

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 25 日現在

機関番号：85402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462008

研究課題名(和文) 腫瘍血管内皮細胞を介した腫瘍の免疫逃避機構の解明と新規抗癌療法への応用

研究課題名(英文) A study for immunological feature of tumor endothelial cells (TEC) in immune evasion mechanism of tumor micro-environment and development of a novel anti-cancer therapy

研究代表者

尾上 隆司 (Onoe, Takashi)

独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・その他部局等・その他

研究者番号：90549809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では癌微小環境における免疫逃避機構において、特に腫瘍血管内皮細胞の免疫学的側面に注目し解析を行った。B16メラノーマ細胞を用いた担癌マウスモデルにおいて腫瘍内皮細胞は用量依存性にT細胞増殖を抑制した。さらに腫瘍-内皮細胞連続培養では、内皮細胞の免疫抑制能獲得には癌からのHMGB1が関与すること、内皮細胞が分泌するエクソソームが免疫抑制能を持つことが明らかとなった。さらに抗HMGB1抗体の局所投与により抗腫瘍効果が得られた。これらの結果は、腫瘍内皮細胞が癌とのクロストークにより免疫抑制能を獲得し免疫逃避機構に寄与すること、クロストークの遮断が有望な癌治療戦略となりうることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Although a remarkable progress in anti-cancer therapies, cancer can be resistant to therapies in some situations, which could be related to immune-evasion of cancer. In this study, we evaluated an immunological feature of tumor endothelial cells (TEC) in immune evasion mechanism of tumor micro-environment. In vitro assay revealed that TECs from growing tumor in mice in which B16 melanoma cells had been implanted suppressed T cell proliferation in a dose-dependent manner. Further, tumor-endothelial cell serial culture assay revealed that immunosuppressive function of TEC required HMGB1 from tumor and exosome secreted from TEC had immunosuppressive activity. In vivo animal model, tumor growth was suppressed by local injection of anti-HMGB1 antibody. These results suggest that TECs contribute immune-evasion of tumor by acquiring immunosuppressive feature through cross-talk with tumor and blockade of this cross-talk could be a promising anti-cancer strategy.

研究分野：外科学

キーワード：腫瘍免疫 免疫逃避 内皮細胞 微小環境 クロストーク

1. 研究開始当初の背景

現在、分子標的薬の開発や放射線診断治療技術の進歩により、癌治療において良好な予後が得られるようになってきた。しかし進行癌、特に消化器系固形癌においては、これらの治療に難渋する場合も多い。その背景には癌の持つ免疫逃避機構が関与していると考えられる。この免疫逃避機構構築には腫瘍内皮細胞を含む癌微小環境が大きく影響していると考えられる。我々は、これまである種の内皮細胞が抗原提示能を持ち、免疫を抑制することを明らかにしてきた。さらに内皮マーカーの腫瘍内陽性率が切除術後の再発・転移率と相関することが種々の固形癌で報告されている。このことから、腫瘍内皮細胞も癌微小環境において同様に種々の細胞とのクロストークを介して、癌免疫の抑制に作用している可能性を考えた。しかしながら、腫瘍内皮細胞の免疫学的特徴の詳細な検討は現在までなされていない。

2. 研究の目的

本研究では腫瘍血管内皮細胞の免疫学的側面に注目し、その免疫抑制能の検証と、癌微小環境における癌および腫瘍血管内皮細胞とのクロストーク機構を解明し、腫瘍血管内皮細胞をターゲットとした新しい治療に応用するための基盤研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) B16 マウスメラノーマ細胞株を用いた担癌マウスモデルの確立と腫瘍内皮細胞の分離およびフェノタイプ解析

高腫瘍活性をもつ、B16F-10 マウスメラノーマ細胞を C57BL6 マウスの皮下に接種し、担癌マウスモデルを確立した。接種 2 週間後に腫瘍を切除し、コラゲナーゼ法を用いて腫瘍構成細胞を digestion し、CD31+CD105+内皮細胞の細胞表面分子フェノタイプをフローサイトメトリーで解析した。

(2) 腫瘍内皮細胞の免疫抑制能の in vitro 解析 直接培養における腫瘍内皮細胞の免疫抑制能の検討

腫瘍構成細胞から、磁気ソーティングおよびフローサイト・ソーティングを用いて、CD31+CD105+内皮細胞をソーティングし、CD3/CD28 刺激を行った C57BL6 同系マウス T 細胞と直接共培養を行い、CFSE 染色法を用いて T 細胞増殖を評価し、腫瘍内皮細胞の免疫抑制能を in vitro で検証した。

腫瘍-内皮細胞クロストークメカニズムの検討

B16F-10 マウスメラノーマ細胞の培養上清を用いて bEnd.3 内皮細胞株の二次培養を行い、腫瘍内微小環境下での癌と腫瘍内皮細胞のクロストークを in vitro で再現した。二次培養後の内皮細胞培養上清を CD3/CD28 刺激を行った C57BL6 同系マウス T 細胞培養系に添

加しその免疫抑制効果を検証した。さらに B16 一次培養時に抗 HMGB1 抗体を添加し、洗浄後の培養上清を bEnd.3 内皮細胞二次培養に使用した二次培養上清でも同様の実験を行い、腫瘍-内皮細胞クロストークにおける HMGB1 の作用を検証した。

(3) 腫瘍-内皮細胞クロストークにおける、内皮細胞由来エキソソームの免疫抑制効果の検討

方法(2)-において、二次培養後の内皮細胞培養上清からエキソソームを分離し、ビーズ法を用いフローサイトメータでそのプロファイルを検討した。さらに分離したエキソソームを CD3/CD28 刺激を行った C57BL6 同系マウス T 細胞培養系に添加しその免疫抑制効果を検証した。

(4) in vivo における検討

B16F-10 マウスメラノーマ細胞を C57BL6 マウスの皮下に接種した担癌マウスモデルにおいて、抗 HMGB1 抗体を腫瘍接種部位に投与し、その腫瘍増大抑制効果を検証した。

4. 研究成果

(1) B16 マウスメラノーマ細胞株を用いた担癌マウスモデルの確立と腫瘍内皮細胞の分離およびフェノタイプ解析

C57BL6 マウスの背部に 1×10^6 個の B16F-10 マウスメラノーマ細胞株を皮下接種し、マウス担癌モデルを確立した。

接種 14 日後の腫瘍体積は $417 \pm 435 \text{ mm}^3$ と腫瘍の生着・増大を認めた。接種 14 日後に行った摘出腫瘍内の CD31+CD105+腫瘍内皮細胞のフェノタイプ解析では、腫瘍内皮細胞は CD80 および PD-L1, TLR-4 を表出しており免疫抑制能を持つことが予想された (図 1)。

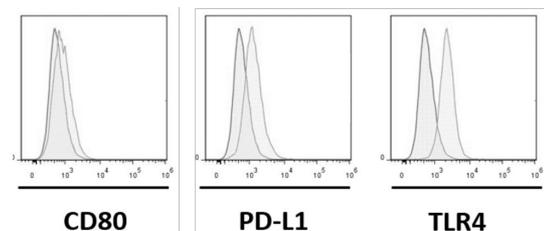


図 1 .CD31+CD105+腫瘍内皮細胞の表面抗原フェノタイプ

(2) 腫瘍内皮細胞の免疫抑制能の in vitro 解析 直接培養における腫瘍内皮細胞の免疫抑制能の検討

腫瘍からソーティングした CD31+CD105+腫瘍内皮細胞は in vitro において、用量依存性 T 細胞増殖抑制効果を認めた。さらにこの腫瘍内皮細胞の持つ T 細胞増殖抑制作用は、低腫瘍活性である B16-F1 メラノーマ由来腫瘍から分離した腫瘍内皮細胞よりも、高腫瘍活性の B16-F10 メラノーマ由来腫瘍から分離した腫瘍内皮細胞の方が強かった。(図 2)

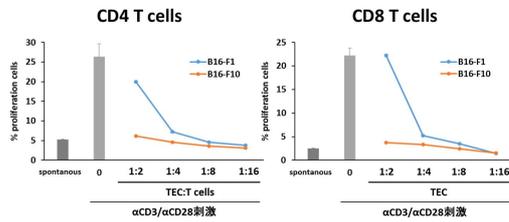


図2 . CD3/CD28 刺激した T 細胞に対する腫瘍内皮細胞 (TEC) の増殖抑制効果 (CFSE 法, CD4T 細胞および CD8T 細胞)

腫瘍-内皮細胞クロストークメカニズムの検討

B16 メラノーマを培養した一次培養上清を用いた bEnd.3 内皮細胞二次培養上清を添加した場合、CD3/CD28 刺激での T 細胞増殖は、単純に bEnd.3 内皮細胞培養上清を添加した時に比べ有意に抑制された。さらに B16 一次培養時に抗 HMGB1 抗体を添加し、洗浄後の培養上清を bEnd.3 内皮細胞二次培養に使用した二次培養上清を用いた場合、この T 細胞抑制作用は消失した。(図3)このことから、腫瘍-内皮細胞のクロストークにより内皮細胞から免疫抑制性のメディエーターが分泌されること、さらに腫瘍培養時の HMGB1 ブロックによりその免疫抑制作用が消失することより、すくなくとも本モデルにおいては、腫瘍-内皮細胞クロストークには HMGB1 が介在することが示唆された。

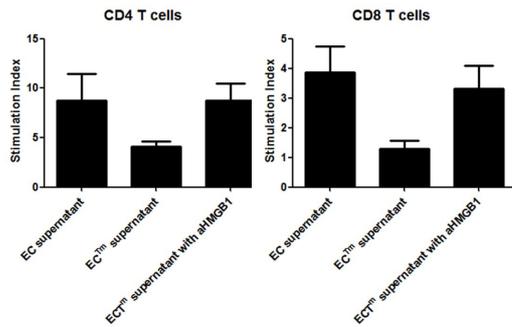


図3 . CD3/CD28 刺激した T 細胞に対する腫瘍-内皮細胞二次培養上清の増殖抑制効果 (CFSE 法, CD4T 細胞および CD8T 細胞)

左: bEnd.3 単純培養上清
中: B16-bEnd.3 連続培養上清
右: B16 培養時に抗 HMGB1 抗体を使用した B16-bEnd.3 連続培養上清

(3) 腫瘍-内皮細胞クロストークにおける、内皮細胞由来エキソソームの免疫抑制効果の検討

(2) - において、腫瘍-内皮細胞二次培養上清からエキソソームを分離し、フローサイトメトリーでの検討を行ったところ、CD80, CD40, PD-L1 の表出を認めた。分離したエキソソームを用いた T 細胞増殖抑制試験では、

bEnd.3 単純培養上清由来エキソソームと比較し、腫瘍-内皮細胞連続培養系を用いた B16-bEnd.3 培養上清由来エキソソームでは有意に高い T 細胞増殖抑制効果を認めた。(図4)この結果は、腫瘍-内皮細胞クロストークにより内皮細胞より免疫抑制性のエキソソームが分泌されることが示唆された。

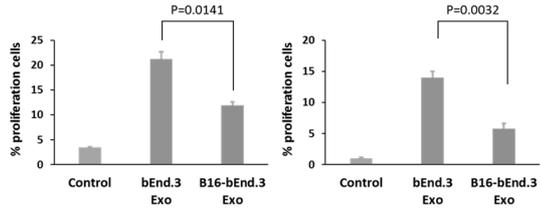


図4 .腫瘍-内皮細胞二次培養上清中のエキソソームによる T 細胞増殖抑制効果

(CFSE 法, CD4T 細胞および CD8T 細胞)
左: コントロール
中: bEnd.3 単純培養上清エキソソーム
右: B16-bEnd.3 連続培養上清エキソソーム

