

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06172

研究課題名(和文)腫瘍微小環境の新規トランスクリプトーム解析

研究課題名(英文)Transcriptome analysis of tumor microenvironment

研究代表者

田口 歩 (Taguchi, Ayumi)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：60756782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス腹膜癌モデルにKRAS導入を行い腫瘍形成や腫瘍内微小環境の変化を検討した。KRAS導入モデルでは、腫瘍形成促進とともに炎症の増悪と好中球の増加がみられた。腹膜癌進展における好中球の関与を検討するために好中球マーカーである抗Ly6G抗体を用いて、好中球を含むLy6G陽性細胞の除去実験を行った。その結果、好中球除去群において、腫瘍形成・腹水産生の促進を認めた。また、T細胞の分画においては、CD8陽性T細胞の減少とCD4陽性T細胞の増加を認めた。KRAS導入がん性腹膜炎由来の好中球は、T細胞共刺激分子であるOX40-Lを発現し、CD8陽性T細胞の増殖を促進することが解明された。

研究成果の概要(英文)：Mutant KRAS was transduced into mouse peritoneal cancer model, and tumor formation as well as characteristics of tumor microenvironment was observed. In the KRAS-transduced model, tumor formation was accelerated along with the exaggerated inflammation and increased number of neutrophils. In order to assess the association of neutrophils with peritoneal cancer, neutrophils were depleted with anti-Ly6G antibody. Depletion of neutrophils promoted tumor formation and production of ascites. Depletion of neutrophils decreased CD8 T cells and increased CD4 T cells in ascites. Neutrophils in KRAS-transduced ascites enhanced naive CD8 T cell proliferation with higher level of T cell costimulatory molecule, OX40-L.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：腫瘍内微小環境 好中球 炎症 T細胞 癌遺伝子

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は腫瘍内微小環境の中の様々な構成細胞と相互作用を及ぼすことでその性質を獲得し、また維持をしている。腫瘍細胞から産生されるサイトカインや酵素によって腫瘍内微小環境の構成成分である線維芽細胞やマクロファージは活性化され、それぞれ、癌関連線維芽細胞や腫瘍関連マクロファージとなり、炎症性サイトカインやケモカインやプロテアーゼなどを産生するようになる。結果、腫瘍内はさらに癌進展にとって好都合な環境に変化していく。

腫瘍細胞は種々の癌原遺伝子変異に伴いその性質を変化させる。癌原遺伝子は、腫瘍細胞の分裂を促進し、足場非依存的増殖を可能にする。一方で、これら癌原遺伝子が腫瘍内微小環境に与える影響についてはほとんど解明されていない。癌原遺伝子の変異により、癌細胞は増殖能を獲得するだけでなく、発現調整を経て腫瘍内微小環境を変化させると考えられる。また変化した腫瘍内微小環境は癌進展をより一層促進する可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、卵巣癌における癌原遺伝子と腫瘍内微小環境の特徴を解明するとともに、腫瘍内微小環境構成成分の変化を、特に発現調整に着目して解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウス卵巣癌細胞株 (ID8) に K-RAS や c-MYC を導入した種々の ID8 細胞を作成し、それぞれを同系マウスに腹腔内投与を行い、腫瘍形成や腹水産生を観察した。

で作成した種々の ID8 細胞を、腹腔内投与し、腹腔内の環境の変化 (特に免疫担当細胞への影響) を検討した。

ID8-KRAS マウスを用いて、好中球の腫瘍形成や腫瘍内微小環境に与える影響を、好中球除去抗体 (抗 Ly6G 抗体) を用いて検討した。

腫瘍関連好中球の腫瘍免疫への影響を、腫

瘍内微小環境の変化から解析をした。

また、好中球の CD8 T 細胞への働きを、in vitro CSFE 増殖アッセイを用いて検討した。さらに、T 細胞共刺激分子の発現に着目して解析した。

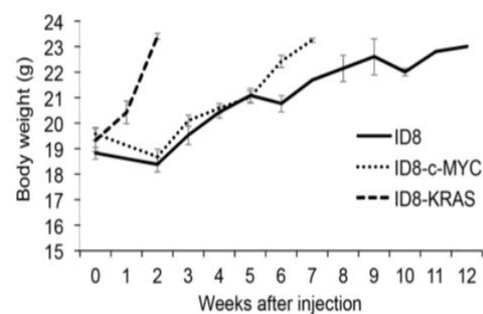
ID8 と ID8-KRAS の腫瘍内微小環境において獲得免疫に与える影響を検討した。腹水中サイトカインについて、サイトカインアレイを用いて解析した。T 細胞からの IL10 発現を RT-PCR で解析した。また、T 細胞の機能について、特に T 細胞疲弊マーカーである Tim3 と PD-1 発現に着目して検討した。

4. 研究成果

ID8 に K-RAS, c-MYC をそれぞれ導入し、ID8-KRAS, ID8-MYC を作成した。ID8, ID8-KRAS, ID8-MYC に in vitro での増殖アッセイや invasion assay に明らかな差はなかった。

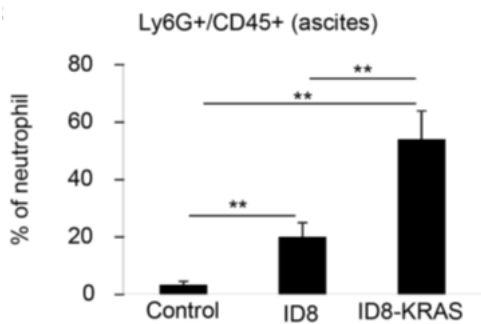
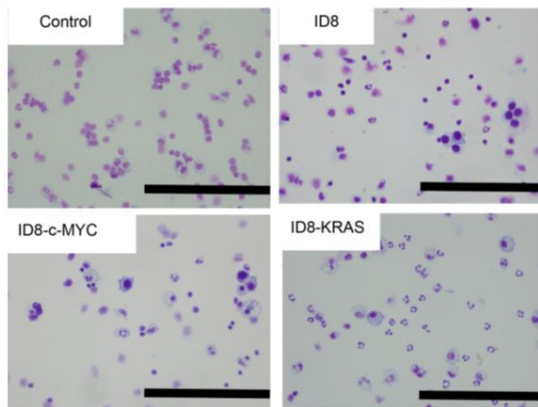
一方、in vivo の検討では、ID8-KRAS では、腫瘍形成や腹水産生は顕著に促進された。3 者で比較を行うと ID8-KRAS (2-3 週間) >> ID8-MYC (6-7 週間) > ID8 (8 週間以降) であった (図 1)。

図 1、各種細胞株における腫瘍形成



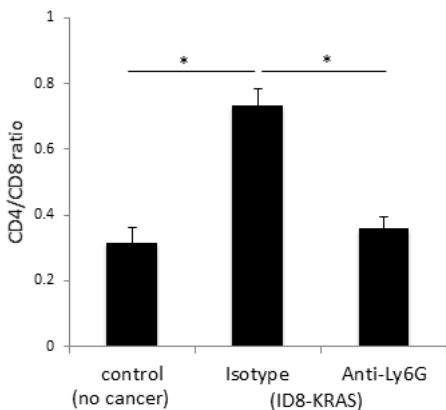
ID8-KRAS によるがん性腹水では IL-6 の濃度が他 (ID8, ID8-MYC) に比べて有意に高く、ID8-MYC の腹水においては、VEGF の濃度が有意に高かった。また、ID8-KRAS の腹水中へは、好中球の遊走が有意に促進されていることがわかった (図 2)。

図 2、腹水中の好中球の割合



D8-KRAS 腹水中での好中球の働きを解明するため、ID8-KRAS を用いて好中球除去実験を行った。その結果、好中球除去群では腫瘍産生の促進が見られた。また、腹水中の T 細胞の分画が変化し、CD8/CD4 比が減少することがわかった (図 3)。

図 3、ID8-KRAS 腹水中 T 細胞分画の変化



Isotype: コントロール群

Anti-Ly6G: 好中球除去群

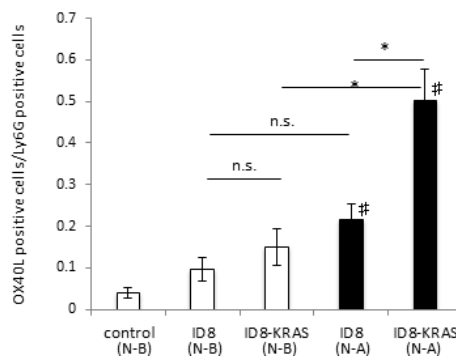
次に、好中球がどのように CD8 T 細胞の維持に関わっているかを検討するため、in vitro での好中球と naïve CD8 T 細胞との共培養による CFSE 増殖アッセイを行った。そ

の結果、ID8-KRAS 腹水中の好中球は naïve CD8 T 細胞の増殖を促進することがわかった。また、好中球の発現解析を好中球表面マーカーに着目して行った。その結果、ID8-KRAS 腹水中の好中球では、T 細胞共刺激分子である OX40L の発現上昇を伴うことがわかった (図 4)。

図 4、各種好中球の OX40L 発現

N-A: 腹水中好中球

N-B: 末梢血中好中球

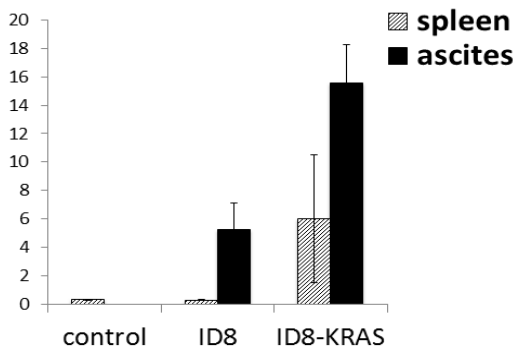


これらの結果より、ID8-KRAS 中の好中球は、T 細胞の活性化を調節し抗腫瘍効果を有することが示唆された。

次に、ID8 と ID8-KRAS の腫瘍内微小環境において獲得免疫に与える影響を検討するため、腹水サイトカインアレイを行ったところ、ID8-KRAS 腹水で IL10 と CXCL10 の著明な上昇を認めた。このため、IL10 の産生細胞に着目した。その結果、IL10 は T 細胞から産生されており、ID8-KRAS 腹水中の T 細胞で特にその発現が上昇していることがわかった (図 5)。

図 5、各種 CD8 T 細胞における IL10 発現

CD8+ T cell



また、T細胞の疲弊マーカーである PD-1 や Tim3 の発現解析を行った結果、ID8-KRAS 腹水中の CD8 T細胞では、PD-1 発現や Tim3 発現が増強されていることがわかった。

さらに、腫瘍細胞のトランスクリプトーム解析より、CXCL10 の産生細胞は癌細胞であること、また癌細胞は IFN γ 刺激により CXCL10 を発現させることを解明した。“炎症 CXCL10 発現 活性化T細胞の誘導 炎症性環境における T細胞疲弊” が起こっている可能性が示唆された。

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)

1. Yoshida M, Taguchi A (co-first), Kawana K, Adachi K, Kawata A, Ogishima J, Nakamura H, Fujimoto A, Sato M, Inoue T, Nishida H, Furuya H, Tomio K, Arimoto T, Koga K, Wada-Hiraike O, Oda K, Nagamatsu T, Kiyono T, Osuga Y, Fujii T. Modification of the Tumor Microenvironment in KRAS or c-MYC-Induced Ovarian Cancer-Associated Peritonitis. PLoS One. 2016 Aug 2;11(8):e0160330.

2. Taguchi A, Koga K, Kawana K, Makabe T, Sue F, Miyashita M, Yoshida M, Urata Y, Izumi G, Tkamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Resveratrol Enhances Apoptosis in Endometriotic Stromal Cells. Am J Reprod Immunol. 2016 Apr 75:486-92.

[学会発表](計 7件)

1. Yoshida Mitsuyo, Taguchi Ayumi et al. Title: The role of neutrophils in the course of ovarian cancer progression 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 6 日~8 日 横浜

2. Ogishima Juri, Taguchi Ayumi et al. Title: Modulation of local and systemic immune responses in the progression of ovarian cancer dissemination 第 75 回日本癌学会学術総会 横浜 2016 年 10 月 6 日~8 日

3. Yoshida Mitsuyo, Taguchi Ayumi et al. Title: Oncogenes (KRAS and c-MYC) modulate tumor immune system and enhance peritoneal carcinomatosis in the ovarian cancer

第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会
2016 年 4 月 21 日~24 日 東京

4. Ogishima Juri, Taguchi Ayumi et al. Title: Cancer cell and oncogene alter subset populations of T and dendritic cells in the tumor microenvironment of disseminated ovarian cancer model 第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会 2016 年 4 月 21 日~24 日 東京

5. 吉田光代 他
題名: 腫瘍免疫における癌原遺伝子(ras, myc)の免疫系への関与と卵巣癌腹腔内進展様式への影響に関する研究
第 30 回日本生殖免疫学会
2015 年 11 月 21 日~22 日 熊本

6. 高橋樹里 他
題名: 腹膜癌モデルマウス腹腔内微小環境における T細胞、樹状細胞サブセットの検討~癌原遺伝子の獲得免疫系への影響について
第 30 回日本生殖免疫学会
2015 年 11 月 21 日~22 日 熊本

7. Mitsuyo Yoshida, Ayumi Taguchi, et al. Title: K-ras and c-myc modulate tumor microenvironment of peritoneal carcinomatosis and enhance its tumorigenesis. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日~10 月 10 日 名古屋

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 田口 歩 (TAGUCHI, Ayumi)
東京大学・医学部附属病院・登録研究員
研究者番号: 60756782

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者