

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791163

研究課題名（和文） 子宮頸癌の免疫逃避機構の解明と免疫療法への応用

研究課題名（英文） Analysis of immune escape mechanism in cervical cancer that aims at immunotherapeutic application

研究代表者

西尾 浩（NISHIO HIROSHI）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90445239

研究成果の概要（和文）：

子宮頸癌の免疫逃避機構を解析するため、子宮頸癌細胞株を用いて各種の免疫抑制性因子の発現を網羅的に検討した。また、その発現機構を解明するため、細胞内シグナル伝達系を解析し、その結果、子宮頸癌細胞株 SKG-II では PD-L1 および B7-DC の発現が MAPK 系の Erk カスケードに依存することが判明した。一方、HPV の E6,E7 遺伝子の発現とこれらの分子との発現との間には関連が認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

Immune suppressive molecules including PD-L1 and B7-DC was evaluated in cervical cancer cell lines by ELISA or FACS method. Activation of intracellular signaling pathways was detected by western blotting method. As a result, PD-L1 and B7-DC protein in SKG II cells was depend on Erk1/2 cascade specifically and not associated with HPV E6/E7 protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮頸癌 腫瘍免疫学 免疫逃避 B7 ファミリー

1. 研究開始当初の背景

「癌の免疫回避」については、多くの癌の免疫療法で課題となっている研究テーマである。癌患者では癌細胞自身が IL6 や TGF- β 、VEGF などの免疫抑制性サイトカインを分泌するなどによって、T reg を誘導し、樹状細胞を抑制型に分化させるといった免疫回

避のメカニズムが働く。子宮頸癌においても同様のことが生じていると考えられる。最近、Bae らはマウスの子宮頸癌モデルでシスプラチンと E7 ペプチドワクチンの併用投与を行い、E7 ペプチドワクチン単独での治療に比べてマウス血中の CTL が増加すること、組織的にも腫瘍浸潤 CTL が増加し癌組織の壊

死が顕著であることを報告した。彼らはこの要因としてシスプラチンによって免疫抑制に作用する T reg や myeloid suppressor cell(MSC)などが減少したことが要因ではないかと考察している。これは子宮頸癌の免疫療法における免疫回避機構解明の重要性を示している。さらに Tang らは E6,E7 タンパクの発現と hypoxia-inducible factor 1 (HIF) および VEGF の発現の関連を報告した。彼らはこの結果を血管新生の面から癌の伸展と関連づけているが、この2つの分子は近年免疫抑制物質としても注目されており、子宮頸癌と免疫回避は密接に関連している査証と考えられる。

研究代表者が所属するグループは免疫回避機構の解明として、メラノーマにおいて変異型 BRAF によって MAPK 経路が亢進されること、大腸癌においては変異型 KRAS や BRAF によって MAPK 経路が亢進されることを示した。さらにメラノーマにおいては β -catenin 変異や APC 変異による Wnt/ β -catenin 経路の亢進が、IL10, IL6, WEGF などの複数の免疫抑制分子の産生に関与することを示し、これらシグナル伝達分子に対する分子標的薬(阻害剤)や siRNA を用いて、癌細胞の増殖や浸潤阻害だけでなく、免疫抑制分子を阻害できることを示してきた。また、子宮頸癌においては HPV18 型の E6,E7 に対する siRNA を標的細胞に導入し、E6,E7 タンパクの発現を抑制することで細胞増殖が抑制されることを示してきた。これらの手法と経験をもとに子宮頸癌の免疫逃避機構の解明を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究では、子宮頸癌における免疫抑制の分子機構の解明と これらの研究成果に基づいた新規治療法の可能性を追究する。具体的には、HPV タンパクである E6, E7 タンパクの発現が免疫抑制分子(TGF- β などの可溶性分子、PD-L1 などの膜分子、IDO などの細胞内分子など)の産生に影響を与えるかを明らかにする。さらに、免疫抑制分子産生に関与するシグナル系の探索を行い、子宮頸癌において各種シグナル亢進(Kras/MAPK, STAT3, PTEN/PI3K-AKT, β -catenin/Wnt, NF-kB 経路など)が生じているか、それが E6,E7 タンパクの発現と関連しているかを検討する。In vitro で同定された免疫回避機構解除の標的となり得る分子については、特異的阻害剤や RNAi を用いた免疫回避の克復の可能性を検討する。

3. 研究の方法

1. 子宮頸癌における免疫抑制性分子産生の測定: 子宮頸癌細胞株 (SKG-I,SKG-II, SKG-IIIa, SKG-IIIb, HeLa, SiHa, TCO-I, C33A)

を培養して免疫抑制分子を測定する。

(1)免疫抑制性の可溶性分子 (IL10, IL-6, VEGF, TGF- β) は培養液中に分泌されたタンパクをサンドイッチ法を用いて ELISA 法で測定する。

(2)免疫抑制性の膜タンパク(PD-L1, B7-DC, BH-H4)は Flow Cytometry で発現を検討する。

以上を測定した上で、特に免疫抑制分子の発現が亢進している細胞株を選択し、その後の研究に使用する。

2. HPV の E6,E7 タンパク発現と免疫抑制分子発現の検討

選択した細胞株についてゲノムに組み込まれている HPV 型の E6,E7 を RNAi によって抑制し、各免疫抑制分子の発現の変化を上記の方法で検討する。これまでに研究代表者のグループは SKG-II 細胞に HPV18 型の E6,E7 に対する siRNA を標的細胞に導入し、E6,E7 タンパクの発現の抑制に成功している。この手法を用いることで実験を行なう。

3. 免疫抑制分子発現とシグナル伝達系異常との関連

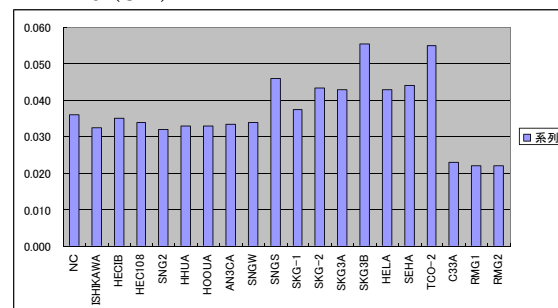
選択した細胞株を用いて各シグナル伝達系(Kras/MAPK, STAT3, PTEN/PI3K-AKT, β -catenin/Wnt, NF-kB 経路など)の阻害実験を行い、シグナル異常と免疫抑制分子の産生との関連を明らかにする。具体的には次の手法を用いる。

(2)既存のシグナル伝達系阻害薬を用いる: MEK 阻害剤 U0126、PI3K 阻害剤 wortmanin, LY294002、NF-kB 阻害剤 DHMEQ を用いてシグナル伝達系の阻害を行い、免疫抑制分子の産生変化を検討する。

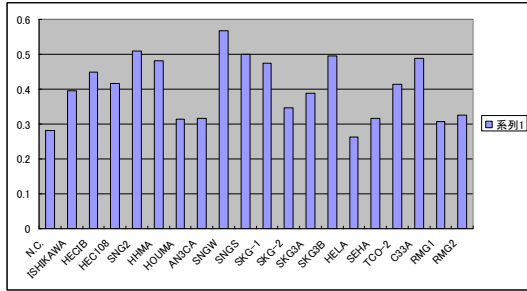
4. 研究成果

1. 子宮頸癌における免疫抑制性分子産生の測定: 子宮頸癌での免疫抑制性分子を他の婦人科癌とも比較するため、子宮体癌、子宮頸癌、卵巣癌の各細胞株について測定を行なった。

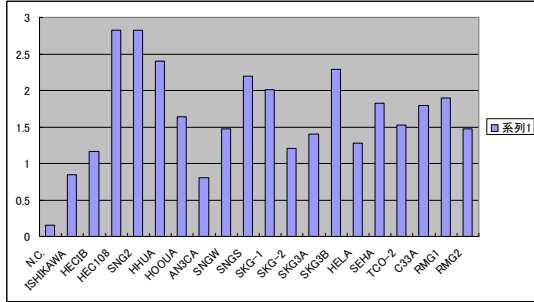
IL-10 (OD)



