

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592464

研究課題名(和文) 卵巣癌における間質細胞・間葉系幹細胞による免疫抑制機構の解明と克服法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of immunosuppression by stromal cells and mesenchymal stem cells in ovarian cancer

研究代表者

岩田 卓 (Iwata, Takashi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30296652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：がん微小環境における間葉系幹細胞(MSC)の免疫学的役割を解析した。マウス腫瘍組織中には、骨髄MSCと同様のマーカーを発現する間質細胞が存在し、マーカーを発現していない細胞と比較し、VEGF、IL10、COX2、MCP-1など免疫抑制分子が高発現していた。また、がん所属リンパ節中にもMSCが存在し、他のリンパ節中のMSCに比べ、MHC class IIの発現が低かった。さらにヒト腫瘍組織中にも、骨髄MSCと同様のマーカーを発現する間質細胞が存在した。以上より担癌生体では、腫瘍局所や所属リンパ節内でMSCが免疫抑制を誘導している事、MSCが免疫抑制解除のための治療標的となりうる事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the immunological role of mesenchymal stem cells (MSC) in the cancer microenvironment. In xenografted mouse model, stromal cells expressing markers similar to bone marrow MSC were infiltrated in tumor tissues, and these stromal cells were highly expressed immunosuppressive molecules such as IL10, COX2, MCP-1 VEGF, compared to cells not expressing MSC marker. Further, MSC were also present in the regional lymph nodes and these MSC were expressed lower level of MHC class II than those existed in nonregional lymph nodes. We also detected stromal cells expressing markers similar to bone marrow MSC in human tumor tissue. These results indicated that immunosuppressive microenvironment was induced by MSC in tumor and regional lymph nodes of cancer patients, and the MSC may be a therapeutic target for restoration of immunosuppressive environment.

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：間葉系幹細胞 免疫抑制 がん微小環境

### 1. 研究開始当初の背景

癌に対する新たな治療として免疫療法が注目され、最近では我が国でも多くの臨床試験が実施されている。しかしながらその奏効率は低く、最も免疫療法が有効とされるメラノーマにおいてさえ、免疫療法で PR, CR を得られたものは 1.5% とされてきた (Rosenberg, S.A. et al.: Nature Med., 10:909-915, 2004.)。一方、Dudly らは放射線療法で骨髄抑制を行った後、養子免疫療法を行なうことで RECIST 基準で奏効率 72% という劇的な奏効率をメラノーマで報告している (Dudley ME et al. J Clin Oncol 26 5233-9 2008)。この機序として、骨髄抑制により抑制性 T 細胞 (Treg) などが抑制され、腫瘍の免疫逃避機構が解除されたためと考えられている。これらのことから、免疫療法においては免疫逃避の解除が劇的な奏効率向上をもたらす重要な因子であると認識されている。

申請者は、これまでに卵巣癌における免疫抑制機構を研究し報告してきた。一つは、卵巣癌における免疫抑制性分子 PDL-1 の発現機序であり、PDL-1 が MAPK 経路によって発現が誘導されること、また MAPK 阻害薬により癌細胞での PDL-1 発現が顕著に低下し、細胞障害性 T 細胞 (CTL) による殺細胞効果が高まることを報告した (第 39 回日本免疫学会 2009 年 12 月)。また、卵巣癌では免疫抑制サイトカイン IL6 が高発現することで免疫抑制性の骨髄由来抑制細胞 (MDSC) が誘導されることを報告し、NF- $\kappa$ B 阻害剤で免疫抑制が解除されることを卵巣癌モデルマウスを用いて示した (第 63 回日本産科婦人科学会総会学術集会 2010 年 4 月発表予定)。これらの成果は今後、論文発表の上、卵巣癌に対する免疫療法の補助療法として薬剤の開発に結び付くと期待できる。

以上のこれまでの卵巣癌の免疫逃避に関する研究は癌細胞自身に着目し行ってきた。一方、癌組織は癌細胞と間質から構成されるが、近年、間質が癌の増殖・浸潤・転移に深くかかわり、さらに免疫抑制作用を有することが報告されている。今回、我々は癌の免疫逃避にかかわる間質の役割について注目した。

