

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20138

研究課題名(和文) 卵巣がんのHeterogeneityと腹腔内免疫環境解析に基づいた腹膜播種の克服

研究課題名(英文) Analyses of tumor heterogeneity and peritoneal tumor microenvironment in ovarian cancer for development of novel tumor immunotherapy

研究代表者

鈴木 史朗 (SUZUKI, Shiro)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20612758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣がんの難治性病態であるがん性腹膜炎における腹腔内免疫環境とがん細胞の相互作用、さらには抗がん剤治療が腹腔内環境及びがんの多様性に及ぼす影響の2点の課題を解明することを目的として研究を行った。

マウス卵巣がん細胞株ID8を基に複数のsub-clone細胞株(高腹腔内播種転移能株ID8-T6、抗がん剤耐性株、VEGF及びIL-33強制発現株)を作製した。さらに、特徴の異なる2種類の細胞亜株を用いて多様性に介入しうる腹腔内播種モデルを作製した。

卵巣がんのがん性腹膜炎病態において、がん性腹水中のIL-33は腫瘍内のMDSC誘導を阻害することで腫瘍免疫を促進し播種進行を抑制していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We established a subclone of ID8 mouse ovarian cancer cell line (ID8-T6) which more quickly forms peritoneal dissemination. IL-33 was up-regulated in both ID8-T6 cells and tissue compared with for ID8. We confirmed the expression of IL-33 in human epithelial ovarian cancer (EOC) cell lines. Unexpectedly, the survival rate of IL33-overexpressing subclone (ID8-IL33) tumor-bearing mice was significantly prolonged compared with that of ID8-mock tumor-bearing mice. Infiltrating CD4+ cells and CD8+ cells within the disseminated tumor tissues were significantly increased in ID8-IL33 tumors compared with in ID8-mock tumors. In contrast, myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) were significantly decreased in IL33-overexpressing tumors. Ascites from ID8-IL33 tumor-bearing mice inhibited MDSC differentiation. EOC patients with high staining of IL-33 had significantly longer overall survival times.

We also established ID8 chemo-resistant subclones and heterogeneity assessment mouse models.

研究分野：産婦人科学

キーワード：卵巣がん 腹膜播種

1. 研究開始当初の背景

がん治療における重大な障壁として、がん細胞自身の変化だけでなく、がん微小環境や転移形成に関与する様々な因子による、がんの不均一性・多様性が挙げられる。がん進展機構における多様性は、内因性要因であるゲノム不安定性や、外因性要因である低酸素・低栄養・治療といった要素によって、動的に変化しているものと考えられる。

卵巣がんの現行治療上、手術は重要であるが、その解剖学的構造から腹腔内転移を生じやすく、残存・細胞レベルの病変に対しては化学療法に依存している。化学療法は有効な治療ではあるものの、多くの場合で薬剤耐性の腫瘍が再燃・再発してくるため、婦人科悪性腫瘍の中でも予後不良である。がんの多様性を前提とした卵巣がんの腹腔内播種及び化学療法耐性に関する研究は、新規治療法の開発につながる可能性がある。

我々はこれまでも卵巣がんの転移部位である腹膜に着目し、腹膜中皮細胞が卵巣がんの微小環境・ニッチの一候補であるとの仮説のもと研究を推進してきており、ヒト及びマウス卵巣がん細胞株を用いた腹腔内播種マウスモデルを複数樹立している。

2. 研究の目的

卵巣がんのがん性腹膜炎病態における腹腔内免疫環境とがん細胞の相互作用、さらには抗がん剤治療が腹腔内播種免疫環境及びがんの多様性に及ぼす影響の2点の課題を解明することを本研究の目的とした。がん性腹膜炎病態を研究対象としていることから、がん微小環境中の免疫細胞が産生または影響を受ける因子から、特にがん性腹水中に検出される液性因子に着目して解析を行う。

3. 研究の方法

(1)多様性を有するマウス卵巣がん腹腔内播種モデルの構築

マウス卵巣がん細胞株 ID8 を基に sub-clone 細胞株 library を作製する。sub-clone の種類として、親株の腹腔内接種後に形成された腹腔内播種を繰り返し *in vivo* 継代することで高腹腔内播種転移能を獲得した細胞株、抗がん剤耐性株、卵巣がんを高発現する因子 (VEGF 等) の強制発現株の樹立を行う。遺伝子導入には、蛍光蛋白質とともにレトロウイルスベクターを用いて行う。親株及び sub-clone 株毎の細胞機能 (*in vitro* での増殖能、遊走能) や腫瘍形成能、炎症・免疫関連因子の発現を解析する。腹腔内播種の微小環境における免疫細胞の差異についてフローサイトメトリー (FCM) 及び免疫染色にて検討する。

