

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462523

研究課題名(和文) 骨髄由来細胞・前転移ニッチに着目した卵巣癌のVEGF阻害薬耐性化メカニズムの検討

研究課題名(英文) Role of MDSC-mediated premetastatic niche formation in the resistance of Anti-angiogenic agent.

研究代表者

馬淵 誠士 (Mabuchi, Seiji)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00452441

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)：Bevacizumab投与中のマウス末梢血にMDSCが存在すること、MDSCが血管新生因子Bv8を発現し血管新生を促進し、MDSCを阻害するとBvacizumabの抗腫瘍効果が増強された。また、癌細胞転移前のマウスの肺・肝臓にMDSCが集積していること、MDSCが肺においてS100A8/9、MMP-9およびBv8を発現させ、さらに、癌細胞の遊走を促進するCXCL2を発現し、CXCR2を発現する癌細胞を誘導した。MDSCを阻害すると、転移前臓器での前転移ニッチ形成が阻害され、癌の転移が抑制された。以上より、MDSCが前転移ニッチの形成を介して癌の転移を促進する可能性が証明された。

研究成果の概要(英文)：MDSC was observed in the peripheral blood of tumor-bearing mice treated with bevacizumab. MDSC expressed Bv8 and significantly enhanced the angiogenesis. MDSC-inhibition significantly enhanced the anti-tumor effect of bevacizumab. In the premetastatic lungs of tumor-bearing mice, markedly increased MDSC cells were observed. MDSC in the premetastatic lungs expressed S100a8, S100a9, and MMP9. Moreover, MDSC expressed Cxcl2 to attract cancer cells that express CXCR2. MDSC-inhibition using anti-Gr-1 inhibited the expression of Cxcl2, S100a8, S100a9, Mmp9 and Bv8, and significantly reduced the pulmonary metastases. These results indicate that MDSC contribute to the formation of a premetastatic niche by generating an immunosuppressive, inflammatory, and pro-angiogenic environment which can facilitate tumor cell metastasis.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 血管新生阻害薬 耐性 Bevacizumab MDSC 前転移ニッチ

1. 研究開始当初の背景

Bevacizumab を用いた抗血管新生治療は、本邦においても、既に臨床応用が始まっているが、卵巣癌を対象とした Phase III study では、Bevacizumab の投与による生存期間の延長効果は 4-6 か月間にとどまっており、現行の抗血管新生治療に対する耐性化機構の解明と克服が求められる。

興味深いことに、Bevacizumab 投与中・投与後の再発・転移は、腹腔外の特定の臓器（特にリンパ節・肺・胸膜）に生じ易い (Gynecol Oncol. 2013;130:295-9.)。これは、「骨盤内に原発した卵巣癌が、抗血管新生治療中に、特定の腹腔外臓器に転移しやすくなる何らかのメカニズム（逃避機構）が働き、これが結果的に抗血管新生治療薬の抗腫瘍効果を減弱させる」ことを示唆する Data である。

2. 研究の目的

Bevacizumab 耐性化のメカニズムを解明し、より有効な血管新生治療を開発することを目的とした。

VEGF 阻害治療中に腫瘍が産生するサイトカインによって誘導された骨髄由来細胞が、VEGF 阻害薬耐性化に関与するとの基礎研究の結果を参考に (Nat Med. 2013;19:1114-23.) 「VEGF 阻害薬投与中に、卵巣癌が何らかの分子を産生し、これによって誘導される骨髄由来細胞が癌細胞の増殖・浸潤能を刺激するだけでなく、癌の転移先決定因子としても機能し、転移予定の臓器にケモカインの過剰発現を特徴とする“前転移ニッチ”を形成することで、原発巣から癌細胞を誘導する」との仮説をたて、実験を計画した。

3. 研究の方法

【1】VEGF 阻害薬による抗血管新生治療中に卵巣癌が産生し、治療抵抗性に関与する分子の同定（サイトカインアレイによる網羅的解析）

【2】卵巣癌から産生されるサイトカインに

よって誘導される骨髄由来細胞の解析（FACS を用い、最も重要な骨髄由来細胞の特定）

【3】VEGF 阻害薬投与中、転移予定の臓器に、転移を促す微小環境の変化（ケモカインの過剰発現に特徴づけられる前転移ニッチの形成）がおきるのか？

【4】骨髄由来細胞が癌細胞の増殖・浸潤・前転移ニッチ形成に与える影響の検討

【5】骨髄由来細胞や前転移ニッチの形成を阻害することにより、VEGF 阻害薬投与中の癌の逃避（遠隔転移）を抑制できるか？

上記 5 つの研究を計画した。

4. 研究成果

平成 26 年度は、卵巣癌細胞株を移植したヌードマウスを用い、Bevacizumab 投与中に誘導される骨髄由来細胞の同定を試みた。骨髄由来細胞の中で腫瘍の進展に関与しうる細胞集団として Myeloid derived suppressor cell (MDSC) に焦点をあて、その表面マーカーである CD11b および Gr1 の両方が陽性になる細胞集団をフローサイトメトリー法にて解析したところ、Bevacizumab 投与中のヌードマウスの末梢血に MDSC が存在することが確認できた。抗体ビーズ法を用いて MDSC を無菌抽出し、In vitro において MDSC の機能解析を行ったところ、MDSC が血管新生促進因子 Bv8 を発現し、血管内皮細胞を刺激して Tube formation を促進することが示された。つまり、MDSC が Bv8 の産生を介して血管新生を促進し、Bevacizumab 耐性化に関与する可能性が示された訳である。そこで、抗 Gr1 抗体を用いて MDSC を阻害すると、Bevacizumab の抗腫瘍効果が増強されることが確認できた。

平成 27 年度は、癌細胞を皮下移植したヌードマウスを用い、転移予定の臓器に、転移を促す微小環境の変化（ケモカインの過剰発現に特徴づけられる前転移ニッチの形成）が形成されるのか？を検討した。その結果、癌細胞

胞が転移する前のヌードマウスの肺および肝臓において、MDSC が多数集積していること、またその MDSC が肺において浸潤・転移を促す蛋白質 (S100A9 および MMP-9) および血管新生を促進する因子 Bv8 を発現することが確認できた。つまり、MDSC が前転移ニッチの形成を介して癌細胞の転移を促進している可能性が示された訳である。さらに同じくヌードマウスを用いた実験により、抗 Gr1 抗体を用いて MDSC を阻害すると、転移前臓器への MDSC の侵入および前転移ニッチの形成が阻害され、癌の転移が抑制できることが示された。これらの研究を通じて、MDSC が前転移ニッチの形成を介して癌の転移を促進する可能性がマウスレベルで証明された。

平成 28 年度は、まず転移前の臓器に浸潤した MDSC がどのようにして転移先に癌細胞を誘導するのかを検討した。その結果、MDSC が癌細胞の遊走を促進する CXCL2 を発現し、CXCR2 を発現する癌細胞を誘導することが確認できた。平成 26-28 年度の研究成果を受け、臨床 Data および臨床検体の免疫組織染色を用い、どのような患者さんで MDSC が増加しているかを検討したところ、好中球増多を伴う症例や G-CSF を強発現する症例は、腫瘍・血中の MDSC が有意に増加していることが明らかになった。一連の研究により、MDSC および前転移ニッチを標的とした治療により、癌の転移が抑制できる可能性がマウスレベルで証明された訳である。現在、MDSC 阻害が Bevacizumab 投与中の新規転移病変の形成を予防するかを検討している段階である。

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 11 件)

1. Kawano M, Mabuchi S, Matsumoto Y, Sasano T, Takahashi R, Kuroda H, Kozasa K, Hashimoto K, Isobe A, Sawada K, Hamasaki T, Morii E, Kimura T. The significance of G-CSF expression and myeloid-derived suppressor cells in the chemoresistance of uterine

cervical cancer.
Sci Rep 2015;5:18217.

2. Ciccone MA, Maoz A, Casabar JK, Machida H, Mabuchi S, Matsuo K. Clinical outcome of treatment with serine-threonine kinase inhibitors in recurrent epithelial ovarian cancer: a systematic review of literature. Expert Opin Investig Drugs. 2016;25:781-96.
3. Takahashi R, Mabuchi S, Kawano M, Sasano T, Matsumoto Y, Kuroda H, Kozasa K, Hashimoto K, Sawada K, Kimura T. Preclinical investigations of PM01183 (lurbinectedin) as a single agent or in combination with other anticancer agents for clear cell carcinoma of the ovary. PLOS one 2016 11:e0151050. doi: 10.1371/journal.pone.0151050.
4. Matsumoto Y, Mabuchi S, Kozasa K, Kuroda H, Sasano T, Yokoi E, Komura N, Sawada K, Kimura T. The significance of tumor-associated neutrophil density in uterine cervical cancer treated with definitive radiotherapy. Gynecol Oncol. 2017, in press.
5. Takahashi R, Mabuchi S, Kuroda H, Kozasa K, Yokoi E, Matsumoto Y, Kimura T. The significance of pretreatment thrombocytosis and its association with neutrophilia in patients with in surgically-treated endometrial cancer patients. Int J Gynecol Cancer 2017, in press.
6. 馬淵誠士 PI3K/AKT/mTOR 経路を標的とした卵巣癌治療 日本婦人科腫瘍学会雑誌 2014;32号:217-225.
7. 馬淵誠士 腫瘍随伴性白血球増多を伴う子宮頸癌 ~ 発症のメカニズムの解明と個別化治療の開発 ~ 日本産科婦人科学会雑誌 2015;67:2546-2552.
8. 馬淵誠士 高橋良子 笹野智之 黒田浩正 木村正 Treatment of Ovarian Clear Cell Carcinoma 癌と化学療法, 42号:174-178. 癌と化学療法社, 東京, 2015.
9. 馬淵誠士 笹野智之 河野まひる 木村正 卵巣癌の分子標的治療 癌と化学療法, 41号:193-198. 癌と化学療法社, 東京, 2015.

10. 馬淵誠士 高橋良子 黒田浩正 笹野智之 小笹勝巳 松本有里 木村正 子宮頸癌の化学療法と分子標的治療 産科と婦人科, 83号:31-37. 診断と治療社, 東京, 2016.

11. 馬淵誠士 黒田浩正 高橋良子 今後の卵巣がん化学療法に期待される薬剤は? 臨床腫瘍プラクティス, 12号:151-160. ヴァンメディカル社, 東京, 2016.

[学会発表](計 11 件)

1. Seiji Mabuchi. Clear cell carcinoma of the ovary: molecular insights and future therapeutic perspectives. Invited lecture at the 55th Annual Congress of Taiwan Association of Obstetrics and Gynecology. Taipei, Taiwan, 3.4-6, 2016.
2. Seiji Mabuchi. Targeting infiltrating immune cells in the treatment of uterine cervical cancer: special focus on myeloid derived suppressor cells. Invited lecture at 102nd Annual Congress of Korean Association of Obstetrics and Gynecology. Seoul, Korea, 9.23-24, 2016.
3. Seiji Mabuchi. Clear cell carcinoma of the ovary (CCC): molecular insights and future therapeutic perspectives. Symposium at 21st Seoul Int'l Symposium. Seoul, Korea, 9.23-24, 2016.
4. 馬淵誠士: シンポジウム; Bevacizumab を用いた卵巣癌治療 ~ 基礎的な視点から ~. 第 56 回 日本婦人科腫瘍学会, 7.17-19, 2014.
5. 馬淵誠士: 腫瘍随伴性白血球増多を伴う子宮頸癌 ~ 発症のメカニズムの解

明と個別化治療の開発 ~. 第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会, 横浜, 4.9-12, 2015.

6. 馬淵誠士: 研究奨励賞講演; 子宮頸癌における Tumor related leukocytosis (TRL) の意義と、そのメカニズムの解明を目指した基礎研究. 第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会, 横浜, 4.9-12, 2015.
7. 馬淵誠士: シンポジウム; 卵巣明細胞腺癌に対する分子標的治療: Clear Cell Carcinoma of the Ovary: Molecular insights and future therapeutic perspectives. 第 57 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 盛岡, 8.7-9, 2015.
8. 馬淵誠士: シンポジウム; 卵巣明細胞腺癌に対する mTOR 阻害治療: 開発の現状と課題. 第 53 回日本癌治療学会, 京都, 10.29-31, 2015.
9. 馬淵誠士: シンポジウム; 婦人科悪性腫瘍における骨髄由来抑制細胞 (MDSC) の重要性. 第 34 回 日本ヒト細胞学会学術集会, 奈良, 7.16-17, 2016.
10. 馬淵誠士: 基調講演; 子宮頸癌に対する血管新生阻害治療 ~ 理論的背景と臨床応用 ~. 第 4 回 大阪婦人科腫瘍講演会, 大阪, 7.30, 2016.
11. 馬淵誠士: 平成 28 年度学術奨励賞受賞講演; 腫瘍随伴性白血球増多を伴う子宮頸癌: 発症のメカニズムの解明と個別化治療の開発. 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会, 広島, 4.13-16, 2017

〔図書〕(計4件)

1. Mabuchi S, Kawano M, Takahashi R, Kuroda H. Management of Metastatic and Recurrent Cervical Cancer. Handbook of Gynecology, Springer 2016. doi:10.1007/978-3-319-17002-2_5-1.
2. Kuroda H, Mabuchi S, Kozasa K, Kimura T. Fertility-Sparing Treatment for Early-Stage Cervical Cancer. Handbook of Gynecology, Springer 2016. doi:10.1007/978-3-319-17002-2_6-1.
3. Mabuchi S, Kawano M, Matsumoto Y, and Kimura T. Cervical Cancer: General Overview. Handbook of Gynecology, Springer 2016. doi:10.1007/978-3-319-17002-2_36-1.
4. Mabuchi S, Kawano M, Sasano T, Kuroda H. Management of Early-Stage and Locally Advanced Cervical Cancer. Handbook of Gynecology, Springer 2016. doi:10.1007/978-3-319-17002-2_34-1.

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

研究代表者

馬淵 誠士 (Mabuchi Seiji)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 00452441

(2)研究分担者

澤田 健二郎 (Sawada Kenjiro)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号: 00452392

橋本 香映 (Hashimoto Kae)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 90612078

(3)連携研究者: なし

(4)研究協力者

河野まひる (Kawano Mahiru)

高橋良子 (Takahashi Ryoko)

黒田浩正 (Kuroda Hiromasa)

小笹勝巳 (Kozasa Katsumi)

横井恵理子 (Yokoi Eriko)