

令和5年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 国際共同研究推進助成金
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
研究課題名	卵巣明細胞癌に対する新規治療薬とバイオマーカーの開発	
研究者所属・氏名	研究代表者： 医学部産科婦人科学 宮川 知保 共同研究者： 医学部産科婦人科学 松村謙臣 医学部産科婦人科学 村上幸祐 医学部ゲノム生物学教室 西尾和人 医学部ゲノム生物学教室 坂井和子 薬学部 薬物治療学研究室 西田升三	

1. 研究目的・内容

卵巣明細胞がん (**clear cell carcinoma: CCC**) は、**IL-6 産生腫瘍**として知られている。IL-6 は腫瘍の増殖、及び腫瘍免疫に関与すると考えられているが、実際の役割は不明である。また、CCC は化学療法抵抗性の難治性腫瘍であるが、臨床試験の結果から**免疫チェックポイント阻害薬 (Immune checkpoint inhibitor: ICI)** が奏功する可能性が示唆されている。しかしながら IL-6 が ICI に与える影響も未だ解明されていない。そこで、ヒト CCC と極めて類似し、IL-6 を産生する腫瘍を形成するマウス CCC モデルを構築した。さらにマウスの腫瘍から様々な IL-6 産生能を有する複数の細胞株を樹立した。高 IL-6 産生株は低 IL-6 産生株と比較し、皮下接種後に筋層を超え腹腔内へ到達するほど高い浸潤能を有するなど、種々の異なる表現系を示した。そこで、本研究ではマウスモデルとこれら CCC 細胞株を用い (i) IL-6 や ICI の CCC に対する治療効果を確認し、(ii) IL-6 が腫瘍の *in vivo* 表現形に及ぼす影響を解明すると共に、(iii) 腫瘍細胞由来 IL-6 が抗腫瘍免疫へ及ぼす影響、更には、(iv) ICI 感受性に与える影響調べる。そして、(v) ヒト CCC データベースと照合することで ICI 奏効のバイオマーカーの探索へ繋げる。

2. 研究経過及び成果

(i) *IL-6 経路阻害は、単剤で強力な抗腫瘍効果を認める

① L-6 の阻害と ICI の併用による抗腫瘍効果 (basic)

CCC では ARID1A と PIK3CA の変異の頻度が高い。そして CD1 マウス(近交系ではなく腫瘍免疫の実験には使用できない)の卵巣に CRE-inaudible な Arid1a/Pik3ca の共変異を生じさせて作成したマウス CCC モデルでも IL-6 の高発現が認められた(Chandler RL, Nat Commun 2015)。Dr. Chandler から上記のマウスの譲渡を受けて、C57BL/6 マウスとの戻し交配を行って、腫瘍免疫の実験が可能なマウス CCC モデルを作成し、そして同モデルを用いた予備実験において、腹腔内腫瘍形成および腹水貯留による腹部膨満を確認後の進行 CCC マウスに対して、抗 IL-6 抗体、抗 Pd-1 抗体とともに一定の抗腫瘍効果を認めたが、抗 IL-6 抗体+抗 Pd-1 抗体、抗 IL-6 抗体+抗 Ctl4 抗体の併用では、抗 IL-6 抗体単独群の抗腫瘍効果をこえることはなかった(図 1)。腹水中のリンパ球を採取して PMA で刺激すると、T-bet 陽性 Th1 細胞の IFN γ 産生が抗 IL-6 抗体投与群で減弱する傾向があり、抗 IL-6 抗体投与による免疫抑制が生じていると考えられた。また、抗 Pd-1 抗体と抗 Ctl4 抗体の 2 剤併用でも、抗 Pd-1 抗体単独群に比してマウスの生存期間延長は認められなかった(図 1)。しかし驚くべきことに、非常に進行した状態から治療を開始したにも関わらず、抗 IL-6 抗体+抗 Pd-1 抗体+抗 Ctl4 抗体の 3 剤併用では、腫瘍の完全消失が得られて非常に長期に生存するマウスが 6 匹中 2 匹認められた。このデータは、irAE を抑制しつつ非免疫経路による抗腫瘍効果を有する IL-6 経路の阻害と、強力な免疫療法の組み合わせが、IL-6 産生腫瘍である CCC の長期生存につながる可能性を示唆している。そこで、卵巣癌発症前後にあたるアデノウイルス投与後 7 週間のマウスモデルに対して、コントロール抗体・抗 IL-6 抗体・抗 IL-6 抗体と抗 Pd-1 抗体と抗 Ctl4 抗体の 3 剤併用療法を行って生存を比較したところ、抗 IL-6 抗体単剤投与が最も有意に生存を延長した。抗 IL-6 抗体による抗腫瘍効果発現メカニズムを探索することを目的に抗 IL-6 抗体投与を行ったマウスの腫瘍を摘出してフローサイトメトリーで免疫担当細胞の分布を確認したところ、好中球と NK 細胞の低下を認めたが ICI のターゲットとなる CD4/8 陽性 T 細胞やマクロファージ樹状細胞の分布に変化は認めなかった。予備実験での CD4/8 陽性 T 細胞の機能低下と合わせ、IL-6 を中和することで免疫担当細胞の機能抑制が起こり、ICI のターゲットである CD8 陽性 T 細胞の機能が抑制されて相加効果が得られない可能性が示唆された。さらにこのことは、抗 IL-6 抗体による抗腫瘍効果が免疫担当細胞を介していない、その他の経路であることも示唆された。

