

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861507

研究課題名(和文) 婦人科癌におけるスタチン投与が腫瘍局所免疫に与える影響

研究課題名(英文) Immunological effects of statin administration in gynecological cancer

研究代表者

西尾 咲子(Nishio, Sakiko)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：00570011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞癌細胞株では、スタチン系の薬剤(SimvastatinとPitavastatin)によって癌シグナルであるNF- $\kappa$ BおよびSTATが抑制され、免疫抑制サイトカインのIL-6の産生が阻害された。細胞増殖に影響を与えなかった。卵巣癌移植マウスを用いた研究でも、スタチンを投与したマウスでは腫瘍中のCD8陽性細胞浸潤が促進され、免疫抑制が解除されていると考えられた。腫瘍内の免疫細胞をFACS法で検討したところ、スタチンの投与によって樹状細胞とマクロファージの浸潤数に変化はなかった。これらのことから、スタチンは、がんにおいて免疫抑制環境を改善し、抗腫瘍T細胞応答を増強することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To release immunosuppressive microenvironment of ovarian cancer, we focused on statins. In ovarian clear cell carcinoma cell lines, cancer signal NF- $\kappa$ B and STAT were both suppressed by statin drugs (Simvastatin and Pitavastatin), and the production of immunosuppressive cytokine IL-6 was inhibited. Statins did not affect cell proliferation. In vivo experiment using ovarian cancer transplanted mice, the mice administered with statins is promoted CD8-positive cell infiltration into the tumor, this supported the hypothesis that statins released immunosuppression. FACS analysis of the immune cells infiltrating into transplanted tumor revealed there was no change in the infiltration number of dendritic cells nor macrophages by administration of statins. For these reasons, statins, to improve the immune suppressing environment in cancer, it was suggested to enhance anti-tumor T cell responses.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：腫瘍免疫 スタチン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、がん細胞の増殖にはこれを取りまく微小環境が極めて重要であることが指摘されている。がんの間質には線維芽細胞をはじめ、免疫細胞、血管やリンパ管に加えて結合組織が存在して特徴的な微小環境を構築している。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。また、免疫抑制も、増殖・生存・浸潤などの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(Hanahan D, Weinberg RA, Hallmarks of Cancer: The next generation, Cell, 4: 144, 2011)。本研究申請者は、がん細胞による各種免疫細胞への作用を解析し、特にがん微小環境における免疫抑制病態の細胞分子機構を研究してきた。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(Nature Med 1998, J Exp Med 2006, Cancer Cell 2009 など)。

卵巣癌は、これまで手術療法と多くの化学療法との組み合わせにより治療が行われてきたものの、5年生存率は未だ約20%と極めて予後不良である。中でも卵巣明細胞腺癌は、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とされることから、本邦において多くの基礎研究や translational study が行われてきたが、未だ奏効率の高い治療法は確立されておらず、新たな治療戦略の開発が望まれている。

スタチン系薬剤はLDLコレステロールを低下させるために開発された薬剤であり、動脈硬化の進展抑制に大きく貢献していることが知られている。スタチン系薬剤の大規模臨床試験のサブ解析から、LDLコレステロール値が同程度の場合でも、スタチン投与群では非投与群に比べて心筋梗塞などの心血管系イベントの発症が少ないことがわかり、LDLコレステロール低下作用以外の機序でイベント発症予防に寄与していることが示された。それらの機序はスタチン系薬剤の多面的効果(pleiotropic effect)と呼ばれ、血管内皮機能改善やアポトーシス調節作用、凝固・線溶系に対する作用と共に、抗酸化作用や抗炎症作用などが近年活発に報告されている。

これら多面的効果を説明する一つの機序としてイソプレノイド産生抑制を介した作用が考えられている。これらはコレステロール合成過程における中間代謝産物であり、スタチン系薬剤によりコレステロール合成と共に産生が抑制される。イソプレノイドの生理作用の一つに活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)の増加があり、NF- $\kappa$ Bを介して遺伝子発現の変調をきたし異常な細胞増殖や浸潤などをもたらす。すなわち、スタチン系薬剤はNF- $\kappa$ Bの阻害剤としても作用が期待できる薬剤であり、循環器領域などでは報告が散見されている。また、多面的効果の一つとして、細胞増殖抑制やアポトーシス調節作用が知られていることから、抗腫瘍効果を示すことが考えられてきた。これまでに種々の癌種にて基礎的・臨床的報告がなされているものの、スタチン系薬剤単独では、その効果は限定的なものである。