(4) in vivo における検討

B16 メラノーマ細胞を用いたマウス担癌モデルにおいて、HMGB1 の効果を検討した。マウス皮下に B16 メラノーマを摂取する際に抗 HMGB1 抗体を接種部位に局所投与したマウスでは、コントロールとして PBS を投与したマウスと比べ、有意に腫瘍体積増大の減少を認めた。(図5)しかしながら、この効果は全身投与では認めなかった。

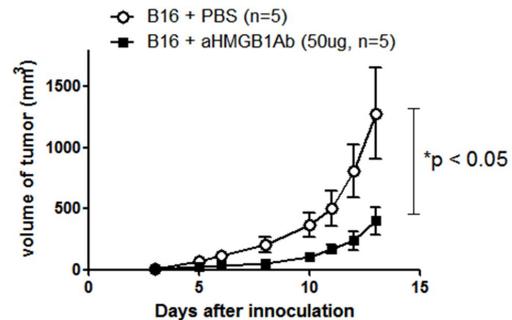


図5 . B16 メラノーマ細胞担癌マウスモデルにおける抗 HMGB1 抗体局所注入の腫瘍増大抑制効果

B16 細胞 1×10^6 個/マウス皮下接種
白丸: B16 細胞+PBS 局所注入
黒丸: B16 細胞+抗 HMGB1 抗体局所注入

以上、これまでの研究結果から、腫瘍内皮細胞が癌とのクロストークを介して免疫抑制能を獲得し、癌に対する免疫逃避機構に寄与している可能性が示唆された。またこのクロストークにおける内皮細胞の免疫抑制効果獲得には HMGB1 が関与していることが明らかとなった。さらに内皮細胞のもつ免疫抑制作用の一部は液性因子によるものであり、そ

の因子として免疫抑制性エキソソームの関与が明らかとなった。この結果は腫瘍-内皮細胞クロストークを遮断することで抗腫瘍効果が得られる可能性を示唆している。しかしながら本結果はB16メラノーマを用いた実験系から得られたものであり、各種癌に適用できるような普遍的なメカニズムであるかは引き続き異なる癌腫を用いての検討を要する。

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)

Igarashi Y, Onoe T, Ohdan H. The role of liver sinusoidal endothelial cells in induction of carbohydrate reactive B cells tolerance through the programmed death 1/programmed death ligand 1 pathway. *Transplantation* 99(11):2325-36. 2015

Shimizu S, Tanaka Y, Tazawa H, Verma S, Onoe T, Ishiyama K, Ohira M, Ide K, Ohdan H. Fc-Gamma Receptor Polymorphisms Predispose Patients to Infectious Complications After Liver Transplantation. *Am J Transplant* 16(2):625-33. 2015

Yanai H, Matsuda A, An J, Koshiba R, Nishio J, Negishi H, Ikushima H, Onoe T, Ohdan H, Yoshida N, Taniguchi T. Conditional ablation of HMGB1 in mice reveals its protective function against endotoxemia and bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17;110(51):20699-704. 2013

Banshodani M, Onoe T, Shishida M, Tahara H, Hashimoto S, Igarashi Y, Tanaka Y, Ohdan H. Adoptive transfer of allogeneic liver sinusoidal endothelial cells specifically inhibits T-cell responses to cognate stimuli. *Cell Transplant*. 22(9):1695-708. 2013

〔学会発表〕(計 1 件)

Hashimoto S, Banshodani M, Onoe T, Tanaka Y, Ohdan H. Adoptive transfer of allogeneic liver sinusoidal endothelial cells specifically inhibits T cell responses to cognate stimuli and prolonged allo-graft survival of heterotopic heart transplantation in mice. (ISEM 2014, 2014.4.11-13, Kyoto, Japan)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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 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

尾上 隆司 (ONOE TAKASHI)

独立行政法人 国立病院機構

呉医療センター・中国がんセンター

臨床研究部 研究室長

研究者番号: 90549809

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

大段 秀樹 (OHDAN HIDEKI)

国立大学法人 広島大学

大学院医歯薬保健学研究院

消化器・移植外科学 教授

研究者番号: 10363061