癌間質の起源としては (1) もともとの発生組織の間質が変化し (2) 骨髄由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) が生着・分化し (3) 癌細胞からの上皮間葉変換 (EMT) などの説がある。このうち、(2) の MSC については最近、腫瘍間質細胞には MSC が多く存在し、癌細胞の転移など、がんの進展に関与することが実際に報告された (Stem cells 26 ;2523 2008, Nature 449 2007)。また、以前から培養された MSC には免疫抑制作用を有することが判明しており、これを利用して造血幹細胞移植時の急性 GVHD の治療を目的に培養 MSC 投与の臨床試験が行われている (Lancet 37;1579 2008)。これらのことから、癌間質に取り込まれた MSC が免疫抑制

を誘起し、癌の免疫逃避に関与していると考えられるが、癌組織中の MSC の免疫細胞に与える影響についてはいまだ報告がなされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、癌間質の由来の一つとされる骨髄由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) に着目し、間質細胞と免疫細胞、癌細胞の三者の相互作用を分子・細胞レベルで解析し、癌微小環境における間質細胞の意義を腫瘍免疫学的見地から解明することを目的とする。担癌モデルマウスにおいて、移植前 MSC と移植後に癌組織に遊走した MSC を分離し、in vitro 実験および in vivo モデル実験で、MSC が DC、マクロファージ、CTL、制御性 T 細胞などの免疫細胞へ与える影響を解析する。同様の結果がヒトでも得られるか、婦人科癌組織より MSC を分離して検討する。これらの結果に基づいて、癌細胞、MSC、免疫細胞の相互作用をとその機序を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウスがん細胞株

マウスがん細胞株 A に対してレンチウイルスベクターを用いて dsRed 遺伝子を恒常的に発現させた。作製した癌細胞株は、RPMI1640 + 10% FCS で培養した。

#### (2) 腫瘍中のヒト MSC の分離

ヒトの婦人科癌組織は、倫理委員会の承認のもとで、患者より了承を得て、手術時に採取した。腫瘍組織はコラゲナーゼ処理後、2% FCS/PBS に懸濁し二種類のマーカに対する抗体で染色後、Gallios (ベックマン・コールター社) を用いて解析した。

#### (3) マウスモデル

EGFP マウスの側腹部に dsRed 遺伝子導入マウスがん細胞株 A を  $3-5 \times 10^5$  個皮下に移植し、約 3 週間後に腫瘍組織を摘出し、コラゲナーゼ処理をした。また、リンパ節を分離し、はさみで細かく砕き、ナイロンメッシュを用いて debris を除去した。得られた、細胞は、2% FCS/PBS に懸濁し、APC-Cy7 標識-抗 CD45 抗体、APC-Cy7 標識-抗 TER119 抗体、PC-7 標識-抗 Sca1 抗体、APC 標識-抗 PDGFR $\alpha$  抗体、PE 標識-抗 I-Ab 抗体で染色し、腫瘍組織中、リンパ節内の PaS 細胞を Gallios で解析もしくは、セルソーターを用いて分離した。

#### (4) qPCR

細胞より、RNeasy (Qiagen 社) を用いて、RNA を分離し、ReverTra Ace $\text{®}$  qPCR RT Master

Mix(TOYOBO 社)を用いて逆転写反応を行い cDNA を得た。各種遺伝子の発現量を TaqMan アッセイ(Applied biosystems 社)を用いて定量した。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウス腫瘍組織中には MSC のマーカーを発現する間質細胞が存在する。

マウス癌細胞株 A に dsRed 遺伝子を導入し、癌細胞を蛍光標識した。この腫瘍を GFP マウスに皮下移植し、腫瘍組織間質内の GFP+, dsRED-, CD45-, TER119-, PDGFR $\alpha$ +, Sca1+細胞(P $\alpha$ S 細胞)を腫瘍浸潤 MSC として単離することを試みた。この際 MSC を染色する抗体の蛍光標識の様々な組み合わせを検討した結果、APC-Cy7 標識-抗 CD45 抗体、APC-Cy7 標識-抗 TER119 抗体、PC-7 標識-抗 Sca1 抗体、APC 標識-抗 PDGFR $\alpha$  抗体で染色することにより、腫瘍組織内より PDGFR $\alpha$ +, Sca1+細胞を単離、培養する事に成功した(図 1)。

