PTEN の loss を認めること、それに対して Akt カスケードが活性化されていることを確認している。免疫抑制分子産生に関与する他のシグナル系について探索を網羅的に行い、子宮体癌においてシグナル亢進 (Kras/MAPK, STAT3,  $\beta$ -catenin/Wnt, NF- $\kappa$ B 経路など)が生じているか、各種免疫抑制分子の発現と関連しているかを検討する。in vitro で同定された免疫逃避機構解除の標的となり得る分子については、マウス腫瘍モデルを用いて、免疫逃避の確認と免疫逃避の克復の可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

(1)2003 年から 2009 年に慶応義塾大学病院で子宮全摘術を行った子宮体癌患者 45 例を対象とした。病理組織診断はいずれも類内膜腺癌であり、grade 1 が 22 人、grade 3 が 23 人であった。術後進行期は I 期 23 人、II 期 4 人、III 期 16 人、IV 期が 2 人であった。術後再発リスク群の 31 名に術後化学療法が行われた。このほか、20 人の子宮体癌患者と年齢を合わせたコントロール患者の血清を

用いた。使用した組織および血清は、すべて研究同意を患者より得て使用した。

#### (2)腫瘍移植 SCID mouse 血清

NOD-SCID IL-2Ry null (NOG) mice に子宮体癌 G3 の組織を移植した。この患者の術後進行期は pT1cN1M0 であった。組織片を 5-mm 平方に細断し、ペニシリンおよびストレプトマイシン入りの RPMI1640 medium で洗浄し、3 匹の SCID マウスの大腿部と右腹壁に移植した。4 週間後に腫瘍移植マウスをサクリファイし、血清を回収した。それぞれのマウスの血清を 300  $\mu$ l ずつ混合して 29.1 ml の TBS-SM (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, 5% skim milk, 0.1% azide) で希釈して SEREX screening に使用した。SEREX 法でスクリーニングに用いたファージライブラリーは SNG-II, Ishikawa, HEC-IB より作成した。得られた陽性クローンを採取して塩基配列を決定して NCBI BLAST search で遺伝子を特定した。

#### (3)細胞株・組織・RNA 検体

ヒト子宮体癌細胞株である SNG2, SNG-S, SNG-M SNG-W, 卵巣癌細胞株 RMG-I, RMG-II, 子宮頸癌細胞株 SKG2, SKG3b は我々の研究室で樹立した。そのほかの細胞株 (Hec-Ib, Ishikawa, HOUA, HHUA, TCO-1, ES2, KF) は全て購入して使用した。Ishikawa, Hec-Ib SNG2, RMG-I, and RMG-II は 10% FCS と 100  $\mu$ g/mL の kanamycin を添加した F12 メディウムで培養した (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)。RT-PCR に用いた正常組織は Clontech (Palo Alto, CA) より購入した。子宮体癌組織は術時に採取後、使用するまで -80°C で保管した。

#### (4)RT-PCR および定量的 PCR

MYEOV 遺伝子の発現を検討するため RT-PCR および定量的 PCR を行った。cDNA を 14 種類の婦人科癌細胞株と 45 例の子宮体癌組織から作成し、RT-PCR を Ex Taq (Takara, Kyoto, Japan) を用いて行った (30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, and 1 min at 72°C) MYEOV (NM\_138768.2) の増幅に用いたプライマーは 5'-TCT CCT CTC CTC CTC CAC CAC-3' および 3'-TCT CCA GGG GCT ACC ACC AAT-5' であり、定量的 PCR は MYEOV-specific probe (Hs00993153\_g1) (Applied Biosystems) を用いて行った。コントロールとして Human GAPDH を用いた。発現量の評価は RQ value を用い、expression scores  $\geq 3$  を

高発現群 < 3 を低発現群とした。

#### (5)GeneChip およびマイクロアレイ

MYEOV の発現を 38 の正常組織と and 39 のがん細胞株を使用した GeneChip (Human Genome-U133A, B; Affymetrix) で解析した。 (<http://www.lsbm.org/database/index.html>)。MYEOV の発現は GAPDH をコントロールとして評価した。

#### (6)統計解析

定量的 RT-PCR は Mann-Whitney U test を用いて評価した。Disease-free survival と臨床病理学的因子は Fisher exact test と Log rank test で評価した。SPSS v.17.0 for Windows (SPSS Inc, Chicago, IL) を用いた。

#### (7)siRNA による MYEOV の発現抑制

SNG2 と HHUA 細胞株を Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いて以下の siRNA により MYEOV を発現抑制した。(sense, 5'-GGA UGU AAG UUA UCA ACU A-3'; antisense, 5'-UAG UUG AUA ACU UAC AUC C-3')。Transfect した細胞は定量的 PCR によって MYEOV の発現を確認した後、運動能と浸潤能を検討した。

#### (8)細胞浸潤能と運動能の評価

MYEOV を発現抑制した SNG2 株と HHUA 株を用いて xCELLigence RTCA DP device (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) によって細胞浸潤能と運動能の評価を評価した。20000 個の細胞を フィブロネクチンでコーティングした CIM-Plates16 で培養し、24 時間後と 52 時間後に運動能と浸潤能を測定し、RTCA software (v.1.2, Roche Diagnostics) のよって評価した。

#### (9)マイクロアレイによる遺伝子発現の検討

MYEOV 遺伝子の抑制株で発現が変動する遺伝子を網羅的に検討するため、MYEOV 抑制 SNG2 株と野生株で RNA を抽出し、3D-Gene Human Oligo chip 25K (Toray Res Institute, Kamakura, Japan) によって 25000 個の遺伝子の発現プロファイルを行った。

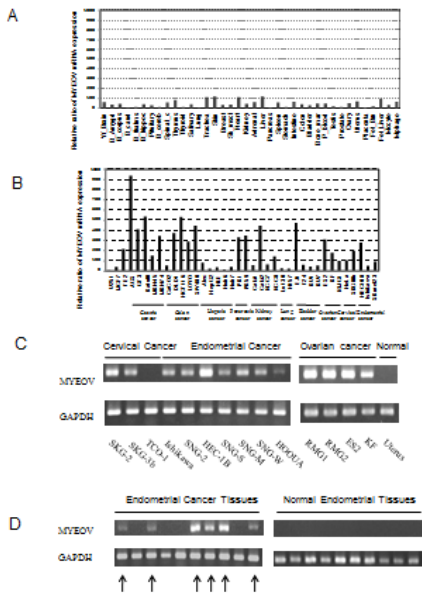
## 4. 研究成果

### (1)SEREX 法による MYEOV の同定

4 匹の子宮体癌移植 SCID の血清中のヒト IgG 抗体価は 527.8, 137.4, 225.8, and 10.4  $\mu$ g/ml であった。500 万クローンをスクリーニングし、23 種の陽性クローンを同定し、結果 15 種の遺伝子を同定した。このうち、KIAA0762, BIRC6, MYEOV, EIF4E が癌関連遺伝子と考えられ、RT-PCR の結果、MYEOV を検討するこ

ととした。MYEOV は Gene-Chip では癌特異的に高発現していた (Fig. 1A, B) また、子宮体癌細胞と子宮体癌組織で発現していたが、正常子宮内膜組織では発現を認めなかった (Fig1C)。

Fig 1



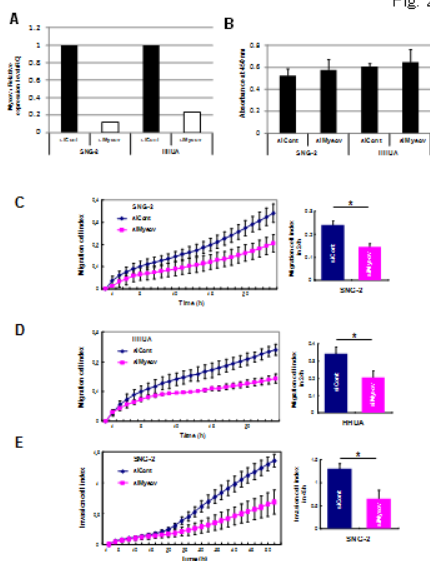
(2) 血清中の MYEOV 抗体の検出

Anti-MYEOV 抗体は、子宮体癌 20 例中 8 人で検出されたが、健常人では 24 人中 3 人であり、有意に子宮体癌患者で抗体保有率が高かった。

(3) MYEOV 遺伝子の抑制と浸潤・運動能との関連

SNG2 と HHUA 細胞株で MYEOV siRNA によって MYEOV の発現を抑制すると運動能と浸潤能が有意に低下した。(Figure 2)

Fig 2



(4) 3Dgene system による MYEOV 関連遺伝子の検索

a3D-GeneChip assay によって 25,000 の遺伝子を検討した。MYEOV の抑制によって発現が 2 倍以上に上昇した遺伝子は 414 であり、KIAA0319, JAG1, NR4A2, TGFBR1 HOXA5 が浸潤に関連すると報告されていた。また 224 個の遺伝子の発現が 1/2 以下となり、SLC7A6, PPAP2B, LPP3, SERPINE1, HBEGF が浸潤に関連すると考えられた (Table 1)。

Table1

Entrez ID	Symbol	Control siRNA (Normalized-Cy5)	MYEOV siRNA (Normalized-Cy3)	Ratio (Cy3/Cy5)
Downregulated genes (<0.5)				
26579	MYEOV	22.84	<6.08*	<0.27
5054	SERPINE1	800.73	309.46	0.39
1839	HBEGF	42.57	21.17	0.50
Upregulated genes (>2.0)				
7046	TGFBR1	8.77	26.87	3.06
126669	SHE	1.67	7.96	4.77
4312	MMP1	2.71	12.46	4.60
222663	SCUBE3	1.99	9.12	4.57
660	BMX	2.02	9.05	4.49
47	ACLY	246.37	1084.64	4.40
171024	SYNPO2	2.88	11.94	4.15
7917	GRM2	2.46	9.85	4.01

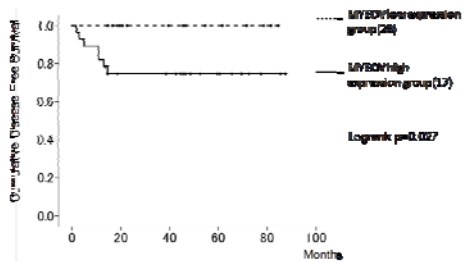
(5) MYEOV 発現と臨床病理学的因子の検討

MYEOV の高発現群では浸潤深度が深かった ( $p=0.045$ )。そのほかの LVSI ( $p=0.1299$ ) grading 3 ( $p=0.2333$ ) などには有意差はなかった (table2)

Table2

Clinicopathological Factors	MYEOV Expression		Fisher exact test	
	High	Low		
Staging (FIGO)	I-III	16	12	$p=0.527$
	III-IV	12	5	N.S.
Depth of invasion	< mid outer 1/3	20	7	$p=0.045$
	> inner 1/3	8	10	*
Lymph node metastasis	Positive	8	5	$p=0.999$
	Negative	20	17	N.S.
extracrine lesion	Positive	6	2	$p=0.630$
	Negative	22	15	N.S.
Histological grade	Grade1	11	11	$p=0.179$
	Grade2	17	6	N.S.
LVSI	Positive	17	7	$p=0.233$
	Negative	11	10	N.S.
Peritoneal cytology	Positive	7	2	$p=0.111$
	Negative	21	15	N.S.
Age	<60	13	6	$p=0.543$
	>60	15	11	N.S.
Menopause	Post	19	8	$p=0.7167$
	Pri	9	9	N.S.
LMI	>25	4	6	$p=1.131$
	≤25	24	11	N.S.

(6)MYEOV 発現と予後との関連  
45 例の子宮体癌患者組織を定量的 PCR 法で MYEOV 発現を検討したところ、高発現群で有意に再発率が高かった。  
( $p=0.027$ , log rank test) (Figure 3).



## 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 1 件)

平尾 薫丸, 岩田 卓, 藤井 多久磨, 西尾 浩, 塚崎 克己, 藤田 知信, 河上 裕, 青木 大輔, 吉村 泰典 SEREX 法により同定された癌抗原 MYEOV(myeloma overexpressed gene) の発現は子宮体癌において予後と相関する。第 63 回日本産科婦人科学会総会学術集会, 2011 年 8 月 29-31 日。大阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平尾 薫丸 (HIRAO NOBUMARU)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：80327593