

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：84305

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11275

研究課題名（和文）卵巣癌の上皮間葉転換による免疫抑制機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of immune-evasion associated with epithelial mesenchymal transition in ovarian cancer

研究代表者

安彦 郁（Abiko, Kaoru）

独立行政法人国立病院機構（京都医療センター臨床研究センター）・内分泌代謝高血圧研究部・研究員

研究者番号：20508246

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：上皮間葉転換（EMT）の中心分子として働く転写因子Snailに注目し、Snailを発現抑制したマウス卵巣癌において腫瘍増大が抑制されることを明らかにした。Snailは、CXCL1やCXCL2といったケモカインを卵巣癌細胞から分泌させ、骨髄由来免疫抑制性細胞（MDSC）の腫瘍内浸潤を促進していることがわかった。CXCL1/2は卵巣癌患者血清で高濃度に存在し、予後や腫瘍内MDSC数と関連していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで上皮間葉転換（EMT）は癌の進展や転移に関連があることが知られていたが、免疫との関連はよくわかっていなかった。今回、EMTが起こっているときに、SnailによるCXCL1/2の発現を通して、免疫抑制性細胞のMDSCが腫瘍内に浸潤してくることを初めて示し、EMTが免疫抑制と関連していることを示した。また、担癌患者のCXCL1/2の血清中濃度を測定することで、腫瘍内のMDSC数といった免疫状態を推定することが可能であることが示唆され、CXCL1/2の腫瘍免疫バイオマーカーとしての価値も確認された。

研究成果の概要（英文）：We focused on transcription factor Snail, which plays a central role in Epithelial-Mesenchymal transition (EMT). In Snail-depleted mouse ovarian cancer, the tumor growth was inhibited. Snail induced the expression of chemokines such as CXCL1 and CXCL2, and increased the infiltration of Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in tumor microenvironment. High concentration of CXCL1/2 was found in ovarian cancer patients' serum. CXCL1/2 was also associated with poor prognosis and high number of MDSCs in the tumor.

研究分野：婦人科癌

キーワード：卵巣癌 上皮間葉転換 免疫抑制性細胞 抗腫瘍免疫 免疫逃避 ケモカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は、本邦において年々罹患者が増えている。その多くが III 期・IV 期で診断され、治療後に再発を繰り返し、抗がん剤耐性を獲得する、予後の悪い癌である。

卵巣癌は遺伝子発現解析により 4 つのサブタイプに分類されるが、特に、mesenchymal subtype とよばれる、上皮間葉転換 (EMT) が亢進しているタイプの卵巣癌は予後不良であることが知られている。一方で、免疫がよく働いている immunoreactive subtype とよばれる卵巣癌は予後良好である。

我々は卵巣癌における免疫チェックポイント分子 PD-1/PD-L1 について研究を行ってきた。また、プラチナ耐性再発卵巣癌に対する抗 PD-1 抗体 Nivolumab の医師主導治験を行った。この治験では一部の再発卵巣癌に Nivolumab が完全奏功したものの、多くの卵巣癌患者は免疫チェックポイント阻害だけでは治癒しないことがわかってきた。

免疫抑制性細胞のひとつ、骨髄由来免疫抑制性細胞 (Myeloid-derived suppressor cells, MDSC) は、各種の癌において腫瘍微小環境に浸潤してくる免疫細胞で、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の抗腫瘍作用を阻害する。我々は、卵巣癌においても、腫瘍内 MDSC が多い症例は予後不良であることを報告した。

2. 研究の目的

我々は、EMT が亢進している卵巣癌において、免疫微小環境の状態を解析し、EMT と抗腫瘍免疫抑制および癌の免疫逃避との関係を明らかにする。

また、予後不良の卵巣癌の微小環境への MDSC 浸潤を促進するメカニズムを解明することにより、卵巣癌に効果のある MDSC を標的とした新規免疫療法を開発することを目的として本研究を行った。

また、卵巣癌臨床サンプルの MDSC 浸潤と血清の各種ケモカイン濃度を多数例で検討することにより、予後不良の卵巣癌免疫微小環境を血清中ケモカイン濃度により予測することが可能になること、すなわち、免疫微小環境を予測するバイオマーカーを探索することをもう一つの目的とした。

3. 研究の方法

EMT の中心分子である転写因子 Snail に着目した。まずは Snail をノックダウンしたマウス卵巣癌細胞株を shRNA にて作成した。細胞株における Snail の発現はウェスタンブロット法で確認した。

この細胞株を用いて、免疫正常マウスおよび免疫不全マウスにおける腫瘍増大を観察した。また、フローサイトメトリーや免疫染色によって腫瘍内免疫細胞を観察した。次いで、マイクロアレイによって遺伝子発現解析を行った。

その結果発現亢進していた CXCL1/2 に注目した。CXCL1/2 による免疫抑制性細胞の遊走をダブルチャンバー法で検討した。Snail の遺伝子導入を行って、ヒト卵巣癌細胞株について、Snail 強制発現株を作成した。Snail の発現抑制細胞株の細胞培養上清と、強制発現株の細胞培養上清について、ELISA を行い、Snail の発現により培養上清中の CXCL1/2 濃度の変化を検討した。

マウス卵巣癌モデルに対し、CXCR2 阻害薬を投与して腫瘍増大を観察した。

最後に、卵巣癌患者血清における CXCL1/2 濃度を測定し、免疫染色により卵巣癌患者サンプルにおける Snail 発現と免疫細胞浸潤を解析した。

4. 研究成果

Snail をノックダウンしたマウス卵巣癌細胞株を shRNA 導入により作成し、Snail 発現が低下していることをウェスタンブロット法で確認した。

Snail をノックダウンしたマウス卵巣癌細胞を免疫正常マウスに皮下接種したところ、骨髄由来免疫抑制性細胞 (MDSC) の腫瘍内浸潤が減少し、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の浸潤が増加し、腫瘍増大が遅延した。

一方、免疫抑制マウスに Snail ノックダウンマウス卵巣癌細胞株を皮下接種すると、腫瘍増大速度はコントロール細胞株と等しかった。

この結果からは、Snail による何らかの免疫作用により、抗腫瘍免疫が抑制されている可能性が示唆された。

マウス卵巣癌細胞株のマイクロアレイによると、Snail ノックダウンはケモカイン CXCL1 および CXCL2 の発現を低下させた。

CXCL1/2 は受容体 CXCR2 を介して MDSC の遊走を促進させた。Snail 高発現のマウス卵巣癌モデルにおいて、CXCR2 阻害薬投与は腫瘍内の MDSC を減少させ、腫瘍増大を抑制したが、Snail ノックダウンされたマウス卵巣癌モデルにおいては、CXCR2 阻害薬投与は抗腫瘍効果を現さなかった。

卵巣癌患者血清では、正常コントロールと比較して、血清中 CXCL1/2 濃度が有意に高かった。

また、CXCL1/2 濃度が高い患者は予後不良であった。

また、卵巣癌患者血清の CXCL1/2 濃度は、腫瘍の Snail 発現や MDSC 浸潤と正の相関を示

していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mana Taki, Kaoru Abiko, Tsukasa Baba, Junzo Hamanishi, et al.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Snail promotes ovarian cancer progression by recruiting myeloid-derived suppressor cells via CXCR2 ligand upregulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1685-
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-03966-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mana Taki, Kaoru Abiko, Tsukasa Baba, Junzo Hamanishi, et al.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Snail promotes ovarian cancer progression by recruiting myeloid-derived suppressor cells via CXCR2 ligand upregulation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 安彦 郁、滝 真奈、堀川直城、水野 林、村上隆介、濱西潤三、馬場 長、万代昌紀
2. 発表標題 Snail upregulates CXCL1/2 and induces immune escape through migration of MDSCs in ovarian cancer microenvironment
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kaoru Abiko
2. 発表標題 Molecular Target Drugs Biomarker Novel Immunotherapy Targeting MDSCs in Ovarian Cancer
3. 学会等名 IGCS2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kaoru Abiko, Naoki Horikawa, Ryusuke Murakami, Ken Yamaguchi, Junzo Hamanishi, Tsukasa Baba, Masaki Mandai
2. 発表標題 GM-CSF increases MDSCs infiltration after anti-VEGF therapy in ovarian cancer
3. 学会等名 SGO2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安彦郁、堀川直城、滝真奈、村上隆介、濱西潤三、馬場長 ほか
2. 発表標題 MDSC浸潤を標的とした卵巢癌新規免疫療法の開発
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安彦郁
2. 発表標題 卵巢癌におけるMDSCを標的とした免疫療法の可能性
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村上 隆介 (Murakami Ryusuke) (40782363)	京都大学・医学研究科・特定病院助教 (14301)	

