

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：84203

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16769

研究課題名(和文) 卵巣癌の微小環境をターゲットとした層別化による個別化治療の開発

研究課題名(英文) Development of personalized treatment by stratification targeting the microenvironment of ovarian cancer

研究代表者

村上 隆介 (Murakami, Ryusuke)

滋賀県立総合病院(研究所)・その他部局等・医長

研究者番号：40782363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣高異型度漿液性癌の遺伝子発現プロファイルを反映した腫瘍微小環境に基づく病理組織分類は予後や治療感受性に関連することを報告した。最も予後良好な免疫反応型Immune Reactiveと最も予後不良な間質反応型Mesenchymal Transitionの遺伝子発現プロファイルを解析し免疫チェックポイント分子CD276が予後不良型の腫瘍と間質で高発現していることを発見した。卵巣癌自然免疫マウスを用いてCD276が免疫抑制因子として直接的なT細胞活性を抑制するのみならず、CCL2の発現を介して免疫抑制細胞であるM2マクロファージを誘導することを検証し、複数の免疫抑制経路を制御する治療を考案する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

予後不良な卵巣高異型度漿液性癌のMesenchymal Transitionにおいて、免疫抑制が腫瘍微小環境で高発現しているCD276により、直接的な活性化Tリンパ球への抑制効果と、間接的に免疫抑制系細胞であるM2マクロファージを誘導することで、免疫抑制環境をより強くさせていることを発見した。本研究で、難治性な卵巣癌に対して複数の免疫抑制経路を遮断する治療がより有効な治療戦略であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We reported that histopathological classification based on tumor microenvironment reflecting the gene expression profile of high-grade serous ovarian cancer was associated with prognosis and treatment sensitivity. Analysis of the gene expression profiles of the Immune Reactive type with the best prognosis and the Mesenchymal Transition with the poorest prognosis revealed that the immune checkpoint molecule CD276 is highly expressed in tumors and stroma with poor prognosis. We verified that CD276 not only suppresses direct T cell activity as an immunosuppressive factor but also induces M2 macrophages, which are immunosuppressive cells, through the expression of CCL2 in ovarian cancer innate immunized mice. I devise treatments that control the immunosuppressive pathways.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣癌 腫瘍微小環境 トランスレーショナルリサーチ CD276

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は多くが進行期で発見され、高率に再発する予後不良の疾患である。最も頻度の高い、高異型度漿液性癌 (HGSOc) には遺伝子発現プロファイルが 4 つ存在し (Mesenchymal、Proliferative、Differentiated、Immunoreactive)、Mesenchymal タイプが最も予後不良、Immunoreactive タイプが最も予後良好であることが報告された (Verhaak et al. JCI 2013)。研究代表者は遺伝子発現プロファイルを反映する新しい病理学的形態分類を腫瘍微小環境に基づいて提唱した。その中で Mesenchymal タイプを反映する Mesenchymal Transition (MT) タイプは間質反応が著明で、腫瘍がばらけて浸潤する像が 10% 以上存在し、Immunoreactive タイプを反映する Immune reactive (IR) タイプは著しい免疫細胞の浸潤が腫瘍内と周辺の間質に存在する組織型と定義とした。また Proliferative タイプを反映する充実性増殖を主体とする Solid and Proliferative (SP) タイプ、Differentiated タイプを反映する管状・乳頭状増殖を主体とする Papillo-Glandular (PG) タイプと定義した。この中で MT タイプが最も予後不良であり、IR タイプが最も予後良好であった。これらの分類を通じて、腫瘍微小環境が HGSOc において予後を規定する重要な因子であることが示唆された。本研究の核心は、腫瘍微小環境において治療ターゲットになる因子を探索し、Immune Reactive タイプに他のサブタイプを近づけ、Mesenchymal Transition タイプの浸潤をいかに制御するか、つまり免疫抑制を解除し抗腫瘍免疫を誘導し、かつ浸潤を抑制するという 2 つの戦略を同時に行う治療戦略にある。研究代表者は遺伝子発現サブタイプを背景とした HGSOc の腫瘍微小環境に基づく新しい病理組織学的細分類がさらに予後やタキサンやプラチナ製剤との治療感受性に関連することを報告してきた。