また、特徴の異なる2種類の細胞株を一定比率で同時もしくは異時的に C57BL6 マウス

へ混合接種することで多様性に介入しうる腹腔内播種モデルを作製する。

(2)腹腔内播種を伴う卵巣がん症例において予後に関与する新規液性因子の探索

ID8 の腹腔内播種モデルのうち、最も予後不良である sub-clone と親株を比較し、液性因子に着目した解析を行う。*in vivo* 実験にて播種形成に関連していた因子につき、ヒトの卵巣がん細胞株及び実際の卵巣がん手術検体でも mRNA 及び蛋白質レベルでの発現を確認し、臨床経過との相関を解析する。

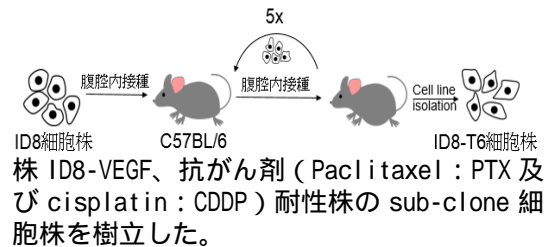
(3)腹腔内播種形成過程におけるがんの多様性及び腹腔内免疫環境変化

特徴の異なる細胞亜株の混合接種によるマウス卵巣がん腹腔内播種モデルにおいて、播種形成の時期別に検体 (腫瘍及び腹水) を回収し解析する。蛍光蛋白質陽性細胞 (sub-clone) を検出することで構成割合やパターンを解析する。

4. 研究成果

(1)多様性を有するマウス卵巣がん腹腔内播種モデルの構築

ID8 を親株として、播種巣から腫瘍細胞を分離しさらにマウスに腹腔内投与する播種継代を計6回繰り返すことで高腹腔内播種転移能を獲得した ID8-T6 (図1)、VEGF 強制発現 図1 *in vivo* selection)によって樹立した高腹膜播種転移能株(ID8-T6)



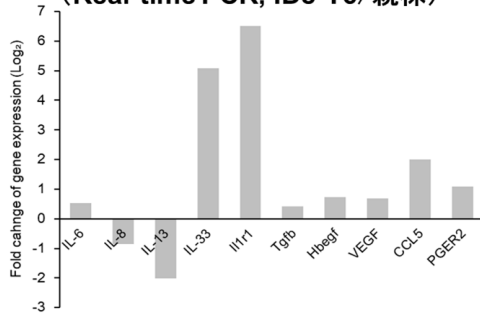
株 ID8-VEGF、抗がん剤 (Paclitaxel : PTX 及び cisplatin : CDDP) 耐性株の sub-clone 細胞株を樹立した。各細胞株の細胞機能実験 (MTS assay による増殖能と wound healing assay による遊走能) を行ったところ、親株と比較していずれの sub-clone 細胞株においても増殖能に有意差は認められなかったが、ID8-T6 に関しては遊走能の亢進が確認された。腹腔内播種モデルにおいて、ID8-T6 は親株に比して最も予後不良 (親株 < ID8-VEGF < ID8-T6) であり、生存期間が親株比で約 1/2 に短縮することが確認された。

ID8-T6 は VEGF の分泌亢進がみられなかったため、ID8-T6 と ID8-VEGF を様々な細胞比率で同時接種することで多様性の異なる腹腔内播種モデルを作製した。また、腹腔内播種に対する CDDP 治療モデルとして CDDP 耐性株 ID8-rCDDP と ID8-GFP 導入株 (CDDP 感受性) の混合接種による腹腔内播種モデルを作製した。

(2)腹腔内播種を伴う卵巣がん症例において予後に関与する新規液性因子の探索

ID8 親株と ID8-T6 の培養細胞及び *in vivo* で形成された播種腫瘍塊を検体としてそれぞれ回収し、DNA microarray を施行した。培養細胞及び腫瘍組織塊の両者において ID8-T6 で高発現していた遺伝子を抽出した。特に液性因子に着目し、IL-1 サイトカインファミリーの1つである IL-33 の mRNA (図2)

図2 mRNA発現解析
(Real-time PCR, ID8-T6/親株)