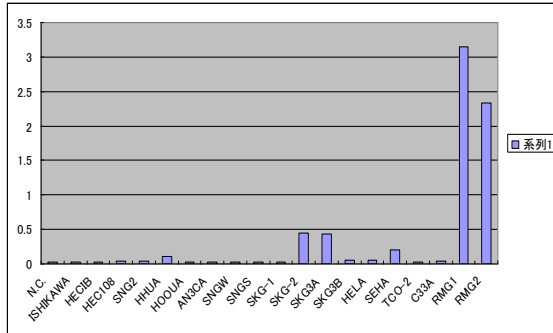
VEGF (OD)



TGF- β 1 (OD)

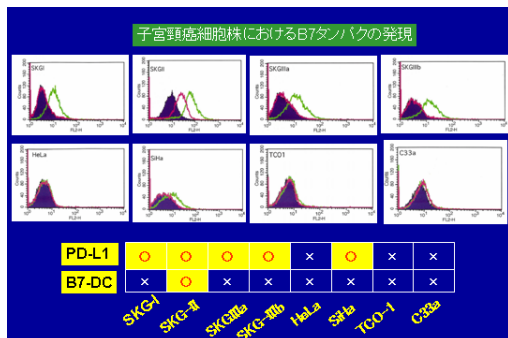


IL-6



以上の結果として、これらの免疫抑制分子が特に子宮頸癌で高発現している傾向は認められなかった。

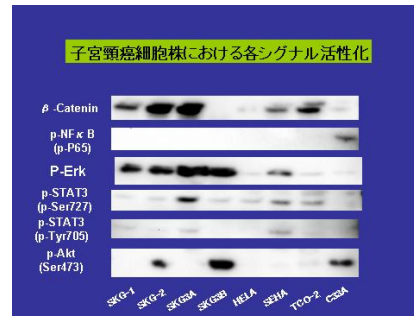
免疫抑制性の膜タンパク (PD-L1, B7-DC, BH-H4) の発現検討を flow cytometry によって行なった。



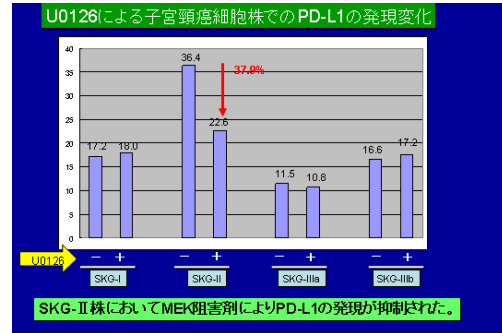
このように、PD-L1 は8種のうち5種に発現を認めた。B7-DC は1種のみ、また、B7-H1を発現していた細胞株はなかった。

次に、子宮頸癌細胞株における各種シグナル

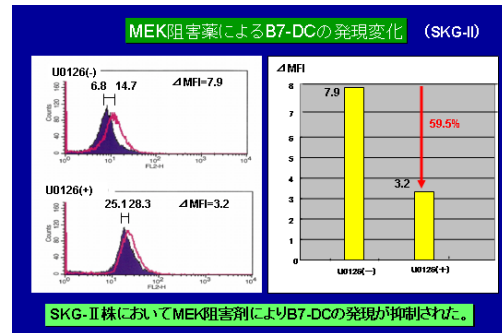
伝達系の活性化を網羅的にウェスタン法で検討した。



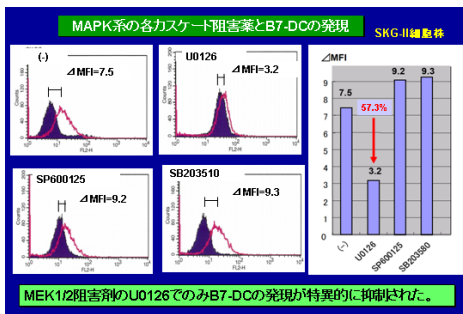
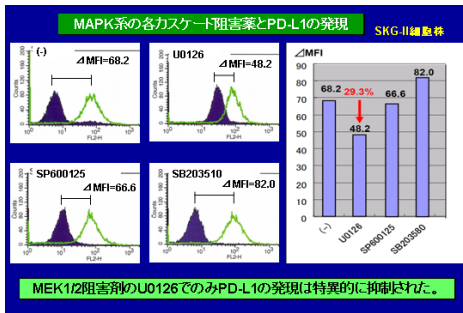
この結果と、前出の PD-L1 の発現を比較すると、子宮頸癌細胞株における PD-L1 の発現とリン酸化 Erk の発現が一致していた。このため、以後の研究は PD-L1 の発現と MAPK 経路との関連に焦点をあて、研究を進めた。まず、MEK 阻害剤である U0126 を PD-L1 を発現している細胞株に添加し、PD-L1 の発現強度を flow cytometer を用いて評価した。



その結果、SKG-II 細胞株において、PD-L1 の発現が 37.9%低下した。また、この細胞においては B7-DC の発現も 59.5%低下していた。

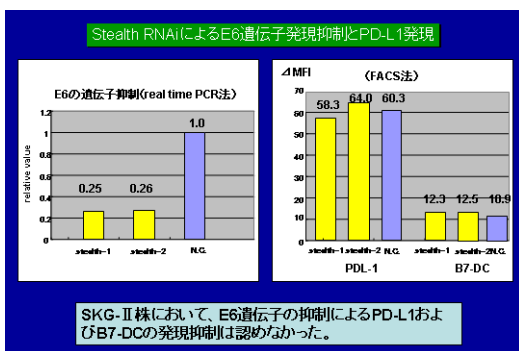


MAPK には、Erk 以外に JUNK および P38 を介する経路が知られている。阻害剤による PD-L1 および B7-DC の発現低下が Erk 特異的かを検討するため、これらの阻害剤である SP600125 および SB203580 を用いて阻害実験を行なったところ、以下の表のように、SKG-II における PD-L1 の発現は U0126 のみで低下しており、Erk が特異的に関与することが判明した。

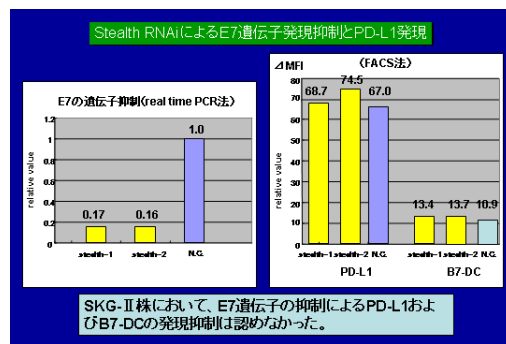


なお、その他の細胞内シグナル伝達系であるPI3Kの阻害剤wortmanin, LY294002、NF-kBの阻害剤DHMEQを用いてシグナル伝達系の阻害を行ったが、PD-L1およびB7-DCの発現に変化は認められなかった。

次に、SKG-II細胞株でのHPV18型E6およびE7遺伝子の発現とPD-L1、B7-DCの発現に関連があるかを検討するため、stealth RNAを用いた遺伝子発現抑制実験を行なった。下図にE6を抑制した場合のPD-L1、B7-DCの発現を示す。このようにE6の発現を抑制してもPD-L1とB7-DCの発現に変化は認められなかった。



次にE7を抑制した場合のPD-L1、B7-DCの発現を示す。このようにE7の発現を抑制してもPD-L1とB7-DCの発現に変化は認められなかった。



以上の研究より、子宮頸癌細胞株SKG-IIでは、PD-L1およびB7-DCの発現がMAPK経路に依存していること、特にErk特異的に発現が制御されていることが明らかとなった。一方、子宮頸癌特異的発癌因子であるHPVのE6、E7についてはPD-L1の発現やB7-DCの発現に関与していないことが示された。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

岩田卓 藤井多久磨 西尾浩 塚崎克己 青木大輔 吉村泰典 子宮頸癌細胞株におけるB7タンパクの発現解析～免疫療法にむけた基盤的研究～ 第61回日本産科婦人科学会総会学術集会 2009.4.3 京都

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西尾 浩 (NISHIO HIROSHI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：90445239

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし