

## 審査の結果の要旨

氏名 吉田光代

癌遺伝子の癌細胞への影響は広く研究されているが、その癌微小環境への影響は殆ど明らかになっていない。本研究は、マウス卵巣癌細胞株 ID8 に癌遺伝子 c-MYC および 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、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。

下記の結果を得た。

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、mRNA とタンパク質発現レベルの両方が、他群よりも ID8-KRAS 細胞群で有意に高かったことから、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+Ly6Glow/CD11b+ 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、癌遺伝子が特徴的な癌微小環境を誘導することで卵巣癌進展に影響することが明らかになった。癌遺伝子と特定の癌微小環境の修飾を解明することは癌進展のメカニズムの理解につながり、各癌遺伝子に最適な、効果的な薬剤による卵巣癌治療の考案が期待でき、学位の授与に値するものと考えられる。