

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 26 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460486

研究課題名(和文) ヒトがん間質の抗腫瘍性免疫微小環境形成の分子機序に関する研究：EBI3の検討

研究課題名(英文) Molecular mechanisms to form antitumor immune microenvironment

研究代表者

平岡 伸介 (Hiraoka, Nobuyoshi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・科長

研究者番号：40276217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：がん間質の免疫微小環境はがんの生物学的特性と密接な関係にある。本研究ではがん間質におけるEBI3分子の機能とその機序の解析を通して、免疫微小環境形成機序に迫ることを目的とする。不活化型EBI3分子を発現するトランスジェニックマウスを作成し化学発がん系にて検討した。不活化型EBI3では野生型に比して、有意に早期から扁平上皮乳頭腫が形成され、腫瘍形成個体数も有意に多く、EBI3が腫瘍発生抑制の微小環境形成に寄与していることが示唆された。また膵がん以外のがん種組織でもEBI3発現が予後因子になり、EBI3による抗腫瘍性効果が一般的に固形腫瘍で認められることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tumor microenvironment can determine the biological behavior of the cancer. The aim of the study was to investigate roles of EBI3 in the formation of anti-tumor immune microenvironment. We examined roles of EBI3 using our newly designed transgenic mice expressing dominant-negative inactive form EBI3 and analyzing tumor formation in those mice treated with chemical carcinogens. Carcinogen-induced tumors developed earlier and more frequently in the transgenic mice rather than wild type mice, suggesting that EBI3 involves in the antitumor immune microenvironment. Clinicopathological examinations also suggested that higher infiltration of EBI3 expressing cells into tumor tissues is a favorable prognosticator in various types of solid cancer other than pancreatic cancer.

研究分野：病理学

キーワード：EBI3

1. 研究開始当初の背景

がんの重要な生物学的特性は、がん細胞、がん間質、また両者の相互作用によって規定される。がん間質を構成する一員として免疫担当細胞があり、それによるがん微小環境に与える影響は大きく、このがん免疫微小環境が形成される分子機序を理解することは、新たながん治療に繋がるものと確信される。

がん免疫微小環境は、抗腫瘍性(免疫反応性)と好腫瘍性(免疫寛容)に大別できることが推定され、免疫微小環境の形成を深く理解するためには、各々の微小環境を構成する要素、それら環境を生体内で切り替えている分子機序の探究が重要と考えられた。そこで、免疫微小環境を特徴付ける遺伝子発現の同定を試みた。

IL-12 ファミリー分子は、IL-12, IL-23, IL-27, IL-35 を含み、細胞性免疫、液性免疫、炎症性免疫、抑制性免疫といった様々な免疫環境の形成に深く寄与しているが、ヒトがん組織での詳細な機能はわかっていない。そこで、免疫微小環境に関わる分子として、IL-12 ファミリーおよびそのリセプターファミリー分子に着目した。IL-12 ファミリー分子はヘテロ二量体構造をとり、構成する分子に共通分子があり、構成分子の組み合わせの違いによって機能が大きく異なる。これら構成分子の発現制御は独立し、各遺伝子欠損マウス解析から既知の組み合わせ以外のヘテロ二量体の存在や生物学的機能の存在が示唆されている。

抗腫瘍性免疫微小環境と関連性の強い遺伝子発現を同定するため、抗腫瘍性免疫環境の存在を良好な患者生命予後をもつがん組織として評価し、患者生命予後と有意な関連性を持つ、遺伝子発現をスクリーニングした。約 120 症例の膵がん外科切除患者コホートをを用いてスクリーニングし、さらに 2 つの別の膵がん外科切除患者コホート(各 100 症例以上)を用いて、候補となった遺伝子発現を転写

レベル(定量 RT-PCR 法)・蛋白質レベル(免疫組織化学)で測定し、その結果を検討・確認した。検討した遺伝子の中で、唯一 EBI3 遺伝子発現が膵がん患者長期生存と有意な相関のあることを見出した。

2. 研究の目的

がん間質の免疫微小環境の形成機序を分子レベルで理解することを目指す中で、本研究では、主に膵がん間質における EBI3 分子の機能とその機序の解析を通して、免疫微小環境形成機序に迫りたいと考えている。

具体的な事項として、(1)膵がん間質における EBI3 分子の発現様式や生化学的性状、抗腫瘍活性等の特性を把握し、EBI3 分子が抗腫瘍免疫微小環境の単なるマーカーであるか、あるいは EBI3 分子自身が抗腫瘍環境の形成に寄与するのかを検討する。(2)EBI3 分子の抗腫瘍活性の機序を、dominant negative 型 EBI3 分子(ヘテロ二量体)を発現するトランスジェニックマウスを作成し、化学発がん系を用いて、EBI3 分子の機能について腫瘍免疫の立場から詳細に検討する。(3)一般的にヒトがん間質で EBI3 分子が抗腫瘍性に働くかについて、膵がん以外のがん種を用いた臨床病理学的検討、を実施する。

3. 研究の方法

抗腫瘍性免疫微小環境を特徴付ける候補分子 EBI3 の解析を通じ、免疫微小環境形成機序に迫る。

(I) EBI3 分子の膵がん間質における特徴：EBI3 分子の生化学的性状・抗腫瘍活性の有無・免疫微小環境との関連性について
(A)使用する膵がん臨床材料(膵がん患者コホート)：コホート 1, 2: 当センターで 2003-2005 年、2006-2008 年に外科切除された約 120、150 症例。新鮮凍結組織およびそこから抽出した全 RNA、ホルマリン固定パラフィン包埋組織、臨床病理学的情報が

使用可能。コホート 3: 当センターで 1990-2002 年に外科切除された約 200 症例。ホルマリン固定パラフィン包埋組織、臨床病理学的情報を使用可能である。更に、新しく外科切除された新鮮な膵がん組織 (約 100 症例/年切除) を使用可能。

(B) 膵がん間質で EBI3 分子を発現する細胞種および状態の同定: 免疫組織化学、新鮮組織から抽出した細胞を用いたフローサイトメトリー法により解析する。

(C) EBI3 分子発現と関連するがん間質免疫微小環境: EBI3 発現細胞が存在する微小環境はどのような特徴のある微小環境であるのか、局所免疫細胞浸潤や免疫関連遺伝子発現との関係性を検討する。

(D) 膵がん間質における EBI3 分子の生化学的性状の同定: EBI3 分子がどのような分子と会合し、あるいは単独で存在しているのかを生化学的に検討する。

EBI3 分子と会合する可能性のある IL-12/IL-6 ファミリー分子 four helical cytokine (IL12A, IL27A, IL6, 等) と EBI3 分子との全ての組み合わせについて、会合の有無を *in vitro* 実験系(培養細胞に遺伝子共導入後、免疫沈降、Western blot 法により) で検討する。また実際のがん組織から回収される EBI3 分子を免疫沈降後に会合分子をマスペクトロメトリーで検出する。

(E) EBI3 分子の抗腫瘍性活性の検討: 同種腫瘍移植マウスモデル系を用いた検討: マウス腫瘍細胞株(膵がん細胞 Pan02, 大腸がん細胞 CT-26, 他)に、EBI3 分子単独で、EBI3 分子とそれと会合の可能性のある分子いずれか 1 つと共に、あるいは EBI3 分子と会合の可能性のある 1 分子をリンカー (Cancer Res 64;1152,2004) で結合した融合分子として、安定発現させた細胞を同種マウスに皮下移植後、腫瘍の生着・拒絶、成長速度、マウス腫瘍死までの期間を検討する。さらに、腫瘍に対する免疫学的作用につい

