

## 論文の内容の要旨

論文題目：卵巣癌における腹腔内癌微小環境と免疫細胞の解析

氏名 吉田光代

わが国の卵巣癌罹患患者数、死亡者数は増加傾向にある。卵巣癌は半数以上の症例で再発し、特に進行癌では2年以内に約55%が再発し、腹腔内播種が多く認められる。

卵巣癌において、慢性炎症やVEGFの濃度増加によっておこる腹水の貯留は病変の進展に特徴的である。大量の腹水は、脱水、食欲不振、体重減少、全身性の浮腫などの症状をおこし、全身状態を悪化させる。したがって、腹水量は卵巣癌の腫瘍進展の指標としても用いられており腹膜炎は卵巣癌の予後不良と関連するため、効果的な治療が求められている。近年、卵巣癌の腹膜播種によって大量の腹水が貯留するような症例においては、炎症のシグナル伝達やVEGF pathwayを標的とした治療など、癌微小環境をターゲットとした治療戦略も用いられている

癌組織には、腫瘍進展促進的かつ免疫抑制的な環境が形成されている。癌組織には tumor-associated macrophage (TAM)、myeloid-derived suppressor cell (MDSC)、tumor-infiltrating T cells (TIL)等の免疫抑制性の細胞が存在し、腫瘍進展に関わる。TAMは癌組織での炎症性微小環境の形成に主たる役割を果たしている。IL-6は、cancer associated fibroblast (CAF)やTAMなどで産生される主なサイトカインの一つであり癌細胞の活性化や癌微小環境の修飾により癌進展、予後不良と関係している。

癌遺伝子の質的・量的な活性化はヒトの癌種間で異なり、悪性細胞のアポトーシスを阻害し、細胞増殖を誘導するなどして腫瘍形成や播種を誘導する。癌遺伝子は治療標的となってきたが、MYCやRASといった“non-kinase”癌遺伝子は標的薬の確立が困難となっている。

大腸癌では、癌細胞の遺伝子異常により癌細胞のCXCL13とIL-15の産生が低下し、腫瘍内のCXCR5+ヘルパーT細胞やCD8+T細胞の遊走や増殖分化が低下することが報告されている。卵巣癌では、ARID1A-PIK3CA変異の共存によりIL-6の発現が上昇し、卵巣明細胞癌の腫瘍形成が促進することが報告されている。これらの既報より、癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の損傷が癌微小環境の修飾にも関連していることが示唆されるが、その機構については十分に理解されていない。

進行癌において、好中球数の増加が予後不良因子であることが報告されている。Nakamura et al.らは好中球／リンパ球比の増加が卵巣癌において予後不良や化学療法反応不良のマーカーとなることを示した。好中球は腫瘍促進マーカーであることが示され、tumor-associated neutrophils (TANs)と癌進展の関連性が近年注目を集めている。TANsには、N1(antitumor) typeとN2(protumor) typeの分類が知られており、多くの研究が、好中球を予後不良因子とし、その腫瘍促進の性質に焦点を当てている。最近の研究では、TANsがT細胞を活性化することで抗腫瘍効果を持つことがいくつかの癌種で報告された。しかしながら、癌種特異的に好中球の修飾が起こるという報告はない。

このような知見に基づき、我々は、卵巣癌の癌進展において癌遺伝子が癌微小環境を修飾すると予想した。そこで、まず、癌性腹膜炎を伴う卵巣癌における癌遺伝子の癌微小環境調節機構に注目し、C57BL/6より樹立したマウス卵巣上皮性不活化細胞株のID8にc-MYCとKRASを導入しマウス卵巣癌細胞株を作成し、ID8細胞、ID8-c-MYC細胞、ID8-KRAS細胞を腹腔内投与後の3種のマウスを、ID8マウス、ID8-c-MYCマウス、ID8-KRASマウスを命名した。以下を目的として、まず研究を行った。

1. 播種性の卵巣癌細胞株をマウスの腹腔内に投与し、癌遺伝子が癌微小環境を修飾するかどうか、するとすればその機序を解明する。
2. 卵巣癌進展における腫瘍微小環境中の好中球の機能と、癌遺伝子KRASがどのように癌微小環境中の好中球の特性に影響するのかを検討する。

