

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861467

研究課題名(和文) 母児免疫寛容のメカニズムに着目した新しい婦人科免疫療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of novel immunotherapy against gynecologic cancer based on the mechanism of maternal-fetal immune tolerance.

研究代表者

清水 大 (Shimizu, Dai)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：60400503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)： 婦人科癌細胞株の検討から、子宮頸癌細胞株(Hela)と卵巣癌細胞株(SK-OV-3)においてHLA-Gの発現をRT-PCR法で確認した。In vivoでの検討を想定し、この細胞株にLuc遺伝子を導入し安定発現株を作成した。これらの細胞株とヒト非ホジキンリンパ腫から樹立されたNK細胞株(NK-92)を共培養し、抗HLA-G抗体共存下での細胞障害活性を測定し検討中である。治療応用への可能性を探るためには、in vivoでの再現性とin vivoでの検討を行う必要があり検討を継続している。

研究成果の概要(英文)： We investigated the expression of HLA-G in human gynecologic cancer cell-lines and identified its expression in cervical cancer cell-line, Hela and ovarian cancer cell-line, SK-OV-3 by RT-PCR. We also established their stable transfectants that integrated luciferase reporter gene. We examined cytotoxic assay of NK cell (NK-92: human NK cell-line derived from non-hodgkin's lymphoma) by co-culture with human gynecologic cancer cells with or without anti-HLA-G neutralization antibody. We continue the examination aim at the clinical application of our strategy against cancer.

研究分野：産科婦人科学

キーワード：母児免疫寛容 癌免疫療法

1. 研究開始当初の背景

受精卵は受精後7日目ころに桑実胚から胚盤胞の状態で子宮内膜に着床する。着床後に絨毛膜から形成された絨毛と子宮内膜由来の脱落膜から胎盤が形成されるが、絨毛は母体子宮内膜内に侵入していく。また絨毛外栄養膜細胞は、子宮内膜よりさらに深く子宮筋層内まで浸潤し、母体らせん動脈の血管内皮と血管平滑筋を置換する。この際の絨毛外栄養膜細胞の浸潤は、正常妊娠では子宮筋層の内側1/3までの範囲にとどまり、さらに深部筋層までは浸潤しないよう制御されていることが知られている。胎児由来の絨毛外栄養膜細胞は母体子宮組織への浸潤過程で免疫学的な排除の対象となるはずであるが、絨毛外栄養膜細胞が発現している非古典的MHC class I分子(HLA-G)が妊娠子宮に豊富に存在するNatural Killer (NK) 細胞による攻撃から免れるために重要とされている(Zdravkovic M et al. Placenta 1999)。子宮に存在するNK細胞に発現するNKレセプター(killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL4, KIR2DL4)のリガンドはHLA-Gであり、このレセプターを介してNK細胞は抑制シグナルを得るのがその免疫機構であると考えられている(Rajagopalan S et al. J Exp Med 1999)。また近年、絨毛外栄養膜細胞に発現するGalectin-1がtolerogenic DCを誘導し、interleukin (IL) -10を分泌する制御性T細胞の増殖を起すとして、fetomaternal toleranceに重要な役割を担っていることが報告されている(Blois SM et al. Nat Med 2007, Cedeno-Laurent F et al. J Immunol 2012)。

また、HLA-GおよびGalectin-1は癌組織での発現も報告されている。婦人科癌では、子宮内膜癌においてHLA-Gの発現と進行病期が正の相関を示すことが報告されている(Barrier BF et al. Gynecol Oncol 2006)。またGalectin-1は、子宮頸癌において癌の浸潤の深さやリンパ節転移の有無と(Ha-Jeong Kim et al, Human Pathology 2012)さらに卵巣癌(Ha-Jeong Kim et al, Eur J Cancer, 2012)においても予後と相関することが報告されている。婦人科領域の癌のみでなく脳腫瘍や消化器癌、乳癌、膀胱癌などでもHLA-G、Galectin-1の発現と癌の進展の関連が報告されている(Amilot L et al. Cell Mol Life Sci 2011, Ito K et al. Cancer Metastasis Rev 2012)。

