

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462535

研究課題名(和文)ケモカインと免疫抑制シグナル及び血管内皮前駆細胞との相互的な卵巣癌促進機構の解明

研究課題名(英文) Role of chemokine systems and its relation to immunotolerance and angiogenesis in ovarian cancer progression

研究代表者

井籠 一彦 (INO, Kazuhiko)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60303640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では卵巣癌微小環境におけるケモカインシステムに着目し卵巣癌進展における役割を検討した。宿主におけるCX3CL1-CX3CR1およびCCR5の機能解析のためCX3CR1KO(ノックアウトマウス)およびCCR5KO(ノックアウトマウス)を用い、マウス卵巣癌細胞株ID8の腹腔内移植モデルにて解析した。CX3CR1KOでは腹膜播種・腹水量が有意に減少し、生存期間は延長、腫瘍内マクロファージの浸潤は減少した。CCR5KOマウスでは血管新生の減弱を認めた。宿主のCX3CR1あるいはCCR5欠損により腫瘍進展は抑制され、癌微小環境内でケモカインシステムが卵巣癌進展に有利な環境を作りだすことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Interaction between tumor and stromal cells through chemokine systems was essential for cancer progression. The purpose of this study is to explore the pathophysiological roles of CX3CL1-CX3CR1 and CCR5 systems in ovarian cancer progression. A murine ovarian cancer cell line ID8 was used. When ID8 cells were inoculated to WT and Cx3cr1^{-/-} mice, Cx3cr1^{-/-} mice survived significantly longer than WT ones, and the tumor number in the abdominal cavity was significantly reduced in Cx3cr1^{-/-} mice. Similarly, when ID8 cells were inoculated to WT and Ccr5^{-/-} mice, tumor dissemination in abdominal cavity and tumor angiogenesis were significantly suppressed in Ccr5^{-/-} mice compared with WT mice. These findings suggest that these chemokine networks are essential for ovarian cancer progression, and that CX3CR1 and CCR5 systems might be candidate molecules for a novel targeted therapy of ovarian cancer.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：婦人科腫瘍 卵巣癌 ケモカイン 血管新生 免疫寛容 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は半数以上が初回手術時に腹膜播種を伴う advanced stage である。これらの進行症例に対する治療の主役は腫瘍減量手術に引き続く化学療法であるが、多くの臨床試験にもかかわらず、近年長期予後の改善は見られていない。従ってさらなる予後改善に向けて、新規の治療戦略が求められている。

卵巣癌は腹膜播種という特異的進展様式をとるが、そのメカニズムは未だ不明な点が多く、腹膜播種において Key となる分子の同定とそれをターゲットとする新たな分子標的治療が期待されている。近年、癌微小環境における tumor-associated macrophage (TAM) や腫瘍関連線維芽細胞 (CAF) の重要性とともに、それらの動員におけるケモカインシステムの腫瘍進展における役割が注目されている。

2. 研究の目的

本研究においては、CXC ケモカインであるフラクタルカイン (CX3CL1) とその受容体 (CX3CR1)、および CC ケモカイン受容体の 1 つである CCR5 に着目し、これらのケモカイン・ケモカイン受容体の卵巣癌腹膜播種の進展における役割を同定し、TAM や CAF の動員への寄与を解明することを目的として、各々のケモカイン受容体ノックアウトマウスを用いた動物モデルを用いて研究をおこなう。

3. 研究の方法

(1) ヒト卵巣癌におけるケモカインおよびケモカイン受容体の発現の検討

学内倫理委員会承認の下、インフォームドコンセントの下に得られヒト卵巣腫瘍の手術検体を用いて、卵巣腫瘍組織における CX3CL1, CX3CR1 の発現を免疫組織染色および RT-PCR にて検討した。

(2) ノックアウトマウスによる in vivo 実験

CX3CL1-CX3CR1 システムの機能解析のため CX3CR1 ノックアウト (KO) マウスおよびコン

トロールとして野生型 C57Bl/6 マウス (WT) を用いた。マウス卵巣癌細胞株 ID8 を使用し、500 万個/マウスで腹腔内投与する卵巣癌腹膜播種モデルを確立し、至適ポイントで Sacrifice し、腹水量、腹膜播種の合計腫瘍重量を計測した。また両群におけるマウスの生存期間を解析した。同様にもう 1 つのケモカイン受容体である CCR5 の機能解析には、CCR5 ノックアウトマウス (KO) を用いて、同様の腹膜播種モデルを確立し、野生型マウス (WT) との間で比較検討をおこなった。

(3) 腫瘍内浸潤する免疫細胞および線維芽細胞の検討

上記(2)の in vivo 実験の条件下において、腹腔内の播種腫瘍を摘出し、ホルマリン固定後切片を作成し、病理組織学的検討を行い、腫瘍内に浸潤する宿主免疫細胞および線維芽細胞の免疫組織化学染色を行い、カウントし定量化し、KO マウス群と WT マウス群との間で比較検討した。

(4) 腫瘍内の免疫関連サイトカイン産生に与える影響の検討

同様に上記(2)の条件下において、腫瘍内のサイトカイン (TGF-beta, VEGF, IL-10, IL-6 など) および腫瘍の増殖・浸潤因子 (MMP など) の発現を Real-time PCR で測定し、KO マウス群と WT マウス群との間で比較検討した。差異のある分子については、免疫組織染色による解析もおこなった。

4. 研究成果

(1) ヒト卵巣癌組織における CX3CL1/CX3CR1 の発現

ヒト卵巣癌組織における局在をけんとうしたところ、リガンドの CX3CL1 は腫瘍細胞に、レセプターである CX3CR1 は腫瘍内の間質に陽性に染色された。また卵巣腫瘍について、RT-PCR をもちいて mRNA の発現を検討すると、リガンド、レセプターとも良性漿液性

