

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592130

研究課題名（和文） 卵巣癌の腹腔内免疫環境と化学療法の相互作用の解析に基づいた免疫療法の構築

研究課題名（英文） immune environment in the peritoneal cavity and development of novel immune therapy in ovarian cancer

研究代表者

万代 昌紀 (MANDAI MASAKI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：80283597

研究成果の概要（和文）：

本研究では卵巣癌細胞が免疫抑制因子 PD-L1 を強発現している症例において有意に腹腔内に悪性細胞を認める頻度が高いことを見出し、この分子が免疫学的に腹腔内播種を促進している可能性を考えた。そこで、マウスの腹腔内播種モデルを用いて検討したところ PD-L1 の強制発現あるいは抑制により、CD8 の癌細胞攻撃能およびマウスの腹腔内播種モデルにおける予後に有意に関連することがわかった。卵巣癌においては腹腔内の免疫環境が播種に重要であることが示された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we hypothesized that cancer cells actively alter immune environment in the peritoneal cavity in order to disseminate. By using human ovarian cancer samples as well as mouse ovarian cancer peritoneal dissemination model, we thoroughly analyzed the association between immune environment and cancer dissemination. We found that PD-L1, an immune suppressive molecule, is expressed or induced by encountering the immune cells in the peritoneal cavity. Forced expression of PD-L1 resulted in the promotion of peritoneal dissemination, while inhibition of PD-L1 inhibited it. These results indicate that, in ovarian cancers with high PD-L1 expression, this molecule could be a therapeutic target to suppress peritoneal dissemination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
22 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
23 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：卵巣癌、腹膜播種、腫瘍免疫、PD-L1、免疫逃避機構

1. 研究開始当初の背景

婦人科悪性腫瘍の多くは化学療法に対する感受性を有しており、進行期であっても集学的治療によって寛解状態に出来る例が多い。しかしそのうちの多くが再発し治療抵抗性を示すため、長期的予後という観点では満足

しうる成績は得られておらず、従来の治療法に加えて新しい治療法の開発・導入が必要である。腫瘍免疫療法はこの点で以前から注目・期待されてきたが、いまだに確実な効果を示す方法が確立されていない。我々は、婦人科悪性腫瘍の病態、予後に対し

て腫瘍免疫がどのように関与しているかを宿主側と腫瘍側の両面からの解析を行なった結果、卵巣癌において腫瘍組織内の CD8T 細胞数が、従来の進行期や組織型とは独立した有意な予後因子となりうること、癌は COX-2 や PD-L1 といった、宿主免疫を抑制する因子を発現することで免疫からの攻撃を回避していることを見出した。すなわち、宿主において腫瘍局所での微小免疫環境は、患者の予後を左右する重要な要素であることが示され、これを積極的に改善することが治療効果を得るためには重要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究においては、これまでの成果を臨床面に展開する、という観点から卵巣癌の進展局面における局所、すなわち腹腔内の免疫環境に着目し、さらに治療面からは化学療法が局所免疫に与える影響に着目することによって、腹腔内環境の変化が癌の進展や抗癌剤感受性にどのような影響を与えるか、という観点から研究を進めた。癌が転移する際に、癌自身が EMT(上皮間葉移行)と言われる変化を起こして転移に適応する現象が最近注目されているが、転移局面で癌が局所環境にどのように働きかけているかという視点での研究は少ない。我々は上述の研究から腹腔内の免疫環境が癌の転移と密接な関係にあることを示した。そこで本研究では、『癌は腹腔内進展の際に自らを変化させるだけでなく、回りの環境、特に免疫環境を自己の生存に有利な方向に変化させつつ進展していく』という仮説に基づき、この現象を臨床サンプルおよび動物実験で証明すると同時にこれを人為的に変化させることで腹腔内進展を抑制できるかどうかを検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒト臨床サンプルを用いた検討：

この検討では、癌性腹水を要する卵巣癌患者と局所免疫との関連をさまざまな方法で解析した。まず、癌性腹水を要する患者の原発巣のパラフィン切片を免疫染色し、どのような特徴があるかを解析した。さらに当科での卵巣癌検体 70 サンプルをマイクロアレイ解析し、どのような免疫学的プロファイルを持つ症例に癌性腹水が多いかを解析した。

(2) ヒトおよびマウス卵巣癌細胞株における免疫抑制因子 PD-L1 の発現様式の解析：ヒト卵巣癌細胞株 5 種類、およびマウス 2 種類において、通常の培養条件での PD-L1 発現の有無をフローサイトメトリーで検討すると同時に、さまざまなサイトカインによってこの発現がどのように変化するかを解析した。ま

た、in vitro で免疫細胞と共培養した時に PD-L1 発現がどのように変化するかについても解析した。

(3) 腹腔内播種モデルの作成と免疫学的な解析：

マウス卵巣癌細胞 HM1 と ID8 を用いて腹腔内播種モデルを用いて、腹腔内播種に伴う局所免疫の変化を検討した。

(4) PD-L1 抑制、および強制発現系の作成と、その免疫に対する影響：

マウス卵巣癌 HM1 と ID8 を用いて shRNA および cDNA の導入により PD-L1 抑制、および強制発現系を作成した。これを用いて、in vitro での CD8T 細胞に対する免疫能の解析と、腹腔内播種モデルでの予後解析を行った。

4. 研究成果

本研究はまず、卵巣癌の腹膜播種が免疫によって影響されるか否かを検討することが目的であったが、これを示すことが出来た。さらにマウスの系で治療的にこれを応用することも示された。本研究の成果は現在、論文投稿中である。

(1) ヒト臨床サンプルを用いた検討：

免疫染色で PD-L1 発現を認めた症例は有意に癌性腹水が多かった。また、マイクロアレイ解析から、癌性腹水に関連する免疫学的因子を抽出したところ、PD-L1 はその上位にあり、また、癌性腹水陽性例と陰性例では陽性例で有意に PD-L1 発現が高かった。

(2) ヒトおよびマウス卵巣癌細胞株における免疫抑制因子 PD-L1 の発現様式の解析：

フローサイトメトリーで PD-L1 の発現は、最初から認められるもの、最初は認めないが IFN- γ 添加によって認めるもの、まったく認めないものに分かれた。前 2 者では IFN- γ 添加によって PD-L1 発現は増強したが、その他のサイトカイン添加では変化しなかった。さらに、CD8T 細胞と共培養したところ、PD-L1 発現は増強した。

(3) 腹腔内播種モデルの作成と免疫学的な解析：

腹腔内播種に伴い、腹腔内には CD8T 細胞が多量に浸潤し、その多くは IFN- γ 陽性の活性化 T 細胞であった。一方、腫瘍は、in vitro では陰性あるいは弱陽性であった PD-L1 が腹水中では強発現していることが示された。

(4) PD-L1 抑制、および強制発現系の作成と、その免疫に対する影響：

in vitro における CD8T 細胞による傷害アッセイでは PD-L1 抑制株では CD8T 細胞傷害に

感受性となり、一方、強制発現系では CD8T 細胞傷害に抵抗性となった。in vivo における腹膜播種モデルでは PD-L1 抑制株ではマウスの生存が有意に延長し、強制発現系では有意に短縮した。

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 4 件)

1. 万代昌紀、濱西潤三、安彦郁、松村謙臣、馬場長、小阪謙三、吉岡弓子、小西郁生
卵巣癌の播種・進展と免疫環境との関連分子を標的とした治療法の開発
産婦人科の実際、61:201-205、2012、査読有、

2. Yamamura S, Matsumura N, Mandai M, Huang Z, Oura T, Baba T, Hamanishi J, Yamaguchi K, Kang HS, Okamoto T, Abiko K, Mori S, Murphy SK, Konishi I.
The activated transforming growth factor-beta signaling pathway in peritoneal metastases is a potential therapeutic target in ovarian cancer.
Int J Cancer.2012 Jan 1;130(1):20-8.査読有、doi: 10.1002/ijc.25961

3. Hamanishi J, Mandai M, Abiko K, Matsumura N, Baba T, Yoshioka Y, Kosaka K, Konishi I
The comprehensive assessment of local immune status of ovarian cancer by the clustering of multiple immune factors.
Clin Immunol. 2011 Dec;141(3):338-47.査読有、PMID: 21955569

4. Hamanishi J, Mandai M, Matsumura N, Baba T, Yamaguchi K, Fujii S, Konishi I.
Activated local immunity by CC chemokine ligand 19-transduced embryonic endothelial progenitor cells suppresses metastasis of murine ovarian cancer.
Stem Cells. 2010 Jan;28(1):164-73. 査読有、PMID: 19911426

[学会発表] (計 3 件)

1. 免疫抑制因子 PD-L1 は卵巣癌の免疫逃避機構を介して腹膜播種を促進する。
安彦郁、万代昌紀、濱西潤三、吉岡弓子、馬場長、松村謙臣、山口建、Budiman Kharna、奈倉道和、天野泰彰、小阪謙三、小西郁生

日本産科婦人科学会 2012.4.13-15 神戸

2. Assessment and manipulation of local tumor immunity in ovarian cancer management

Masaki Mandai, Junzo Hamanishi, Kaoru Abiko, Noriomi Matsumura, Tsukasa Baba, Ken Yamaguchi, Kenzo Kosaka, Ikuo Konishi

日本癌学会 2011.10.3-5 名古屋

3. 進行卵巣癌に対する化学療法によって、腫瘍局所の免疫状態が変化する。

濱西潤三、万代昌紀、安彦郁、松村謙臣、馬場長、山村省吾、吉岡弓子、岡本尊子、姜賢淑、奈倉道和、小阪謙三、小西郁生
日本産科婦人科学会 2011.8.29-31 大阪

6. 研究組織

(1)研究代表者

万代 昌紀 (MANDAI MASAKI)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：80283597

(2)研究分担者

小西 郁生 (KONISHI IKUO)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：90192062

松村 謙臣 (MATSUMURA NORIOMI)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：20452336