一方、1980年代にアメリカ国立がんセンターのRosenbergらのグループによって始まった癌の細胞免疫療法は、Lymphokine Activated Killer Cell (LAK)療法、Tumor-infiltrating Lymphocyte(TIL)療法と開発されてきたが臨床試験では有効性を証明できず衰退した。新たに開発されたDendritic Cell(DC)療法も癌特異的抗原を提示する樹状細胞を用いる方法であったが、実際に腫瘍を攻撃するエフェクター細胞は患

者自身のものを利用する方法であるため免疫能が保たれていなければ効果は期待できないという問題があり十分な効果が得られていない現状である。

臨床現場では、症例は少ないが無治療経過観察中に長期(数年単位)の無病期間を経て再発してくる腫瘍がある。長期の間に生体内で増殖も消失もせず存在し続ける癌細胞の存在は、免疫系による癌細胞の排除と腫瘍増殖が拮抗した状態が存在することを想起させる。また、癌のリンパ行性転移は主要な進展形態であるが、免疫系の前線であるリンパ節への転移が成立する機序にも免疫寛容のメカニズムの関連が想起される。

以上のことから、癌細胞にも栄養膜細胞が持つような免疫細胞による攻撃を免れる機構が利用されている可能性が示唆される。栄養膜細胞の免疫システムの詳細な解析から、癌細胞が免疫細胞の攻撃を免れる機構を想定して、これを解除する方法が確立すれば、改めて免疫療法の有効性を再検討し、新たな治療法として転移性癌治療に貢献する可能性がある。周産期医学と腫瘍学の機能を有する大学病院産婦人科において施行可能な研究であり、この研究を着想した経緯である。

2. 研究の目的

本研究は、妊娠に伴う免疫寛容のシステムに着目した新たな癌免疫療法の開発を目的とする。細胞性免疫は生体内で毎日発生している癌細胞の排除に働くとされており、免疫システムを用いた癌治療の開発が進められてきた。しかし現在までに臨床レベルで有効なエビデンスを持った癌免疫療法は確立されていない。胎児由来の細胞は母体にとって非自己と認識され免疫的に排除されるべきものであるが、妊娠子宮において胎児由来の栄養膜細胞(トロホプラスト)は子宮筋層への侵入を許され、これによって正常な妊娠が成立・維持される。妊娠子宮におけるこの免疫寛容が正常に機能しなければ、流産や妊娠高血圧症候群、さらには癒着胎盤や侵入奇胎といった日常の産婦人科診療で問題となる転帰をたどる。我々は、流産症例や妊娠高血圧症候群症例、癒着胎盤症例や侵入奇胎症例から得られた組織・血液検体をもとに免疫寛容メカニズムの解明に迫り、このシステムを婦人科腫瘍の新たな免疫療法開発の基礎とする。本研究は周産期医学と腫瘍学の機能を共に有する大学病院産婦人科のみで施行可能なチャレンジである。

3. 研究の方法

当科で手術を施行した婦人科癌(子宮頸癌・子宮体癌・卵巣癌・卵管癌・絨毛膜・子宮肉腫など)症例から得た癌組織、および婦人科癌細胞株よりTotal RNAを抽出しHLA-GやGalectin-1の発現量を網羅的に解析する。これらの分子の発現頻度・発現量と臨床的な癌進展パターンや予後との関連について解析

する。また、免疫不全マウスのヒト癌細胞株移植モデルを作製し、ヒト末梢血から単離・増幅したNK細胞および抗HLA-G抗体・抗Galectin-1抗体を注入・投与する。この免疫治療モデルを用いて、NK細胞と免疫寛容の中心的分子の中和抗体を併用して、癌縮小効果を検討することで新規癌免疫療法の基礎を確立する。

