

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：84203

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18210

研究課題名（和文）卵巣癌の腫瘍微小環境におけるB7H3を標的とした治療開発

研究課題名（英文）Therapeutic development targeting B7H3 in the tumor 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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣癌はPD-1/PD-L1阻害治療が期待されたほど有効ではない。本研究では同じPD-L1ファミリーであるB7H3（CD276）がPD-L1の低い非免疫反応性卵巣癌で高発現し、腫瘍免疫反応性を反映するIFNシグネチャーと負の相関関係があることからB7H3に着目した。同系卵巣癌マウスモデルで腫瘍細胞のB7-H3ノックアウト（KO）が腫瘍の進行を抑制し、M2マクロファージの数が減少しIFN + CD8+T細胞の数が増加した。CCL2の発現は、B7-H3KO腫瘍細胞株で抑制された。B7H3の発現はCCL2-CCR2経路を介しM2マクロファージの移動と分化を誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌ではB7H3が高発現する腫瘍があり、B7H3の発現はCCL2の発現およびM2マクロファージの量的な正の相関があり、B7H3の高い卵巣癌は、B7-H3の低い卵巣癌よりも腫瘍IFN + CD8 + T細胞が少なく、予後が不良であった。したがって、腫瘍細胞におけるB7H3の発現は、CCL2-CCR2-M2マクロファージ軸を介した免疫抑制と腫瘍の進行に寄与すると考えます。これらの発見は、卵巣癌の腫瘍微小環境への新しい洞察を提供し、好ましくない卵巣癌の免疫抑制型の表現型に対する新しい治療アプローチの開発につながる可能性があります。

研究成果の概要（英文）：Ovarian cancer is not as effective as expected for PD-1 / PD-L1 inhibitory treatment. In this study, B7H3 (CD276), the same immune checkpoint family as PD-L1, is highly expressed in non-immune-reactive ovarian cancer with low PD-L1 and is negatively correlated with the IFN signature, which reflects tumor immunoreactivity. Focused on B7H3, in a mouse model of allogeneic ovarian cancer, tumor cell B7-H3 knockout (KO) suppressed tumor progression, decreased the number of M2 macrophages, and increased the number of IFN + CD8 + T cells. Expression of CCL2 was suppressed in the B7-H3 KO tumor cell line. Expression of B7H3 was shown to induce migration and differentiation of M2 macrophages via the CCL2-CCR2 pathway.

研究分野：卵巣癌

キーワード：腫瘍微小環境

1. 研究開始当初の背景

一般的に癌の悪性器質として Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) が知られており、Mesenchymal state は予後不良と言われている。一方で CD8-T 細胞などの免疫細胞の集積を示す群は予後良好と知られている。卵巣癌で最も頻度の高い、高異型度漿液性癌 (HGSC) 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。HGSC 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の特徴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細胞がばらけて迷宮様に浸潤する像を特徴とし、Immunoreactive タイプを反映する Immune reactive (IR) タイプは腫瘍内と周辺の間質に著しい免疫細胞の浸潤を特徴とするものと定義した。MT タイプは EMT を特徴とし最も予後不良であり、IR タイプは免疫反応が著しく最も予後良好であった。独自の遺伝子発現解析から IR タイプで最も低い遺伝子が免疫チェックポイント分子 CD276 (B7-H3) であることを発見した (図1)。B7-H3 は、PD-L1 や PD-L2 と同じ B7 ファミリーに属する膜貫通型蛋白で免疫チェックポイント分子として T 細胞に対して免疫抑制効果があると報告され、腫瘍組織に高い選択性が報告されている。B7-H3 は予後不良型の HGSC において高発現となり免疫抑制環境を構築していると仮説を立てた (図2)。B7-H3 を抑制する治療は免疫抑制環境を改善し抗腫瘍免疫を活性化することで癌の増殖を抑制すると着想し研究を行った。

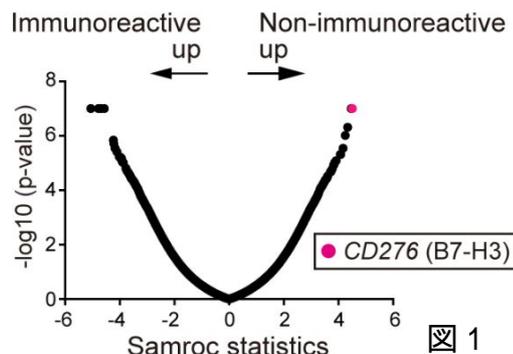


図1

2. 研究の目的

卵巣癌の治療として、従来手術や化学療法に加えて、抗 VEGF 抗体や PARP 阻害剤などの分子標的薬の登場により、無増悪生存期間は著しく延長したが、依然として過半数の症例では癌の進行が不可避である。卵巣癌において、PD-1/PD-L1 阻害をはじめとする免疫チェックポイント阻害治療は、PD-L1 が高発現する、免疫活性型の腫瘍には比較的有効であるが、大部分を占める免疫不活性型の腫瘍に対しては抵抗性を示す。このような腫瘍の免疫活性状態の違いに寄与する因子の解明、および、免疫不活性型腫瘍に対する PD-1/PD-L1 阻害を超えた新しい治療戦略が求められている。本研究では、卵巣癌の微小環境環境を標的とした治療法の開発として B7-H3 の免疫抑制に関わる機序の解明と治療ターゲットの探索を行うことを目的とした。

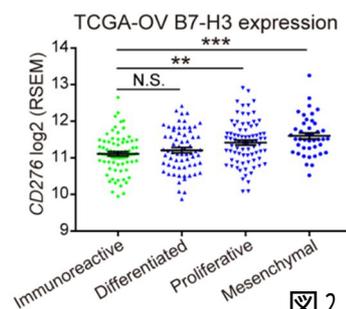


図2

3. 研究の方法

- (1) The cancer genome atlas (TCGA) の卵巣癌 HGSC の遺伝子発現データセットで、B7 ファミリーである PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, B7-H5 と、HGSC の免疫活性型、免疫不活性型の腫瘍との相関を調べた。
- (2) 免疫活性マーカーである IFN シグネチャーと PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, B7-H5 との相関を調べた。
- (3) 卵巣癌マウス自然免疫モデルの卵巣癌細胞株 HM1 で B7-H3 を CRISPR-Cas9 でノックアウト (B7-H3 KO) した細胞株をマウスの皮下に移植し、腫瘍の増殖を調べた。また T 細胞の欠損した免疫不全マウス (ヌードマウス) に皮下移植し、腫瘍の増殖を調べた。
- (4) 卵巣癌マウス自然免疫モデルの HM1 腫瘍 (B7-H3 KO とコントロール) から、免疫活性系の IFN 陽性 CD8 陽性 T 細胞の分画と免疫抑制系の M2 マクロファージ (CD206 陽性) の分画を調べた。
- (5) 卵巣癌マウス自然免疫モデルの腫瘍 (B7-H3 KO とコントロール) より RNA シークエンス解析を行い、変動遺伝子発現解析を行った。
- (6) (5) から導かれた M2 マクロファージを誘導しうる液性因子 CCL2 に着目して、腫瘍内で B7-H3 が内因性シグナル STAT3 のリン酸化を介して CCL2 の分泌を促しているかを調べた。M2 マクロファージの CCR2 受容体が腫瘍が分泌する CCL2 により分化・遊走する