HGSOc の 4 つの形態分類の中で最も予後良好であり、多数の免疫細胞の集簇を特徴とする IR タイプに特徴的な因子を抽出するため、遺伝子発現マイクロアレイデータを有する HGSOc の IR 群対それ以外の群で網羅的に変動発現遺伝子を探索すると、IR タイプは CD276/B7H3 が最も発現低下していることが分かった。CD276 は PDL1 等 B7 ファミリーの一つとして、免疫チェックポイントあるいは卵巣癌において増殖や浸潤能に関与すると報告される。

我々は The cancer genome atlas のトランスクリプトーム解析から HGSOc の CD276 と強く相関する遺伝子にメタルプロテアーゼマトリックスファミリーの一つである MMP14 を認め (r value 0.44, 上位 8 番目)、CD276 は Mesenchymal タイプに高発現することを確認した。一方 MMP14 は Mesenchymal 遺伝子発現サブタイプを特徴づける遺伝子である (Verhaak et al. JCI, 2013)。つまり CD276 と MMP14 は強調してがんの悪性を高めている可能性があると考えられ、これら 2 つの分子を HGSOc の選択的に治療ターゲットになりうるか検討したいと考えた。この解析結果を検証するため、CD276 を免疫化学組織染色を行うと、4 つの形態分類の中で、腫瘍の発現強度が IR タイプが最も弱く、MT タイプでは腫瘍および間質に強発現していた。また MMP14 は免疫化学組織染色で腫瘍でいずれのタイプも発現していたが、間質において MT タイプで強発現していることを確認している。

これらの独自の解析から卵巣高異型度漿液性癌の腫瘍微小環境において B7 ファミリーの CD276 が免疫抑制因子のみならずメタルプロテアーゼファミリーの MMP14 と強調して間質反応や浸潤に関与する仮説を打ち立てた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は上記 1 の仮説を立証し、CD276 に関連するターゲット分子の機構を解明することで、卵巣癌の腫瘍微小環境を層別化し、免疫抑制因子を排除して免疫反応を誘導し、浸潤を抑制するという 2 つの治療戦略を同時に行う治療法を開発し、個別化治療に応用することである。

CD276 については免疫抑制細胞として骨髄由来免疫抑制細胞 Myeloid derived suppressor cells (MDSC) さらには M2 マクロファージが関連していることを見出した。RNA シークエンスを用いて CD276 ノックアウト細胞株とコントロール細胞株を比較することで、MDSC や M2 マクロファージを誘導するサイトカインの候補を複数見出した。については浸潤に関連する MMP ファミリーや Extra cellular matrix (ECM) 関連の遺伝子、Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) 関連の遺伝子がノックアウト群で抑制されていた。このことから B7H3 は MMP ファミリーおよび ECM や EMT 関連の遺伝子を直接制御している可能性があり、これらの候補因子の機能的メカニズムを探索する。

腫瘍内の免疫抑制因子を解除し、免疫細胞の抗腫瘍効果を増強させ、腫瘍間質の浸潤能を抑制することをターゲットとした治療戦略は、癌の個性を把握するところから始まり、新しい治療薬の開発により、卵巣癌の予後の改善に寄与することが期待される。

### 3. 研究の方法

(1) 臨床サンプルを用いて、CD276 のタンパク発現を確認し、発現強度による予後の違いを検証した。

(2) CD276 の抑制株の作成

CRISPR/CAS9 システムで CD276 をノックアウトしたマウス卵巣癌細胞株 HM1 と ID8 を樹立した (CD276-KO 株)。

(3) 自然免疫マウスモデルでの腫瘍発育の検討

自然免疫マウスモデル B6C3F1 mice に HM1 を皮内移植あるいは腹腔内投与し、C57BL/6 (B6)

mice に ID8 を腹腔内投与し、コントロールに対する CD276-KO 株の腫瘍の形成の違い、腹水重量の変化について測定した。

(4) RNA シークエンス解析

自然免疫マウスモデル B6C3F1 mice に HM1 を腹腔内移植し、C57BL/6(B6) mice に ID8 を腹腔内移植した。CD276-KO 株とコントロール株でそれぞれ、大網腫瘍を形成した。細胞株と腫瘍からそれぞれ RNA シークエンスを行い、CD276-KO 株とコントロール株で発現変動遺伝子を解析した。

(5) CD276-KO マウス卵巣癌細胞株の T 細胞増殖アッセイと細胞障害アッセイ

T 細胞 (Pan T cell isolation kit) を用いて CD276-KO とコントロールのマウス卵巣癌細胞株 HM1 と ID8 より、免疫抑制能を T 細胞機能抑制実験 (CFSE assay) にて行う。また、これらの癌細胞に OVA を施し抗原性を高め、CD276-KO とコントロール株でそれぞれ、細胞傷害性リンパ球 (Cytotoxic T Lymphocyte; CTL) の刺激をうけ、標的細胞を溶解することで、免疫細胞との相互作用を解明する。