(1) 主要な婦人科腫瘍における HLA-G および Galectin-1 の発現の検討

子宮頸癌・子宮体癌・卵巣癌・卵巣癌・絨毛癌の手術検体より total RNA 抽出、パラフィン包埋ブロック作製を行う。この試料を用いて real-time RT-PCR を行い、各腫瘍における HLA-G および Galectin-1 の発現量を検討する。また、腫瘍組織内での HLA-G および Galectin-1 の発現の局在を、特異的抗体を用いて免疫組織化学的に検討する。さらに腫瘍組織およびその境界領域におけるNK細胞の存在・局在性も同時に免疫組織化学的に検討する。また、リンパ節転移症例においても、これらの分子の発現および局在を検討し、リンパ節転移症例に癌の発生母地をこえて共通する発現パターンや局在について解析する。また、症例は限られるが長期の無病期間を経て再発し再発腫瘍の摘出を行った症例を抽出して同様の解析を行い、初回手術により摘出した癌組織との発現パターンの比較を行う。これらの結果をもとに、臨床的な病期および腫瘍進展経過との相関関係の有無を検討する。症例の少ない腫瘍（子宮肉腫など）や長期期間を経た再発症例については、過去に採取され作製されたパラフィンブロックより QIAGEN RNeasy FFPE kit を用いて total RNA を調整する。

(2) 免疫不全マウスへの腫瘍細胞株の移植
子宮頸癌・子宮体癌・卵巣癌・絨毛癌などの婦人科癌由来のヒト癌細胞株における HLA-G および Galectin-1 の発現量を real-time RT-PCR 法を用いて網羅的に解析する。これらの分子の発現が確認された癌細胞株を免疫不全マウスに移植し、腫瘍形成の有無を確認する。腫瘍形成が認められた細胞株については、ルシフェラーゼレポーター遺伝子をコードするベクターをトランスフェクトして安定的にルシフェラーゼを発現する単一クローンを作製し、これを用いて後述する in vivo 系の実験を行う。以降の実験において、NK細胞を用いた免疫治療モデルを作製する必要があるため、免疫不全マウスとして T細胞・B細胞・NK細胞を欠失した NOD/Shi-scid-IL2R γ ^{null} マウス (NOG マウス) を用いる。

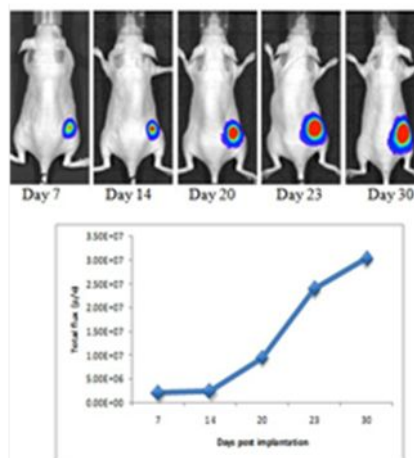
(3) 健常人、婦人科癌そして産科症例における HLA-G の受容体および Galectin-1 の発現の検討

健常人および担癌患者よりインフォーム

ドコンセントを得た後に、末梢血より Miltenyi NK Cell Isolation Kit を用いてNK細胞を精製する。このNK細胞において、HLA-Gの受容体である KIR2DL4 の発現量および、Galectin-1の受容体とされる CD45 の発現量に差があるか検討する。症例は限られるが、手術症例では癌組織中に浸潤しているNK細胞も精製し同様に検討する。

また、癒着胎盤症例、侵入奇胎で子宮摘出が行われた症例、分娩後の弛緩出血などの適応で胎児由来細胞の子宮への過度の侵入がなく子宮が摘出された症例（胎児由来細胞の侵入がなかった妊娠子宮）において、妊娠子宮に多く存在するNK細胞を抗CD56抗体で免疫組織学的に同定しさらに抗KIR2DL4抗体および抗CD45抗体で同時に染色する。子宮への侵入性とこれらの分子の発現パターンを比較する。

免疫不全マウスを用いた in vivo 系での抗腫瘍効果の検討



Caliper Life Science社HPより

(4) NK細胞を効率的に刺激するために樹立された遺伝子改変細胞株 K562-mb15-41BBL と(3)で精製されたNK細胞を IL-2 存在下に共培養することでNK細胞を増幅する。担癌患者で慢性的・全身的な免疫抑制状態にあるかを検討しておく必要があるため、健常人末梢血由来および担癌患者末梢血由来のNK細胞で増幅効率に差があるか検討する。増幅した各NK細胞は以降の免疫治療モデルマウスの実験に用いる。

(5)(2)で HLA-G および Galectin-1 の発現を確認し選択したヒト癌細胞株と(4)で調整した健常人または担癌患者由来ヒトNK細胞を、抗 HLA-G 抗体および抗ヒト Galectin-1 抗体存在下または非存在下で共培養し in vitro でNK細胞による癌細胞障害活性を測定する。培養液には calcein AM を添加し細胞障害活性はフローサイトメトリーで測定する。

(6)(5)で細胞障害活性が観察されたヒト癌細胞株を NOD/Shi-scid-IL2Rγ^{null} マウス (NOG マウス) 皮下に移植し、腫瘍を形成した後に、(4)の方法で調整したNK細胞および抗 HLA-G 抗体・抗ヒト Galectin-1 抗体をこのマウスに投与し、腫瘍の発育を計測する。移植する癌細胞株にはルシフェラーゼ遺伝子を導入してあるため、腫瘍の大きさのみならず浸潤・転移などの癌進展についても検討することができる。

4. 研究成果

婦人科癌細胞株の検討から、子宮頸癌細胞株(Hela)と卵巣癌細胞株(SK-OV-3)において HLA-G の発現を RT-PCR 法で確認した。In vivo での検討を想定し、この細胞株に Luc 遺伝子を導入し安定発現株を作成した。これらの細胞株とヒト非ホジキンリンパ腫から樹立された NK 細胞株(NK-92)を共培養し、抗 HLA-G 抗体共存下での細胞障害活性を測定し検討中である。治療応用への可能性を探るためには、in vivo での再現性と in vivo での検討を行う必要があり検討を継続している。

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2件)

下記査読あり

Shimizu D, Sato N, Sato T, Makino K, Kito M, Shirasawa H, Kumagai J, Terada Y(2014) Impact of adjuvant chemotherapy for stage ovarian carcinoma with intraoperative tumor capsule rupture. J Obstet Gynaecol Res. 41:432-439
DOI : 10.1111/jog.12551
Sugawara T, Sato N, Shimizu D, Sato T, Makino K, Kito M, Tamura d, Kato A, Terada Y(2014) Efficient Screening strategy for Kynch Syndrome in Japanese Endometrial Cancer. Tohoku J. Exp. Med. 235:117-125

[学会発表](計4件)

木藤正彦、佐藤直樹、清水大、佐藤敏治、牧野健一、菅原多恵、寺田幸弘 (2014) 子宮魚鱗癬をともなった子宮体部症状癌の1例. 第66回日本産科婦人科学会 4月18日~20(東京)
牧野健一、清水大、木藤正彦、菅原多恵、佐藤敏治、佐藤直樹、寺田幸弘 (2014) 外陰部リンパ管拡張症に合併した血管線維腫の1例. 第66回日本産科婦人科学会 4月18日~20(東京)
菅原多恵、木藤正彦、牧野健一、佐藤利治、清水大、佐藤直樹、寺田幸弘 (2014) 若年で発症し、卵巣腫瘍との鑑別が困難

であった結腸間膜原発血管周皮腫 (hemangiopericytoma) の1例. 第66回日本産科婦人科学会 4月18日~20(東京)

木藤正彦、牧野健一、上野真侑、菅原多恵、佐藤敏治、清水大、佐藤直樹、寺田幸弘 (2014) 会陰部に発育した消化管間質腫瘍(GIST)の1例. 第62回北日本産科婦人科学会 9月27日~28日(金沢)

[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]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水大(SHIMIZU, Dai)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号: 60400503