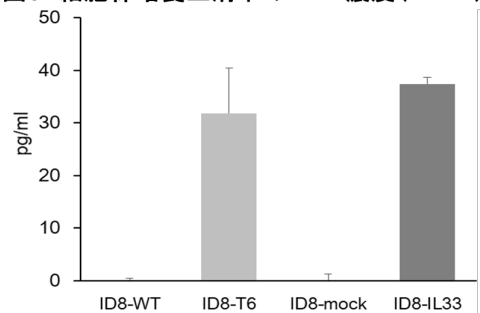
及び蛋白質レベルでの発現差の検証を行った。がんに対する IL-33 の作用としては促進的・抑制的のいずれの既報も散見され、卵巣がんでは未だ解明されていない点が多い。

さらに培養上清及び腹水中の分泌蛋白質量にも同様な差を認めることを IL-33 ELISA にて確認した。ヒト卵巣がん細胞株 4 種類 (SKOV3, CAOV3, OV90, A2780) でも IL-33 及びそのレセプターである ST2 の蛋白質発現を Western blotting にて解析したところ、A2780 を除く 3 株で IL-33 及び ST2 の発現が確認できた。そのため、IL-33 強制発現株 ID8-IL-33 及び発現抑制株 ID8-T6-shIL-33 の sub-clone 株を新規に樹立することとした。

ID8-IL-33 及び ID8-T6-shIL-33 のいずれにおいても *in vitro* ではコントロール株と比し増殖能に有意な差を認めなかった。

ID8-IL-33 は ID8-T6 と同程度の IL-33 分泌能 (図3) を有していたが、*in vivo* 実験

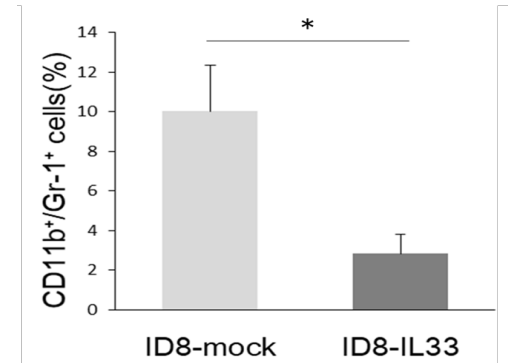
図3 細胞株培養上清中のIL-33濃度(ELISA)



(ID8-mock vs ID8-IL-33) では、当初の予想に反して腹腔内播種モデルにおいて ID8-IL-33 株で有意に生存が延長した。一方、皮下腫瘍モデルにおいては生存に差を認めなかった。その機序解明のためにがん性腹水のプロテオーム解析及び腹腔内播種局所の病理学的微小環境解析を行ったところ、腹腔内播種モデルの生存差に腫瘍免疫が関与している可能性が考えられた。播種組織の免疫細胞の局在を評価するために CD4、CD8、CD11b、F4/80 の各抗体を用いて免疫染色を施行した。

ID8-IL-33 群では腫瘍内に浸潤する CD4 陽性及び CD8 陽性細胞が有意に増加し、逆に CD11b 陽性細胞は有意に減少を認めた。さらに腫瘍内の骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) 分画 (CD11b 陽性かつ Gr-1 陽性細胞) を FCM にて解析すると ID8-IL-33 において有意に少数であった (図4)。がん性腹水中の内容差が MDSC

図4 マウス腫瘍組織内MDSC(FCM)

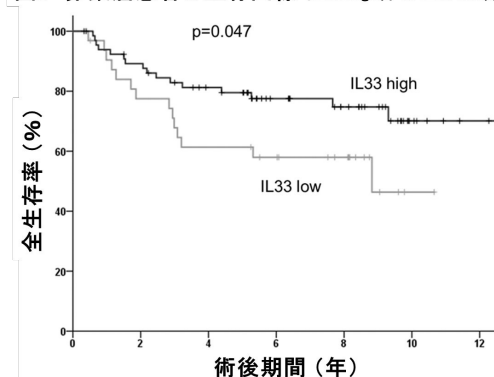


誘導に関与していると考察されたため、マウスの骨髄細胞に担癌マウスの各腹水を添加して培養した後に MDSC 分化誘導能を FCM にて解析した。ID8-IL-33 由来腹水群において MDSC の誘導が有意に減少していた。さらに腹水中の IL-33 の影響を評価するために、ほとんど IL-33 が含まれていないコントロール群由来腹水に rIL-33 を添加し同様に骨髄細胞を培養したところ、濃度依存的に MDSC 誘導の抑制が確認された。

IL-33 発現抑制株 ID8-T6-shIL-33 を用いた腹腔内播種モデルでも ID8-T6-sh コントロール株と比較し有意に生存の短縮が確認された。播種腫瘍内に浸潤している CD4 陽性及び CD8 陽性細胞を免疫染色にて評価したところ、ID8-T6-shIL-33 で CD4 陽性及び CD8 陽性細胞は少数である結果が得られた。

当院で卵巣がん手術を受けられた 100 症例 (漿液性 48 例、明細胞 29 例、類内膜 23 例) の病理検体で IL-33 の免疫染色を行ったところ、67 例で腫瘍細胞の十分な IL-33 発現が確認された。IL-33 発現の high 及び low2 群間において、年齢、進行期、組織型、異型度、治療前 CA125 値に有意差はみられなかったが、IL-33 high 群が IL-33 low 群と比較して有意に予後良好であった (図5)。IL-33 high 群

図5 卵巣癌患者の生存曲線 (IL33 high群 vs IL33 low群)



では腫瘍内へ浸潤している CD8 陽性細胞が

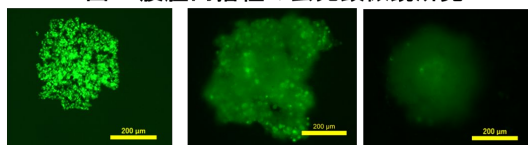
low 群に比べて有意に増加していたことから、臨床的にも IL-33 が腫瘍免疫を介して予後を改善している可能性が考えられた。また TCGA のデータベースの検索においても Optimal Surgery 後の PFS において有意に IL-33 発現が高い症例ほど PFS が延長する傾向が認められた。

以上より、IL-33 は卵巣がんのがん性腹膜炎病態において抑制的に作用していると考察された。

(3) 腹腔内播種形成過程におけるがんの多様性及び腹腔内免疫環境変化

ID8-CDDP 耐性株と ID8-GFP 導入株(CDDP 感受性)の混合接種による腹腔内播種モデルにおいて、CDDP 治療に対する多様性変化を検討した。CDDP 腹腔内注治療前の腹膜播種巣を蛍光顕微鏡で確認したところ、播種巣は ID8-CDDP 耐性細胞と ID8-CDDP 感受性細胞が混在し腫瘍形成していることが確認されたが、CDDP を 1 週毎 3 回腹腔内治療した後の播種巣は耐性株のみで形成されていた(図 6)。

図6 腹腔内播種の蛍光顕微鏡所見



今後、抗がん剤投与スケジュールや regimen 毎の腹膜播種微小環境やがん多様性変化を評価するモデルとしての応用が可能と考えられた。

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 10 件)

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. A novel mechanism of neovascularization in peritoneal dissemination via cancer-associated mesothelial cells affected by TGF- β derived from ovarian cancer.

Oncol Rep. 2018; 39(1):193-200.

査読有, DOI: 10.3892/or.2017.6104

Sakata J, Kajiyama H, Suzuki S, Utsumi F, Niimi K, Sekiya R, Shibata K, Senga T, Kikkawa F. Impact of positive ZEB1 expression in patients with epithelial ovarian carcinoma as an oncologic outcome-predicting indicator.

Oncol Lett. 2017; 14(4):4287-93.

査読有, DOI: 10.3892/ol.2017.6658

Suzuki S, Sakata J, Utsumi F, Sekiya R, Kajiyama H, Shibata K, Kikkawa F,

Nakatsura T. Efficacy of glypican-3-derived peptide vaccine therapy on the survival of patients with refractory ovarian clear cell carcinoma. *Oncoimmunology*. 2016;

5(11):e1238542.

査読有, DOI:

10.1080/2162402X.2016.1238542.

[学会発表](計 10 件)

鈴木史朗, 玉内学志, 清水裕介, 吉原雅人, 中村謙一, 芳川修久, 梶山広明, 吉川史隆 ESTABLISHMENT AND CHARACTERISATION OF PATIENT-DERIVED XENOGRAFT MODELS FOR MALIGNANT GYNECOLOGIC TUMORS. 20th Biennial Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology (ESGO 2017), 2017 年 11 月

坂田純, 梶山広明, 内海史, 新美薫, 関谷龍一郎, 鈴木史朗, 柴田清住, 吉川史隆 抗癌剤耐性再発卵巣癌における耐性能の可逆性と Drug-rechallenge への応答 第 59 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 2017 年 7 月

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, 2017 年 4 月

鈴木史朗, 内海史, 三井寛子, 関谷龍一郎, 梶山広明, 柴田清住, 吉川史隆 ミニワークショップ 5: 卵巣明細胞腺癌患者における HLA-A アリル多型性の検討 第 57 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 2015 年 8 月

[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]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 史朗 (SUZUKI Shiro)

名古屋大学医学部附属病院・講師

研究者番号: 20612758

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

中面 哲也 (NAKATSURA Tetsuya)

国立がん研究センター 先端医療開発セン

ター 免疫療法開発分野長