その結果、*in vivo*の腹膜播種の進行は、3種の細胞株間において有意差を認めしたが、*in vitro*増殖アッセイと播種組織のKi-67増殖能は細胞株間において有意差を認めなかった。これらの結果より、癌細胞のc-MYC、KRASが、CAF、TAMおよび癌微小環境に働きかけて癌進展様式を調節する可能性が示唆された。腹水中のVEGF濃度は、ID8群およびID8-KRAS群と比較し、ID8-c-MYC群で有意に上昇し、c-MYC誘導性の腹膜癌の癌進展はVEGFによる血管透過性の上昇が寄与することが示唆された。IL-6やTNF $\alpha$ などの炎症性サイトカイン濃度がKRAS誘導性の腹水で有意に上昇していたことより、KRAS誘導性の癌進展では、炎症が中心的な役割を果たしていることが示唆された。KRAS誘導性の癌微小環境のその他の特徴として、腹水中の好中球数の増加が認められた。そこで、KRASが好中球数増加をもたらす機序を調べる目的で、本研究でも腹水や細胞培養液中のケモカイン濃度を測定したが、3群間で有意差は認めなかったため、細胞培養液でサイトカインアレイを施行したところ、サイトカインアレイのパネルに含まれる好中球の産生あるいは遊走と関連したサイトカインやケモカイン中、GM-CSFのみがID8-KRAS細胞培養液で同定された。GM-CSFは、好中球やマクロファージから産生されるhematopoietic growth factorとして注目されてきたが、近年の報告では、顆粒球の刺激に加え、*in vivo*において好中球を微小血管から血管外へ遊走させること、また、好中球の生存を延長させることが報告されていることから、KRAS誘導性のGM-CSFの発現は、癌微小環境における好中球数の増加の一因であることが示

唆された。さらに、腹水中への好中球遊走のメカニズムについて c-MET/HGF シグナルに着目したところ、好中球の c-MET の発現は、非担癌マウスや ID8 マウスより ID8-KRAS マウスの血中と腹水中で有意に高かった。HGF 濃度は KRAS 誘導性の腹水中で有意に上昇し、IL-6 や TNF $\alpha$  のような炎症性サイトカイン濃度も KRAS 誘導性の微小環境で上昇を認めた。したがって、炎症性サイトカインが ID8-KRAS マウスの好中球の c-MET 発現を増加させる可能性が考えられ、c-MET/HGF シグナルも KRAS 誘導性好中球遊走の一因であることが示唆された。以上の結果から、腹水量や播種形成に関わらず、KRAS が動員される好中球の数を増加させることが示唆された。また、癌遺伝子が好中球数を増加させる役割を果たすことも示唆された。

次に、卵巣癌進展における腫瘍微小環境中の好中球の機能と、癌遺伝子 KRAS がどのように癌微小環境中の好中球の特性に影響するのかを検討した。抗 Ly6G 抗体 (Nimp-R14) を用いた好中球除去により、有意に腹水貯留が促進され、IL-6 が関与する炎症が増悪した。また、腹水中の CD11b+F4/80+マクロファージや CD11b+ Ly6C+単球の割合には有意な変化は認めなかった。さらに、腹水中では Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>low</sup>/CD11b<sup>+</sup> M-MDSC が制御性 T 細胞 (regulatory T cell : Treg) とともに増加し、一方、CD8 T 細胞は減少した。次に、腹腔内の好中球 (peritoneal neutrophils : PEN) に注目し、*in vitro* での CD8 T 細胞活性化を解析した。末梢血中の好中球 (peripheral blood neutrophils : PBN) や ID8 マウスの PEN と比較し、ID8-KRAS マウスの PEN では、T 細胞の共刺激分子である OX40 ligand (OX40L) の発現が高く、また、T 細胞分裂能の増強もより大きかった。以上の結果から、腹水中の好中球は、KRAS 誘導性に増加し、癌微小環境の修飾により IL-6 が関与する炎症と腹水貯留を抑制することで抗腫瘍効果を発揮すること、また、この抗腫瘍効果は KRAS 誘導性の好中球でより強いことが示された。

以上、本研究結果から、c-MYC 誘導性の癌微小環境では VEGF による血管透過性が寄与し腫瘍進展が促進することが考えられた。また、KRAS 誘導性の癌微小環境では、炎症反応惹起により腫瘍進展が促進する可能性が考えられた。癌微小環境中の好中球は、OX40L や 4-1BBL を高発現して CD8 T 細胞の分裂を抑制することや、制御性 T 細胞数や M-MDSC 数の減少により好中球が抗腫瘍効果をもつことが明らかとなった。また、好中球の抗腫瘍効果は、IL-6 に関係する炎症反応の抑制や腹水貯留の抑制の効果を持つことも示唆された。今後は、癌性腹膜炎の進展抑制と腹水貯留抑制を目的とした治療には、c-MYC 変異を認める腫瘍では、Bevacizumab などの抗血管新生剤を、KRAS 変異を認める腫瘍では、抗炎症剤が有効と考えられる。また、免疫療法として、T 細胞の共刺激分子である OX40 ligand (OX40L) あるいは 4-1BB ligand (4-1BBL) を介す治療の併用も有効となる可能性がある。