

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008年

課題番号：19591508

研究課題名(和文) 腫瘍免疫誘導におけるリンパ系樹状細胞活性化の意義に関する研究

研究課題名(英文) Significance of activation of lymphocytic dendritic cells in induction of tumor immunity

研究代表者

有廣 光司 (ARIHIRO KOJI)

広島大学・病院・准教授

研究者番号：70232064

研究成果の概要：

術前化学療法によるヒト乳癌の腫瘍縮小効果と治療抵抗性を評価するため、樹状細胞の活性化と autophagy に注目して乳癌細胞の質的变化を客観的に検討することを試みた。本学外科で術前化学療法を施行された 56 例を対象として、化学療法による細胞内恒常性の破綻のため蓄積する不要な蛋白質の分解に先立って autophagosome の形成に必須な LC3, GABA 受容体関連蛋白質、Golgi-associated ATPase enhancer (GATE-16) また Atg3, Atg4B, Atg7, Atg16L などの因子の発現を免疫組織化学的染色法により検討した。その結果、Grade2 と判定した 16 例中 4 例に LC3, GATE-16, Atg4B, Atg7, Atg16L の発現を認めた。胞体内に空胞変性を伴い核の膨化を示す高度の変性像と判定した乳癌細胞でも autophagy により生存の可能性があることが示されたが、今回対象とした 56 例では未だ再発例や遠隔転移を伴う死亡例はなく、無病再発や生存を指標とした評価は困難であった。一方、未成熟・成熟樹状細胞 (pDC, mDC) の発現を CD1a, CD11c, CD123, CD80, CD83, CD86 をマーカーとして検討したが、これらを発現する細胞は殆どなく、pDC, mDC の関与を検討するためには化学療法開始後 4 週間後あるいは 8 週間後の生検標本を用いるべきであろうと考えた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：(1)Autophagy (2)治療抵抗性 (3)乳癌 (4)術前化学療法 (5)LC3

(6) GATE-16 (7)PI-3K

1. 研究開始当初の背景

腫瘍免疫の成立には、腫瘍特異的抗原の未成熟樹状細胞による貪食、樹状細胞の成

熟、所属リンパ節への遊走、naïve T 細胞への抗原提示、殺細胞 T 細胞 (CTLs) の増殖、腫瘍への集積・攻撃といった一連のプロセスが

必要である。樹状細胞は、自然免疫と獲得免疫誘導に重要な役割を担っており、樹状細胞の成熟度は免疫誘導と寛容の両面に関与する。樹状細胞には骨髄系(mDC)とリンパ系(pDC)が知られているが、従来の腫瘍免疫惹起の研究ではmDCの活性化を中心に行われてきた。pDCはmDCに比べて抗原提示能、摂取能は劣ることから、免疫寛容・抑制に関与することが報告されている。mDCは外因性抗原に対して免疫応答するのを主とするのに対して、pDCは内因性抗原に対する免疫応答を担っていると考えられる。実際、pDCの toll-like receptor 9 (TLR9)は細胞表面ではなく、endosomal compartment に発現しており、CpG オリゴヌクレオチド(CpG ODNs)により活性化し、IL-12, type I インターフェロン(IFNs)を放出して、Th1 分化に関与する。また、CD40L により活性化し、メラノーマ分化抗原のパルス刺激により、特異的 CD8+ T 細胞を誘導することが報告されている。このように、pDCの腫瘍免疫誘導への関与は正負の報告があり、その臨床的意義は明らかでない。

オートファジーによる細胞死は、細胞の栄養飢餓状態で誘導されるが、癌細胞ではアポトーシス抵抗性の獲得と同時にオートファジー抵抗性により、微小環境下での増殖・進展を容易にしていると考えられる。オートファジー誘導関連遺伝子の遺伝子欠損・発現減少が、既に固形癌で報告されているが、抗癌剤効果での分子機構、アポトーシスとの相互作用は十分に解明されていない。アポトーシス及びオートファジー誘導経路との相互作用では、抗癌剤による両経路の相乗的効果、アポトーシス誘導経路欠損でのオートファジー誘導による耐性の克服、あるいはオートファジー抑制によるアポトーシスの誘導等のモデルが考えられる。また、固形癌微小環境の特性である低酸素・グルコース欠乏下でのアポトーシス・オートファジー抵抗性の解析は、固形癌の抗癌剤耐性克服の解明と新たな治療戦略に寄与するものである。一般的に嫌気性環境下での ATP の減少は、AMP-activated protein kinase の活性化、AMP/ATP 比の上昇により、通常、非アポトーシス細胞死(オートファジー)が誘導される。しかしながら、癌細胞における class I PI3K/Akt/mTor の活性化は同時にオートファジー抵抗性を誘導して、抗癌剤耐性の獲得、腫瘍の増殖・進展に関与している。また、オートファジー誘導遺伝子として、Beclin 1 が同定されており、乳癌・大腸癌での遺伝子欠損による発現の減少が報告されている。

一方、オートファジーは化学療法などによる細胞障害性の環境下において、腫瘍細胞における代謝系に異常が生じ、そのために発生した異化不全による老廃物の蓄積などに対

応してこれらの自己細胞由来の蛋白を自己消化する仕組みと理解することも可能である。この場合、オートファジーにより腫瘍細胞は化学療法への抵抗性を示すことになる。このように、オートファジーは固形癌の抗癌剤耐性機構と薬剤による細胞死機構の両方に関与する可能性があり、未だその意義付けは一定ではない。

2. 研究の目的

ヒトの腫瘍系において、腫瘍免疫誘導における pDC の機能的役割とその臨床的意義を解析する。通常、pDC は自己抗原に対して免疫寛容に作用する。腫瘍周囲に集積した pDC は免疫抑制に作用しているが、その機能は活性化の有無により Th1 あるいは Th2 に働く。pDC 活性化に関与する CpG-motif は、ヒト癌ゲノム中ではメチル化異常で知られているが、非メチル化 CpG island の存在も報告されている。化学療法による多量の細胞死の誘導は腫瘍抗原の低メチル化 CpG ODNs を放出させ、danger signal が誘導され、腫瘍免疫誘導に関与すると考えられる。

ヒト癌の化学療法におけるオートファジーの臨床病理学的意義を解析する。すなわちオートファジーを来すことにより腫瘍細胞にとって低酸素状態や代謝不全という過酷な微小環境を生き残るといった治療抵抗性を示す場合には、オートファジーの存在を治療抵抗性予測因子として臨床的に応用することが可能であるか否かについての検討をすることが目的の一つである。一方、オートファジーが治療による腫瘍死を誘発するのであれば、その存在は治療効果予測因子となり得る可能性があるため、どちらをより重視できるのかを検討することがもう一つの目的である。

3. 研究の方法

化学療法施行後の腫瘍縮小率と切除原発巣での浸潤 T リンパ球、未成熟・成熟樹状細胞(pDC, mDC)、およびセンチネルリンパ節(SLN)での未成熟・成熟樹状細胞(pDC, mDC)との関係を検討する。免疫組織染色、フローサイトメトリー法により、CD1a, CD11c, CD123, CD80, CD83, CD86 の発現を解析し、SLN では Th1, Th2 サイトカイン(IL-12, IFN- α , IFN- γ , IL-6, IL-10, TGF- β)を RT-PCR 法で測定する。また、腫瘍縮小効果における細胞死の形態(アポトーシス, オートファジー)を TUNEL, 抗 LC3 抗体で染色し、腫瘍免疫誘導との関連を検討する。術前化学療法によるヒト乳癌の腫瘍縮小効果と治療抵抗性を評価するため、autophagy に注目して乳癌細胞の質的变化を客観的に検討することを試みた。

4. 研究成果

術前化学療法によるヒト乳癌の腫瘍縮小効果と治療抵抗性を評価するため、autophagy に注目して乳癌細胞の質的変化を客観的に検討することを試みた。本学外科で術前化学療法を施行された 56 例を対象として免疫組織化学的染色を行なった。症例の内訳は組織学的治療効果判定 Grade0: 5 例、Grade1: 24 例、Grade2: 16 例、Grade3: 11 例であった。一般的に Grade2 と Grade3 では予後が異なるが、この中で変性した乳癌細胞の評価によって Grade2 と Grade3 の評価が分かれることが大きな問題である。このため化学療法による細胞内恒常性の破綻のため蓄積する不要な蛋白質の分解に先立って autophagosome の形成に必須な LC3, GABA 受容体関連蛋白質、Golgi-associated ATPase enhancer (GATE-16) また Atg3, Atg4B, Atg7, Atg16L などの因子の発現を検討した。その結果、Grade2 と判定した 16 例中 4 例に LC3, GATE-16, Atg4B, Atg7, Atg16L の発現を認めた。胞体内に空胞変性を伴い核の膨化を示す高度の変性像と判定した乳癌細胞でも autophagy により生存の可能性があることが示されたが、今回対象とした 56 例では未だ再発例や遠隔転移を伴う死亡例はなく、無病再発や生存を指標とした評価は困難である。今後は乳癌学会班研究の一環として更に大きな症例群を対象に検討を継続する。なお、未成熟・成熟樹状細胞 (pDC, mDC) の発現を CD1a, CD11c, CD123, CD80, CD83, CD86 をマーカーとして検討したが、これらを発現する細胞は殆どなく、pDC, mDC の関与を検討するためには化学療法開始後 4 週間後あるいは 8 週間後の生検標本を用いるべきであろうと考えた。

一方、乳癌細胞の Lapatinib に対する抵抗性は Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10 (PTEN) /phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) の高値と相関することが報告されているが、これらの因子は autophagy を促進することも知られており、治療抵抗性における autophagy の関与を示唆する可能性がある。今後は PTEN や PI-3K の発現も検討する予定である。

加えて化学療法抵抗性を示す乳癌細胞として basal-like carcinoma あるいは乳がん幹細胞も想定されるので、Cytokeratin (CK) 5/6, CK14, EGFR, c-kit, BRCA1 あるいは SOX2, Oct4 をマーカーとしてその発現と予後との関係を検討する。

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 25 件)

1. T. Kubo, T. Sugita, S. Shimose, T. Matsuo, K. Arihiro, and M. Ochi. Expression of hypoxia-inducible factor-1{alpha} and its relationship to tumour angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumours. *J Bone Joint Surg Br*, 査読有, 2008; 90-B(3): 364 - 370.
2. 片岡 健、田中 友加、小川 勝成、尾田 三世、有広 光司 . 乳腺乳頭部腺腫の 1 例. *日本臨床細胞学会雑誌*, 査読有, 47(2): 156-157, 2008
3. Miki D, Aikata H, Uka K, Saneto H, Kawaoka T, Azakami T, Takaki S, Jeong SC, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S, Itamoto T, Asahara T, Arihiro K, Chayama K. Clinicopathological features of elderly patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 査読有, 2008;43(7):550-557.
4. Hamatani K, Eguchi H, Ito R, Mukai M, Takahashi K, Taga M, Imai K, Cologne J, Soda M, Arihiro K, Fujihara M, Abe K, Hayashi T, Nakashima M, Sekine I, Yasui W, Hayashi Y, Nakachi K. RET/PTC rearrangements preferentially occurred in papillary thyroid cancer among atomic bomb survivors exposed to high radiation dose. *Cancer Res*. 査読有, 2008;68(17):7176-7182.
5. Teramoto S, Arihiro K, Koseki M, Kataoka T, Asahara T, Ohdan H. Role of vascular endothelial growth factor-C and -D mRNA in breast cancer: *Hiroshima J Med Sci*. 査読有, 2008;57(2):73-78.
6. Kobayashi T, Ochi M, Yanada S, Ishikawa M, Adachi N, Deie M, Arihiro K. : A novel cell delivery system using magnetically labeled mesenchymal stem cells and an external

magnetic device for clinical cartilage repair. Arthroscopy. 査読有, 2008;24(1):69-76.

7. Hyogo H, Tazuma S, Arihiro K, Iwamoto K, Nabeshima Y, Inoue M, Ishitobi T, Nonaka M, Chayama K. Efficacy of atorvastatin for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis with dyslipidemia. Metabolism. 査読有, 2008;57(12):1711-1718.

8. Sentani K, Oue N, Tashiro T, Sakamoto N, Nishisaka T, Fukuhara T, Taniyama K, Matsuura H, Arihiro K, Ochiai A, Yasui W. Immunohistochemical staining of Reg IV and claudin-18 is useful in the diagnosis of gastrointestinal signet ring cell carcinoma. Am J Surg Pathol. 査読有, 2008;32(8):1182-1189.

9. Kubo, S. Shimose, T. Matsuo, K. Arihiro, M. Ochi. Scalp metastasis from malignant fibrous histiocytoma of bone. Journal of the American Academy of Dermatology, 査読有, 2008; 59 (5): S88 - S91

10. 乳管腺腫 有広光司, 病理と臨床, 査読有, 26(11) :1132-1134, 2008.

11. 沖田理貴, 清水克彦, 三村剛史, 恵美学, 川崎由香里, 宮田義浩, 有廣光司, 岡田守人. 術前化学療法, 胸膜肺全摘術後に再発をきたした線維形成性悪性胸膜中皮腫の1剖検例, 癌の臨床, 査読有, 54(9) : 771-777, 2008.

