

HPV-16由来のE7配列(変異E7:E7Rb)に*Lactococcus lactis*由来の細胞壁結合タンパクAcmAのアンカー部分(cA)をコ換え体により、E7Rb=cA 融合タンパクを大量に産生させ、his タグを使って、回収・精製した。本研究では、cA=E7Rb を発現させる宿主として *E. coli* BL21(DE3) の LPS 欠損株 (Clear Coli™) を、用いた。

#### ②乳酸菌の菌体表層への cA=E7Rb の固定化

*Lactobacillus casei* IGM393 株を酸処理した後、Tjibbe Bosma ら(2006)の方法で、E7Rb=E7 の精製物を、菌体表層へ固定化した。固定化の確認は、蛍光顕微鏡での蛍光検出により確認した。また、E7Rb=E7 の精製物を濃度を変えて乳酸菌表層に固定化し、FACS により、菌体表層への固定化の状態を確認した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験は、委員会の審査を受けた後、国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則にしたがい、実験を行った。

### C. 研究結果

#### ①大腸菌によるE7-アンカータンパクの作成

大腸菌用のプラスミドpQE-31に、cA=E7Rbを組み込み、大腸菌 *E. coli* JM 109を形質転換した。抗HPV16 E7抗体を用いたWestern-blotの結果を、図2に示した。挿入した遺伝子産物は、*E. coli* BL21(DE3)のLPS欠損株 (Clear Coli™) で発現した。抗HPV16 E7抗体によるWestern Blotにより、組み込んだ遺伝

子産物を結合させ、大腸菌用のプラスミドpQE31に挿入した(図1)。このプラスミドで形質転換した組子産物の発現を確認した(図2)。

得られた組換え体を大量培養し、hisタグを利用して回収・精製した。Western-blot法により画分を確認した結果、不溶性画分であることが確認された。そのため、一度タンパクを変性させて抽出し、TALON® Metal Affinity Resinを用いて精製を行った。

#### ②乳酸菌の菌体表層へのcA=E7Rbの固定化

乳酸菌としては、*Lactobacillus casei* IGM393を用いた。菌体表層へアンカータンパクcAとの融合タンパクを固定化には、培養した菌体をあらかじめ酸処理を行いcA=E7Rbを固定化した。

蛍光顕微鏡での蛍光検出によりcA=E7Rbの*L. casei* IGM393菌体表層への固定化を確認した(図3)。また、固定化するcA=E7Rbの濃度を変化させて固定化した場合の実際の表面上のcA=E7Rbの状態については、FACSにより確認した(図4)。

### D. 考察

#### ①大腸菌によるE7-アンカータンパクの作成

形質転換体は、hisタグ付きのcA=E7Rbタンパクを発現し、TALON® Metal Affinity Resinを用いて精製を行った。宿主をLPS欠損株 (Clear Coli™) にすることで、精製物中には、LPS活性をほとんど含まない今回の実験の目的に

用いるには申し分の無い精製物が得られた。

## ②乳酸菌の菌体表層へのcA=E7Rbの固定化

乳酸菌を酸処理することにより、精製タンパクは菌体表層に固定化することができ、添加する濃度を変化させることで、 $10^8$ 細胞あたりで、約 $1.0\mu\text{g}$ 程度のcA=E7Rbを固定化できることがわかった。また、加えるcA=E7Rbの量に合わせて、乳酸菌表層に固定化できる量が濃度依存的に変化させることができることを確認できた。

これらのcA=E7Rbの量を変化させた乳酸菌を用い、マウスの実験系で免疫効果を評価することにより、最も効果の高い抗原と乳酸菌の量比を決めるといふ当初の目的を達成することが期待される。

## E. 結論

E7Rbにアンカーを結合させたタンパク質を用いて、乳酸菌表層にE7Rb

を固定化することに成功した。この手法を用いて、E7Rbの量を任意に変化させた乳酸菌を作出することができた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

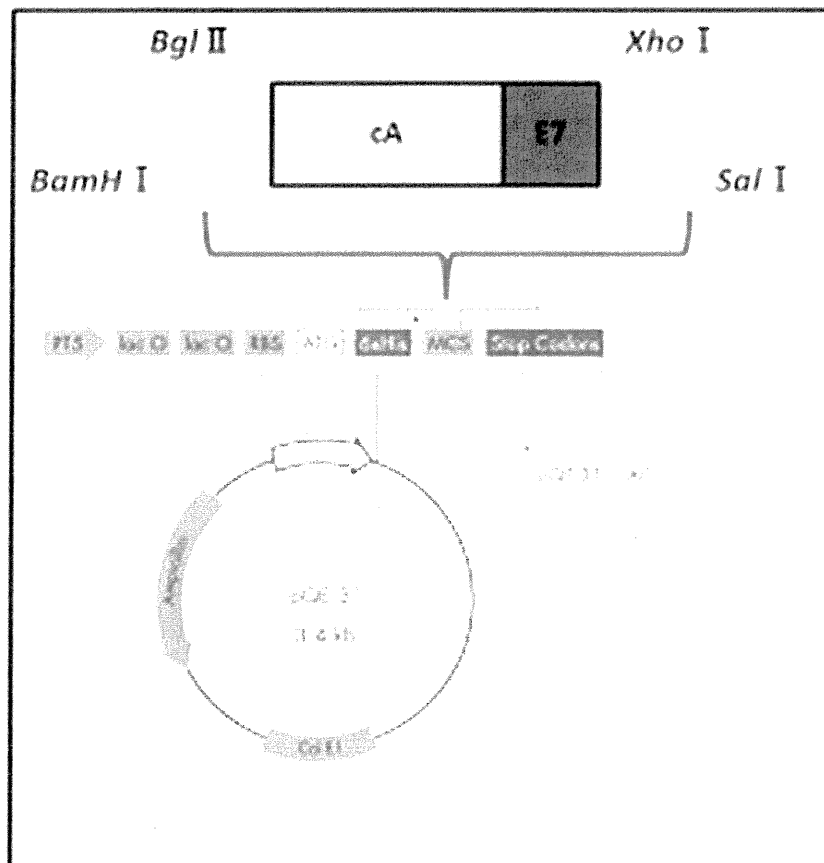


図1. cA=E7Rb発現プラスミドの構築

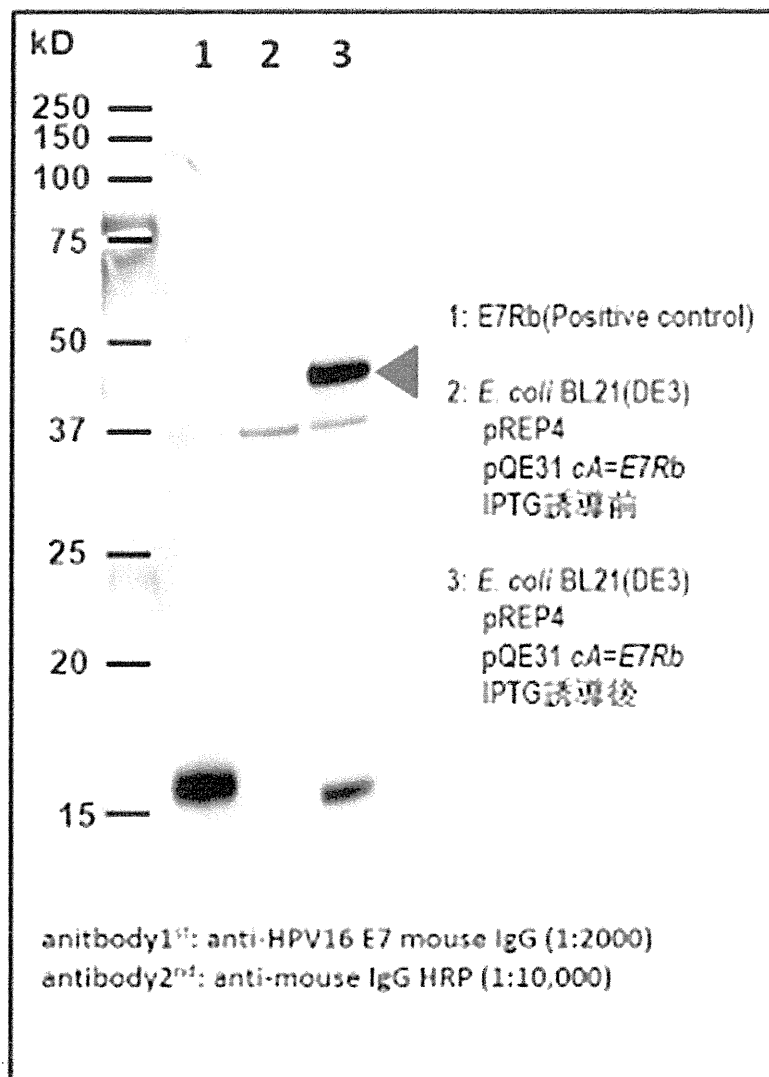


図2 Western BlotによるcA=E7Rbの発現確認

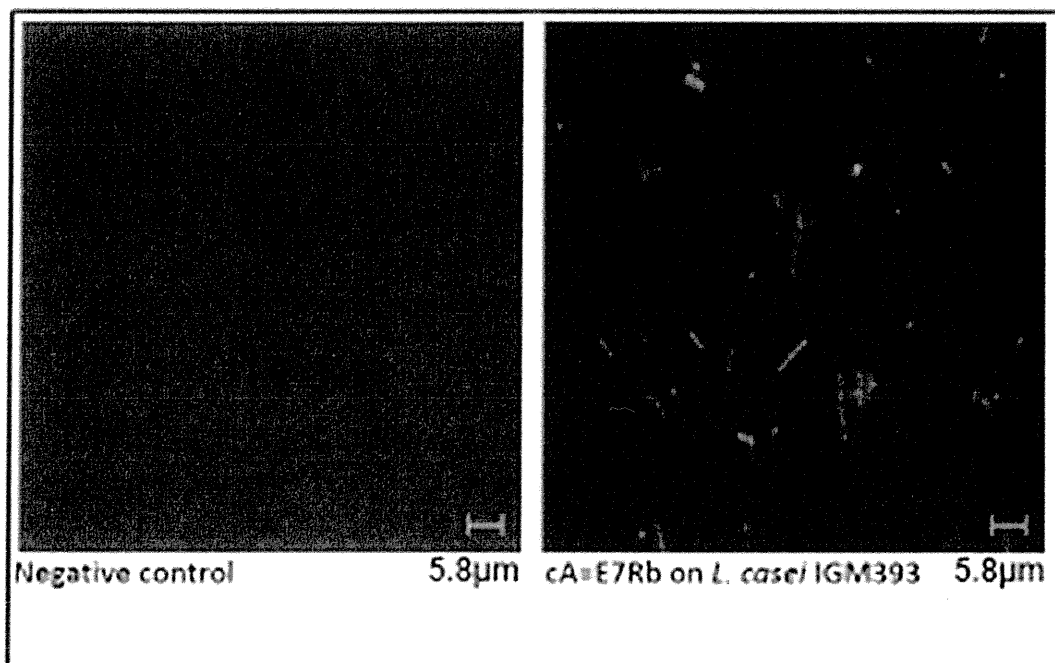


図3. 蛍光顕微鏡での蛍光検出によりcA=E7Rbの  
*L. casei* IGM393菌体表層への固定化確認

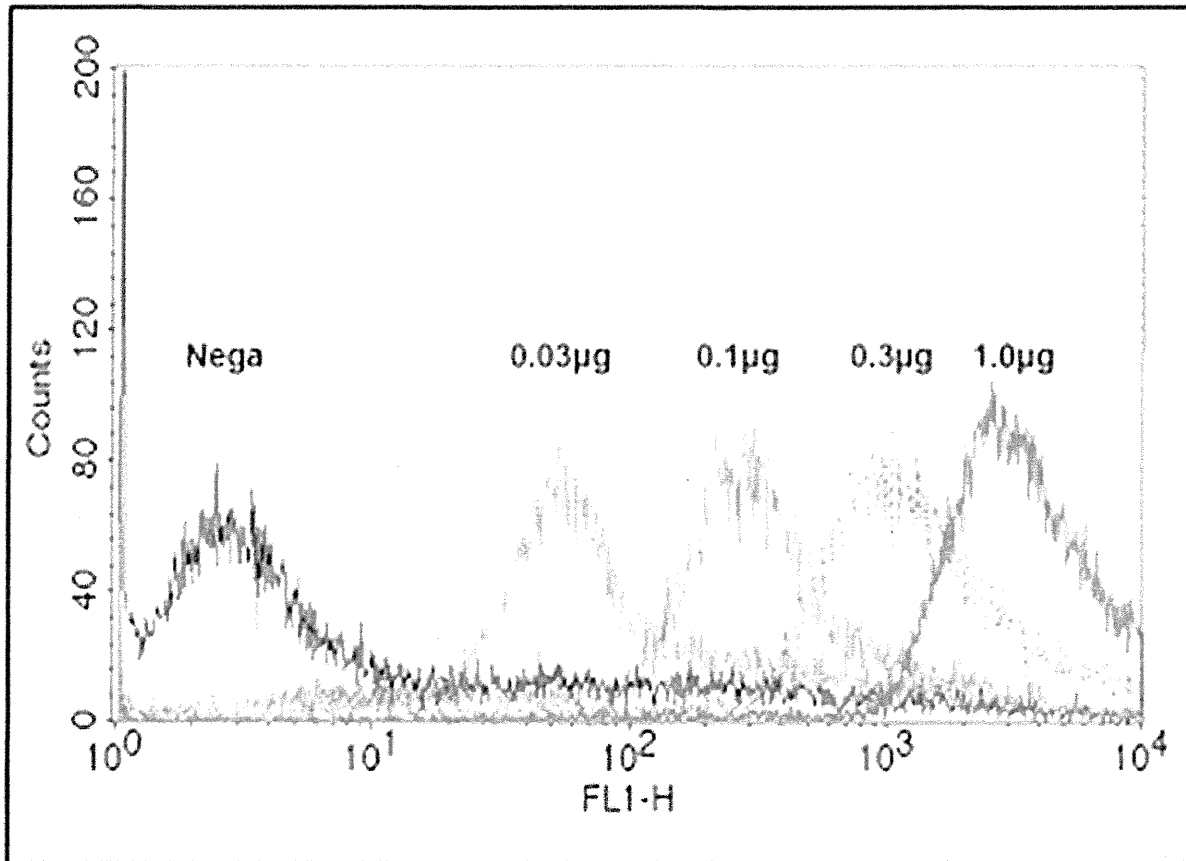


図4. FACSによるcA=E7Rbの*L. casei* IGM393菌体表層への固定化量の変化の確認  
 固定化量は、 $10^8$ 細胞あたりのタンパク量

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究報告書

子宮頸癌に対する HPV 分子標的免疫療法における HPV 特異的 T 細胞応答の解析

研究分担者 立川 愛  
東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野 准教授

研究要旨

HPV 分子標的免疫療法により子宮頸部粘膜組織に誘導される HPV 特異的細胞性免疫応答の詳細な解析を可能にするため、子宮頸部擦過検体からの上皮内リンパ球の刺激培養系を確立した。試験管内での刺激培養後も粘膜組織リンパ球が発現するホーミングレセプターが発現されており、体内環境での性質を維持されていた。

A. 研究目的

癌に対する宿主免疫応答として癌抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球(CTL)が有効であると考えられており、近年各種癌に対する CTL を賦活化する免疫細胞療法の開発が進んでいる。子宮頸癌はヒトパピローマウイルス (HPV) によるウイルス発癌である。HPV 抗原に対する CTL 応答が癌化を制御しているという報告もあり、HPV 特異的 CTL を賦活化する治療ワクチンの効果が期待される。

これまでに行われている癌に対する CTL 賦活化を目指した治療法は主に全身性の CTL を増強することを目的とされている。しかしながら、子宮頸癌は生殖器粘膜に生ずることから、粘膜免疫、特に生殖器系の所属リンパ組織である腸管リンパ組織における CTL の増強を目指す必要がある。

研究代表者はこの点に着目し、HPV 発癌の責任分子である HPV-E7 タンパク質

に対する粘膜免疫系での細胞性免疫応答の誘導を目的とした分子標的薬の開発に取り組んでいる。これまでに、前癌病変(CIV3)に対する E7 を発現する乳酸菌経口薬(GLBL101c)の探索的Ⅰ/Ⅱa 相臨床試験を実施し、子宮頸癌前癌病変に対する治療効果を確認した。本研究班では、第二世代 E7 乳酸菌乳酸菌経口薬、また HPV-E2 タンパク質を標的とした乳酸菌経口薬を製剤化し、前駆病変(CIN1, CIN2)への治療効果を調べることを目的としている。本分担研究では、乳酸菌経口薬の免疫誘導能の評価系を確立し、惹起された E7, E2 に対する細胞性免疫応答と治療効果の因果関係を明らかにする。

上述したように、本研究班で使用する乳酸菌経口薬は粘膜免疫系での E7 特異的 CTL 誘導を目的としているため、その効果を評価するためには粘膜組織に存在する T 細胞について評価を行う必要がある。粘膜組織では上皮内リンパ球として存在する免疫細胞は、通常診療で行われ

る細胞診のため採取する子宮頸部擦過細胞中に混入しており、侵襲性なく採取することが可能である。しかしながら、その細胞数はごく少数であり、評価に必要な細胞数を得ることは困難な場合がある。本年度は子宮頸部擦過検体中に含まれるリンパ球の培養法を検討した。末梢血由来のリンパ球培養法は確立されているが、子宮頸部擦過細胞は検体の性質上、培養を行う際の細菌等の汚染、剥離した上皮細胞の混入によるリンパ球の増殖阻害の可能性が考えられる。また、子宮頸部粘膜組織に存在する T 細胞の特徴として、粘膜組織にホーミングするためのレセプターを発現している。無菌的培養条件下での T 細胞の増殖性を検討し、培養後の上皮内リンパ球の性状解析を行った。

## B. 研究方法

凍結保存されていた子宮頸部擦過細胞（通常診療での細胞診検査のため採取された子宮頸部擦過検体の余剰分）を抗 CD3 抗体で刺激し、IL-2 存在下で培養した。

培養後、抗 CD3, CD4, CD8, Integrin-beta7 抗体で染色し、フローサイトメトリーにて解析を行った。

### （倫理面への配慮）

臨床材料の提供を受ける場合には研究目的や必要事項を文書を用いて説明し、書面でインフォームドコンセントを得た。研究対象者への負担は、临床上必要な検査に加えて少量の血液採取のみであり、倫理面への問題はないと判断される。本研究内容は東京大学、東京大学医科学研究

所倫理審査委員会により承認されている。

## C. 研究結果

### リンパ球増殖性の検討

凍結保存された子宮頸部擦過細胞は溶解後の生存細胞数の割合は末梢血単核球 (PBMC) と比べて低く、 $10^6$  オーダー以上の生細胞が得られることは稀であった。

T 細胞を抗 CD3 抗体にて非特異的に刺激し、増殖因子として IL-2 を添加し、培養を行った。通常の培養条件で細菌、真菌によるコンタミネーションは観察されなかった。培養開始時の細胞数が  $1 \times 10^5$  個以下では増殖を確認することはできなかったが、 $10^5$  個オーダーの生細胞で開始した場合、3-4 週間の培養を行うことで、増殖が確認され、ELISpot assay やフローサイトメトリー解析等の T 細胞の特異性や機能解析に必要な細胞数を確保することができた。

### 培養後の T 細胞性状解析

T 細胞の性状解析を行うため、試験管内での抗 CD3 抗体 + IL-2 による刺激培養後の細胞を CD3, CD4, CD8, Integrin beta7 に対する抗体で染色した。その結果、CD4 陽性、CD8 陽性 T 細胞いずれもほぼ全てが Integrin beta7 を発現していた。

## D. 考察

無菌的環境ではない子宮頸部由来の擦過検体を用いて、無菌培養が可能であることが確認された。さらに、PBMC 中のリンパ球と同様の刺激培養条件で十分に増殖させ得ることが確認された。刺激培養・増殖させた T 細胞は、粘膜に局在す



るために必要なホーミングレセプターの発現が維持されていることも確認され、体内での性状を維持していることが示唆された。培養・増殖が可能となったことで、E7 特異的 CTL の定量のみならず、分化状態やサイトカイン産生能等の機能的評価も可能となる。

#### E. 結論

粘膜局所における T 細胞応答の解析を可能にするために、侵襲性なく採取可能な子宮頸部擦過検体を用いて T 細胞の培養系の確立を検討した。通常検査の範囲内で採取された子宮頸部擦過検体中の上皮内リンパ球中の T 細胞を粘膜指向性を保持したまま培養、増殖させることが可能であった。次年度以降は本研究班で実施される第 II 相臨床試験において、刺激培養・増殖させた子宮頸部リンパ球を用いて E7 特異的細胞性免疫応答の詳細な解析を行い、その薬理効果を評価する予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kawana-Tachikawa A, Llibre JM, Bravo I, Escrig R, Mothe B, Puig J, Puertas MC, Martinez-Picado J, Blanco J, Manzardo C, Miro JM, Iwamoto A, Pozniak AL, Gatell JM, Clotet B, Brander C; MARAVIBOOST investigators. Effect of

Maraviroc Intensification on HIV-1-Specific T Cell Immunity in Recently HIV-1-Infected Individuals. PLoS One. 9:e87334, 2014.

2. Shimizu A, Kawana-Tachikawa A, Yamagata A, Han C, Zhu D, Sato Y, Nakamura H, Koibuchi T, Carlson J, Martin E, Brumme CJ, Shi Y, Gao GF, Brumme ZL, Fukai S, Iwamoto A. Structure of TCR and antigen complexes at an immunodominant CTL epitope in HIV-1 infection. Sci Rep. 3:3097, 2013
3. Teeranaipong P, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z, Iwamoto A. Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay. J Int AIDS Soc. 16:18723, 2013.

##### 2. 学会発表

1. Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Hosoya T, Nakamura H, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A. Low IL-2 expression by epigenetic modification is associated with immunosenescence in HIV non-controllers. Keystone symposia, HIV Pathogenesis – Virus vs Host. Banff, Alberta, Canada, Mar 2014.
2. Meribe SC, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno T. Linkage between disease status and a naturally-arising mutation in functional region of HIV-1 Nef. 21th conference on retroviruses and

- opportunistic infections. Boston, USA. Mar 2014.
3. Kawana-Tachikawa A .The 9th China-Japan Laboratory Workshop: Pathogenesis, Gene regulation, and signal transduction. “Interaction between virus and host immune response during chronic HIV-1 infection.”, Beijing, China, Nov 2013.
  4. Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Hosoya T, Nakamura H, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A. The essential role of epigenetic regulation for CD4+ T cell dysfunction during chronic HIV-1 infection. AIDS Vaccine 2013 Conference. Barcelona, Spain, Oct 2013.
  5. Meribe SC, Kawana-Tachikawa A, Takamasa Ueno T. Naturally arising amino-acid polymorphisms within functional regions of HIV-1 Nef influence viral persistence in vivo. 第42回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2013年12月.
  6. 石坂彩、立川（川名）愛、中村仁美、古賀道子、細谷紀彰、鯉渕智彦、野本明男、岩本愛吉、水谷莊利. HIV-1 陽性者末梢血からの HIV-1 短鎖 RNA の検出および定量法の確立. 第27回日本エイズ学会学術集会, 熊本, 2013年11月.
  7. 立川（川名）愛、韓忠勇、清水晃尚、細谷紀彰、中村仁美、古賀道子、鯉渕

智彦、いわ本愛吉. 重複する CTL エピトープ部位に生じた1アミノ酸変異によるエピトープの消滅と出現. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013年11月.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
（総括・分担）研究報告書

子宮頸癌組織内微小環境における癌関連線維芽細胞を介した免疫制御機構  
に関する研究

研究分担者 藤井知行、永松 健  
所属 東京大学医学部附属病院 女性診療科・産科

研究要旨

子宮頸癌組織内において癌関連線維芽細胞(CAF)がNK細胞の細胞機能に与える影響について検討した。ヒト頸癌組織より分離したCAFはNK細胞との細胞間応答により細胞障害活性を抑制する作用を有することを明らかにした。また、この作用はTGF- $\beta$ シグナル経路を介して制御されていることを確認した。子宮頸癌の分子標的治療戦略において、TGF- $\beta$ シグナル経路の遮断をターゲットとしたアプローチの有効性が示唆された。

A. 研究目的

抗腫瘍免疫においてNK細胞は重要な働きを担っており、HPV分子標的免疫療法においても組織局所に存在するNK細胞の機能制御をターゲットとしたアプローチは有望である。がん微小環境においてがん細胞と共存する線維芽細胞(CAF: cancer associated fibroblasts)は、がんの増殖・生存能、浸潤能、転移能といった腫瘍細胞の機能や周囲の細胞との相互的応答に深く関わっていることが近年注目されている。しかし、CAFとNK細胞機能の関係についてはいまだ知見が乏しい。そこで、本研究ではCAFとの細胞間相互作用によりNK細胞の抗腫瘍機能がどのような影響を受けているかについて検討を開始した。

B. 研究方法

検討1: CAFとの共培養に伴うNK細胞の細胞障害活性の変化について

ヒト頸癌症例の臨床検体よりCAFを分離培養した。また、第3者の末梢血を採取してそこから磁気ビーズ法を用いてNK細胞を分離して、CAFとの共培養によるNK細胞の細胞障害活性の変化を調べた。細胞障害活性の計測はK562細胞を標的として、死細胞へのPIの取り込みをフローサイトメトリー法にて評価することで行った。

検討2: TGF- $\beta$ を介したCAFの機能修飾にともなうNK細胞との相互作用の変化

CAF 培養系に TGF- $\beta$  を添加して、細胞機能の変化を誘導した後に、NK 細胞との共培養を行った。TGF- $\beta$  刺激による CAF の性質変化が NK 細胞の細胞障害活性に与える影響を調べた。さらに、トランスフェクションによる強制発現系、siRNA による発現抑制系の2つの実験系を用いて CAF に発現する TGFBR2 受容体の発現レベルを変化させた。それらの実験系を用いて TGF- $\beta$  とその受容体を介したシグナル経路が CAF の細胞機能の変化に関わっていることを確認した。

#### (倫理面への配慮)

本研究において腫瘍組織検体の使用は東京大学医学部附属病院の研究倫理委員会の承認のもと、患者のインフォームドコンセントを得た上で行った。

### C. 研究結果

#### 検討 1 :

Western blotting法、蛍光免疫組織染色法にて、マーカー蛋白である  $\alpha$ SMA の発現を調べることで頸癌組織から分離培養した細胞が CAF であることが確認できた。NK細胞の単独培養と比較して、CAF との共培養に伴ってNK細胞は細胞障害活性を有意に減弱していた。この変化は臍帯静脈血管内皮細胞との共培養では生じず、CAF に特徴的な細胞特性であると考えられた。

#### 検討 2 :

CAF細胞をTGF- $\beta$  10ng/mlの存在下で24時間培養した。その後にNK細胞と共培

養を行い細胞障害活性の変化を調べたところ、TGF- $\beta$  刺激後のCAFでは無刺激の場合と比較してNK細胞抑制作用が増強することが明らかとなった。CAF上にTGFBR2を強制発現させたところその作用がさらに増強し、一方でsiRNAを用いてTGFBR2の発現抑制を行うと同作用の減弱を生じた。これら一連の結果よって、CAFによるNK細胞の細胞障害活性抑制作用を制御する分子機構として、TGFBR2を介したCAFへのTGF- $\beta$  シグナル経路が重要であることが示された。

### D. 考察

従来の報告によるとCAFはT細胞との相互作用により細胞障害性T細胞の機能を抑制することが知られてきた。本研究はCAFはNK細胞の細胞障害活性への抑制作用も発揮することを明らかとした。NK細胞はHPVに対する抗ウイルス免疫、子宮頸癌細胞に対する抗腫瘍免疫において中心的な役割を担う細胞である。CAFがNK細胞機能を抑制することによりHPVの持続的感染、腫瘍細胞の増殖にとって有利な環境を形成する補助的役割を担っていることが推測される。

子宮頸癌を含めた腫瘍組織においてTGF- $\beta$  は豊富に産生されることが知られている。子宮頸部粘膜局所においてE6、E7などのHPV由来蛋白がqTGF- $\beta$ 、その受容体の発現に関与して腫瘍形成、進展に関与していることが多くの報告で示されてきた。本研究ではTGF- $\beta$  の作用によりCAFの有するNK細胞の細胞障害活性の抑制作用が増強されることが示された。このことは逆にTGF- $\beta$  シグナル経路の遮

断をターゲットとした治療戦略が子宮頸癌において有効であることを示唆している。

## E. 結論

HPV分子標的治療を構築する上で、HPV特異抗原に対する細胞障害性T細胞の誘導のみではなく、TGF- $\beta$ シグナルあるいはCAFの細胞機能を抑制する方法を併用することでより効果的な治療効果が得られる可能性がある。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Seisuke Sayama, Takeshi Nagamatsu, Danny J. Schust, Naoko Itaoka, Mayuko Ichikawa, Kei Kawana, Takahiro Yamashita, Shiro Kozuma, Tomoyuki Fujii, Human decidual macrophages suppress IFN- $\gamma$  production by T cells through costimulatory B7-H1:PD-1 signaling in early pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2013 Dec;100(2):109-17.  
doi: 10.1016/j.jri.2013.08.001. Epub 2013 Aug 22.

### 2. 学会発表

1: 日本産科婦人科学会第65回学術講演会 2013年5月  
CIN治療を目的としたE7発現型乳酸菌HPV経口ワクチンによるE7特異的粘膜免疫誘導能は合成セラミド $\alpha$ -GalCerと漢方薬併用経口投与により増強する

2: 日本産科婦人科学会第66回学術講演会 2014年4月(予定)

腫瘍間質細胞はNatural Killer細胞活性を抑制する

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Taguchi A, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Isobe Y, Nagasaka K, Koga K, Inoue T, Nishida H, Kojima S, Adachi K, Matsumoto Y, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Oda K, Kang JX, Arai H, Arita M, Osuga Y, Fujii T.	Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 in Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) Is Suppressed by Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids In Vitro and In Vivo.	PLoS One	9	e89605	2014
Inaba K, Nagasaka K, Kawana K, Arimoto T, Matsumoto Y, Tsuruga T, Mori-Uchino M, Miura S, Sone K, Oda K, Nakagawa S, Yano T, Kozuma S, Fujii T.	High-risk HPV correlates with recurrence after laser ablation for treatment of patients with CIN3: a long-term follow-up retrospective study,	The journal of obstetrics and gynaecology research	40(2)	554-60	2014
川名 敬	HPV分子を標的とした粘膜免疫を介したがん免疫療法の開発	診断と治療社	81(2)	210-216	2014
Nagasaka K, Kawana K, Osuga Y, Fujii T.	PDZ domains and viral infection: versatile potentials of HPV-PDZ interactions in relation to malignancy.	BioMed research international	2013	369712	2013

Nagasaka K, Seiki T, Yamashita A, Massimi P, Subbiah VK, Thomas M, Kranjec C, Kawana K, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Fujii T, Kozuma S, Banks L.	A novel interaction between hScrib and PP1 $\gamma$ downregulates ERK signaling and suppresses oncogene-induced cell transformation.	PLoS One	8(1)	e53752	2013
川名 敬	新たなHPVワクチンの開発	臨床婦人科産科	67(8)	790-797	2013
Fujii T, Takatsuka N, Nagata C, Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Kawana K, Mitsuhashi A, Hirai Y, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T,	Association between carotenoids and outcome of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective cohort study	Int J Clin Oncol	18	1091-101	2013
Miyamoto Y, Nakagawa S, Wada-Hiraike O, Seiki T, Tanikawa M, Hiraike H, Sone K, Nagasaka K, Oda K, Kawana K, Nakagawa K, Fujii T, Yano T, Kozuma S, Taketani Y,	Sequential effects of the proteasome inhibitor bortezomib and chemotherapeutic agents in uterine cervical cancer cell lines,	Oncology Reprts	29	51-57	2013
Kojima S, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Taguchi A, Nagamatsu T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Arimoto T, Oda K, Wada-Hiraike O, Yano T, Taketani Y, Fujii T, Schust DJ, Kozuma S	The prevalence of cervical regulatory T cells in HPV-related cervical intraepithelial neoplasia (CIN) correlates inversely with spontaneous regression of CIN	Am J Reprod Immunol,	69	134-141	2013



Kawana-Tachikawa A, Llibre JM, Bravo I, Escrig R, Mothe B, Puig J, Puertas MC, Martinez-Picado J, Blanco J, Manzardo C, Miro JM, Iwamoto A, Pozniak AL, Gatell JM, Clotet B, Brander C; MARAVIBOOST investigators.	Effect of Maraviroc Intensification on HIV-1-Specific T Cell Immunity in Recently HIV-1-Infected Individuals.	PLoS One	9	e87334	2014
Shimizu A, Kawana-Tachikawa A, Yamagata A, Han C, Zhu D, Sato Y, Nakamura H, Koibuchi T, Carlson J, Martin E, Brumme CJ, Shi Y, Gao GF, Brumme ZL, Fukai S, Iwamoto A.	Structure of TCR and antigen complexes at an immunodominant CTL epitope in HIV-1 infection.	Scientific reports	3	3097	2013
Teeranaipong P, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z, Iwamoto A.	Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay.	Journal of International AIDS Society	16	18723	2013
Sayama S, Nagamatsu T, Schust DJ, Itaoka N, Ichikawa M, Kawana K, Yamashita T, Kozuma S, Fujii T.	Human decidual macrophages suppress IFN- $\gamma$ production by T cells through costimulatory B7-H1:PD-1 signaling in early pregnancy.	Journal of Reproductive Immunology	100(2)	109-17	2013

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 in Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) Is Suppressed by Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids *In Vitro* and *In Vivo*

Ayumi Taguchi<sup>1</sup>, Kei Kawana<sup>1\*</sup>, Kensuke Tomio<sup>1</sup>, Aki Yamashita<sup>1</sup>, Yosuke Isobe<sup>2</sup>, Kazunori Nagasaka<sup>1</sup>, Kaori Koga<sup>1</sup>, Tomoko Inoue<sup>1</sup>, Haruka Nishida<sup>1</sup>, Satoko Kojima<sup>1</sup>, Katsuyuki Adachi<sup>1</sup>, Yoko Matsumoto<sup>1</sup>, Takahide Arimoto<sup>1</sup>, Osamu Wada-Hiraike<sup>1</sup>, Katsutoshi Oda<sup>1</sup>, Jing X. Kang<sup>3</sup>, Hiroyuki Arai<sup>2</sup>, Makoto Arita<sup>2\*9</sup>, Yutaka Osuga<sup>1</sup>, Tomoyuki Fujii<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, <sup>2</sup> Department of Health Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, <sup>3</sup> Department of Medicine, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Charlestown, Massachusetts, United States of America

## Abstract

Cancer associated fibroblasts (CAFs) are responsible for tumor growth, angiogenesis, invasion, and metastasis. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 secreted from cancer stroma populated by CAFs is a prerequisite for cancer angiogenesis and metastasis. Omega-3 polyunsaturated fatty acids (omega-3 PUFA) have been reported to have anti-tumor effects on diverse types of malignancies. Fat-1 mice, which can convert omega-6 to omega-3 PUFA independent of diet, are useful to investigate the functions of endogenous omega-3 PUFA. To examine the effect of omega-3 PUFA on tumorigenesis, TC-1 cells, a murine epithelial cell line immortalized by human papillomavirus (HPV) oncogenes, were injected subcutaneously into fat-1 or wild type mice. Tumor growth and angiogenesis of the TC-1 tumor were significantly suppressed in fat-1 compared to wild type mice. cDNA microarray of the tumors derived from fat-1 and wild type mice revealed that MMP-9 is downregulated in fat-1 mice. Immunohistochemical study demonstrated immunoreactivity for MMP-9 in the tumor stromal fibroblasts was diffusely positive in wild type whereas focal in fat-1 mice. MMP-9 was expressed in primary cultured fibroblasts isolated from fat-1 and wild type mice but was not expressed in TC-1 cells. Co-culture of fibroblasts with TC-1 cells enhanced the expression and the proteinase activity of MMP-9, although the protease activity of MMP-9 in fat-1-derived fibroblasts was lower than that in wild type fibroblasts. Our data suggests that omega-3 PUFAs suppress MMP-9 induction and tumor angiogenesis. These findings may provide insight into mechanisms by which omega-3 PUFAs exert anti-tumor effects by modulating tumor microenvironment.

**Citation:** Taguchi A, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Isobe Y, et al. (2014) Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 in Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) Is Suppressed by Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids *In Vitro* and *In Vivo*. PLoS ONE 9(2): e89605. doi:10.1371/journal.pone.0089605

**Editor:** Zhongjun Zhou, The University of Hong Kong, Hong Kong

**Received:** October 10, 2013; **Accepted:** January 22, 2014; **Published:** February 27, 2014

**Copyright:** © 2014 Taguchi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was funded by Tokyo IGAKUKAI (K.K.), the Japan Science and Technology Agency Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO) (M.A.), the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (M.A.). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: kkawana-tky@umin.org (K. Kawana); marita@mol.f.u-tokyo.ac.jp (MA)

<sup>9</sup> These authors contributed equally to this work.

## Introduction

The tumor microenvironment is comprised of microvascular endothelial cells, adjacent normal epithelial cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs), and is reported to be an important regulator of tumorigenesis [1,2]. As the most common cellular population found in the tumor microenvironment, CAFs are responsible for the synthesis of proteins involved in the remodeling of the extracellular matrix (ECM), and for the secretion of growth factors and cytokines that regulate tumor cell proliferation and invasion [3,4]. In murine ovarian cancer xenograft models, the p53/NF- $\kappa$ B pathway in CAFs significantly increased *in vivo* tumor growth [5]. In colon cancer, Zhu Y et al. report that IL-1 $\beta$  increased colon cancer cell proliferation and invasion by up-regulating COX-2 signaling in CAFs [6].

Matrix-metalloproteinases (MMPs) are synthesized as proenzymes and typically activated by proteolytic removal of a propeptide [7]. MMPs are reported to influence tumor progression by facilitating events pivotal for neovascularization and establishment of distant metastasis including proliferation, survival and migration of endothelial, tumor and stromal cells [8,9]. MMP-2 and MMP-9 are implicated as prerequisites for angiogenesis and metastasis in the carcinogenic process: MMP-2 is expressed in the various cancer cell lines [10]. In contrast, MMP-9 has very limited or no expression in these cancer cells. Instead, MMP-9 is well-known to be secreted from cancer stromal fibroblasts and endothelial cells [11,12]. MMP-9 is a member of a family of zinc containing endoproteinases that is involved in degradation of extracellular matrix (ECM) and in vascular remodeling [13].

Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) and eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) are representative mediators of omega-3

polyunsaturated fatty acids (omega-3 PUFAs) and exert anti-inflammatory effects in acute and chronic pathological inflammatory reactions by counteracting inflammation [14]. Omega-3 PUFAs are also reported to have anti-cancer effects based on in vitro and vivo studies [15–17]. Several mechanisms have been proposed to explain the anti-cancer effects of omega-3 PUFAs. Omega-3 PUFAs alter the growth of tumor cells by modulating cell replication, by interfering with components of the cell cycle or by increasing cell death via necrosis or apoptosis [18,19]. Omega-3 PUFAs are also known to exert anti-angiogenic effects by inhibiting the production of many angiogenic mediators including: vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), and prostaglandin E2 (PGE2) [20–24].

Dietary supplementation is a traditional approach to modify tissue nutrient composition in animal studies of nutrition. Feeding animals diets that alter specific nutritional and non-nutritional components can help to differentiate experimental groups; however, it can be exceedingly difficult to provide diets that are identical in all but a single or a small but controlled number of components. Kang et al. recently engineered a transgenic mouse that carries the fat-1 gene from the roundworm *Caenorhabditis elegans* [25]. This gene encodes an omega-6 to omega-3 PUFAs and that is absent in most animals, including mammals. There is a remarkable difference in the tissue omega-6/omega-3 PUFA ratio between wild type and fat-1 transgenic mice [26]. Fat-1 mice, which typically exhibit a balanced ratio of omega-6 to omega-3 PUFAs in their tissues and organs independent of diet, allow carefully controlled studies to be performed in the absence of potential confounding factors of diet. This makes them a useful model to investigate the biological properties of endogenous omega-3 PUFAs [25]. Several reports using fat-1 mice have demonstrated anti-cancer effects of omega-3 PUFAs [27–30]. In these investigations, omega-3 PUFAs exerted anti-cancer effects by suppressing inflammatory reactions and PGE2 secretion from cancer cells. To date, there are few studies that investigate the involvement of omega-3 PUFAs in the biology of CAFs.

In this study, we hypothesized that omega-3 PUFAs may alter tumor microenvironments by influencing CAF activity. To examine this hypothesis, fibroblasts derived from fat-1 and wild type mice were assessed both in vitro and in vivo under conditions allowing interaction with TC-1 cancer cells. TC-1 cells were derived from the epithelium of C56BL/6 mice and immortalized by human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7 oncoproteins. They are commonly used in vitro and in vivo in murine models of HPV-related cancer [31]. Here, we investigated the involvement of omega-3 PUFAs in TC-1 tumorigenesis by comparing fat-1 and wild type mice. Our specific focus involved the study of tumor-associated fibroblasts. These models are useful in the study of CAFs because the cancer cells originate in wild type murine epithelium while the cancer stromal components, including CAFs, come from fat-1 (omega-3 PUFAs-rich) or wild type (normal PUFAs) mice.

## Materials and Methods

### Animals and diet

Fat-1 mice were created on a C57BL/6 background as described [26] and subsequently backcrossed (at least four times) onto a C57BL/6 background. Animals were fed a special diet (AIN-76A+10% safflower oil; CLEA Japan, Inc.) that contained 10.3% total fat with fatty acid composition of C16:0 (7.6%), C18:0 (2.7%), C18:1n-9 (14.1%), C18:2n-6 (73.2%), C18:3n-3 (0.3%), C20:4n-6 (<0.1%), C20:5n-3 (<0.1%), C22:6n-3 (<0.1%), high

in n-6 and low in n-3 fatty acids, until the desired age (6–8 weeks) for experiments. To prevent the oxidation of lipids in the diet, all foods were stored in the refrigerator with antioxidants (AGELESS; Mitsubishi Gas Chemical Inc.), and prepared newly every two days. Animal studies were approved by the University of Tokyo Animal Committee.

### Tumor growth assay in mice

TC-1 cells are derived from a primary lung epithelial cell from C56BL/6 mice and immortalized using HPV 16 E6/E7 plus c-Ha-ras (kind gift from Dr. T. C. Wu, Johns-Hopkins University, Baltimore MD USA) [32]. TC-1 cells were cultured in DMEM (Gibco, NY, USA) containing 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, and 0.25 g/ml amphotericin B. Eight-week-old female mice were injected with  $5 \times 10^6$  murine TC-1 cells suspended in 100  $\mu$ l of DMEM. Tumor volume, based on caliper measurements, was calculated at 7 and 14 days after injection according to the following formula: (tumor volume) =  $1/2 \times (\text{the shortest diameter})^2 \times (\text{the largest diameter})$ . Mice were sacrificed 14 days after inoculation, tumors were excised and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for future analyses.

### cDNA microarray

Total RNA from TC-1 tumors (above) was extracted using an RNeasy minikit (QIAGEN, Hilden, Germany). For the cDNA microarray analysis, 0.5  $\mu$ g of pooled total RNA was amplified and labeled using an Amino Alkyl MessageAmp™ II mRNA Amplification kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Each sample of mRNA labeled with Cy3 and reference mRNA labeled with Cy5 was cohybridized to the Gene™ Mouse Oligo chip 24 k (Toray Industries Inc., Tokyo, Japan) at  $37^\circ\text{C}$  for 16 h. After hybridization, each DNA chip was washed and dried. Hybridization signals derived from Cy3 and Cy5 were scanned using Scan Array Express (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The scanned image was analyzed using GenePix Pro (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). All analyzed data were scaled by global normalization. GEO accession number is GSE54079.

### Immunohistochemistry

Paraffin sections (4  $\mu$ m) of TC-1 tumors were dewaxed in xylene and rehydrated through graded ethanol to water. Antigens were retrieved by boiling in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) for 30 min. The cooled sections were incubated in DAKO REAL Peroxidase-Blocking solution (DAKO, Carpinteria, CA, USA) for 10 min to quench endogenous peroxidase. To block nonspecific binding, sections were incubated in DAKO Protein Blocking solution (DAKO) for 10 min at room temperature. Sections were then incubated with a rabbit polyclonal antibody against mouse MMP-9 (PAB12714, Abnova, 1:100 dilution) in DAKO REAL Antibody Diluent (DAKO) overnight at  $4^\circ\text{C}$ . The slides were incubated for 1 hour at room temperature with peroxidase-conjugated secondary antibodies, washed, incubated with DAB, counterstained with hematoxylin, dehydrated through an ethanol series and xylene, and mounted. To evaluate tumor microvessel formation, tumor sections were stained for CD-31 using a rat monoclonal antibody against mouse CD-31 (ab56299, Abcam, Tokyo, Japan, 1:100 dilution).

### RT-quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from TC-1 tumors and cultured fibroblasts using an RNeasy minikit (QIAGEN, Hilden, Germany), followed by reverse transcription. cDNA was amplified for