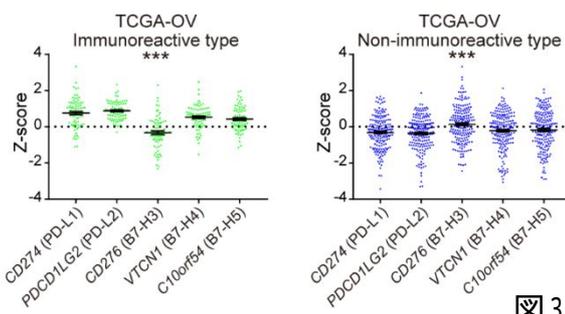


図3

か、CCL2、CCR2 阻害治療を用いて調べた。

- (7) ヒト卵巣癌において、免疫組織化学染色で、B7-H3 の高発現と、CD206 陽性 M2 マクロファージ・IFN 陽性 CD8 陽性 T 細胞の分布との相関を調べ、生存解析を行った。

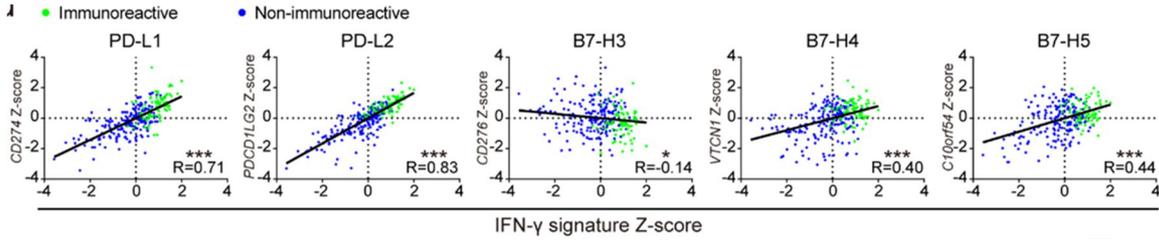
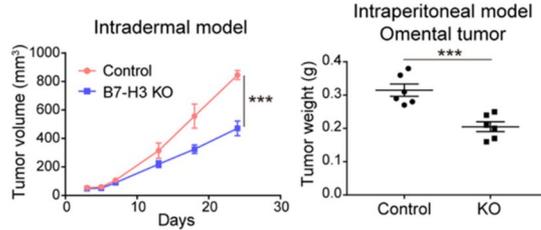


図 4

4. 研究成果

- (1) The cancer genome atlas (TCGA) の卵巣癌の公開データにおける遺伝子発現解析にて、B7-H3 は免疫活性型で低発現し、免疫不活性型の腫瘍で高発現していた。他の同属分子の発現は、免疫活性型で高発現し、免疫不活性型で低発現であった (図 3)。B7-H3 は腫瘍における免疫活性状態と他の免疫チェックポイント分子と異なる挙動が示唆された。
- (2) B7-H3 を除く、PD-L1, PD-L2, B7-H4, B7-H5 は IFN シグネチャーと明らかな正の相関を認めたのに対し、B7-H3 の発現のみが負に相関し、同属の免疫チェックポイント分子と異なる B7-H3 の免疫抑制作用を推定した (図 4)。
- (3) 免疫正常マウスにおいて、マウス卵巣癌細胞の B7-H3 をノックアウト (KO) すると、コントロール細胞と比較して、in vitro での細胞増殖には差を認めず、in vivo での腫瘍発育が緩徐になった (図 5)。免疫不全マウスにおいて両群の腫瘍発育差は見られず、B7-H3 が免疫システムを介して腫瘍の増殖に関与していることが示唆された。
- (4) 腫瘍浸潤免疫細胞の解析にて、CD8+ T 細胞数には差を認めない一方で、B7-H3 KO の腫瘍では M2 マクロファージの数が減少し、IFN + CD8+ T 細胞の数が増加し、抗腫瘍免疫の増強が確認された (図 6)。
- (5) マウス卵巣癌細胞株およびその腫瘍の RNA シークエンス解析にて、B7-H3 KO 群において単球遊走因子である Ccl2 の発現低下を認めた。CCL2 の低下は、shRNA を用いたヒト卵巣癌細胞株における B7-H3 の抑制においても確認された。

自然免疫マウスモデル



免疫不全マウスモデル

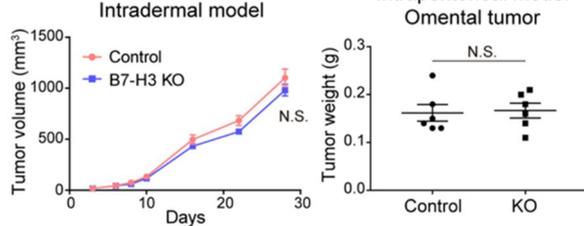


図 5

- (6) B7-H3 抑制細胞株では、核内リン酸化 STAT3 の低下を認め、それが少なくとも部分的に CCL2 の低下に関与していることが示唆された。CCL2 およびその受容体である CCR2 の阻害は、in vitro における M2 マクロファージの遊走と分化、および in vivo における M2 マクロファージの浸潤および腫瘍の進行に対する B7-H3 の作用を部分的に打ち消し、CCL2-CCR2-M2 マクロファージ経路が、B7-H3 を介した腫瘍発育促進の一部に寄与していることが示唆された (図 7)。
- (7) ヒト卵巣癌において、B7-H3 の発現は CCL2 の発現および腫瘍浸潤 M2 マクロファージ数と正の相関を認め、B7-H3 高発現群は、B7-H3 低発現群に比べて、腫瘍内の IFN + CD8+ T 細胞が少なく、予後不良であった。

フローサイトメトリー (HM-1腫瘍)

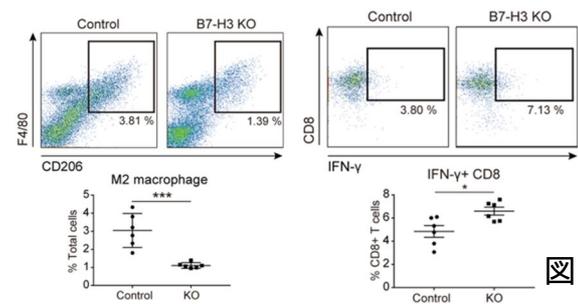
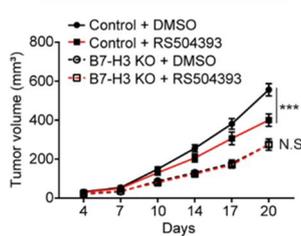


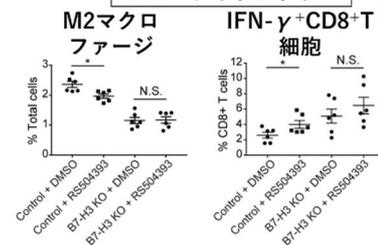
図 6

結論として、卵巣癌における B7-H3 の CCL2-CCR2-M2 マクロファージ経路による免疫抑制への関与を明らかにした。この知見は、卵巣癌の免疫学的腫瘍微小環境の理解を深めるとともに、B7-H3 が高発現し、M2 マクロファージの豊富な免疫抑制型卵巣癌に対する治療標的としての、B7-H3 の有望な可能性を示す。

HM-1皮内腫瘍モデル



フローサイトメトリー



RS504393: CCR2阻害剤
*p<0.05, ***p<0.001, N.S.: not significant

図 7

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 2件）

1. 著者名 Miyamoto Taito, Murakami Ryusuke, Hamanishi Junzo, Tanigaki Kenji, Hosoe Yuko, Mise Nathan, Takamatsu Shiro, Mise Yuka, Ukita Masayo, Taki Mana, Yamanoi Koji, Horikawa Naoki, Abiko Kaoru, Yamaguchi Ken, Baba Tsukasa, Matsumura Noriomi, Mandai Masaki	4. 巻 Jan;10(1)
2. 論文標題 B7-H3 Suppresses Antitumor Immunity via the CCL2-CCR2-M2 Macrophage Axis and Contributes to Ovarian Cancer Progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 56-69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2326-6066.CIR-21-0407	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------