

主論文の要旨

Interleukin-33 expression in ovarian cancer and its possible suppression of peritoneal carcinomatosis

〔 卵巣癌におけるインターロイキン 33 の発現と
腹膜播種抑制の可能性 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

関谷 敦史

【緒言】

卵巣癌は腹膜転移やリンパ行性転移を起こしやすいものの、一般的に自覚症状に乏しいため、診断時点で進行している場合が多い。手術で病変を除去することが重要であるが、残存・細胞レベルの病変に対しては化学療法に依存している。化学療法は有効な治療ではあるものの、多くは薬剤耐性の腫瘍が再発してくるため、婦人科悪性腫瘍の中でも予後不良である。

IL-33 は IL-1 サイトカインファミリーの 1 つであり、癌に関連する既報も近年増えてきている。しかし、癌に対する作用として促進的か抑制的であるかについては、いずれの報告も散見されており、未だ解明されていない点が多い。本研究では、進行卵巣癌において来しやすく難治性である腹膜播種と IL-33 の関連性を解明すべく臨床的・基礎的に検討した。

【方法】

マウス卵巣癌細胞株 ID8 の IL-33 強制発現株を作製し、B6 マウス腹膜播種および皮下腫瘍モデルを作製した。IL-33 の腫瘍免疫に対する効果を免疫染色にて評価した。骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)の関与に関しては腫瘍内への浸潤を解析した。さらに癌性腹水による MDSC 誘導能を検討した。また、ID8 を播種継代した高播種株 ID8-T6 の IL-33 発現抑制株を用いたマウスモデルを作製し評価した。

100 症例の卵巣癌病理組織検体、臨床データを用いて IL-33 の発現と腫瘍局所免疫および予後との関係を解析した。

【結果】

腹膜播種環境下における IL-33 の役割を検討するために、IL-33 発現陰性株である ID8-WT に IL-33 cDNA を遺伝子導入し、ID8-IL33 株を作製した。遺伝子導入後の IL-33 の発現は、半定量 PCR および Western blotting 法にて確認した (Figure1A,B)。さらに、細胞培養上清中の IL-33 濃度が十分に高いことも確認した (Figure1C)。in vitro での細胞増殖能を評価したが、ID8-IL33 株とコントロール株との間に差は認めなかった (Figure1D)。次に in vivo での腫瘍増殖における IL-33 の役割を評価した。皮下腫瘍マウスモデルを作製し両群での腫瘍形成能を比較したが、差は認めなかった (Figure1E)。続いて、腹膜播種マウスモデルを作製し生存を比較した。コントロール株と比較して ID8-IL33 株群の生存期間は有意に延長された (P = 0.001; Figure1F)。

IL-33 が腫瘍免疫に関与している可能性を検討するため、免疫染色により腹膜播種腫瘍内の免疫細胞 (CD4、CD8、CD11b および F4/80) の局在を解析した (Figure1G)。腫瘍内に浸潤している CD4+細胞および CD8+細胞の数は、ID8-IL33 腫瘍で有意に増加していた。対照的に、CD11b+細胞の数は減少していた。これらの結果から、IL-33 が抗腫瘍免疫を促進することにより腫瘍増大を阻害することが示唆されたため、骨髄由来抑制細胞 (MDSC) の関与を検討した。MDSC は、マウスの CD11b+ Gr-1+細胞とし

て特徴付けられるため、FCMにより腫瘍内 CD11b+Gr-1+細胞を解析した。ID8-IL33 株由来の腫瘍では、腫瘍内 CD11b+Gr-1+細胞の数が大幅に減少していた (Figure2A)。

MDSC に対する癌性腹水の影響を検討するために、健常マウスの骨髄細胞を担癌マウスの腹水添加条件下で培養した。ID8-IL33 由来腹水群において誘導される CD11b+Gr-1+細胞の数は有意に少なかった (Figure2B)。マウス腹水中の IL-33 濃度を ELISA で測定すると、コントロール株由来の腹水中には IL-33 がほとんど含まれていなかったのに対して ID8-IL33 由来腹水中の IL-33 濃度は有意に高かった (Figure2C)。コントロール株由来腹水 (IL-33-free) に、rIL-33 を添加して骨髄細胞を培養すると、rIL-33 濃度に依存して MDSC の分化が有意に減少した。 (Figure2D)。

腹膜播種マウスモデルにおいて、ID8-T6 (高播種能細胞株) 群は ID8-WT 群と比較して生存期間が大幅に短縮していた。ID8-T6 細胞の IL-33 をノックダウンし、shIL-33 株を作製した。IL-33 の発現抑制は Western blotting 法により確認した (Figure3A)。in vitro での細胞増殖はコントロール株と比較して差を認めなかった (Figure3B)。腹膜播種マウスモデルでは、shIL-33 腫瘍マウスは生存期間が有意に短くなった (P = 0.019; Figure3C)。さらに、IL-33 のノックダウンにより、腫瘍内の CD8+細胞の数が減少し、CD11b+Gr-1+細胞の数が増加していた (Figure3D,E)。

腹膜播種マウスモデルでは IL-33 が抗腫瘍免疫を増強することで生存期間の延長に寄与している結果であったため、臨床的にも同様な関連性があるかを評価するために、ヒト原発卵巣癌組織 100 個における IL-33 の発現を解析した (Table1)。IL-33 の発現レベルをスコア 0/1 は low、2/3 は high と分類した (Figure4A)。IL-33 の染色が high の症例では、全生存期間が有意に延長していた (P = 0.047; Figure4B)。CD4 および CD8 の免疫染色も実施した。腫瘍内浸潤 CD8+細胞の数は IL-33 高発現群で有意に増加していた (Figure4C)。

【考察】

本研究では、卵巣癌の腹膜播種に関与する潜在的な因子として IL-33 に注目した。IL-33 は近年癌との関連が報告されてきている液性因子の一つである。IL-33 強制発現株の検討では、マウス腹膜播種モデルにおいて IL-33 発現は生存期間の大幅な延長をもたらした。対照的に ID8-T6 細胞での IL-33 のノックダウンは、マウスの生存期間を大幅に短縮した。したがって、IL-33 はマウスの腹膜播種モデルにおいて腫瘍増殖を抑制したと考えられた。IL-33 を高発現するにも関わらず ID8-T6 が高い播種能を有する理由については、IL-33 よりも腹膜播種に大きな影響を及ぼすいくつかの増悪因子が ID8-T6 細胞で発現を獲得している可能性がある。すなわち、IL-33 の抗腫瘍効果は、他の腫瘍促進因子との相互作用により埋没している可能性があると考えられた。その検証のひとつとして、我々は ID8-WT または ID8-T6 細胞を免疫不全マウス (BALB/C nude) に腹腔内注射したところ、免疫能を有する B6 マウスと同様に ID8-T6 細胞による腹膜播種形成能は ID8-WT 細胞によるそれよりも高かった。

ID8-T6 において、IL-33 は ID8 を繰り返し播種継代する過程で獲得された腫瘍抑制

因子といえる。同様にヒトの腫瘍がある程度進行するにつれて、腫瘍内の IL-33 発現が最終的に増加している可能性がある。実際、IL-33 の発現レベルは、原発部位と比較して転移部位の腫瘍組織でさらに増加したという既報がある。したがって、本研究では IL-33 高発現症例で予後が良好な結果であったが、IL-33 を卵巣癌の予後マーカーとして使用することに関しては、さらなる検討が必要と考えられる。

本研究では、皮下腫瘍モデルでは IL-33 の過剰発現による腫瘍増殖に有意な差は確認できなかったが、腹膜播種モデルではマウスの生存が有意に延長した。これは腹膜播種に特徴的な結果であると考えられた。腫瘍で発現した IL-33 は、皮下腫瘍モデルでは主に局所的に作用するが、腹膜播種モデルにおいては癌性腹水を介して広範囲に作用する差異がある。IL-33 が及ぼす抗腫瘍免疫能の増強と、その結果である抗腫瘍効果は担癌状態によって左右されると考えられた。

【結語】

IL-33 は卵巣癌の腹膜播種において抑制的に働くことが示唆された。また、皮下腫瘍モデルでは腫瘍形成能に差を認めなかったことから腹膜播種に特徴的な反応であると考えられた。癌性腹水中の IL-33 が腫瘍内への MDSC の誘導を阻害することで間接的に抗腫瘍免疫を増強し、結果として腹膜播種の進行を抑制していることが示唆された。

IL-33 の抗腫瘍効果の解明は、将来、腹膜播種を伴う卵巣癌の新しい治療戦略の一つとなりうるかもしれない。