

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592459

研究課題名(和文) 卵巣癌腹膜播種における免疫寛容誘導機序の解明と新規標的免疫療法の開発

研究課題名(英文) Mechanisms of tumor-induced immune tolerance during the process of peritoneal dissemination of ovarian cancer

研究代表者

井筒 一彦 (Ino, Kazuhiko)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60303640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)はトリプトファン代謝酵素であり免疫抑制作用を有する。本研究では卵巣癌進展におけるIDOの役割を解明する。マウス卵巣癌細胞株HM-1にIDO遺伝子を導入し、IDO過剰発現株(HM-1-IDO)を確立し、HM-1-IDOおよびmockをマウスに腹腔内移植した。移植後day14における腹膜播種腫瘍重量、腹水量はHM-1-IDO移植マウスで有意に増加し、腫瘍内浸潤CD8+T-cell, NK cellの有意な減少を認め、腹水中TGF-betaの有意な上昇を認めた。IDOは微小環境内において免疫寛容誘導を介して卵巣癌の進展を促進する。

研究成果の概要(英文)：Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is a tryptophan-catabolizing enzyme that has immunoregulatory functions. The purpose of the present study is to clarify the role of IDO during the process of peritoneal dissemination of ovarian cancer. IDO-cDNA was transfected into the murine ovarian carcinoma cell line HM-1, establishing IDO-overexpressing cells (HM-1-IDO). HM-1-IDO or mock were intraperitoneally transplanted into syngeneic immunocompetent mice. HM-1-IDO-transplanted mice showed significantly shortened survival, and increased tumor weight and ascites with the significantly reduced numbers of CD8+ T cells and NK cells within tumors as well as increased levels of TGF-beta in ascites. These data show that tumor-associated IDO promotes the peritoneal dissemination of ovarian cancer through suppression of tumor-infiltrating T and NK-cell recruitment and enhancement of immunosuppressive cytokines in ascites, thus IDO may be a promising molecular target for the therapeutic strategy of ovarian cancer.

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 腫瘍免疫 免疫寛容 腹膜播種 マウスモデル 酵素

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌はその半数以上が初回手術時に腹膜播種を伴う advanced stage である。これらの進行症例に対する治療の主役は腫瘍減量手術に引き続く化学療法であるが、多くの臨床試験にもかかわらず、近年長期予後の改善は見られていない。従ってさらなる予後改善のためには、有害事象を高めずに且つ化学療法と組合せてその効果を促進し得る新規治療戦略が求められており、その中で卵巣癌に対する新たな免疫療法の開発が脚光を浴びつつある。

癌が増殖・進展するためには腫瘍微小環境内での宿主免疫監視機構からの逃避、すなわち免疫寛容の獲得が必須である。従って腫瘍が特異的に誘導する免疫寛容システムを解明し、これを打破する治療戦略は、従来の免疫療法や化学療法の有効性を飛躍的に高める可能性があるが、卵巣癌における免疫寛容機序の詳細は未だ明らかでない。

Indoleamine 2,3-dioxygenase(IDO)はトリプトファン代謝酵素であり、免疫抑制作用を有する。我々はこれまでの研究にて、卵巣癌に高頻度に IDO が発現し、Stage や患者生存率に有意に相関することを報告してきた。また手術検体による免疫組織化学的解析により、IDO の発現量は腫瘍内に浸潤する T 細胞数と逆相関し、腫瘍の進展や不良な予後に関与している可能性を示した。しかしながら卵巣癌における IDO を中心とした腫瘍免疫寛容誘導メカニズムとその役割については十分な検討がなされておらず、これらの解明とこれを標的とする新たな治療戦略が期待されている。

2. 研究の目的

本研究においては、(1)マウス卵巣癌 IDO 過剰発現細胞株の確立と characterization、(2) IDO のマウス卵巣癌進展への寄与とそのメカニズムの解明、(3) IDO に対する特異的阻害剤の抗腫瘍効果の検討の 3 つを行い、進行卵巣癌に対する新たな標的治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) IDO 過剰発現マウス卵巣癌細胞株の生物学的特性の検討

マウス IDO 遺伝子をマウス卵巣癌細胞株 0V2944-HM-1(以後 HM-1 と略す)に導入し、安定化マウス卵巣癌 IDO 過剰発現細胞株を樹立する。本細胞株の *in vitro* における behavior をコントロールベクター導入株(mock)と比較する。

(2) IDO の腹膜播種促進効果の有無の検討

HM-1 mock、IDO 過剰発現株(HM-1-IDO) 1×10^6 個/body を B6C3F1 マウス(,6 週齢)に腹腔内投与し、至適ポイントで Sacrifice し、腹水量、腹膜播種の合計腫瘍重量を計測する。また両群におけるマウスの生存期間を解析する。

(3) 腫瘍内浸潤する免疫細胞への影響の検討

上記(2)の *in vivo* 実験の条件下において、腹腔内の播種腫瘍を摘出しホルマリン固定後切片を作成し、病理組織学的検討を行い、同時に腫瘍内に浸潤する宿主免疫細胞の免疫組織化学染色を行い、カウントし定量化する。

(4) ID0 の腹水中の免疫関連サイトカイン産生に与える影響の検討

同様に上記(2)の条件下において、腹水中のサイトカイン (TGF-beta, VEGF, IL-10, IL-6) を ELISA で測定し、比較検討する。

(5) ID0 阻害剤の抗腫瘍効果および抗癌剤との併用治療効果の検討

ID0 過剰発現させた HM-1 細胞を B6C3F1 マウスに腹腔内移植し ID0 阻害剤 1-methyltryptophan(1-MT)を連日経口投与または隔日腹腔内投与し、day10, day14 の播種腫瘍重量、腹水量およびマウス生存期間を比較する。

4. 研究成果

(1) マウス卵巣癌 ID0 過剰発現細胞株 (HM-1-ID0)の特性

HM-1-ID0 は in vitro での培養上清中のトリプトファンの枯渇、代謝産物キヌレニンの著増という high level の ID0 酵素活性を有することを確認した。

in vitro の培養系における 72 時間までの細胞増殖能および細胞遊走能について HM-1-ID0 は mock と有意差を認めなかった。培養中の細胞形態学的にも有意な差は認めなかった。

(2) マウス卵巣癌腹膜播種モデルにおける ID0 過剰発現の腫瘍促進効果

ID0 過剰発現株移植マウスにおいて、day14 における開腹所見は mock 移植マウスに比較して肉眼的に著明な腹膜播種、腹膜肥厚を認め、病理組織学的にも癌細胞の腹膜浸潤の有

意な増加をみた。day10、day14 の腹膜播種腫瘍重量および腹水量は、ともに mock 移植マウスに比較して有意に増加した。

(3) ID0 による腫瘍微小環境内および腹腔内の免疫寛容誘導作用

上記(2)の実験において、播種腫瘍の免疫組織化学解析を行ったところ、ID0 過剰発現株移植マウスは、mock 株移植マウスに比較して、腫瘍内浸潤 CD8+T 細胞および NK 細胞の有意な低下を認めた。さらに、ID0 過剰発現株移植マウスは、mock 株移植マウスに比較して、腹水中の免疫抑制性サイトカインである TGF-beta, IL-10 の有意な増加を認めた。IL-6, VEGF については有意な差は認めなかった。

(4) ID0 阻害剤の抗腫瘍効果および抗癌剤との併用治療効果の検討

ID0 阻害剤 1-MT(4mg/body)を隔日腹腔内投与して腫瘍進展に対する治療効果を検討した。D-1-MT の投与群においてコントロール群と比較して day14 の有意な播種重量低下および腹水量の減少を認めた。L-1MT 単独群では有意な抗腫瘍効果を得られなかった。

(5) まとめと考察

免疫寛容を誘導する ID0 が卵巣癌の癌性腹膜炎の促進に関与し、分子標的治療の候補に成り得るといふ仮説を証明するため本研究を行ってきた。我々は過去にヒト卵巣癌 ID0 過剰発現株を用いてヌードマウスの系で ID0 の機能解析をしてきたが、T-cell 系免疫が欠損しているというデメリットがあり、大きな障

壁、limitation となってきた。今回、世界で初めてマウス卵巣癌細胞HM-1にIDOを過剰発現させた細胞を確立し、immunocompetentなB6C3F1マウスへの腹腔内移植が可能になり、マウス卵巣癌腹膜播種モデルを確立し得たことは、今後のIDOの腫瘍進展に寄与するメカニズムの解明やIDO阻害剤の抗腫瘍効果を検討するための基盤作りとしてたいへん有意義であった。本研究において、我々は、IDO過剰発現株移植マウスにおいて、腹膜播種腫瘍重量および腹水量の有意な増加を認め、腫瘍由来のIDOが腫瘍微小環境内において免疫寛容を誘導し、卵巣癌の腹膜転移を促進していることを見いだした。また過剰発現株移植マウスの生存期間が有意に短いことは、ヒトの臨床検体を用いた過去のstudyにおいて、IDO高発現患者の予後が不良である結果をサポートするものであるといえる。IDO阻害剤1-MTを用いたマウスモデルにおけるにおいては、腫瘍の有意な減少を認め、IDOを標的とする卵巣癌の新たな治療戦略の可能性を示唆した。

5. 主な発表論文等

「雑誌論文」(計6件) <すべて査読あり>

(1) 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 via inducing immunosuppressive environment. *Cancer Sci*. 2014 May 14. doi: 10.1111/cas.12445. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24826982.

(2) Tanizaki Y, Kobayashi A, Shiro M, Ota N, Takano R, Mabuchi Y, Yagi S, Minami S, Terada M, Ino K. Diagnostic value of preoperative SUVmax on FDG-PET/CT for the detection of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2014 Mar;24(3):454-60. doi: 10.1097/IGC.000000000000074. PubMed PMID: 24463640.

(3) Yasuoka H, Tsujimoto M, Ueda M, Kodama R, Iwahashi Y, Inagaki M, Mabuchi Y, Ino K, Sanke T, Nakamura Y. Monoclonality of composite large-cell neuroendocrine carcinoma and invasive intestinal-type mucinous adenocarcinoma of the cervix: a case study. *Int J Gynecol Pathol*. 2013 Jul;32(4):416-20. doi: 10.1097/PGP.0b013e318261c35b. PubMed PMID: 23722515.

(4) Yasuoka H, Tsujimoto M, Inagaki M, Kodama R, Tsuji H, Iwahashi Y, Mabuchi Y, Ino K, Sanke T, Nakamura Y.

Clinicopathological significance of podocalyxin and phosphorylated ezrin in uterine endometrioid adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2012 May;65(5):399-402. doi: 10.1136/jclinpath-2011-200359. Epub 2012 Mar 12. PubMed PMID: 22412054.

(5) Ino K, Shibata K, Yamamoto E, Kajiyama H, Nawa A, Mabuchi Y, Yagi S, Minami S,

Tanizaki Y, Kobayashi A, Kikkawa F. Role of the renin-angiotensin system in gynecologic cancers. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011 May;11(4):405-11. Review. PubMed PMID: 21395551.

(6) Ino K. Indoleamine 2,3-dioxygenase and immune tolerance in ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2011 Feb;23(1):13-8. doi: 10.1097/GCO.0b013e3283409c79. Review. PubMed PMID: 20930628.

[学会発表] (計4件)

(1) Aya Kobayashi, Yuko Tanizaki, Saori Toudjima, Tamaki Yahata, Madoka Yamamoto, Michihisa Shiro, Nami Ota, Yasushi Mabuchi, Shigetaka Yagi, Sawako Minami, Toshikazu Kondo, Kazuhiko Ino. Suppression of STAT1 signal pathways reduces ovarian cancer progression. The 3rd ASGO / The 55th JSGO 2013, December 13-15, Kyoto.

(2) Yuko Tanizaki, Aya Kobayashi, Saori Toudjima, Tamaki Yahata, Madoka Yamamoto, Michihisa Shiro, Nami Ota, Yasushi Mabuchi, Shigetaka Yagi, Sawako Minami, Toshikazu Kondo, Kazuhiko Ino. Pivotal roles of CX3CL1-CX3CR1 axis on host cells in ovarian cancer progression. The 3rd ASGO / The 55th JSGO 2013, December 13-15, Kyoto.

(3) 谷崎優子、小林彩、東嶋左緒里、山本円、馬淵泰士、八木重孝、岩橋正明、南佐和子、井籠一彦。免疫寛容を誘導する Indoleamine 2,3-dioxygenase は卵巣癌腹膜播種を促進し、

新規標的治療の候補分子になり得る。第11回婦人科がん分子標的研究会。2012年6月。日光。

(4) 谷崎優子、小林彩、山本円、馬淵泰士、岩橋正明、南佐和子、井籠一彦。免疫寛容誘導分子 IDO は卵巣癌腹膜播種を促進する。第64回日本産科婦人科学会、2012年4月、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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：60303640

(2) 研究分担者

馬淵 泰士 (MABUCHI Yasushi)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80382357