本研究申請者は、これまでに、一部の卵巣癌において、NF- $\kappa$ Bが恒常的に活性化しIL-6を高産生すること、その結果、本来は抗腫瘍T細胞を誘導するはずの樹状細胞の機能が障害されることや免疫抑制作用をもつ骨髄由来抑制細胞(MDSC)が誘導されること、さらにNF- $\kappa$ B阻害剤の投与により免疫抑制環境が改善されることを明らかにしている。そこで、すでに臨床にて国内外で広く投与されており、臨床応用が可能であるスタチン系薬剤を用いて、卵巣癌における免疫抑制が解除できる可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、卵巣明細胞腺癌に対するスタチン系薬剤の有効性を確認し、より実際的な臨床応用を目指すことを目的とする。種々のスタチン系薬剤は、コレステロール低下作用については比較を行った報告が多数あるものの、多面的効果や抗腫瘍効果に関して比較を行った報告は少ない。そこで、卵巣明細胞腺癌細胞株に対して、それぞれのスタチン系薬剤を投与し、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。

### 3. 研究の方法

#### 1) IL6 測定、NF-kB、STAT3 活性測定

ヒト卵巣癌細胞株をスタチン存在下 24 時間培養し上清を回収した。上清中の IL6 を ELISA で測定した。また、細胞の核内タンパク質を抽出し、NF-kB、STAT3 の活性を、Filter Plate Assay (Thermo scientific 社)で測定した。

#### 2) Nude マウスモデル

Nude マウスにヒト卵巣癌細胞株を皮下移植し、スタチンを連日経口投与した。約一ヶ月後に、脾臓から樹状細胞を分離し、Balb/c マウス由来の T 細胞と抗 CD3 抗体存在下で、24 時間培養した。24 時間後培養上清を回収し、ELISA 方で IFN- $\gamma$  の濃度を測定した。また、実験中数日おきに血清を採取し、IL6 を ELISA で測定した。

#### 3) 抗原特異的 T 細胞誘導

近交系マウスに、同系マウス腫瘍株を皮下移植し、スタチンを連日経口投与した。約 20 日後に、所属リンパ節から、細胞を取り出し、腫瘍抗原の MHC class I エピトープペプチドで 5 日間刺激した。その後、T 細胞を分離し、エピトープペプチドをパルスした脾細胞と 24 時間共培養し、IFN- $\gamma$  の産生を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) スタチンはヒト卵巣癌細胞株の産生する IL6 産生を阻害する

ヒト卵巣癌細胞株にスタチンを添加して培養すると、NF-kB の活性化および STAT3 の活性化がともに阻害されるとともに IL-6 の産生量が著明に低下した。一方で、増殖能には有意な低下を認めなかった。さらに、in vivo の検討をヒト卵巣癌細胞株移植ヌードマウスを用いて行った。この担癌マウスにスタチンを連日投与すると、マウス血清中のヒト IL-6 濃度が有意に低下した。以上より、スタチンは経口投与可能な投与量で、卵巣明細胞癌のサイトカイン産生量を有意に低下させる結果を得た。

#### (2) スタチンはヒト卵巣癌移植マウスの樹状細胞の機能を回復させる

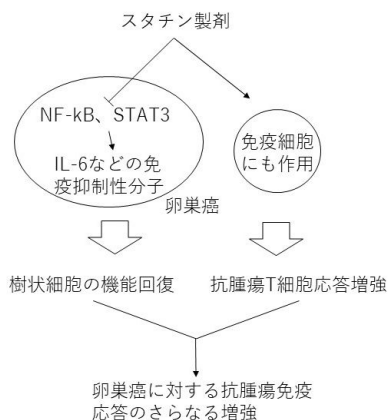
ヒト卵巣明細胞腺癌細胞株を、Nude マウスに皮下移植し、約三週間後に、脾臓、リンパ節、腫瘍中の樹状細胞の T 細胞活性を評価すると、担癌マウスでは、非担癌マウスに比べて、T 細胞活性が低下していたが、スタチンを投与することで、部分的に改善した。

#### (3) スタチンは、腫瘍抗原特異的 T 細胞応答を増強させる

次に、腫瘍抗原特異的 T 細胞応答に対する影響も評価した。免疫系が完全である近交系マウスに、マウス癌細胞株を移植し、スタチンを約三週間投与すると、所属リンパ節での腫瘍抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞誘導が上昇することが分かった。この現象は別の担癌近交系マウスでも見られた。また、これらの T 細胞誘導は、スタチン製剤を高容量で投与すると、むしろ抑制されてしまうことがわかり、用量が重要であることが分かった。次にこの T 細胞誘導のメカニズムを検証するために、腫瘍組織内の免疫細胞を FACS を用いて解析した。その結果、樹状細胞、マクロファージの腫瘍浸潤数には変化がなく、Statin の標的となる細胞は、他にあると考えられた。以上より、statin 系薬剤は、様々ながん種において免疫抑制的環境を改善し、抗腫瘍 T 細胞応答を増強できる可能性が示唆された。

以上より、スタチンは、卵巣癌に直接作用し、IL6 などの免疫抑制分子の産生を抑制する作用、何らかの免疫細胞にはたらき最終的に抗腫瘍 T 細胞の誘導を増強させる作用の二つがあることが示唆された(図)。

(図) 本研究で考えられたスタチン製剤が卵巣癌において抗腫瘍免疫応答を増強させるメカニズム。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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〕

なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

西尾 咲子 (Nishio Sakiko)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：00570011

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし