

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592347

研究課題名(和文)尿路上皮癌に対する免疫抑制物質IDOを用いた新規免疫療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel immunotherapy targeting immunosuppressant IDO in urinary tract cancer

研究代表者

原 勲(Hara, Isao)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10263378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：進行性尿路上皮癌患者のパラフィンブロック標本を用いてIDOの発現を免疫組織学的手法により調べたが、有意な発現は認められなかった。このため腎細胞癌で検討を行った。腫瘍内血管にIDOの発現を確認したため定量的PCRを用いてIDOの発現を検討した。腎細胞癌患者52例においてIDOの発現を調べたが病理組織学的因子あるいは予後との関連について相関は認められなかった。IDOのcDNAを組み込んだ発現ベクターを用いてマウス卵巣癌腫瘍細胞株に強制発現させた株を樹立した。母細胞であるHM-1と比較して腹腔内での腫瘍の発育は早く腫瘍内に浸潤するCD8 T cellやNK cellは有意に少なかった。

研究成果の概要(英文)：We measured IDO expression level in patients with metastatic bladder cancer. However, no significant expression of IDO was observed in these patients. Then we measured IDO expression in patients with renal cell carcinoma. IDO was expressed in tumor vessels. In order to quantify the level of IDO expression, we performed quantitative PCR. We analyzed the expression level of IDO in 52 patients who underwent radical nephrectomy due to renal cell carcinoma. However, we could not find any significant correlation between IDO expression level and clinic-pathological features in these patients. Next we established stable transformant ovarian cancer cell line expressing IDO by gene transduction. When this IDO over expressing cell line was inoculated into peritoneal cavity, they grew quickly comparing with parental cell line. Significant reduce of CD8 T cells and NK cells in tumor site was observed.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腫瘍免疫 腎細胞癌 卵巣癌

1. 研究開始当初の背景

腫瘍が生体内で増殖・進展するメカニズムの1つとして、癌細胞が特異的に誘導する免疫寛容システム、宿主免疫細胞の攻撃からの回避が重要でありこれを制御する key molecule の一つが IDO (Indoleamine 2,3-dioxygenase) であることが知られている。IDO は必須アミノ酸であるトリプトファン代謝酵素で、1998年に胎盤に発現して妊娠維持の母子免疫寛容機構に働くことがはじめて報告された。その後の研究で IDO は局所のトリプトファン濃度を低下させ、キヌレニンなどの毒性代謝産物を産生することにより、T 細胞や NK 細胞の増殖や機能を抑制することが明らかにされた。2003年になって悪性腫瘍にも IDO が発現し、IDO が腫瘍抗原に対する免疫寛容を誘導し腫瘍進展に関与することがマウスにおいて報告され癌の分野で初めて脚光をあびた。さらに IDO が腫瘍免疫における抑制系の主役である制御性 T 細胞 (Treg) を直接的に活性化することがマウスにおいて報告された。IDO と Treg は腫瘍微小環境内 (Effector phase) と所属リンパ節 (Priming phase) の両者の場において、協調しながら免疫寛容のネットワークを形成する可能性が考えられる。

研究分担者である井篁は産婦人科領域の悪性腫瘍における IDO の役割について研究を推進してきた。すなわち免疫組織学的検討により子宮体癌 80 例において腫瘍細胞に発現する IDO が独立した予後因子になることを発表した (Ino et al. Br J Cancer 2006)。また IDO cDNA を子宮体癌細胞に導入してヒト IDO 過剰発現 stable clone を樹立した。過剰発現株は in vitro での増殖能・遊走能・抗癌剤感受性に関して母細胞との間で変化を示さないものの、ヌードマウスに移植した際には増殖は著明に亢進し、NK 活性は抑制されていた (Yoshida et al. Clin Cancer Res 2008)。さらに IDO の阻害剤である 1-methyl-tryptophan (以下 1-MT と略す) を抗癌剤と同時に投与することにより IDO 過剰発現株の増殖を抑制することが可能であった。

一方、尿路生殖器腫瘍は膀胱癌に対する BCG 免疫療法や腎細胞癌に対する IL2、IFN 療法など腫瘍免疫療法が奏功する癌腫が少なくない。尿路生殖器腫瘍では腫瘍免疫が関与していると思われるが、IDO の意義に関しては現在までにほとんど明らかにされていないため本研究では尿路生殖器腫瘍における IDO の意義を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究の目的の一つは尿路生殖器癌における IDO の発現と臨床病理学および予後との関係を考察することであり、もう一つは IDO の遺伝子導入による IDO 強制発現

株を作成することにより IDO の腫瘍免疫学的意義を考察することである。

申請者は当初、転移性膀胱癌をモデルとして IDO の発現を免疫組織学的に定量し予後との関連を解析する予定であったが、実験の結果膀胱癌においては有意な IDO の発現を認めることができなかった。そこで研究対象を膀胱癌から腎細胞癌へ変更して研究を行った。免疫組織染色および定量的 PCR 法にて腎細胞癌における IDO の発現を検索した。IDO 過剰発現細胞株の樹立に関しては共同研究者の井篁らが、卵巣癌細胞株を対象として行った。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織学的手法による IDO 発現の定量

パラフィンブロック標本を用いて IDO の発現を免疫組織学的手法により調べる。IDO に対する抗体は研究協力者である産婦人科の井篁教授を通じて国立長寿医療センターの滝川修博士より供与していただいた。IDO の発現と病理組織学的所見との関連および抗癌化学療法における抗腫瘍効果、無増悪生存率、全生存率との関連について解析を加える。さらに同一の切片で腫瘍浸潤リンパ球を染め分けることにより IDO が局所の免疫担当細胞に与える影響についても検討を加える。

