

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592532

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌に高発現するHNF-1 によるがん微小環境構築機構の解明

研究課題名(英文) Immunosuppressive roles of HNF-1beta in ovarian clear cell carcinoma (OCCC)

研究代表者

藤田 知信 (Fujita, Tomonobu)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20199334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞腺癌(OCCC)に高発現するhepatocyte nuclear factor-1 (HNF-1)に着目し、がん微小環境における免疫抑制を検討した。HNF-1 高発現細胞株ではNF-κBやSTAT3の活性が高く、HNF-1 発現を抑制すると、NF-κBやSTAT3の活性が減弱しIL-6の産生も減少した。HNF-1 の発現抑制により共培養した樹状細胞が活性化され、そのT細胞刺激能も増強することがin vitroおよびin vivoにおいても示された。したがって、HNF-1 はOCCCのがん免疫抑制環境に関与するとともに、それを解除する標的分子となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) is a transcription factor and is overexpressed in ovarian clear cell carcinoma (OCCC). Here, we investigated immunosuppressive roles of HNF-1beta in OCCC. IL-6 production and activation of NF-κB and STAT3 was associated with HNF-1beta accumulation in OCCC cell lines. Culture supernatants (CS) from HNF-1beta accumulated OCCC have activities to impair dendritic cells (DCs) maturation. These immunosuppressive CS activity was reduced by knocking down HNF-1beta, partly owing to down-regulation of IL-6. Murine splenic, lymphnode and tumor-infiltrating DCs obtained from nude mice implanted with HNF-1beta knocking down OCCC cells restored activity to activate T cell than did DCs from control OCCC cells. These results indicate that HNF-1beta in OCCC may be involved in the immunosuppression mediated by impaired DC, and is not only useful as the tumor marker but also attractive targets for restoring immunocompetence in patients with OCCC.

研究分野：がん免疫学

キーワード：卵巣明細胞腺癌 HNF-1beta がん微小環境 がん免疫抑制

1. 研究開始当初の背景

がんの増殖・浸潤・転移のしやすさは、がん細胞自体のもつ特性のみならず、がん細胞と微小環境との相互関係が深く関わっている。免疫抑制も、増殖・生存・浸潤などががん悪性形質の一つとして重要であることが明らかになってきた。これまでの研究成果より、免疫療法を含め、がん治療効果の改善のためには、免疫抑制的あるいはがん細胞増殖浸潤促進的ながん微小環境の、分子・細胞レベルでの解明とその制御法の開発が重要であることを提言してきた。

卵巣明細胞腺癌は、欧米に比して日本での発生頻度が高いこと、化学療法に低感受性で予後不良で、未だ奏効率の高い治療法は確立されていない。卵巣明細胞腺癌のがん微小環境を詳細に解明することは、上述の通り、新たな治療戦略の開発につながるものと考えられる。

2. 研究の目的

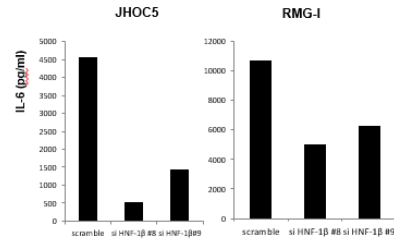
卵巣明細胞腺癌に高発現する HNF-1 (hepatocyte nuclear factor-1) を介したがん微小環境、特に免疫抑制的・がん細胞進展促進的な免疫病態形成機構の解明を目的とする。近年、癌の浸潤・転移・増殖といった生物学的特性は、がん細胞だけでは決まらず、がん細胞のおかれた微小環境での免疫細胞やその他の間質細胞との相互作用により決定されることが明らかになっている。そこで、本腫瘍に高発現する転写因子 HNF-1 の機能解析を通じて、がん細胞および免疫細胞や他の間質細胞との相互作用を解析し、本腫瘍が形成するがん微小環境の病態を解明するとともに、解析結果に基づいた診断・治療標的の同定により、新たな治療戦略の構築を目指す。

3. 研究の方法

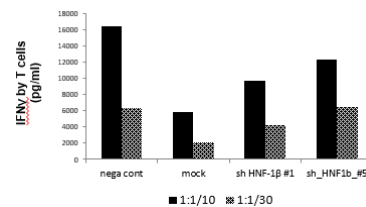
HNF-1 高発現卵巣明細胞腺癌細胞株では、siRNA やレンチウイルス shRNA を用いた発現抑制により、HNF-1 低発現細胞株では、HNF-1 cDNA 導入による高発現により、HNF-1 の、がん細胞自体の悪性形質(増殖・生存・浸潤・免疫抑制)への影響、および免疫細胞への作用を介した間接的ながん細胞悪性形質(増殖・生存・浸潤・免疫抑制)の促進作用を、in vitro および in vivo マウスモデルの実験系を用いて明らかにする。

4. 研究成果

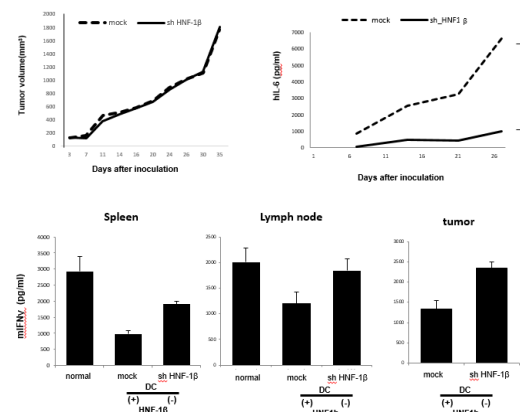
HNF1 を高発現する OCCC 癌細胞株に siRNA を用いて発現抑制を行い、HNF-1 の発現抑制により IL-6 の産生量が mock 株に比較し有意に減少すること、sh 株および mock 株での NF- κ B、STAT3 の活性は、sh 株では有意に活性が抑制されることを確認した。



また、HNF1 を高発現する OCCC 癌細胞株 (mock 株) と、その shRNA 導入による発現抑制細胞株 (sh 株) を作成し樹状細胞 (DC) の活性化を評価するため、mock 株と sh 株それぞれの培養上清を添加した培地 (mock 株培地、sh 株培地) にて DC を培養し、さらに DC の T 細胞刺激能を評価するため、得られた DC と T 細胞を共培養し、リンパ球混合試験 (MLR) を行い sh 株培地で mock 株培地に比して T 細胞の産生する IFN 産生量が増加し、DC の T 細胞刺激能が増強していると考えられた。



そこで、sh 株/mock 株をヌードマウスへ移植し、腫瘍形成能およびマウスリンパ組織の樹状細胞などへの作用に HNF-1 の関するの検討を行った。sh 株移植マウスでは mock 株移植マウスに比して tumor volum は同等であった。一方で、sh 株移植マウスでは mock 株移植マウスに比して血中 hIL-6 値は著明に低値であった。それぞれのマウスから採取した脾臓・リンパ節・腫瘍から樹状細胞 (DC) を抽出し、同系のマウスより採取した T 細胞を共培養する MLR 試験では sh 株培地で mock 株培地に比して T 細胞の産生する IFN 産生量が増加し、DC の T 細胞刺激能が増強していると考えられた。



したがって、OCCC において HNF-1 を抑制すると、NF- κ B や STAT3 の活性が抑制されることにより IL-6 の産生が抑制され、さらに DC が活性化され T 細胞刺激能も増強することが in vivo においても示された。したが

って、HNF-1 は OCCC の癌免疫抑制環境に関与するとともに、それを解除する標的分子となる可能性が示された。

近年、卵巣癌領域においても抗 PD-1 抗体など免疫療法の臨床試験が散見されるようになっており、本研究によって得られた免疫抑制を制御する知見から、治療効果を向上することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Iwata T, Fujii T, Morii K, Saito M, Sugiyama J, Nishio H, Morisada T, Tanaka K, Yaguchi T, Kawakami Y, Aoki D. Cytokine profile in cervical mucosa of Japanese patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Oncol*. 2015 Feb; 20(1):126-33. doi: 10.1007/s10147-014-0680-8. (査読有)
2. Fujita Y, Okamoto M, Goda H, Tano T, Nakashiro K, Sugita A, Fujita T, Koido S, Homma S, Kawakami Y, Hamakawa H. Prognostic significance of interleukin-8 and CD163-positive cell-infiltration in tumor tissues in patients with oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2014 Dec 2;9(12):e110378. doi: 10.1371/journal.pone.0110378. eCollection 2014. (査読有)
3. Nishio H, Yaguchi T, Sugiyama J, Sumimoto H, Umezawa K, Iwata T, Susumu N, Fujii T, Kawamura N, Kobayashi A, Park J, Aoki D, Kawakami Y. Immunosuppression through constitutively activated NF- B signaling in human ovarian cancer and its reversal by an NF- B inhibitor. *Br J Cancer*. 2014 Jun 10;110(12):2965-74. doi: 10.1038/bjc.2014.251. (査読有)
4. Hazama S, Nakamura Y, Tanaka H, Hirakawa K, Tahara K, Shimizu R, Ozasa H, Etoh R, Sugiura F, Okuno K, Furuya T, Nishimura T, Sakata K, Yoshimatsu K, Takenouchi H, Tsunedomi R, Inoue Y, Kanekiyo S, Shindo Y, Suzuki N, Yoshino S, Shinozaki H, Kamiya A, Furukawa H, Yamanaka T, Fujita T, Kawakami Y, Oka M. A phase I study of five peptides combination with oxaliplatin-based chemotherapy as a first-line therapy for advanced colorectal cancer (FXV study). *J Transl Med*. 2014 Apr 30;12:108. doi: 10.1186/1479-5876-12-108. (査読有)
5. Tsujikawa T, Yaguchi T, Ohmura G, Ohta S, Kobayashi A, Kawamura N, Fujita T, Nakano H, Shimada T, Takahashi T, Nakao R, Yanagisawa A, Hisa Y, Kawakami Y. Autocrine and paracrine loops between cancer cells and macrophages promote lymph node metastasis via CCR4/CCL22 in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2013 Jun 15;132(12):2755-66. doi: 10.1002/ijc.27966. (査読有)
6. Yaguchi T, Goto Y, Kido K, Mochimaru H, Sakurai T, Tsukamoto N, Kudo-Saito C, Fujita T, Sumimoto H, Kawakami Y. Immune suppression and resistance mediated by constitutive activation of Wnt/ -catenin signaling in human melanoma cells. *J Immunol*. 2012 Sep 1;189(5):2110-7. doi: 10.4049/jimmunol.1102282. (査読有)
7. Okabayashi K, Fujita T, Miyazaki J, Okada T, Iwata T, Hirao N, Noji S, Tsukamoto N, Goshima N, Hasegawa H, Takeuchi H, Ueda M, Kitagawa Y, Kawakami Y. Cancer-testis antigen BORIS is a novel prognostic marker for patients with esophageal cancer. *Cancer Sci*. 2012 Sep;103(9):1617-24. doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02355.x. (査読有)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 藤田 知信、徐 明利、ポピバノバ ポリヤナ、岡本 正人、桜井 敏晴、鳥越 俊彦、古畑 智久、杉浦 史哲、奥野 清隆、裕 彰一、岡 正朗、河上 裕、腫瘍浸潤 T 細胞は大腸癌の予後マーカーとなる、第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)、2014/9/27
2. Kawakami Y, Popivanova B, Nagumo H, Muramatsu R, Shinobu Noji, Xu M, Fujita T, Okamoto M, Sakurai T, Sugiyama J, Hayakawa T, Satomi R, Nishio H, Yaguchi T., Cancer-induced differential immune-status among patients and its modification for effective cancer treatment., Cold Spring Harbor Asia, Frontiers of Immunology in Health and Diseases, Suzhou, China, 2014/9/4, 招待
3. 杉山 重里、岩田 卓、西尾 浩、森定 徹、田中 京子、谷口 知恵、藤田 知信、河上 裕、吉村 泰典、青木 大輔
HNF-1 は免疫抑制的がん微小環境の構築に関与する 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会 東京国際フォーラム (東京) 2014/4/18
4. 杉山重里、谷口知恵、川村直、中村健太、大村学、岩田卓、藤田知信、青木大輔、河上裕 ヒト卵巣明細胞腺癌に発現す HNF-1b は腫瘍免疫の抑制に関与する

- 第 72 回日本癌学会学術総会 パシフィ
コ横浜(神奈川県横浜市) 2013/10/03
5. 岩田 卓, 田中 京子, 杉山 重里, 西尾
浩, 平尾 薫丸, 森定 徹, 早川 妙香,
谷口 智恵, 河上 裕, 青木 大輔 婦人
科がんにおけるトランスレーショナル
リサーチ NF-kB シグナルを標的とした
卵巣癌局所における免疫抑制環境の改
善と治療への応用 第 72 回日本癌学会
学術総会 パシフィコ横浜(神奈川県横
浜市) 2013/10/03
 6. 杉山重里, 谷口智恵, 川村直, 中村健太,
大村学, 岩田卓, 藤田知信, 青木大輔,
河上裕 ヒト卵巣明細胞腺癌に発現する
HNF-1b は免疫抑制的癌微小環境の構築
に關与する第 17 回日本がん免疫学会総
会 ANA クラウンプラザホテル宇部(山
口県宇部市) 2013/07/03
 7. 杉山 重里, 岩田 卓, 西尾 浩, 平尾
薫丸, 田中 京子, 藤井 多久磨, 藤田
知信, 河上 裕, 青木 大輔, 吉村 泰典
卵巣明細胞腺癌において HNF-1 は腫瘍
免疫の抑制に關与する 第 65 回日本産
科婦人科学会 ロイトン札幌(札幌)
2013/5/10

〔図書〕(計 1 件)

1. Kawamura N, Udagawa M, Fujita T,
Sakurai T, Yaguchi T, Kawakami Y.
Intratumoral Injection of BCG-CWS-
Pretreated Dendritic Cells Following
Tumor Cryoablation.in “Cancer
Vaccines Methods and Protocols” Eds,
Michael J.P., Patricia D. : Human
Press. Methods in Molecular Biology,
Vol. 1139:145-153,2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

www.keiocancer.com

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 知信(FUJITA TOMONOBU)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号:20199334

(2)研究分担者

河上 裕 (KAWAKAMI YUTAKA)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号:50161287

岩田 卓 (IWATA TAKASI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号:30296652

(3)連携研究者

青木大輔 (AOKI DAISUKE)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号:30167788