腫瘍と比較して、漿液性卵巣癌で有意に発現が増強していた。

(2) CX3CR1 ノックアウトマウス卵巣癌腹膜播種モデルにおける検討

ID8 細胞を WT および CX3CR1KO マウスに腹腔内移植し Day79 に開腹したところ, KO マウスでは腫瘍形成数, 腹水量が有意に減少していた (それぞれ $P=0.001$, $P=0.001$)。KO マウスの生存期間は WT マウスに比べて有意に延長した (中央値; 101 日 vs. 94 日, $P<0.001$)。腫瘍組織の免疫染色では CX3CR1KO マウスにおいて腫瘍内のマクロファージ (TAM) の減少を認めた。また CX3CR1KO マウスでは MMP-2、TGF- β 産生細胞の減少を認め, 免疫二重染色により、MMP-2 及び TGF- β 産生細胞はマクロファージ (TAM) と判明した。さらに CX3CR1KO マウスでは腫瘍間質組織内の α -SMA 陽性の線維芽細胞 (CAF) の有意な減少を認めた。

(3) CCR5 ノックアウトマウス卵巣癌腹膜播種モデルにおける検討

(2) と同様の実験モデルを用いて、ID8 細胞を CCR5 ノックアウトマウス (CCR5KO) および WT マウスに腹腔内に投与すると、CCR5KO マウスで有意に腹水量や腹膜播種数の減少を認めました。また、CCR5KO マウスで生存期間の有意な延長が見られた。

(4) まとめ

宿主の CX3CR1 欠損および CCR5 欠損により卵巣癌の腹膜播種および腫瘍進展が抑制された。さらに癌微小環境内で CX3CR1-CX3CR1 システムが腫瘍内への tumor-associated macrophage (TAM) および腫瘍関連線維芽細胞 (CAF) の動員を介して、卵巣癌進展に有利な環境を作りだしているメカニズムが解明された。以上の結果より、本ケモカインシステムに対する新たな卵巣癌標的治療開発の可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

「雑誌論文」(計 6 件) <すべて査読あり>

(1) Iwahashi N, Yamamoto M, Nanjo S, Toujima S, Minami S, Ino K. Downregulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in the villous stromal endothelial cells of placentas with preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2017 Feb;119:54-60. doi: 10.1016/j.jri.2017.01.003. Epub 2017 Jan 23. PubMed PMID: 28131097.

(2) Yahata T, Yagi S, Mabuchi Y, Tanizaki Y, Kobayashi A, Yamamoto M, Mizoguchi M, Nanjo S, Shiro M, Ota N, Minami S, Terada M, Ino K. Prognostic impact of primary tumor SUV(max) on preoperative (18)F-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography and computed tomography in endometrial cancer and uterine carcinosarcoma. *Mol Clin Oncol*. 2016 Oct;5(4):467-474. Epub 2016 Aug 4. PubMed PMID: 27703679; PubMed Central PMCID: PMC5038871.

(3) Yagi S, Yahata T, Mabuchi Y, Tanizaki Y, Kobayashi A, Shiro M, Ota N, Minami S, Terada M, Ino K. Primary tumor SUV(max) on preoperative FDG-PET/CT is a prognostic indicator in stage IA2-IIIB cervical cancer patients treated with radical hysterectomy. *Mol Clin Oncol*. 2016 Sep;5(3):216-222. Epub 2016 Jul 7. PubMed PMID: 27588184; PubMed Central PMCID: PMC4997975.

(4) Mabuchi Y, Yahata T, Kobayashi A, Tanizaki Y, Shiro M, Ota N, Yagi S, Minami S, Ino K. Clinicopathologic Factors of Cervical Adenocarcinoma Stages IB to IIB. *Int J Gynecol Cancer*. 2015 Nov;25(9):1677-82.

doi: 10.1097/IGC.0000000000000542.

PubMed PMID: 26495760.

(5) Kobayashi A, Tanizaki Y, Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Toujima S, Kuninaka Y, Minami S, Ino K, Kondo T. AG490, a Jak2 inhibitor, suppressed the progression of murine ovarian cancer. Eur J Pharmacol. 2015 Nov 5;766:63-75. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.09.039. Epub 2015 Sep 26. PubMed PMID: 26410360.

(6) Tanizaki Y, Kobayashi A, Toujima S, Shiro M, Mizoguchi M, Mabuchi Y, Yagi S, Minami S, Takikawa O, Ino K. Indoleamine 2,3-dioxygenase promotes peritoneal metastasis of ovarian cancer by inducing an immunosuppressive environment. Cancer Sci. 2014 Aug;105(8):966-73. doi: 10.1111/cas.12445. Epub 2014 Jun 27. PubMed PMID: 24826982; PubMed Central PMCID: PMC4317851.

[学会発表] (計2件)

(1) Tanizaki K, Kobayahi A, Yahata T, Ino K. CX3CL1-CX3CR1 system enhances ovarian cancer progression via recruitment of CX3CR1-positive tumor associated macrophages (TAMs). 第68回日本産科婦人科学会学術講演会, 2016年4月, 東京

(2) 谷崎優子, 小林彩, 東嶋左緒里, 向田直史, 近藤稔和, 井籠一彦. Fractalkine system が腫瘍随伴マクロファージの動員を介して卵巣癌腹膜播種を促進する. 第53回日本癌治療学会学術集会, 2015年10月, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井籠 一彦 (INO, Kazuhiko)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60303640

(2) 研究分担者

近藤 稔和 (KONDO, Toshikazu)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70251923

馬淵 泰士 (MABUCHI, Yasushi)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80382357