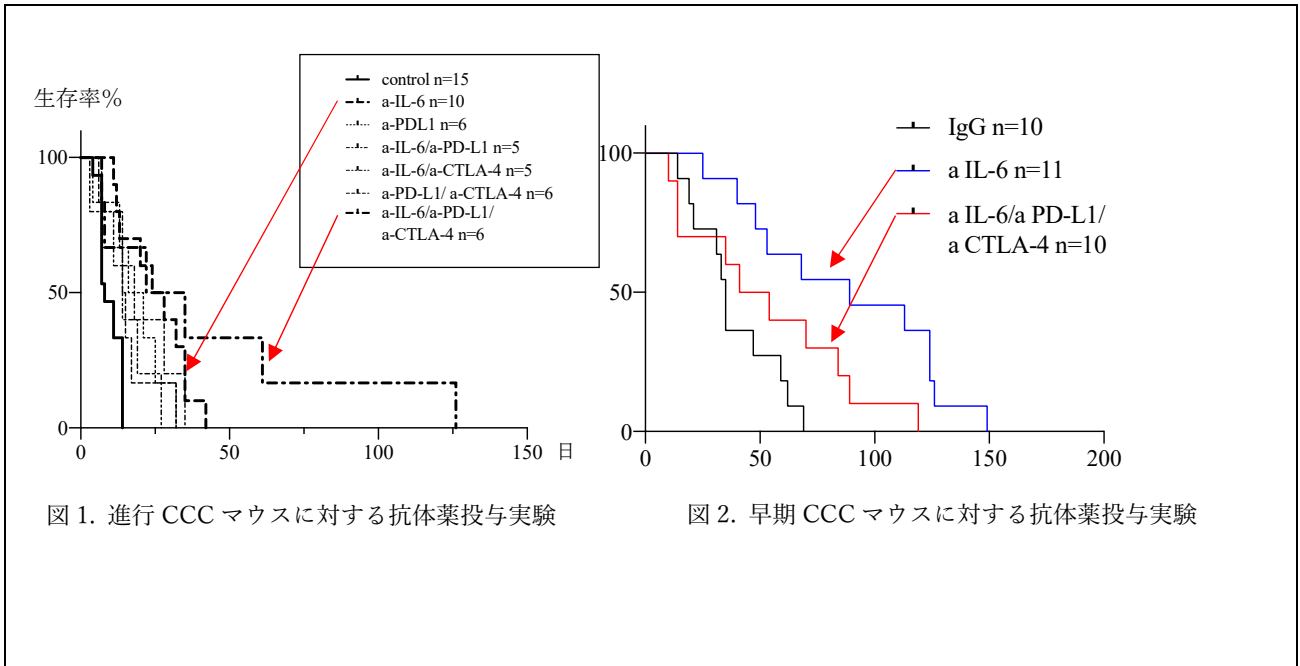
② IL-6 産生量の異なる細胞株を用いた、腫瘍増殖と免疫の関係、及び ICI 投与による抗腫瘍効果の解析 (basic)

本マウスモデルから樹立した細胞株は同種移植が可能であり、移植後の腫瘍の進展把握や時系列での免疫学的解析の比較が可能である。また、IL-6 は、発癌だけでなく腫瘍生着や進展の過程の全てに寄与し、腫瘍免疫への影響のみならず、適応範囲の広い治療の標的因子になる可能性がある。

未治療発癌マウス、もしくは抗 IL-6 抗体治療を施した発癌マウスより種々の癌細胞を分離し、異なる IL-6 高産生能を有する細胞株を得た。B6 マウスを用いた皮下移植実験にて、IL-6 高産生株は背部皮下から筋層を通過し腹腔内まで達するほどの激しい浸潤能を持つ一方、IL-6 産生能を完全に失った株は、皮下・卵巣・腹腔内投与しても腫瘍は増殖しなかった。そこで、IL-6 高産生腫瘍の IL-6 発現をノックアウトした細胞株の作成を試みたが作成はできなかった。すなわち、腫瘍形成に IL-6 が必要絶対条件である可能性が示唆された。

③ マウスモデルから得られたデータのヒトへの応用 (translational)

発癌したマウスモデルに対し、コントロール抗体と抗 IL-6 抗体を 1 週間投与して腫瘍を摘出し、腫瘍細胞の mRNA 発現を RNA sequencing で確認した。コントロール抗体を投与したマウスモデル腫瘍の PCA に個体差が大きく PCA が一定しなかったため、単遺伝子レベルでの解析は困難であったが、Gene set で比較すると IL-6 によって発現が亢進する IL-17 シグナリングの発現低下を認め、抗体薬投与している効果が見えていることはわかった。その他抗 IL-6 抗体投与による影響は、セリンスレオニンキナーゼや MAPK カスケードの Gene set の遺伝子発現の低下を認めた。IL-6 は JAK/STAT 経路のシグナルを亢進して c-myc, bcl2, cyclinD1, MCP-1, MMPs などの転写を促進して増生・分化・アポトーシス回避・化学療法抵抗性を獲得すると言われている。そのうち、MMP はセリンスレオニンキナーゼであり、この pathway の亢進の影響が少なからずあると思われる。卵巣癌細胞株 A2780/SK-OV3 でも a-IL6 による増殖抑制効果 (IL-6 による MMP2/9 産生抑制と線維化・血管新生抑制) が本腫瘍でも生じている可能性が示唆された。



3. 本研究と関連した今後の研究計画

IL-6 と免疫担当細胞の関連が本当はないのかどうかを検証するために、CD8 を抑制した担癌マウスで抗 IL-6 抗体投与による効果が同様に得られるかどうかを確認する。さらに、その他の組織型の卵巣癌マウスモデルに対して抗 IL-6 抗体の効果が得られるかどうか確認する。

IL-6 による腫瘍増殖効果のメカニズムを検証することを目的に、IL-6 高産生株の IL-6 発現をノックダウンして高産生株の RNA 発現と比較して腫瘍増殖にかかわる pathway を検索する。その結果とヒト卵巣癌遺伝子発現データを比較して CCC 固有の腫瘍増殖経路を特定し今後の治療ターゲットを見出す。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
日本産科婦人科学会	ポスター	2024/4/21
日本婦人科がん分子標的研究会	口頭	2023/12/17
日本癌学会	ポスター	2023/9/22
日本婦人科腫瘍学会	口頭	2023/7/16