て、T 細胞等の除去マウスへの腫瘍細胞移植、移植腫瘍に浸潤する免疫細胞の解析、また T 細胞の障害活性等について解析する。

(II) EBI3 分子の抗腫瘍免疫における個体レベルの機能解析

(A) Dominant negative 型 EBI3 ヘテロ二量体 (あるいは単量体) の設計: IL-6/IL-12 ファミリー four-helical cytokine の中で、それと EBI3 との会合した二量体が膵がん間質に発現し、最も強い抗腫瘍活性を示す four-helical cytokine と EBI3 との二量体を選択し、次にそれがレセプターに結合するが、細胞内にシグナルが入らない、dominant negative 変異分子を設計する。

(B) Dominant negative 型 EBI3 ヘテロ二量体 (あるいは単量体) 発現トランスジェニックマウスの作成: dominant negative 型 EBI3 ヘテロ二量体をリンカー (Cancer Res 64;1152,2004) でつなぎ、この融合遺伝子が keratin 14 プロモーター (Proc Natl Acad Sci USA 86;1563,1989) 下で発現するベクターを構築する。トランスジェニックマウスは外部企業に有料委託して作成し、皮膚扁平上皮細胞での導入遺伝子発現を確認し、マウス 2 系統以上を実験に用いる。

(C) Dominant negative 型 EBI3 発現トランスジェニックマウスの解析:

化学発がん: トランスジェニックマウスとコントロールマウス間での発がんの違いを比較し、腫瘍部への免疫細胞浸潤や遺伝子発現等の宿主免疫反応の違いについても比較検討する。発がん系は、7,12-dimethylbenzanthracene/PMA 投与皮膚扁平上皮癌発がん (J Exp Med 201;1089,2005)、3-Methylcholanthrene 皮下注入後の線維肉腫発がん (J Exp Med 191;661,2000) を用いる。尚、適切なマウス膵化学発がんモデルの報告はない。

(III) EB13 発現細胞のがん間質への浸潤とその臨床病理学的意義の検討

膵がんのみならず、一般的にがん間質に浸潤する EB13 分子発現細胞の臨床病理学的意義について、腫瘍浸潤 EB13 発現細胞を免疫組織化学にて同定後、患者予後を含む臨床病理学的情報と比較検討する。いずれも当センターで外科切除された症例のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片と臨床病理学的情報を使用する。

4. 研究成果

(I) EB13 分子の膵がん間質における特徴：EB13 分子の生化学的性状・抗腫瘍活性の有無・免疫微小環境との関連性について

免疫微小環境を特徴付けるサイトカインとして IL-12 ファミリーおよびそのリセプターファミリー遺伝子の発現と膵がん患者予後との関係を検討し、長期の患者生命予後と統計学的に有意に関連する遺伝子発現、すなわち抗腫瘍性免疫微小環境と深く関連する遺伝子 EB13 を同定した。この分子に対するモノクローナル抗体を作成し、免疫組織化学を実施したところ、この分子は膵がん組織中で CD208 陽性成熟骨髄性樹状細胞や一部のマクロファージに発現していたが、膵がん細胞を含めてそれ以外の細胞種には発現していなかった。EB13 発現細胞を含む局所膵がん組織では EB13 発現細胞を含まない膵がん組織と比較して、CD8⁺T 細胞・M1 マクロファージ浸潤が有意に多く制御性 T 細胞・M2 マクロファージ浸潤が有意に少ない細胞性免疫の活性化した局所免疫微小環境であること、また EB13 陽性細胞浸潤の多い膵がん組織であった。以上から EB13 陽性細胞と抗腫瘍性免疫微小環境との強い関連性が示唆された。

EB13 分子は *in vitro* 解析にて多様な IL-12/IL-6 ファミリー分子 four helical cytokine (IL12A, IL27A, IL6, 等) と会合することが明らかになった。そこで実際の膵がん組織中から EB13 分子を免疫沈降法により

抽出後、マスマスペクトロメトリーを用いた 2D-ICAL 法により EB13 分子の会合分子について解析した結果、複数の分子候補が得られた。次にそれら各会合候補分子と EB13 分子とをリンカーで結合させる融合分子を安定発現する Pan02 細胞および CT26 細胞を作成し、同種腫瘍移植モデル系により移植腫瘍の増殖を検討した。候補分子の一部との融合分子を安定発現した腫瘍細胞のみが腫瘍生着・増殖が完全に拒絶された。以上からこの候補分子と会合することで EB13 は膵がん組織内で抗腫瘍免疫活性を発現していることが示唆された。

(II) EB13 分子の抗腫瘍免疫における個体レベルの機能解析

Dominant negative 型 EB13 ヘテロ二量体をリンカーで結合した融合分子をコードする遺伝子を keratin 14 プロモーター下で発現させるトランスジェニックマウスを作成した。7,12-dimethylbenzanthracene/PMA 投与皮膚扁平上皮癌発がんの化学発がん系を用いて、トランスジェニックマウスとコントロールマウス間での発がんの違いを比較したところ、野生型に比して Dominant negative 型では有意に早期から扁平上皮乳頭腫が形成され、最終的な腫瘍形成数も多く、一方で乳頭腫から扁平上皮癌への発がん速度に有意な差はみられなかった。以上から、EB13 融合分子は抗腫瘍免疫活性を有することが示唆された。3-Methylcholanthrene 皮下注入後の線維肉腫発がんの化学発がん系では、野生型と Dominant negative 型で腫瘍発生速度や腫瘍発生数に有意な差はみられなかった。Dominant negative 型 EB13 分子を発現する上皮細胞と離れた皮下組織内で腫瘍が形成されることで変異型分子の影響を受けなかった可能性が示唆された。

(III) EB13 発現細胞のがん間質への浸潤とそ

の臨床病理学的意義の検討

膵がん以外の複数のがん種において EB13 分子発現細胞浸潤の多い症例はそうでない症例に比して予後良好であることが示された。全てのがん種ではないが、多くのがん種においてヒトがん間質で EB13 分子が抗腫瘍性に働くことが示唆された。

以上から、EB13 ががん間質の抗腫瘍性免疫微小環境の指標になるのみならず、EB13 自身がその形成に寄与していることが強く示唆され、またこの現象は膵がんのみならず多くのがん種で認められる現象であ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 3 件)

Hiraoka N., Ino Y., Yamazaki-Itoh R., Kanai Y, Kosuge T, Shimada K. (2015) Intratumoral tertiary lymphoid organ is a favorable prognosticator in patients with pancreatic cancer. Br J Cancer 112, 1782-90.

DOI: 10.1038/bjc.2015. 145.

Oguro S, Ino Y., Shimada K, Hatanaka Y, Matsuno Y, Esaki M, Nara S, Kishi Y, Kosuge T, Hiraoka N. (2015) Clinical significance of tumor-infiltrating immune cells focusing on BTLA and Cbl-b in patients with gallbladder cancer. Cancer Sci 106, 1750-60.

DOI: 10.1111/cas. 12825.

Hiraoka N., Ino Y., Yamazaki-Itoh R. (2016) Tertiary lymphoid organs in cancer tissues. Front Immunol 7, 244.

DOI: 10.3389/fimmu.2016.00244

[学会発表](計 1 件)

平岡伸介. 膵がんの免疫微小環境. 日本病理学会総会 2015 年 4 月 名古屋

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平岡 伸介 (HIRAOKA, Nobuyoshi)

国立がん研究センター中央病院・病理臨床検査科・科長

研究者番号: 40276217

(2) 研究分担者

石川 義典 (ISHIKAWA, Yoshinori)

(=猪野義典, INO Yoshinori)

国立がん研究センター研究所・バイオマーカー評価部門・主任研究官

研究者番号: 90291137

(3) 連携研究者

山崎 理恵 (YAMAZAKI, Rie)

国立がん研究センター研究所・分子病理分野・特任研究員

研究者番号: