

PD-L1 on tumor cells is induced in ascites and promotes peritoneal dissemination of ovarian cancer through CTL dysfunction

(卵巣癌細胞上の PD-L1 は、腹水中で発現誘導され、細胞傷害性 T 細胞の機能を低下させることで腹膜播種を促進させる)

安彦 郁

卵巣癌は、本邦では年間約 8000 人が罹患し、4500 人以上が死亡している、婦人科腫瘍の中で最も予後が悪い疾病である。その原因として、腹膜播種を起こしやすく、半数以上の症例が、診断時に広範な腹膜病変を伴う進行例であることが挙げられる。したがって、腹膜播種を制御することは卵巣癌の治療において非常に重要である。進行卵巣癌に対しては、手術による可及的腫瘍減量と抗癌剤治療を組み合わせた集学的治療が行われるが、長期予後は不良であるため、新規治療法の開発が望まれている。

近年、がん細胞が宿主免疫から逃避する能力（がん免疫逃避機構）を備えていること、またこの機構を解除することによりがんの進展を抑えられることが注目されている。PD-L1 (Programmed cell death 1 ligand 1) は、免疫抑制性補助シグナル分子の一つで、リンパ球表面の受容体 PD-1 (Programmed cell death 1) と結合するとリンパ球の活性化を抑制する。多くの癌細胞が PD-L1 を発現し、宿主免疫から逃避していることが知られており、当教室では卵巣癌における PD-L1 発現が予後不良因子であることを報告している。

そこで、本研究では、卵巣癌の腹膜播種における PD-L1 の役割を解明することを目的とした。

当科にて 1997 年から 2011 年に初回治療を行った卵巣癌 64 症例の腫瘍組織の遺伝子発現マイクロアレイによる検討では、腹水細胞診陽性の症例では、陰性例に比して PD-L1 を含む免疫に関連した遺伝子群の発現が有意に高かった。また、免疫組織染色においても、PD-L1 高発現例は、低発現例に比して有意に腹水細胞診陽性例が多く ($p=0.048$)、全生存率において予後不良であった ($p=0.023$)。

次に 6 つのヒト卵巣癌細胞株における PD-L1 発現をフローサイトメトリーで解析した結果、PD-L1 陽性が 2 株、陰性が 4 株であったが、PD-L1 陰性株中 3 株において、インターフェロン- γ (IFN- γ) 添加により、PD-L1 発現が誘導された。

マウス卵巣癌細胞株 ID8 においても、PD-L1 発現は陰性であったが、IFN- γ 添加により PD-L1 発現が誘導され、また、活性化 CD8+T 細胞との共培養によっても同様に PD-L1 発現が誘導された。さらに、ID8 を同系マウスの腹腔内に

投与し腹膜播種モデルを作製した結果、腹水中の腫瘍細胞に PD-L1 が発現した。マウス腹水中の T 細胞は細胞内 IFN- γ に富み、この腹水中 T 細胞と共培養することでも ID8 の PD-L1 は発現誘導された。

次に、PD-L1 遺伝子を強制発現または発現抑制したマウス卵巣癌細胞株、ID8-PDL1 と ID8-MirPDL1 を作製し、抗原特異的に活性化させた CD8+T 細胞とそれぞれ共培養し、細胞傷害試験およびタイムラプスでの観察を行った。その結果、ID8-PDL1 には CD8+T 細胞は集積せず、細胞溶解も抑制されたが、ID8-MirPDL1 には CD8+T 細胞が集積し、容易に溶解された。また、これらの細胞株をマウスの腹腔内に投与すると、PD-L1 発現を抑制した ID8-MirPDL1 を投与した群では、ID8-control 群や ID8-PDL1 群に比して腹膜播種が抑制されるとともに、マウスの生存期間が有意に延長した。マウス卵巣癌細胞株 HM-1 を用いて、同様の動物実験を行ったところ、ID8 の場合と同様、PD-L1 発現抑制株投与群では腹膜播種が抑制され、マウスの生存期間が有意に延長した。また、T リンパ球を欠く SCID マウスを用いて同様の動物実験を行ったところ、PD-L1 発現抑制または強制発現によってマウスの生存期間には差を認めなかった。

本研究の結果から、卵巣癌細胞は、腹腔内で免疫細胞との接触により PD-L1 を発現し、PD-L1 が細胞傷害性 T 細胞の機能を抑えることにより、腹膜播種が促進されることが示された。PD-L1 を標的とした治療によって、腹膜播種を抑制し、卵巣癌患者の長期予後を改善できる可能性が示唆された。

論文本文中の引用文献一覧

1. Roett MA, Evans P. Ovarian cancer: an overview. *Am Fam Physician* 2009;80(6):609-16.
2. du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* 2009;115(6):1234-44.
3. Bookman MA. Developmental chemotherapy and management of recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(10 Suppl):149s-67s.
4. Tan DS, Agarwal R, Kaye SB. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *Lancet Oncol* 2006;7(11):925-34.
5. Padua D, Massague J. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res* 2009;19(1):89-102.
6. Yoshida J, Horiuchi A, Kikuchi N, Hayashi A, Osada R, Ohira S, et al. Changes in the expression of E-cadherin repressors, Snail, Slug, SIP1, and Twist, in the development and progression of ovarian carcinoma: the important role of Snail in ovarian tumorigenesis and progression. *Med Mol Morphol* 2009;42(2):82-91.
7. Yamamura S, Matsumura N, Mandai M, Huang Z, Oura T, Baba T, et al. The activated transforming

growth factor-beta signaling pathway in peritoneal metastases is a potential therapeutic target in ovarian cancer. *Int J Cancer* 2011;130(1):20-8.

8. Masoumi Moghaddam S, Amini A, Morris DL, Pourgholami MH. Significance of vascular endothelial growth factor in growth and peritoneal dissemination of ovarian cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2012;31:143-62.

9. Peoples GE, Schoof DD, Andrews JV, Goedegebuure PS, Eberlein TJ. T-cell recognition of ovarian cancer. *Surgery* 1993;114(2):227-34.

10. Abrahams VM, Straszewski SL, Kamsteeg M, Hanczaruk B, Schwartz PE, Rutherford TJ, et al. Epithelial ovarian cancer cells secrete functional Fas ligand. *Cancer Res* 2003;63(17):5573-81.

11. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10(9):942-9.

12. Gordon IO, Freedman RS. Defective antitumor function of monocyte-derived macrophages from epithelial ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006;12(5):1515-24.

13. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-74.

14. Thibodeaux SR, Curiel TJ. Immune Therapy for Ovarian Cancer: Promise and Pitfalls. *International Reviews of Immunology* 2011;30(2-3):102-19.

15. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(9):3360-5.

16. Li K, Mandai M, Hamanishi J, Matsumura N, Suzuki A, Yagi H, et al. Clinical significance of the NKG2D ligands, MICA/B and ULBP2 in ovarian cancer: high expression of ULBP2 is an indicator of poor prognosis. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58(5):641-52.

17. Liu M, Matsumura N, Mandai M, Li K, Yagi H, Baba T, et al. Classification using hierarchical clustering of tumor-infiltrating immune cells identifies poor prognostic ovarian cancers with high levels of COX expression. *Mod Pathol* 2009;22(3):373-84.

18. Hamanishi J, Mandai M, Abiko K, Matsumura N, Baba T, Yoshioka Y, et al. The comprehensive assessment of local immune status of ovarian cancer by the clustering of multiple immune factors. *Clin Immunol* 2011;141(3):338-47.

19. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999;5(12):1365-9.

20. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000;192(7):1027-34.

21. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 2010;28(19):3167-75.

22. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and

Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2443-54.

23. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2455-65.

24. Zheng Q, Wang XJ. GOEAST: a web-based software toolkit for Gene Ontology enrichment analysis. *Nucleic Acids Res* 2008;36(Web Server issue):W358-63.

25. Sana TR, Janatpour MJ, Sathe M, McEvoy LM, McClanahan TK. Microarray analysis of primary endothelial cells challenged with different inflammatory and immune cytokines. *Cytokine* 2005;29(6):256-69.

26. Roby KF, Taylor CC, Sweetwood JP, Cheng Y, Pace JL, Tawfik O, et al. Development of a syngeneic mouse model for events related to ovarian cancer. *Carcinogenesis* 2000;21(4):585-91.

27. Janát -Amsbury MM, Yockman JW, Anderson ML, Kieback DG, Kim SW. Comparison of ID8 MOSE and VEGF-modified ID8 cell lines in an immunocompetent animal model for human ovarian cancer. *Anticancer Res* 2006;26(4B):2785-9.

28. Yamaguchi K, Mandai M, Oura T, Matsumura N, Hamanishi J, Baba T, et al. Identification of an ovarian clear cell carcinoma gene signature that reflects inherent disease biology and the carcinogenic processes. *Oncogene* 2010;29(12):1741-52.

29. Hamanishi J, Mandai M, Matsumura N, Baba T, Yamaguchi K, Fujii S, et al. Activated local immunity by CC chemokine ligand 19-transduced embryonic endothelial progenitor cells suppresses metastasis of murine ovarian cancer. *Stem Cells* 2009;28(1):164-73.

30. Quigley M, Pereyra F, Nilsson B, Porichis F, Fonseca C, Eichbaum Q, et al. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8⁺ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med* 2010;16(10):1147-51.

31. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8(8):793-800.

32. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2008;8(6):467-77.

33. Petroff MG, Chen L, Phillips TA, Hunt JS. B7 family molecules: novel immunomodulators at the maternal-fetal interface. *Placenta* 2002;23 Suppl A:S95-101.

34. Hori J, Wang M, Miyashita M, Tanemoto K, Takahashi H, Takemori T, et al. B7-H1-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. *J Immunol* 2006;177(9):5928-35.

35. Muhlbauer M, Fleck M, Schutz C, Weiss T, Froh M, Blank C, et al. PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *J Hepatol* 2006;45(4):520-8.

36. Waeckerle-Men Y, Starke A, Wuthrich RP. PD-L1 partially protects renal tubular epithelial cells from the attack of CD8⁺ cytotoxic T cells. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22(6):1527-36.

37. Parsa AT, Waldron JS, Panner A, Crane CA, Parney IF, Barry JJ, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med* 2007;13(1):84-8.

38. Marzec M, Zhang Q, Goradia A, Raghunath PN, Liu X, Paessler M, et al. Oncogenic kinase NPM/ALK

induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(52):20852-7.

39. Aslam N, Marino CR. Malignant ascites: new concepts in pathophysiology, diagnosis, and management. *Arch Intern Med* 2001;161(22):2733-7.

40. Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res* 2005;65(3):1089-96.

41. Blank C, Brown I, Peterson AC, Spiotto M, Iwai Y, Honjo T, et al. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer Res* 2004;64(3):1140-5.