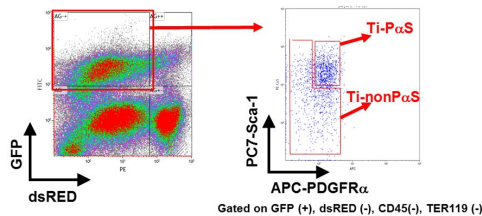
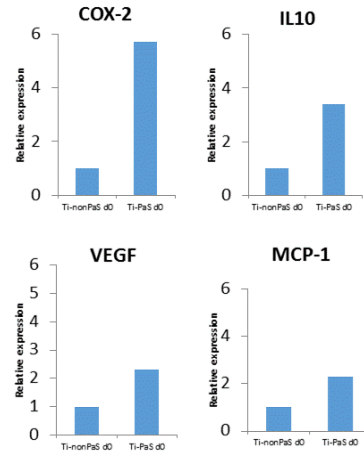


図 1 EGFP マウスに dsRED を発現するマウスがん細胞を移植した。腫瘍組織中の、GFP(+), dsRED(-), CD45(-), TER119(-)の分画には MSC のマーカーを発現する細胞集団が存在する。

##### (2) 腫瘍組織中に存在する MSC は免疫抑制的である。

GFP+, dsRED-, CD45-, TER119-で、PDGFR $\alpha$ +, Sca1+ の分画を腫瘍浸潤 P $\alpha$ S(Ti-P $\alpha$ S)細胞として、それ以外の分画を Ti-nonP $\alpha$ S 細胞として(図 1)、両者の性質を比較した。Ti-P $\alpha$ S 細胞は Ti-nonP $\alpha$ S 細胞に比べ、増殖が速く、一細胞からのクローン樹立効率が、有意に優っていた。また、両者の遺伝子発現を RT-PCR で解析した。その結果、VEGF、IL10、COX2、MCP-1 などの免疫抑制分子が数倍高発現していることが分かった(図 2)。以上より、がん組織の間質にある P $\alpha$ S 細胞は、免疫抑制分子の産生を通して、免疫抑制的な腫瘍微小環境の構築に関与している可能性が示唆された。

図 2 腫瘍組織より、Ti-P $\alpha$ S 細胞, Ti-non P $\alpha$ S 細胞を分離し、各種免疫抑制分子の遺伝子発現を qPCR で評価した。



##### (3) 腫瘍所属リンパ節内の MSC は MHC クラス II を低発現している。

マウスリンパ節内に存在する P $\alpha$ S について解析したところ、腫瘍の所属リンパ節内の P $\alpha$ S は、それ以外のリンパ節内の P $\alpha$ S に比べて、MHC classII の発現が減少していることが分かった。このことより MSC(P $\alpha$ S 細胞)は、リンパ節内にも存在し、腫瘍の影響で抗原提示能などが低下している可能性が示唆された。

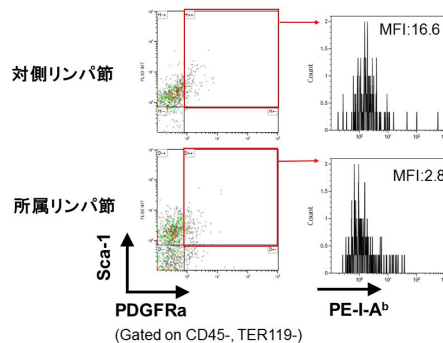


図 3 腫瘍所属リンパ節(腫瘍組織と同側のリンパ節)内の P $\alpha$ S 細胞の MHC classII の発現は、対側のリンパ節内の P $\alpha$ S 細胞よりも低下していた。

##### (4) ヒト腫瘍組織中には MSC のマーカーを発現する間質細胞が存在する。

次にヒトの腫瘍組織内、および末梢血中の MSC を、二つの表面マーカーで定義される細胞分画を FACS で測定することで、解析した。健常人及び婦人科担癌患者 3 症例の末梢血では、MSC は検出されなかった

が、腫瘍組織内では 8 症例中 4 症例で MSC 様の細胞が検出された。そのうち 1 症例は腫瘍の約 0.3% を MSC 様の細胞が占めていた。

以上より、がん組織の間質および、腫瘍所属リンパ節内にある MSC は、マウスでは、免疫抑制分子の産生を通して、免疫抑制的な腫瘍微小環境の構築に関与しており、さらにヒトの腫瘍組織においても MSC が存在し、何らかの免疫抑制に関与していることが示唆された。

#### 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 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：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

岩田 卓 (Takashi Iwata)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30296652

##### (2)研究分担者

藤田 知信 (Tomonobu Fujita)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20199334

##### (3)連携研究者

河上 裕 (Yutaka Kawakami)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：50161287