(6) In vitro における、CD276-KO、shRNA、治療抗体を用いた細胞内シグナルの評価  
Western blot により細胞内シグナルについて経路を検討する。

#### 4. 研究成果

##### 研究成果の概要

CD276 を CRISPR/CAS9 システムでノックアウトしたマウス卵巣癌細胞株 HM1 と ID8 を樹立した。マウス自然免疫モデル HM1 においてコントロール細胞株に比して KO 細胞株がマウス皮下移植および腹腔内投与モデルにおいて、腫瘍形成能が遅延することを認められ、ID8 においても腹腔内投与モデルで KO 細胞株が腫瘍形成能が遅延することが確認された。(ID8 においては皮内腫瘍ができない。)

また CD276-KO 細胞株 HM1、ID8 はいずれも T 細胞増殖がコントロールに比して増強し、OVA で抗原性を高めた HM1 および ID8 は CD276-KO で細胞障害性 T 細胞による細胞障害性が増加した。さらに骨髄由来免疫抑制細胞 Myeloid derived suppressor cells(MDSC)および免疫抑制に作用する M2 マクロファージが CD276-KO 細胞株を移植して形成された腫瘍内で有意に減少することを認めた。つまり CD276 は直接的に T 細胞への抑制作用のみならず、免疫抑制細胞である MDSC や M2 マクロファージを介して間接的に免疫抑制環境を作り出している可能性が示唆された。

RNA シークエンス解析でこれらの免疫抑制細胞を誘導する経路として CCL2 - CCR2 を候補として絞り、CD276 を抑制することで、複数のヒトおよびマウス卵巣癌細胞株の CCL2 の低下を確認していた。CD276 が CCL2 を介して、MDSC や M2 マクロファージを誘導している可能性を CCR2 阻害剤による、腫瘍増殖能の検討ならびに MDSC および M2 マクロファージ分画の誘導について検証している。

また CD276-KO 細胞株 HM1、ID8 は蛋白レベルで MMP14 が低下していることを確認し、RNA シークエンスで Extra cellular matrix(ECM)関連の遺伝子、Epithelial Mesenchymal Transition(EMT)関連の遺伝子がノックアウト群で抑制されていた。このことから CD276 は MMP ファミリーおよび ECM や EMT 関連の遺伝子を直接制御している可能性が示唆される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murakami R, Matsumura N, Michimae H, Tanabe H, Yunokawa M, Iwase H, Sasagawa M, Nakamura T, Tokuyama O, Takano M, Sugiyama T, Sawasaki T, Isonishi S, Takehara K, Nakai H, Okamoto A, Mandai M, Konishi I.	4. 巻 May;153(2)
2. 論文標題 The mesenchymal transition subtype more responsive to dose dense taxane chemotherapy combined with carboplatin than to conventional taxane and carboplatin chemotherapy in high grade serous ovarian carcinoma: A survey of Japanese Gynecologic Oncology Group study (JGOG3016A1).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 312-319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygyno.2019.02.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mulati K, Hamanishi J, Matsumura N, Chamoto K, Mise N, Abiko K, Baba T, Yamaguchi K, Horikawa N, Murakami R, Taki M, Budiman K, Zeng X, Hosoe Y, Azuma M, Konishi I, Mandai M.	4. 巻 120(1)
2. 論文標題 VISTA expressed in tumour cells regulates T cell function	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Br J Cancer	6. 最初と最後の頁 115-127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-018-0313-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horikawa N, Abiko K, Matsumura N, Baba T, Hamanishi J, Yamaguchi K, Murakami R, Taki M, Ukita M, Hosoe Y, Koshiyama M, Konishi I, Mandai M.	4. 巻 122(6)
2. 論文標題 Share Anti-VEGF therapy resistance in ovarian cancer is caused by GM-CSF-induced myeloid-derived suppressor cell recruitment.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Cancer.	6. 最初と最後の頁 778-788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-019-0725-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Miyamoto T, Murakami R
2. 発表標題 CD276 expression correlates with poor prognosis in ovarian cancer
3. 学会等名 第71回日本産婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyamoto T, Murakami R
2. 発表標題 CD276 expression on ovarian cancer induces infiltration of myeloid derived suppressor cells.
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