(2) 定量的 PCR 法による IDO 発現の定量
腎細胞癌の凍結手術検体 52 例を対象とした。凍結標本から RNAeasy Plus Mini (Qiagen) を用いて RNA を精製した。抽出 RNA は Super Script VILO cDNA Synthesis Kit を用いて cDNA を作成した。TaqMan Gene Expression Assay を用いて IDO1 に対する primer で定量的な PCR を行った。内在性のコントロールとして beta actin に対する primer を用いた。各増殖曲線における CT 値を決定し beta actin の CT 値から補正して IDO の発現量を相対的に求めた (delta CT 法)。

(3) IDO 過剰発現卵巣癌細胞株の樹立

卵巣癌細胞株である OV2944-HM-1 に遺伝子導入を行った。IDO の cDNA を有したほ乳類発現ベクターを膀胱癌細胞株に導入し G418 による薬剤選択を行ったのち、複数の遺伝子導入クローンを得る。これらの中からウエスタンブロッティング法により IDO の発現に関するスクリーニングを行い、IDO 過剰発現細胞株を選択する。また培養上清中のトリプトファンとキヌレインの濃度を HPLC 法にて測定して IDO の生理活性を確認する。IDO 過剰細胞発現株に関して母細胞との比較を行う。In vitro において細胞の増殖能を検討し、In vivo モデルにおいて腫瘍の増殖、腹水の形成について検討した。

4. 研究成果

(1) 膀胱癌における IDO の発現 (免疫組織学的検討)

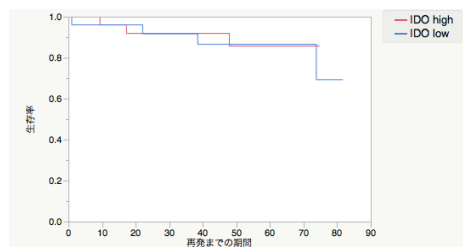
転移を有する膀胱癌患者から得られた経尿道的膀胱腫瘍切除時のパラフィンブロックを用いて IDO の発現を免疫組織学的に検討した。残念ながら膀胱癌においては全検体において IDO の有意な発現を認めることができなかった。さらに筋層非浸潤性膀胱癌の手術検体を用いて同様の検討を行ったが IDO の発現を認めることはできなかった。

(2) 腎細胞癌における IDO の発現 (免疫組織学的検討)

膀胱癌においては IDO の発現を認めなかったため対象臓器を腎細胞癌に切り替えて同様の検討を行った。2007 年に腎細胞癌において IDO の発現を検討した報告があり (Riesenberg et al. Clin Cancer Res 2007)、その結果では腫瘍内血管において IDO の発現の強弱を認め、IDO 陽性の腫瘍血管を含む患者では予後不良であったとの報告があった。我々も腎細胞癌組織内での腫瘍血管において IDO の発現を認めたが発現の強弱に関して定量的な測定を行うのが困難であったため定量的 PCR を行うこととした。

(3) 腎細胞癌における IDO の発現 (定量的 PCR)

予後情報を有する腎細胞癌患者 52 例の腎摘出術時の凍結標本から RNA の抽出を行い、Gene expression assay を用いて定量的に IDO の発現を測定した。IDO の発現量は内在性コントロールである beta actin との相対的な発現量にて表した。腎細胞癌患者 52 例の内訳は男性: 29 例、女性: 23 例、年齢の中央値は 64.6 歳であった。臨床病期は Stage I: 33 例、Stage II: 5 例、Stage III: 8 例、Stage IV: 5 例であった。観察期間の中央値は 51.7 ヶ月、7 例に再発を認め、癌死が 2 例、他因死が 5 例であった。IDO の腎摘出時の Stage との関連につき検討したが有意な傾向は認められなかった ($p=0.8986$)、さらに IDO の発現を中央値で区切り高発現群と低発現群とに分けて非再発率を比較した。Kaplan Meier 法にて再発曲線を描き、ログランク法にて検定したが両者に有意な差は認められなかった ($p=0.7925$ 図)。



(4) 卵巣癌細胞株での IDO 強制発現株の樹立
IDO cDNA を含んだ発現ベクターをマウ

ス卵巣癌細胞株である OV2944-HM-1 に遺伝子導入を行い、IDO を過剰に発現する細胞株を樹立した (HM-1-IDO)。HM-1-IDO は in vitro での細胞増殖能に変化はなかったが、同系マウスの腹腔内に接種すると母細胞である HM-1 と比較して生存期間は短かった。腹腔内での腫瘍容積、癌性腹水の量はともに IDO 過剰発現株で有意に多かった。また腫瘍内に浸潤する CD8 T cell や NK cell は IDO 過剰発現株で有意に少なく、腹水中の TGF beta や IL10 の濃度は有意に高かった。

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 1 件)

Tanizaki Y, Kobayashi A, Toujima S, Shiro M, Mizoguchi M, Mabuchi Y, Yagi S, Minami S, Takikawa O, Ino K. Indoleamine 2,3-dioxygenase promotes peritoneal metastasis of ovarian cancer by inducing an immunosuppressive environment. Cancer Sci. 2014 Aug;105(8):966-73. (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 勲 (HARA, Isao)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 1 0 2 6 3 3 7 8

(2)研究分担者

井籠 一彦 (INO Kazuhiko)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号： 6 0 3 0 3 6 4 0

(3)連携研究者

松村 永秀 (MATSUMURA, Nagahide)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号： 3 0 3 1 6 1 0 3

児玉 芳季 (KODAMA, Yoshiki)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号： 9 0 3 4 7 5 8 4