12. Arihiro K, Umemura S, Kurosumi M, Moriya T, Oyama T, Yamashita H, Umekita Y, Komoike Y, Shimizu C, Fukushima H, Kajiwara H, Akiyama F. Comparison of evaluations for hormone receptors in breast carcinoma using two manual and three automated immunohistochemical assays. Am J Clin Pathol, 査読有, 127: 356-365, 2007.

13. Takahashi K, Eguchi H, Arihiro K, Ito R, Koyama K, Soda M, Cologne J, Hayashi Y,

Nakata Y, Nakachi K and Hamatani K. The presence of BRAF point mutation in adult papillary thyroid carcinomas from atomic bomb survivors correlates with radiation dose. Mol Carcinog, 査読有, 46: 242-248, 2007

14. Ogawa T, Tashiro H, Miyata Y, Ushitora Y, Fudaba Y, Kobayashi T, Arihiro K, Okajima M and Asahara T. Rho-associated kinase inhibitor reduces tumor recurrence after liver transplantation in a rat hepatoma model. Am J Transplant, 査読有, 7: 347-355, 2007

15. Oyama T, Ishikawa Y, Hayashi M, Arihiro K, Horiguchi J. The effects of fixation, processing and evaluation criteria on immunohistochemical detection of hormone receptors in breast cancer. Breast Cancer, 査読有, 14: 182-188, 2007

16. Kim R, Emi M, Tanabe K and Arihiro K. Potential functional role of plasmacytoid dendritic cells in cancer immunity. Immunol, 査読有, 121: 149-157, 2007

17. Urabe S, Fujiwara H, Miyoshi H, Arihiro K, Soma H, Yoshihama I, Mineo S, Kudo Y. Epithelioid trophoblastic tumor of the lung. J Obstet Gynaecol Res. 査読有, 2007;33(3):397-401.

18. Mukai S, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Arihiro K, Chayama K. Involvement of Kruppel-like factor 6 (KLF6) mutation in the development of nonpolypoid colorectal carcinoma. World J Gastroenterol. 査読有, 2007;13(29):3932-3938.

19. Kaneko I, Tanaka S, Oka S, Yoshida S, Hiyama T, Arihiro K, Shimamoto F, Chayama K. Immunohistochemical molecular markers as predictors of curability of endoscopically resected submucosal colorectal cancer. World J Gastroenterol. 査読有,

2007;13(28):3829-3835.

20. 小川尚之、板本敏行、田代裕尊、浅原利正、有広光司、北本 幹也. 肝細胞癌と肝内結石症に起因したと思われる胆管内発育型肝内胆管癌の同時性重複癌の1例. 日臨外会誌, 査読有, 68(6): 1528-1534, 2007.

21. Liang S, Wei FY, Wu YM, Tanabe K, Abe T, Oda Y, Yoshida Y, Yamada H, Matsui H, Tomizawa K, Takei K. Major Cdk5-dependent phosphorylation sites of amphiphysin 1 are implicated in the regulation of the membrane binding and endocytosis. J Neurochem. 査読有 2007;102(5):1466-1476. Epub 2007 Apr 10.

22. Wada Y, Yoshida K, Hihara J, Tanabe K, Ukon K. Kidney metastasis of resected early gastric carcinoma: report of a case. Surg 査読有, 2007;37(3):248-250. Epub 2007 Mar 9.

23. Taomoto J, Yoshida K, Wada Y, Tanabe K, Konishi K, Tahara H, Fukushima M. Overexpression of the orotate phosphoribosyl-transferase gene enhances the effect of 5-fluorouracil on gastric cancer cell lines. Oncology. 2006;70(6):458-464. Epub 2007 Jan 19. 査読有

24. Wada Y, Yoshida K, Tsutani Y, Shigematsu H, Oeda M, Sanada Y, Suzuki T, Mizuiri H, Hamai Y, Tanabe K, Ukon K, Hihara J. Neutrophil elastase induces cell proliferation and migration by the release of TGF-alpha, PDGF and VEGF in esophageal cell lines. Oncol Rep. 2007;17(1):161-167. 査読有

25. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. Immunology. 2007;121(1):1-14. Epub 2007 Mar 26. Review. 査読有

[学会発表] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

2008 年度

有廣 光司 (ARIHIRO KOJI)
広島大学・病院・准教授
研究者番号: 70232064

2007 年度

金 隆史 (KIM RYUNGSA)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教授
研究者番号: 80274132

(2) 研究分担者

村上 茂 (MURAKAMI SIGERU)
広島大学・病院・講師
研究者番号: 00403527

田邊 和照 (TANABE KAZUTERU)
広島大学・病院・講師
研究者番号: 40379847

(3) 連携研究者