

令和 4 年 4 月 22 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18684

研究課題名(和文)近交系化卵巢明細胞がんモデルマウスの確立と宿主免疫応答の解析

研究課題名(英文) Establishment of inbred murine model of ovarian clear cell carcinoma and analysis of host immune response

研究代表者

村上 幸祐 (Murakami, Kosuke)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：60734671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Arid1aflox/flox;(Gt)Rosa26Pik3ca\*H1047Rの遺伝子共変異をC57BL/6マウスに組み込み、近交系卵巢明細胞癌マウスモデルを樹立した。このマウスに対し、抗IL-6抗体および抗PD-L1抗体の単独の投与では有意な生存の延長を認めただが、一方で、併用療法では相加効果を認めないことを確認した。また、抗IL-6抗体を投与したマウスでは、腫瘍局所にTregが誘導されていることがわかった。さらにIL-17A投与により、局所の腫瘍免疫が活性化することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの臨床試験データからは卵巢明細胞癌には免疫療法が奏功する可能性が示唆されているが、免疫応答をin vivoで研究する動物モデルが存在しないため、その詳細については不明であった。本研究で樹立したマウスモデルは、OCCCにおける腫瘍免疫の解明に大いに役に立つと考えられる。また、抗体薬やサイトカイン投与によって得られた腫瘍免疫応答のデータは、卵巢明細胞癌に対する新たな治療法開発のベースになる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the Arid1aflox/flox;(Gt)Rosa26Pik3ca\*H1047R gene co-mutation was incorporated into C57BL/6 mice to establish an inbred ovarian clear cell carcinoma mouse model. We observed that administration of anti-IL-6 and anti-PD-L1 antibodies alone significantly prolonged survival in these mice, whereas combination therapy had no additive effect. In addition, mice treated with anti-IL-6 antibody showed induction of Tregs at the tumor site. Furthermore, IL-17A administration was found to activate local tumor immunity.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巢癌 卵巢明細胞癌 IL-6 IL-17 PD-L1 マウスモデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

卵巣明細胞がん (Ovarian clear cell carcinoma; OCCC) は、卵巣がんの他の病理組織型と比較して化学療法抵抗性であることがわかっているのにも関わらず、画一的な治療が行われているのが現状である。昨今、免疫療法が注目を浴びており、婦人科領域においても世界中で免疫チェックポイント阻害薬を中心とした臨床試験が行われている。そして、卵巣がんの中でも、特に OCCC に対する免疫療法の有効性が示唆されるデータが出ている。

種々のがんにおいて、免疫療法の奏功のメカニズムの解明が徐々に進んでおり、どのような症例に対して有効か探索する研究が盛んに行われている一方で、OCCC に関しては未知である。その大きな理由として、免疫応答を *in vivo* で研究するシンジェニックな動物モデルが存在しないということが挙げられる。本当に OCCC に対して免疫療法が有効であるかどうか、また、どのように治療効果が期待できる症例を適切に選択するかは、単に臨床試験の結果だけでなく、*in vivo* での免疫応答の解明が必須である。

### 2. 研究の目的

#### (1) 近交系 OCCC マウスモデルの樹立

過去に、遺伝子改変マウスを用いて、ARID1A 遺伝子を失活させ、PIK3CA 遺伝子を過剰発現させることでマウスの OCCC モデルを作成できたという報告があり、われわれはこのマウスに注目した。しかし、このマウスは非近交系である CD-1 マウスであったため、免疫学的遺伝子背景が揃っておらず、*in vivo* での免疫応答を調べる研究には使用し難いものであった。そこで、近交系 OCCC モデルマウスを自ら作成することとした。

#### (2) 近交系 OCCC マウスモデルを用いた *in vivo* での腫瘍に対する宿主免疫応答と免疫療法に対する抗腫瘍効果

OCCC には免疫が重要な役割を果たしている可能性が高く、免疫療法の有効性が期待される。*In vivo* での免疫応答の詳細が明らかになれば、適切な症例選択や既存の治療との併用などを機序に基づいて行うことができるようになる可能性がある。

### 3. 研究の方法

#### (1) 近交系 OCCC マウスモデルの樹立

以前に譲渡された  $Arid1a^{fllox/fllox}; (Gt)Rosa26Pik3ca^*H1047R$  を有する遺伝子改変 CD-1 マウスをベースに、戻し交配 (Backcross) の手法を用いて、遺伝子共変異を近交系マウスである C57BL/6 マウスに組み込むこととした。具体的には、まず雌 C57BL/6 wild type (wt) マウスから採卵し、譲渡を受けた精子と受精させて受精卵を作り、雌 C57BL/6 wt 偽妊娠マウスに胚移植を行う。生まれてきた第 1 世代のうち、 $Arid1a^{fllox/+}; (Gt)Rosa26Pik3ca^*H1047R$  を有する雄マウスを PCR 法で抽出し、親世代で使用した雌 C57BL/6 wt と再び交配させ、第 2 世代の  $Arid1a^{fllox/+}; (Gt)Rosa26Pik3ca^*H1047R$  を有するマウスを抽出した。これを繰り返し、8 世代 backcross を行った。 $Arid1a^{fllox/fllox}; (Gt)Rosa26Pik3ca^*H1047R$  を有するものを、PCR 法を用いて抽出し、ovarian bursa に Cre アデノウイルスを投与し、発がんするかどうかを確認した。また、HE 染色による病理組織形態および免疫組織化学染色法を用いて、OCCC と同様の特徴を有するがんかどうかを確認した。発生したがんは細胞株として保存を試みた。

#### (2) 近交系 OCCC マウスモデルを用いた *in vivo* での腫瘍に対する宿主免疫応答と免疫療法に対する抗腫瘍効果

マウスを発がんさせ、腫瘍の IL-6 産生を RT-qPCR で解析した。また、発がんを確認したマウスに抗 IL-6 抗体、抗 PD-L1 抗体、およびその併用投与を行い、生存期間を検討した。さらに、腫瘍 (卵巣、播種) の免疫細胞をフローサイトメトリーで解析した。また、IL-17A を投与し、腫瘍免疫の変化を RT-qPCR で解析した。

### 4. 研究成果

#### (1-1) 発癌について

Cre アデノウイルスを ovarian bursa に局注すると、約 6-10 週で体重の増加および腹水の貯留を認め (図 1A)、ウイルスを投与した卵巣に腫瘍形成を認め (図 1B)、腹腔内に多数の播種を呈し、癌性腹膜炎の状態となった。HE 染色では、淡明な胞体を有する細胞が増殖し (図 1C)、hobnail 状と表現される像も認めた (図 1D)。ヒト OCCC の病理組織像に非常に類似していた。

#### (1-2) 細胞株化

発癌したマウスから腹水を採取し、細胞株を作成し、安定して継代できることを確認した。細胞をC57BL/6 マウスの皮下へ移入すると、生着して約4週で腫瘍を形成することを確認した。

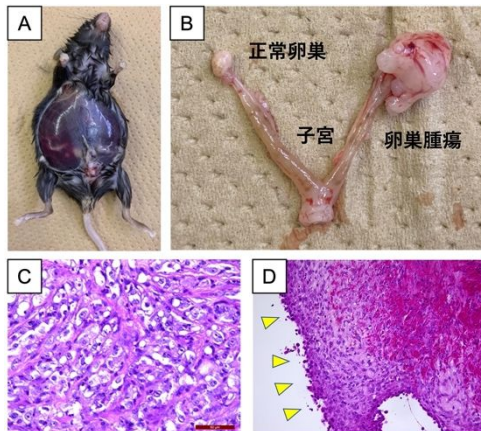


図1 マウスの発癌

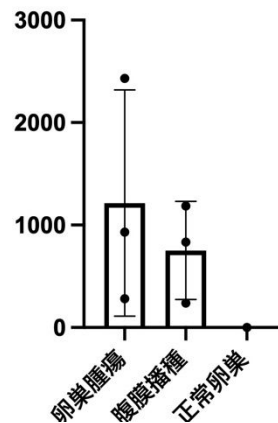


図2 腫瘍のIL-6産生

(2-1) 腫瘍のIL-6産生

卵巢腫瘍および播種では、正常卵巢と比較して、IL-6が高値であった(図2)。

(2-2) 抗体薬投与による生存期間の延長

抗IL-6抗体投与群(n=10)、抗PD-L1抗体投与群(n=6)、2剤併用群(n=5)、コントロール群(n=14)の発癌確認後の生存期間中央値は、それぞれ25日、19日、20日、10日であり、抗体薬投与群で有意に生存期間が延長したが(p=0.0014)、併用による相加効果は認めなかった(図3)。

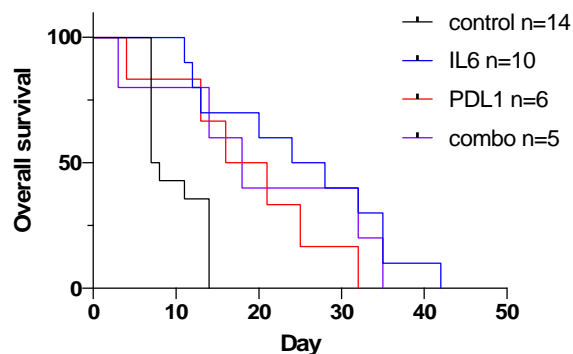


図3 抗体薬投与と生存曲線

(2-3) フローサイトメトリーによる解析

抗IL-6抗体を投与したマウスの腫瘍では、コントロールや抗PD-L1抗体を投与したマウスの腫瘍と比較して、腫瘍内にTregが誘導されていた(図4)。

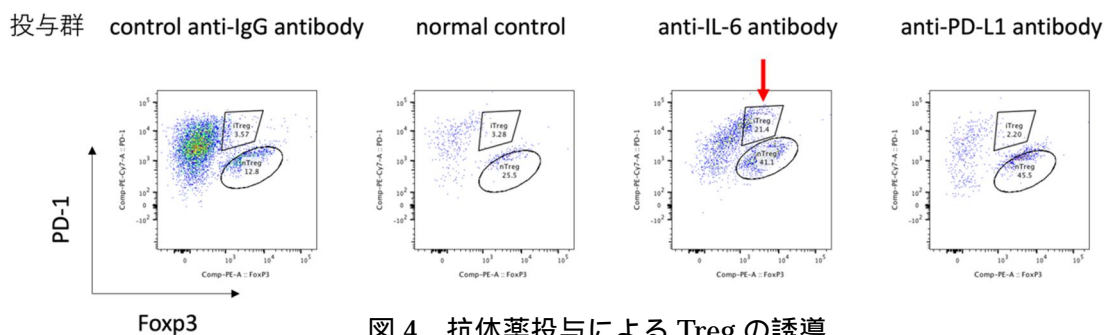


図4 抗体薬投与によるTregの誘導

(2-4) IL-17A投与による局所腫瘍免疫の変化

IL-17Aを静脈投与して1週間後に解析すると、コントロールと比較して、卵巢腫瘍および播種のPD-L1およびCXCL9の発現が上昇していた(図5)。

(3) 今後の展望

抗IL-6抗体投与により腫瘍に誘導されるTregに着目し、Tregを抑制する作用のある抗CTLA4抗体の併用療法の効果を探索する。また、IL-17A投与により局所の腫瘍免疫が活性化することに着目し、IL-17を産生するTh17のマスター転写因子であるROR T overexpressionマウスを用いて骨髄キメラを作成し、抗PD-1/PD-L1抗体がより強く奏効するかどうか検討する。

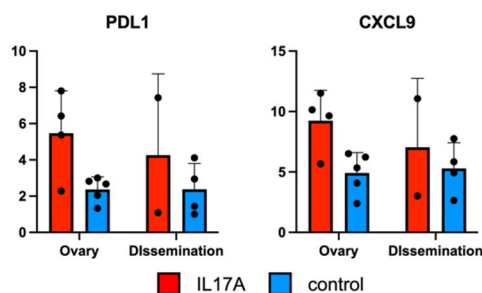


図5 IL-17A投与による腫瘍局所の免疫の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上幸祐、宮川知保、加藤茂樹、高村史記、宮澤正顯、松村謙臣
2. 発表標題 近交系卵巣明細胞癌マウスモデルの樹立と腫瘍免疫の解析
3. 学会等名 第63回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kosuke Murakami, Chiho Miyagawa, Noriomi Matsumura
2. 発表標題 Establishment of an inbred mouse model of ovarian clear cell carcinoma and analysis of tumor immunity
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------