

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462614

研究課題名(和文) 卵巣癌における癌免疫逃避機構の解明及び効果的な免疫治療法の開発

研究課題名(英文) Investigating cancer-immunescape mechanism and effective immunotherapy for ovarian cancer

研究代表者

西尾 浩(Hiroshi, Nishio)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：90445239

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)：担がん生体における免疫抑制的な環境が引き起こす腫瘍免疫逃避の個体差が免疫療法の効果を損なう因子の一つと考えられている。

今回、ヒト卵巣明細胞がんで活性化がみられる転写因子HNF-1bが抑制性サイトカインや抑制細胞を産生・誘導することで、樹状細胞やT細胞の機能を抑制していることが示された。一方、HNF-1bを抑制することで樹状細胞やT細胞の機能が回復し免疫抑制からの解除が可能であることが細胞株、卵巣がんモデルマウスより明らかとなった。これらの知見により、本転写因子の制御は免疫療法の効果を増強する新たなターゲットとなりうることを示された。

研究成果の概要(英文)：Cancer-induced immunosuppression is one of the major problems for development of cancer immunotherapies. A transcriptional factor HNF-1 preferentially activated in human ovarian clear cell cancer (OCCC) have been reported. We have investigated roles of HNF-1 in the immunosuppressive activity of human OCCC. HNF-1 knockdown and overexpression experiments revealed that HNF-1 induced immunosuppressive cytokine production. In vitro suppressive activities of human OCCC culture supernatants on dendritic cell were reduced by knockdown of HNF-1 in cancer cells. In the mice model, knockdown of HNF-1 in the cancer cells resulted in restoration of T cell stimulatory activity of murine splenic DC in spleens and tumors. Therefore, HNF-1 activation in human OCCC is an upstream event for induction of immunosuppression, and is an attractive target for restoring immunocompetence in OCCC patients.

研究分野：産婦人科学

キーワード：卵巣がん 免疫逃避

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんに対する治療として、手術療法後にタキサン製剤やプラチナ製剤などの化学療法を組み合わせた治療が行われているが、依然として進行癌での5年生存率は約20%とその予後は不良であり、新たな診断法・治療法が望まれている。その一つとして、がんに対して免疫を誘導し作用させる免疫療法が試みられてきた。

免疫療法はこれまで婦人科がんのみならず、悪性黒色腫を中心としてヒト腫瘍抗原が同定され、がんワクチン(能動免疫法)の臨床試験が実施されてきたが、期待されたほどの十分な効果は認められなかった。しかし、抗原特異的な培養T細胞を投与する養子免疫療法では、RECIST基準で奏効率72%という劇的な治療効果も報告された。また近年T細胞応答をターゲットとする抗PD1抗体・抗CTLA4抗体などの抗体療法において劇的な臨床効果が再発卵巣がんを含め臨床試験により示され、免疫療法に注目が集まっている。しかしながらこれらの臨床試験の解析では、抗腫瘍効果が十分でない症例が多く存在する。その原因の一つは、担がん生体における免疫抑制的な環境が引き起こす**腫瘍免疫逃避の個体差**であると考えられ、免疫治療においては**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、婦人科がんを中心としてこの腫瘍免疫逃避を克服すべく、**がん細胞による各種免疫細胞への作用を解析し、がん微小環境における免疫抑制の分子機構を明らかにしてきた(平成20・22年度若手研究(B))**。特に卵巣がんにおいては**免疫抑制性サイトカインIL-6高産生の細胞株が存在し、それらが転写因子NF-κBの恒常的活性化により誘導されており、NF-κB阻害剤(DHMEQ)によりIL-6の産生が著明に減少すること**を解明した。(平成22年度若手研究(B)・平成23年度日本学術振興会特別研究員)また、**卵巣がん細胞株を移植した卵巣癌モデルマウスにおいて脾臓と腫瘍内に骨髄由来抑制細胞(MDSC)が誘導され、それらはNF-κB阻害剤(DHMEQ)の投与により抑制されること**を解明した。しかしながら、**腫瘍免疫逃避からの解除はこれらの pathway の阻害のみでは当然ながら不十分であり、更なる異常シグナルや免疫抑制細胞の制御を行うことにより、より効果的な免疫治療は望むことが可能であると考えられる**。

本研究では新たな研究対象として、卵巣明細胞がんを中心として活性化されている転写因子HNF-1bに着目する。HNF-1bは主に卵巣がんまた子宮内膜がんでの活性化が報告されており、これまで癌細胞の抗アポトーシス作用や薬剤耐性に関与することが報告されている。しかしながら、HNF-1bが癌免疫逃避と関連するとの報告はこれまでなされおらず、本転写因子と免疫逃避機構とのメカニズムを解析することで難治性の卵巣が

んの免疫逃避機構からの解除が可能となり、さらなる免疫療法の効果が期待される。

2. 研究の目的

近年、癌細胞は宿主からの免疫から逃れるべく、癌遺伝子の発現などにより様々な免疫抑制物質や免疫抑制細胞を誘導することが明らかとなってきた。本研究では、卵巣がんを対象として細胞内で活性化されたHNF-1bによる異常シグナルやそれにより誘導される免疫抑制物質、更に免疫抑制細胞の相互関係を検討し、癌微小環境における免疫逃避の分子機構を解明する。さらに免疫抑制物質や免疫抑制細胞を標的とした免疫抑制の解除法の可能性を追究し、より効果的な免疫治療法の確立を目的とする。本研究成果は、がん進展の分子機構の解明につながるだけでなく、担がん生体の免疫抑制状態からの回復や免疫療法の効果増強など、免疫治療を主体としたがん治療への貢献を目的とする。

3. 研究の方法

(1) HNF-1bの発現抑制もしくは過剰発現系を用いた機能解析

予備実験では、4つの細胞株(RMG-I、RMG-II、JHOC5、KK)での発現が認められたが、これらのHNF-1b発現細胞株にレンチウイルスによるshRNAの導入を行い、遺伝子発現が恒常的に抑制された細胞株を作成する。予備実験で確認されたIL-6産生の抑制が他のヒト卵巣がん細胞株においても同様であるかを検討し、さらにIL-6以外の免疫抑制性サイトカインに変化が見られるかを実験1の結果をもとにEILSA法で検討する。一方でHNF-1bを発現していない細胞株(ES2、RMG-V)にウイルスベクターを用いて遺伝子導入をおこない、上記と同様の手法で、免疫抑制性サイトカインの産生が上昇するか、膜分子や細胞内分子の発現が上昇するかを検討する。

(2) 卵巣がんモデルマウスを用いた免疫抑制機序の解析と克服法の開発

申請者はこれまでヒト卵巣がん細胞株を免疫不全マウスに移植することにより、脾臓と腫瘍内に免疫抑制細胞である骨髄由来抑制細胞(MDSC)や好中球が誘導されることが明らかとしてきた。これまでの検討でHNF-1bの発現を抑えるとin vitroでのIL-6の産生が著明に抑制されることから、in vivoにおいてHNF-1bの発現抑制株を用いることでIL-6などの免疫抑制分子の産生が抑制され、MDSCなどの免疫抑制細胞の誘導が抑制することが可能であるかを解析する。

具体的にはヌードマウスにヒト卵巣癌細胞株(HNF-1b発現株とshRNAにより発現を恒常的に抑制した細胞株(以下sh株)を皮下移植し腫瘍が生着したことを確認した後、一定期間を経て脾臓と腫瘍、リンパ節を摘出・homogenizeし、flow cytometryにて免疫抑制細胞(MDSC、TAM)や樹状細胞の数の変化を両群で比較する。また脾臓より樹状細胞を取

り出し、CD3 の刺激下に T 細胞と共培養することで樹状細胞の T 細胞活性化機能が HNF-1b の発現を抑制することで回復するかを検討する。

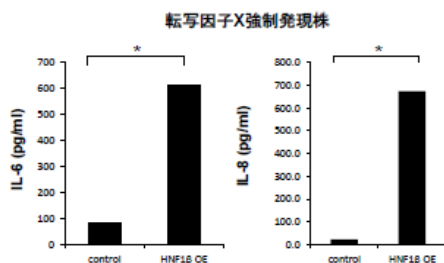
(3) 卵巣がん細胞株における NF-κB と HNF-1b の相互作用を解析

申請者はこれまで IL-6 高産生卵巣がん細胞株では NF-κB の活性化が起きており、NF-κB 阻害剤の投与により IL-6 の産生が抑制されることを報告してきた。今回の予備実験の結果、これらの細胞株では HNF-1b を抑制した場合でも同様の結果が得られている。すなわち、NF-κB と HNF-1b は直接もしくは何らかの細胞内因子を介して相互作用を有している可能性が高い。

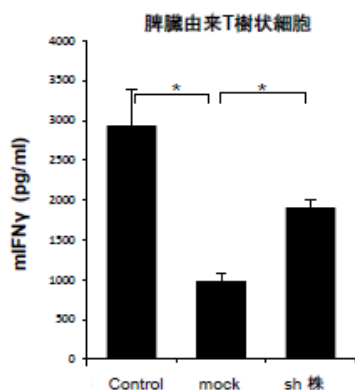
これらを分子レベルで確認するために NF-κB 阻害剤を用いた場合の HNF-1b の発現を検討する。一方で HNF-1b の発現抑制を行った場合の NF-κB の活性化を検討する。また shRNA により恒常的に HNF-1b の発現を抑えた細胞とコントロールの細胞で比較・解析を行い、NF-κB と関連する因子を同定する。

4. 研究成果

(1) sh 株でのサイトカインの減少は IL-6 以外では IL-8 で顕著であった。HNF-1b を強制発現させた細胞株において IL-6 の産生を認めた。

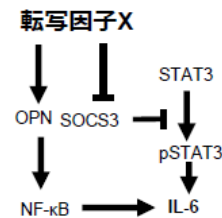


(2) 卵巣がんモデルマウスでは HNF-1b 抑制株を移植したマウスでは control 株の場合に比べ血清中のヒト IL-6 濃度が有意に低下した。また脾臓より採取した樹状細胞を T 細胞と共培養すると T 細胞の IFN γ 産生が増加した。



(3) HNF-1b の発現抑制により NF-κB、STAT3 の活性が低下し、IL-6・IL-8 の産生量が減少した。一方、転写因子強制発現により NF-κB、

STAT3 が活性化し、IL-6・IL-8 の産生量は増加した。すなわち HNF-1b は NF-κB と STAT3 を介してこれらのサイトカインを産生することが示された。



以上よりの知見はこれまで我々の検討以外での発表はなされておらず、本転写因子の制御は免疫療法の効果を増強する新たなターゲットとなりうることを示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) Iwata Takashi, Fujii Takuma, Morii Kenji, Saito Miyuki, Sugiyama Juri, Nishio Hiroshi, Morisada Tohru, Tanaka Kyoko, Yaguchi Tomonori, Kawakami Yutaka, Aoki Daisuke. Cytokine profile in cervical mucosa of Japanese patients with cervical intraepithelial neoplasia. Int J Clin Oncol. 査読有 :20(1): 2015 pp126-133.doi: 10.1007/s10147-014-0680-8.
- (2) Nishio Hiroshi, Yaguchi Tomonori, Sugiyama Juri, Sumimoto Hidetoshi, Umezawa Kazuo, Iwata Takashi, Susumu Nobuyuki, Fujii Takuma, Kawamura Noshi, Kobayashi Asuka, Park John, Aoki Daisuke, Kawakami Yutaka. Br J Cancer. 査読有 2014 Jun 10;110(12):2965-74.doi:10.1038/bjc.2014.251.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 西尾浩、卵巣明細胞腺がんが発現する HNF-1 β を介した免疫逃避機構とその解除、第 3 回婦人科がんバイオマーカー研究会 2015 年 2 月 7 日 九州大学百年記念講堂 福岡県福岡市
2. Hiroshi Nishio, Immunosuppression through HNF-1 β signaling in human ovarian clear cell cancer SITC (Society of Immunotherapy of Cancer) Annual Meeting 2013 年 11 月 10 日 ワシントン DC(米国)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西尾 浩 (NISHIO HIROSHI)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：90554239

(2)研究分担者

岩田 卓 (IWATA TAKASHI)
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号：30296652

(3)連携研究者

谷口 智恵 (TOMONORI YAGUCHI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：40424163