

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10714

研究課題名(和文) 卵巣癌局所免疫解析に基づくテーラーメイド免疫療法の開発

研究課題名(英文) The development of tailor-made immunotherapy based on ovarian cancer local immunity analysis

研究代表者

柴田 清住 (Shibata, Kiyoisumi)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：90335026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌腹膜播種における免疫抑制メカニズムにおいて卵巣癌細胞と腹膜中皮細胞との相互作用に着目した。腫瘍由来のTGF- $\beta$ は、正常な腹膜中皮細胞(HPMC)の形態を変化させると同時にサイトカインの産生を変化させた。CAMCはVEGF産生を介して血管新生の促進および悪性腹水の産生増加を引き起こした。EOCにおける癌細胞-HPMC間のクロストークの理解は、EOCの新規治療戦略の開発さらにはEOC患者の予後改善につながる。マウス卵巣癌細胞HM-1をマウス腹腔内移植を繰り返し行うことによって樹立した高播種能獲得細胞(HM-1-6)を樹立し、サイトカインアレイを施行した結果、IL-33の発現が亢進していた。

研究成果の概要(英文)：We aimed to determine the role of cancer-associated mesothelial cells (CAMCs) in the promotion of tumor neovascularization and vascular permeability via enhanced VEGF production and local immunologic effects. We examined whether a characteristic morphological change in human peritoneal mesothelial cells (HPMCs) was observed in the presence of malignant ascites and tumor-derived TGF- $\beta$ . We focused on the enhanced production of VEGF in CAMCs and its crucial role in endothelial tube formation. We found that EOC-derived TGF- $\beta$  induced typical EMT-like morphological alteration in HPMCs, which was associated with CAMCs. We further discovered that CAMCs play a crucial role in the enhanced VEGF production. Furthermore we showed that IL-33 secretion was elevated in high metastatic cell lines. The novel mechanism of CAMCs as a facilitator of EOC progression and immunological effect are displayed by microenvironmental cell-to-cell communication.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：腹膜播種 癌微小環境 サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、がん特異抗原が同定され、これらの分解産物であるペプチドとHLAクラス 分子を認識する CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte:CTL) が、がん細胞だけを攻撃するメカニズムを用いたがん抗原特異的免疫療法を目指すことが可能になり、世界中で臨床試験が行われている。我々も卵巣明細胞腺癌に対する GPC3 ペプチドワクチン療法臨床第 II 相試験を行っており現在までに 68 例に対して投与を行った。その中でも進行・再発症例 28 例の検討では 3 例で PR(Partial Response)を認めたと、25 例は PD(Progressive disease)であった(Hum Vaccin Immunother 2014)。そしてワクチン無効症例の組織学的検討の結果、腫瘍組織内への CTL の浸潤が認められない結果が得られている。さらにワクチン無効症例では血清中の IL-6、IL-8、IL-10 など免疫抑制系のサイトカインが上昇していることが解った。このようにがんペプチドワクチン療法の効果は十分とは言えないのが現状であり、その原因の一つとして担がん生体においてがん組織が周囲に免疫抑制的環境を形成するといった腫瘍免疫逃避機構が存在すると考えられており、我々のデータからもその傾向が認められた。このがん微小環境による免疫逃避機構をいかにして解除し、がん局所へ CTL を集積させるかがペプチドワクチン療法の治療成績向上に必須の課題である。また我々の臨床試験の結果から再発形式の中で腹水を伴った腹膜播種症例に対してペプチドワクチンの効果が減弱していることが示された。卵巣がん腹膜播種における微小環境の研究に関して、これまでに我々は腹膜播種の転移・浸潤先である、腹膜中皮細胞に着目し、卵巣がん細胞と腹膜中皮細胞との相互作用に関する研究を行い、1) 腹膜中皮細胞はフィブロネクチンを介して卵巣がん細胞の浸潤・転移能を亢進する。2) 卵巣がん腹膜播種過程において卵巣がん細胞、腹膜中皮細胞双方の EMT が関与する。3) 卵巣がん腹膜播種過程において腹膜中皮細胞はがん幹細胞ニッチになり得る。これらの研究から腹膜播種局所において卵巣癌細胞と腹膜中皮細胞をはじめとする癌微小環境構成細胞との相互作用によって免疫抑制メカニズムが形成されている可能性

があると考え研究計画を立案した。

## 2. 研究の目的

婦人科がんの中でも進行卵巣癌は手術、化学療法などの集学的治療を行っても再発する症例が多く、再発時には治療抵抗性を獲得していることが多い。そのような症例に対する新規治療戦略の一つとしてがん免疫療法がある。しかしながらこの免疫療法も現状は効果が十分とは言えず、その原因として癌局所における免疫逃避メカニズムが考えられる。卵巣癌腹膜播種においても微小環境における免疫逃避が抗がん剤治療、免疫療法などの治療法に対する抵抗性獲得につながっていると考えられる。今回の研究によって卵巣癌腹膜播種の微小環境における免疫抑制メカニズムを解明し、免疫抑制解除療法とこれまでに我々が行ってきたがん特異的免疫療法および抗がん剤治療を併用したテーラーメイド癌免疫療法の開発を指向する。具体的には以下の目的

抑制性免疫細胞の誘導 免疫抑制サイトカインの産生 免疫抑制性シグナル分子の誘導の3項目を中心に、in vitroおよび免疫能を有したマウスの卵巣癌腹膜播種モデルを用いてin vivoでの検討を行う。In vitroの検討においては、ヒト卵巣癌細胞と腹膜中皮細胞やCAF(cancer-associated fibroblast)血管内皮細胞との共培養モデルを用いて免疫抑制性サイトカインの産生誘導、免疫抑制性シグナル誘導につき検討する。In vivoにおいてはマウス卵巣癌細胞株HM-1の腹膜播種モデルをすでに先行して行っている研究にて作製済みであり(Oncol Rep 2014)本研究ではこのHM-1に対して各種免疫抑制性サイトカイン、ケモカインの強制発現細胞株を作製し、腹膜播種モデルにおける腫瘍形成能の変化、腫瘍局所における抑制性免疫細胞の発現につき検討を行い、腹膜播種局所での免疫逃避メカニズムのターゲットの同定を行う。II)については現在進行中のペプチドワクチン臨床試験を発展させる形での臨床試験実施を計画している。

)によって腹膜播種局所にて誘導される分子をターゲットとしたペプチドワクチンの作製を行い、マウスでの前臨床試験を行った後に、現行のGPC3ペプチドに追加するカクテルワクチンの臨床試験を行い、現行の臨床試験との免疫学的および臨床的効果を比較検討する。

## 3. 研究の方法

卵巣癌腹膜播種における免疫抑制メカニズムにおいて我々は卵巣癌細胞と腹膜中皮細胞との相互作用に着目している。我々は以前の研究において腹膜中皮細胞は癌細胞との共培養により上皮間葉転換EMT(epithelial mesenchymal transition)が誘導され、SDF-1などのケモカインやフィブロネクチンの発現亢進を介し、癌細胞の接着能、浸潤能の亢進やstemnessの維持に関与することを証明した。我々はEMT現象が誘導された中皮細胞をCAM(cancer-associated-mesothelial cell)と名付け、予備実験によりCAMはTGF- $\beta$ 、VEGF、IL-6、IL-8、IL-10など免疫抑制性サイトカインの発現誘導を確認している。まずin vitroにおいて卵巣癌細胞株SKOV3と腹膜中皮細胞を共培養し、中皮細胞培養液においてサイトカイン、ケモカイン発現プロファイル解析を行い、免疫抑制性サイトカインの発現亢進を確認し、さらにreal-time PCR、ELISA kitにても発現亢進を確認する。次に卵巣癌細胞における免疫抑制シグナルの発現についての検討を行う。SKOV3とCAMを共培養後にSKOV3におけるPD-L1、CTLA-4などのイムノチェックポイント経路をWestern blottingおよびFACSにて発現亢進を検討する。さらに発現亢進が確認された因子に対し、各種中和抗体、siRNAなどの抑制系の併用により、免疫抑制性細胞(制御性T細胞(Treg、CD4+CD25+FOXP3+)、抑制性ミエロイド細胞(MDSC)、寛容性DCなど)の誘導に対する癌細胞と腹膜中皮細胞のinteractionの検討として、Transwellの下層にまずヒト腹膜中皮細胞をコートした後に下層に3群の各がん細胞、上層にヒト末梢血単核球(PBMC)を播種し、共培養にて免疫に関する血球細胞の生細胞数および免疫抑制性細胞の頻度などFACSを用い確認する。実験を平行してin vivoの検討も行う。マウス卵巣癌細胞HM-1にマウスTGF- $\beta$ 、VEGF、IL-6、IL-8、IL-10、MCP-1遺伝子を導入し、各種過剰株を確立し、ベクター導入株と比較検討を行う。マウス腹腔内に投与し、腹水量、播種腫瘍重量、生存期間を検討する。さらに腫瘍局所におけるリンパ球、マクロファージの浸潤など免疫学的解析を行い、卵巣癌腹膜播種における微小環境免疫抑制メカニズムのターゲット因子の同定を行う。我々はターゲットの候補の一つとしてVEGFを考えている。我々のこれまでの研究におい

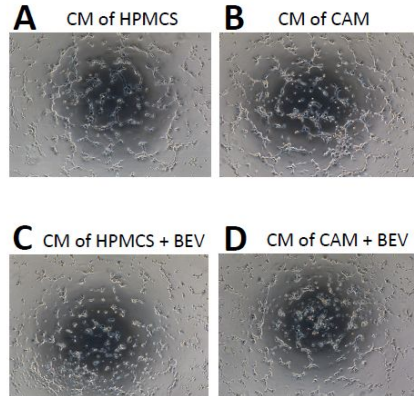
て卵巣癌細胞と腹膜中皮細胞は相互作用によりともにVEGFの発現が顕著に亢進する現象をとらえている。VEGFは腫瘍血管新生作用にとどまらず、樹状細胞の成熟抑制を介して免疫抑制にも関与することが知られている。VEGFをターゲットとした治療としては卵巣癌に対して適応が承認された抗VEGF抗体(bevacizumab)があり、ペプチドワクチン療法とbevacizumabの併用療法は比較的早期に臨床試験を開始できると考えているが、前臨床試験としてマウスの実験を計画している。我々は以前の研究でHM-1にGPC3を遺伝子導入し播種モデルで免疫学的検討を行っている。この腹膜播種モデルに対し、GPC3ペプチドワクチンとbevacizumab併用効果を検討する。

#### 4. 研究成果

まず、EOC患者の癌組織または悪性腹水の存在下で腹膜中皮細胞(HPMC)がどのように形態変化するか観察した。正常なHPMCは敷石状形態であったが、EOC組織と共培養したHPMCは線維芽細胞様の紡錘形に変化した。悪性腹水と共培養した場合においても、上皮様形態から間葉系形態に変化した。ウェスタンブロット解析では、腹水の割合に比例してHPMCでの $\alpha$ -SMA発現が亢進していた。次に、ES-2細胞のCMをHPMCに添加したところ、上皮系から間葉系への形態変化が認められた。この変化はTGF- $\beta$ 受容体阻害剤(SB-431542)添加によって完全に阻害されたため、HPMCの形態変化は腫瘍由来のTGF- $\beta$ に依存すると考えた。TGF- $\beta$ シグナル伝達は、EMTに関連する重要な経路の一つであるため、HPMCにおけるEMT誘導マーカーの発現を評価した。各種EMT関連転写因子は癌細胞のCMを添加したHPMCにおいて発現亢進しており、その作用はSB-431542によって阻害された。次に、HPMCの形態学的変化およびEMT関連転写因子発現に対するTGF- $\beta$ の作用を評価した。HPMCはTGF- $\beta$ 添加処理によって紡錘形へ形態変化した。またEMT関連転写因子の発現を調べると、Vimentin、N-cadherinおよび $\alpha$ -SMAの発現は亢進し、E-cadherinの発現は低下した。このようにTGF- $\beta$ によって形態変化し、EMT関連転写因子の発現亢進を示すHPMCをCAMCと定義した。VEGFはHPMCおよびEOC細胞の両方から産生されるが、本研究ではHPMCおよびCAMCにおけるVEGF発現に焦点を当

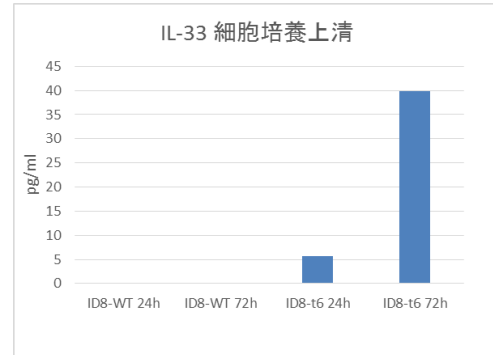
てた。VEGFの発現はTGF- 刺激によってアップレギュレートされ、さらにCAMC中のVEGF発現はSB-431542によって著明に低下した。またCM中VEGF濃度でも同様の結果が得られた。さらに、CAMCが血管新生に与える影響を調べるためHUVECの遊走能と管腔形成能を評価した。

HUVEC の遊走能は HPMC よりも CAMC の CM で処理した場合に亢進した。その促進効果はペバシズマブ



(VEGF阻害剤)の添加により阻害された。またSB-431542、ペバシズマブの添加にてさらに抑制された。一方HUVECの管腔形成能も、HPMCよりCAMCのCMで培養した際に亢進し、ペバシズマブを添加すると有意に低下した。In vivoにおいてはマウス卵巣癌細胞株HM-1の腹膜播種モデルをすでに先行して行っている研究にて作製済みであり、本研究ではこのHM-1に対して各種免疫抑制性サイトカイン、ケモカインの強制発現細胞株を作製し、腹膜播種モデルにおける腫瘍形成能の変化、腫瘍局所における抑制性免疫細胞の発現につき検討を行い、腹膜播種局所での免疫逃避メカニズムのターゲットの同定を行う。II)については現在進行中のペプチドワクチン臨床試験を進展させる形での臨床試験実施を計画している。)によって腹膜播種局所にて誘導される分子をターゲットとしたペプチドワクチンの作製を行い、マウスでの前臨床試験を行った後に、現行のGPC3ペプチドに追加するカクテルワクチンの臨床試験を行い、現行の臨床試験との免疫学のおよび臨床的效果を比較検討する。)についても)によって同定された免疫抑制性サイトカインやケモカイン、そして免疫チェックポイント分子をターゲットとした、抗体療法やsiRNAなどの分子標的治療と、ペプチドワクチン療法の併用試験をマウスによる前臨床試験を経たのちにヒトへの応用を目指した臨床試験を行う。マウス卵巣癌細胞HM-1をマウス腹腔内移植を繰り返し行うことによって樹立した高播種能獲得細胞(HM-1-6)を樹立し、

親株との間でサイトカインアレイを施行した結果、IL-33の発現が亢進していることが解った。さらに培養液中のIL-33をエライザキット



にて測定した結果、HM-1-6細胞で有意に分泌が亢進していた。この結果をふまえて、IL-33の発現ベクターを作製し、HM-1各細胞に遺伝子導入を行った。今後、ベクター導入株と比較検討を行う。マウス腹腔内に投与し、腹水量、播種腫瘍重量、生存期間を検討する。さらに腫瘍局所におけるリンパ球、マクロファージの浸潤など免疫学的解析を行い、卵巣癌腹膜播種における微小環境免疫抑制メカニズムのターゲット因子の同定を行う。

## 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) A novel mechanism of neovascularization in peritoneal dissemination via cancer-associated mesothelial cells affected by TGF- $\beta$  derived from ovarian cancer. Fujikake K, Kajiyama H, Yoshihara M, Nishino K, Yoshikawa N, Utsumi F, Suzuki S, Niimi K, Sakata J, Mitsui H, Shibata K, Senga T, Kikkawa F. *Oncol Rep*. 2018 Jan;39(1):193-200. doi: 10.3892/or.2017.6104. 査読有

2) Efficacy of glypican-3-derived peptide vaccine therapy on the survival of patients with refractory ovarian clear cell carcinoma. Suzuki S, Sakata J, Utsumi F, Sekiya R, Kajiyama H, Shibata K, Kikkawa F, Nakatsura T. *Oncoimmunology* 30;5(11):e1238542.2016 査読有

〔学会発表〕(計1件)

1) 鈴木史朗、坂田純、内海史、関谷龍一郎、梶山広明、柴田清住、吉川史隆 婦人科がん patient-derived xenograft モデルの構築 第69回日本産科婦人科学会学

術講演会 平成29年4月13日 広島  
県立総合体育館 広島県、広島市

〔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)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

柴田 清住 (Shibata Kiyosumi)  
藤田保健衛生大学・医学部・教授  
研究者番号：90335026

##### (2) 研究分担者

梶山 広明 (Kajiyama Hiroaki)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：00345886

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )