

免疫を惹起する可能性がある。PD-1 欠損マウスが、マウスの系統により異なる種類の自己免疫疾患を自然発症することから、PD-1 欠損による免疫応答の活性化には、PD-1 欠損以外の遺伝要因や環境要因が大きく影響を与えると考えられる。最近我々は、LAG-3 (Lymphocyte activation gene-3) という別の免疫抑制受容体が PD-1 と協調的に自己免疫を制御していることを見出した。がん免疫における抗原は、多くの場合自己の抗原であるため、がん免疫においても PD-1 と LAG-3 が協調的に働くと考えられる。そこで、LAG-3 をはじめとした他の免疫抑制シグナルを PD-1 と同時に阻害することにより、PD-1 阻害抗体による抗腫瘍効果を増強し得ると期待される。

## B. 研究方法

### 1) T 細胞株を用いた機能解析

I-Ad 拘束性にニワトリ卵白アルブミン由来ペプチドを認識する DO11.10 細胞株、I-Ek 拘束性に蛾シトクローム C 由来ペプチドを認識する 2B4.11 細胞株等の T 細胞株を用いて、抗原特異的な T リンパ球の活性化に対する PD-1 及び LAG-3 の抑制効果を評価した。具体的には、適合するハプロタイプの MHC を発現した細胞を抗原提示細胞として用い、抗原ペプチドを提示させ、各 T 細胞株を刺激した。刺激開始後、6~24 時間の時点で細胞を回収し、マイクロアレイ解析及びフローサイトメトリー解析を行った。また、培養上清を回収し、IL-2 等のサイトカインを定量した。抗原提示細胞と T 細胞の量と比率、抗原ペプチドの濃度、刺激時間等を増減させることにより刺激の強度を変えて検討した。

DO11.10 細胞株と 2B4.11 細胞株は、恒常的に PD-1 を発現していたため、抗原提示細胞に PD-1 リガンドを強制発現させることにより、PD-1 介在の有無を制御した。両細胞株とも LAG-3 は恒常的に発現していなかったため、レトロウイルス

ベクターを用いて過剰発現させて、LAG-3 介在の有無を制御した。

### 2) マイクロアレイによる発現解析

DO11.10 細胞株を用いて、6 条件 ((1) 無刺激、(2) PD-1 と LAG-3 の介在無しでの刺激、(3) PD-1 のみ介在下での刺激、(4) LAG-3 のみ介在下での刺激、(5) PD-1 と LAG-3 両者介在下での刺激、(6) MHC クラス II に対する阻害抗体存在下での刺激) における遺伝子発現をマイクロアレイ解析により網羅的に解析した。具体的には、刺激開始後 12 時間の時点で T 細胞のみを回収し、RNA を調製し、アジレント社のマイクロアレイを用いて全遺伝子の発現を比較した。

### 3) モノクローナル抗体の作製

マウス LAG-3 の細胞外領域をヒト IgG の Fc 領域と融合させたキメラタンパク質を発現するプラスミドベクターを作製し、293T 細胞に一過性に強制発現させた。培養上清からプロテイン A セファロースを用いてキメラタンパク質を回収した。得られたキメラタンパク質を LAG-3 欠損マウスに免疫した。免疫したマウスからリンパ球を回収してミエローマ細胞株 SP2/o と融合させた。LAG-3 を強制発現させた細胞株に対する反応性を指標にして、抗 LAG-3 抗体産生細胞株を得た。得られたクローンについて、LAG-3 に対する結合強度、機能阻害活性等を検討した。

### 4) レポーター細胞の作製

抗原受容体刺激により活性化を受けることが知られている NF-AT、NF $\kappa$ B、AP-1 等の転写因子が結合する配列を 1 個あるいは複数個重複させて EGFP、BFP、AmCyan、mCherry、tdTomato、Crimson、Dimer2、dsRed、LacZ、あるいは CRE 組換え酵素の上流に配置したプラスミドベクターを作製した。また、CRE 組換え酵素により EGFP を発現するプラスミドベクターを

作製した。各発現プラスミドベクターを DO11.10 細胞株に導入した後、特異的な抗原を用いて刺激し、蛍光タンパク質の発現頻度と強度或いは LacZ の酵素活性を定量した。

上述の転写因子結合配列に加え、PD-1 や LAG-3 により発現誘導が強く抑制される遺伝子の転写調節領域を用いて、各種レポータープラスミドを作製し、検討した。得られた結果を基に、用いる転写調節領域の長さ、重複数等を調節し、改良を試みた。

### C. 研究結果

#### 1) 抗原刺激による各種遺伝子の発現誘導に対する PD-1 と LAG-3 の抑制効果

これまでに、がん細胞の表面上に PD-1 リガンドが発現している場合には、抗 PD-1 阻害抗体が治療効果を示す可能性が高いことを示唆する結果が得られているが、リンパ球側のバイオマーカーについては、ほとんど解析されていない。そこで、リンパ球側のバイオマーカーの探索を試みた。

抗原刺激により、複数の情報伝達経路が活性化されることが知られているが、具体的に PD-1 や LAG-3 がどういった経路を、どのようなタイミングで、どれくらいの効率で抑制するかは、ほとんど分かっていない。そこで、抗原刺激による各種遺伝子の発現誘導に対する影響を指標に、各抑制受容体の機能的な違いを検討した。DO11.10 細胞株においては、抗原刺激により発現量が 2 倍以上上昇した遺伝子の数は 2,358 個であった。そのうちの 1,465 遺伝子は、PD-1 により 50%以上、発現誘導が抑制されていた。一方、406 遺伝子は、PD-1 による抑制効果が 10%以下であった。例えば、IL-2 遺伝子は抗原刺激により発現量が 15.3 倍に増加していたが、PD-1 介在時には 3.2 倍の増加にとどまり、約 85%の発現誘導抑制が確認された。また、PD-1

介在時に発現量が 4 倍以上亢進する遺伝子が 613 遺伝子、認められた。

#### 2) PD-1 による抑制効果を検知するマーカーの探索

抗原受容体刺激により活性化を受けることが知られている NF-AT、NF $\kappa$ B、AP-1 等の転写因子が結合する配列を検討したところ、刺激強度を調整することにより、活性化細胞を効率的に標識できる条件を見出したが、PD-1 による抑制効果の判定には不適であった。

上述の通り、DO11.10 細胞株において、抗原刺激により発現量が 2 倍以上上昇し、かつ、PD-1 により 50%以上、発現誘導が抑制される遺伝子を 1,465 個、PD-1 による抑制効果が 10%以下の遺伝子を 406 個、同定している。その中で、PD-1 による抑制効果が特に強い遺伝子及び弱い遺伝子を 4 個選別し、それらの転写調節領域をクローニングして、検討した。その結果、遺伝子 A の転写調節領域を用いたレポーター(以下レポーターA)が、PD-1 による抑制を鋭敏に検出し得ることを見出した。

LAG-3 については、抗原刺激により発現量が 2 倍以上上昇し、かつ、LAG-3 により 50%以上、発現誘導が抑制される遺伝子を 1,431 個、LAG-3 による抑制効果が 10%以下の遺伝子を 428 個、同定している。その中で、LAG-3 による抑制効果が特に強い 3 遺伝子、及び上述の 4 遺伝子について、各々の転写調節領域を検討した。その結果、レポーターB が、LAG-3 による抑制を鋭敏に検出し得ることを見出した。一方、レポーターC は、LAG-3 による影響をほとんど受けなかった。また、PD-1 はレポーターB を抑制したが、レポーターC は中程度にしか抑制しなかった。さらに、LAG-3 はレポーターA を抑制しなかった。

また、同時に複数の条件で解析するために、BFP、AmCyan、mCherry、tdTomato、Crimson、

Dimer2、dsRed2 等、他の蛍光タンパク質を検討したところ、EGFP、BFP、Crimson および Dimer2 の4種類の蛍光色素を同時に使用することにより、最大4種類の条件で細胞の状態を同時に評価できるようになった。

### 3) 抗 PD-1 阻害抗体と組み合わせることにより相乗効果を示す治療法の開発

これまでに 16 種類の抗マウス LAG-3 モノクローナル抗体を得ることに成功した。そのうち、6 種類が試験管レベルで良好な機能阻害活性を示した。そのうちの一つは、既に市販されている抗体(クローン名:C9B7W)と比較して、親和性が 10 倍以上高く、阻害活性もより高いことが確認された。

また、ヒト LAG-3 についても、これまでに 18 種類の抗ヒト LAG-3 モノクローナル抗体を得ることに成功し、複数のクローンが強い阻害活性を有していることが確認できている。

## D. 考察

抗原受容体刺激によって多くの遺伝子が発現誘導を受けるが、その全てが PD-1 あるいは LAG-3 によって均一に抑制される訳ではないことが明らかとなった。また、一部の遺伝子については、発現がむしろ誘導されていた。PD-1 による発現誘導抑制効果が特に強い遺伝子、ほとんど抑制されない遺伝子、むしろ発現が誘導される遺伝子等に注目して解析することにより、PD-1 阻害抗体による T 細胞の活性化をより鋭敏かつ正確にモニターできる可能性がある。それにより、抗 PD-1 抗体による治療前及び治療中のがん患者において PD-1 が実際にどの臓器のどのような種類の細胞で、どの程度機能しているかを判定できれば、より効率的な使用方法の確立に役立つとともに、より効果的な治療法の開発につながるものと期待される。

抗原受容体刺激により活性化を受けることが知られている転写因子のモデル認識配列を用いてレポーターの作製を試みていたが、特に標識率が高い条件では、PD-1 存在下でもレポーター遺伝子の弱い発現が確認され、PD-1 による抑制を受けた細胞を明確に分離することが困難であった。そこで、マイクロアレイを用いた網羅的発現解析の結果を基に、PD-1 により発現誘導が強力に抑制される遺伝子の転写調節領域を用いたところ、PD-1 による抑制を受けた細胞と受けていない細胞を、より明確に分離できるようになった。

また、PD-1 と LAG-3 が発現誘導を抑制する遺伝子の種類が異なることを利用し、PD-1 及び LAG-3 による抑制を判別できるシステムの構築を試みた。遺伝子 A、B、C の転写調節領域、及び異なる色の蛍光色素を用いることにより、PD-1 によって抑制を受けている T リンパ球 (A<sub>low</sub>、B<sub>low</sub>、C<sub>int</sub>)、LAG-3 によって抑制を受けている T リンパ球 (A<sub>high</sub>、B<sub>low</sub>、C<sub>high</sub>)、両者による抑制を受けていない T リンパ球 (A<sub>high</sub>、B<sub>high</sub>、C<sub>high</sub>)、及び全く抗原刺激を受けていない T リンパ球 (A<sub>low</sub>、B<sub>low</sub>、C<sub>low</sub>) を分離することが可能となった。現時点では、レポーター C の標識率はほぼ 100% であるが、それ以外のは標識率が低いため、判定の精度が条件によっては必ずしも高く無い。今後、実際にマウス生体内等で利用するには、縦列化等により標識高率を向上させる必要があると思われる。また、上述の組み合わせでは、PD-1 と LAG-3 の両者によって抑制を受けている細胞を判別することができないため、今後、別の遺伝子の転写調節領域も検討する予定である。

## E. 結論

抗 PD-1 阻害抗体は、がんの治療に対して革新的な変化を与えると期待される。しかし、抗

PD-1 抗体による治療効果は、使用するがん細胞株の種類およびマウスの系統によって大きく異なることから、抗 PD-1 阻害抗体による T 細胞の活性化レベルを鋭敏かつ正確にモニターし、治療効果を予測する方法を開発するとともに、抗 PD-1 阻害抗体の効果をより高める治療法を開発することが重要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sugino Yoshio, Nishikawa Nobuyuki, Yoshimura Koji, Kuno Sadako, Hayashi Yukio, Yoshimura Naoki, Okazaki Taku, Kanematsu Akihiro, Ogawa Osamu. BALB/c-Fcgr2bPdc1 mouse expressing anti-urothelial antibody is a novel model of autoimmune cystitis. *Sci Rep.* 2012;2:317.
2. Iwamoto Satoru, Kido Masahiro, Aoki Nobuhiro, Nishiura Hisayo, Maruoka Ryutaro, Ikeda Aki, Okazaki Taku, Chiba Tsutomu, Watanabe Norihiko. IFN- $\gamma$  is reciprocally involved in the concurrent development of organ-specific autoimmunity in the liver and stomach. *Autoimmunity.* 2012 Mar;45(2):186-198.
3. Hisako, Ueda Yoshiyasu, Sawa Yukihisa, Jeon Seong Gyu, Ma Ji Su, Okumura Ryu, Kubo Atsuko, Ishii Masaru, Okazaki Taku, Murakami Masaaki, Yamamoto Masahiro, Yagita Hideo, Takeda Kiyoshi. Intestinal CX3C chemokine receptor 1high (CX3CR1high) myeloid cells prevent

T-cell-dependent colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Mar ;109(13):5010-5015.

4. Satoru Iwamoto, Masahiro Kido, Nobuhiro Aoki, Hisayo Nishiura, Ryutaro Maruoka, Aki Ikeda, Taku Okazaki, Tsutomu Chiba, Norihiko Watanabe, "TNF- $\alpha$  is essential in the induction of fatal autoimmune hepatitis in mice through upregulation of hepatic CCL20 expression", *Clin Immunol*, vol. 146, No. 1, pp.15-25, 2013
  5. Taku Okazaki, Shunsuke Chikuma, Yoshiko Iwai, Sidonia Fagarasan, Tasuku Honjo., A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application., *Nat. Immunol.* 14(12):1212-1218, 2013
- ##### 2. 学会発表
1. 岡崎 拓、自己免疫疾患のゲノム解析、第8回宮崎サイエンスキャンプ、宮崎、2012年2月17日
  2. Taku Okazaki, Regulation of autoimmunity by immuno-inhibitory receptors, *New horizons in immune system*, Tokushima, February 9th, 2012
  3. 岡崎 拓、*aida* マウスを用いた自己免疫疾患発症制御機構の解析、第7回自己免疫疾患研究会、東京、2012年7月7日
  4. Taku Okazaki, Immuno-inhibitory receptors in the regulation of autoimmunity, 2013 SKKU International Symposium on Molecular Medicine, Suwon, Korea, February 28th, 2013

5. 岡崎一美、杉浦大祐、高橋涼香、梶原雄、岡崎 拓、PD-1 欠損マウスを用いた自己免疫疾患のゲノム解析、第11回四国免疫フォーラム、高知県南国市 2012 年 6 月 9 日
  6. 岡崎 拓、免疫抑制受容体による免疫応答の制御、第4回 東京編・徳島大学研究者との集い、東京、2012 年 7 月 27 日
  7. Il-mi Okazaki and Taku Okazaki, Genetic reconstitution of autoimmunity in mice, The Second Immunology Symposium at the University of Tokushima, Tokushima, January 25th, 2013
  8. Taku Okazaki, Immuno-inhibitory receptors in the regulation of autoimmunity, The Second Immunology Symposium at the University of Tokushima, Tokushima, January 25th, 2013
  9. Il-mi Okazaki, Daisuke Sugiura, Suzuka Takahashi, Takeo Kajihara, Taku Okazaki, Identification of new therapeutic targets by genetic dissection and reconstitution of autoimmune diseases in mice, JST-CREST International Symposium, Tokyo, February 12-13<sup>th</sup>, 2013
  10. Taku Okazaki. Regulation of autoimmunity by immuno-inhibitory receptors., The 3<sup>rd</sup> Bizan immunology symposium, Tokushima, February 14th, 2014
  11. Daisuke Sugiura, Il-mi Okazaki, Taku Okazaki. Molecular analyses of an inhibitory co-receptor, LAG-3., The 3<sup>rd</sup> Bizan immunology symposium, Tokushima, , February 14th, 2014
  12. 杉浦大祐、免疫抑制受容体 LAG-3 による T 細胞活性化制御機構の解析、第 12 回四国免疫フォーラム、香川県さぬき市、2013 年 6 月 22 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得 なし
  2. 実用新案登録 なし
  3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金  
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)  
(総合)分担研究報告書

PD-1 欠損マウスを用いた、バイオマーカー探索の基礎的検討

研究分担者 竹馬 俊介 京都大学 免疫ゲノム医学 助教  
研究協力者 RUI YUXIANG 京都大学 博士課程大学院生

研究要旨

ヒト型 PD-1 抗体療法は、がんに対する有効な免疫増強治療法として国内外で精力的に開発が進められている。この治療法の副作用として起こり得る、アレルギーや自己免疫様症状の、環境危険因子や早期検出を可能にするバイオマーカーを検討するため、PD-1 欠損マウスに既知の自己抗原を投与し、同時投与でT細胞反応に影響するような因子を検討した。その結果、結核菌抗原を投与した PD-1 欠損マウス由来のマクロファージが、炎症性サイトカインである interleukin(IL)-6 を大量に産生し、これが T 細胞に作用して IL-17 を産生する自己反応性 T 細胞への分化を起しやすくなる事がわかった。結核の不顕性感染や、それに類する(マイコバクテリア属)微生物学的因子が疑われるがん患者においては、思わぬ副作用としてのT細胞性自己免疫症状が起こり易い可能性があり、このような患者へのPD-1 阻害薬投与は、より慎重に行う必要があること、自己免疫の兆候をいち早く察知するマーカーとして、免疫細胞から産生される IL-6 の定量が有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒト型 PD-1 抗体療法は、がんに対する有効な免疫増強治療法として国内外で精力的に開発が進められている。PD-1 阻害による免疫増強の副作用として、一部の患者には、アレルギーや自己免疫様症状が現れることが予測され、投与初期に自己免疫疾患の兆候をとらえるバイオマーカーを得ることが出来れば有用であると考えられる。また、自己免疫疾患の危険因子として、患者の先天性因子だけでなく、基礎疾患や不顕性感染といった環境因子が考えられる。当研究では、不顕性感染の代表である、結核菌の菌体抗原が危険性因子となる可能性を、PD-1 欠損マウスを用いて検討した。

B. 研究方法

(環境因子による自己免疫反応の検討)

PD-1 欠損マウスに、結核死菌単独、あるいは結核死菌と、マウス脳ミエリンタンパク由来)自己ペプチド(MOG35-55)を投与し、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発症を 30 日間観察した。病勢を観察し、定法によって点数化し、評価した。また、投与後、8 日後、30 日後のマウスよりT細胞を調整し、このT細胞を同系マウスの脾臓細胞、および MOG35-55 で再刺激した。培養上清を採集し、BD 社の cytometric bead array 法を用いて、抗原特異的なサイトカイン産生を測定した。また、野生型マウスに、PD-1 欠損 RAG2 欠損マウスの骨髓および野生型 CD4 陽性 T 細胞を移植し、非リンパ球でのみ PD-1 を欠損するマウスを作

製、ここに結核死菌とMOG35-55を投与して、実験的 EAE を誘導した。

(炎症性 T 細胞産生能の評価とメカニズム解析)

PD-1 欠損マウスおよび野生型マウスに結核死菌を投与して、7~8 日後に脾臓細胞を調整し、これを抗原提示細胞として用い、OTII TCRトランスジェニックマウスマウスの T 細胞を特異的抗原 (OVA323-339) にて刺激した。3 日間培養後、T 細胞を Phorbol 12-Myristate 13-acetate および ionomycin で 6 時間刺激し、蛍光標識 CD4 および TCR Va2 抗体で表面染色を施した。この細胞を、4%パラホルムアルデヒド固定後、0.1%サポニンを含む FACS 緩衝液で洗浄、細胞内に産生された IL-17 を、特異的抗体で染色し、結核菌を経験した細胞の T 細胞分化に与える影響を検討した。いくつかの実験では、結核菌を投与しないマウスから、脾臓細胞を調整し、マクロファージの表面抗原である CD11b を認識する磁気ビーズで標識、ミルテニ社の AUTO MACS で分離した。分離したマクロファージには、試験管内で結核菌を投与し、前述の T 細胞との共培養に用いた。また、培養中に、抗 IL-6 レセプター抗体を添加し、IL-6 の作用を中和した状態で、Th17 分化に与える影響を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、京都大学医学研究科の定める動物実験実施要綱、および京都大学動物実験指針を遵守して行った。また、PD-1 欠損マウスは、組み換え DNA 技術を用いて作出されているため、事前に京都大学組み換え DNA 実験委員会の承認を得たうえで行った。

### C. 研究結果

PD-1 欠損マウスに結核死菌(250 $\square$ g/マウ

ス)を投与すると、同時に投与した自己抗原である、MOG35-55 に対して、強い反応が惹起され、野生型マウスに起こる EAE と比較して早期発症、重症化が見られることがわかった。野生型マウスでは、低用量の結核死菌(50 $\square$ g/マウス)では EAE が起らなかったが、PD-1 欠損マウスでは半数以上が発症した。試験管内の再刺激実験において、PD-1 欠損マウスでは MOG35-55 に対する IL-17 の産生が更新しており、PD-1 欠損マウスでは結核菌に対する 17 型ヘルパー T 細胞 (Th-17) 型の免疫反応が更新していることが示唆された。

次に、PD-1 欠損マウスを結核死菌単独で免疫したマウスより 8 日後に脾臓細胞を分離し、これを抗原提示細胞として、抗原特異的ナイーブ T 細胞を分化させる実験を行った。結果、結核死菌を経験した PD-1 欠損マウスの抗原提示細胞、特に、CD11b を表現するマクロファージは、野生型に比べ、有意に多くの Th-17 を分化させる事が明らかとなった。試験管内で、PD-1 欠損マウス由来のマクロファージを結核死菌により刺激すると、野生型マクロファージに比べ、高濃度の IL-6 を放出することがわかった。この IL-6 と Th17 分化亢進の関係を調べるため、PD-1 欠損脾臓細胞を用いて抗原特異的 T 細胞を分化させる培養系において、IL-6 と、そのレセプターの結合を阻害する抗体を作用させた。この処置は、Th17 分化を阻害抗体の濃度依存性に抑制したため、PD-1 欠損マクロファージからの IL-6 産生が Th-17 分化亢進に直接かかわっていることが明らかになった。また、骨髄移植法によって、マクロファージなど、非リンパ球系細胞でのみ PD-1 を欠損するマウスを作製した。このようなマウスでは、PD-1 を発現するコントロールマウスと比較して、Th-17 型反応の亢進を伴う、実験的脳脊髄炎の早期発症および重症化が観

察された。

#### D. 考察

PD-1 欠損下では、マクロファージから通常より多くの IL-6 産生が起こり、自己反応性 T 細胞に作用して Th-17 細胞を分化させる可能性が示唆された。IL-6 は、PD-1 欠損マウスと野生型マウスで結核菌刺激後初期に差が見られた唯一のサイトカインであり、PD-1 抗体治療開始時の血清 IL-6 を測定すれば、免疫増強療法の副作用としての自己免疫疾患発症を予測できる可能性がある。

#### E. 結論

結核菌など、トル様受容体を刺激して、抗原提示細胞からの IL-6 を誘導する活性をもつ病原体、およびカビなどの環境因子は、潜在的に自己反応性 Th-17 の分化も起こす可能性を持っている。ここに PD-1 阻害を行うと、自己反応性 Th-17 の活性化を誘導し、思わぬ自己免疫病を発症する可能性がある。よって、患者における、不顕性感染などの微生物学的因子は、PD-1 抗体療法の際に慎重にモニタリングされる必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

**竹馬 俊介** 本庶 佑 PD-1の機能が  
ん分子標的治療 2014 12(1) 51-56

Okazaki T, **Chikuma S**, Iwai Y, Fagarsan S, Honjo T A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical applica-

tion. *Nat Immunol.* 2013  
Dec;14(12):1212-8

Stumpf M, Zhou X, **Chikuma S**, Bluestone JA Tyrosine 201 of the cytoplasmic tail of CTLA-4 critically affects T regulatory cell suppressive function. *Eur. J. Immunol.* 2014 Mar 20. [Epub ahead of print]

Nguyen T, Xu J, **Chikuma S**, Hiai H, Kinoshita K, Moriya K, Koike K, Marcuzzi GP, Pfister H, Honjo T, Kobayashi M Activation-induced cytidine deaminase is dispensable for virus-mediated liver and skin tumor development in mouse models. *Int. Immunol.* 2014 Mar 15. [Epub ahead of print]

**Rui Y**, Honjo T, **Chikuma S** Programmed cell death 1 inhibits inflammatory helper T-cell development through controlling the innate immune response. *P.N.A.S.* 2013 Oct 1;110(40):16073-8.

**竹馬 俊介** TRIM28による自己炎症性 T細胞の制御 *医学のあゆみ* 2013 245(8):665-6 2013

Hara-Chikuma M, **Chikuma S**, Sugiyama Y, Kabashima K, Verkman AS, Inoue S, Miyachi Y. Chemokine-dependent T cell migration requires aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide uptake. *J Exp Med.* 2012 Sep 24;209(10):1743-52

**Chikuma S**, Suita N, Okazaki IM, Shibayama S, Honjo T. TRIM28 prevents autoinflammatory T cell development *in vivo*. *Nat. Immunol.* 13:596-603, 2012.



Qin H, Suzuki K, Nakata M, **Chikuma S** et al. "Activation-induced cytidine deaminase expression in CD4+ T cells is associated with a unique IL-10-producing subset and increase with age." PLoS One vol.6, online publication (e29141), 2011.

## 2. 学会発表

**Rui Y**, Honjo T, **Chikuma S**. PD-1 inhibits inflammatory helper T cell development through controlling the innate immune response. 日本免疫学会・学術集会 2013年12月11-13日

竹馬 俊介「抗 PD-1 抗体によるがん治療」日台癌のトランスレーショナル研究シンポジウム. 神戸 2012年11月21日.

竹馬 俊介「核内因子 TRIM28 による自己炎症性 T 細胞の制御」北海道大学獣医学部 学術交流資金群講演会「自己免疫疾患研究の最先端」札幌 2012年11月1日.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 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

<平成 23 年度>

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamura S, Matsumura N, Mandai M, Huang Z, Oura T, Baba T, Hamanishi J, Yamaguchi K, Kang HS, Okamoto T, Abiko K, Mori S, Murphy SK, Konishi I.	The activated transforming growth factor-beta signaling pathway in peritoneal metastases is a potential therapeutic target in ovarian cancer.	Int J Cancer.	130	20-28	2012
Mandai M, Matsumura N, Baba T, Yamaguchi K, Hamanishi J, Konishi I.	Ovarian clear cell carcinoma as a stress-responsive cancer: influence of the microenvironment on the carcinogenesis and cancer.	Cancer Lett.	210	129-133	2011
Hamanishi J, Mandai M, Abiko K, Matsumura N, Baba T, Yoshioka Y, Kosaka K, Konishi I.	The comprehensive assessment of local immune status of ovarian cancer by the clustering of multiple immune factors.	Clin Immunol.	141	338-347	2011
万代昌紀、濱西潤三、安彦郁、松村謙臣、馬場長、小阪謙三、吉岡弓子、小西郁生	卵巣癌の播種・進展と免疫環境との関連分子を標的とした免疫法の開発	産婦人科の実 際	61巻2号	201-205	2012
万代昌紀、馬場 長、松村謙臣、小西郁生	「【婦人科がんの Molecular Biology】 cancer stem cell」	産科と婦人科	78巻1号	95-100	2011
万代昌紀	婦人科がん免疫療法の現状	化療ニュース	19	1-3	2011

<平成24年度>

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Abiko K, Mandai M, Hamanishi J, Yoshioka Y, Matsumura N, Baba T, Yamaguchi K, Murakami R, Yamamoto A, Kharma B, Kosaka K, Konishi I.	PD-L1 on tumor cells is induced in ascites and promotes peritoneal dissemination of ovarian cancer through CTL dysfunction.	Clin Cancer Res.	19(6)	1363-1374	2013
Huang RY, Chen GB, Matsumura N, Lai HC, Mori S, Li J, Wong MK, Konishi I, Thiery JP, Goh L.	Histotype-specific copy-number alterations in ovarian cancer.	BMC Med Genomics.			2012
Matsumoto K, Katsumata N, Saito I, Shibata T, Konishi I, Fukuda H, Kamura T.	Phase II study of oral etoposide and intravenous irinotecan for patients with platinum-resistant and taxane-pretreated ovarian cancer: Japan Clinical Oncology Group Study 0503.	JPN J Clin Oncol	42(3)	222-225	2012
Horiuchi A, Hayashi T, Kikuchi N, Hayashi A, Fuseya C, Shiozawa T, Konishi I.	Hypoxia upregulates ovarian cancer invasiveness via the binding of HIF-1 $\alpha$ to a hypoxia-induced, methylation-free hypoxia response element of S100A4 gene.	Int J Cancer.	131(8)	1755-67	2012
Yoshioka Y, Ono M, Osaki M, Konishi I, Sakaguchi S.	Differential effects of inhibition of bone morphogenic protein (BMP) signalling on T-cell activation and differentiation.	Eur J Immunol	42(3)	749-59	2012

<平成25年度>

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Koshiyama M, Matsumura N, Baba T, Yamaguchi K, Yoshioka Y, Konishi I.	Two cases of recurrent ovarian clear cell carcinoma treated with sorafenib.	Cancer Biol Ther.	15(1)	22-25	2014
Yamaguchi K, Huang Z, Matsumura N, Mandai M, Okamoto T, Baba T, Konishi I, Berchuck A, Murphy SK.	Epigenetic determinants of ovarian clear cell carcinoma biology.	Int J Cancer.			2013
Okamoto T, Mandai M, Matsumura N, Yamaguchi K, Kondoh H, Amano Y, Baba T, Hamanishi J, Abiko K, Kosaka K, Murphy SK, Mori S, Konishi I.	Hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$ (HNF-1 $\beta$ ) promotes glucose uptake and glycolytic activity in ovarian clear cell carcinoma.	Mol Carcinog.			2013
Tan TZ, Miow QH, Huang RY, Wong MK, Ye J, Lau JA, Wu MC, Bin Abdul Hadi LH, Soong R, Choolani M, Davidson B, Nesland JM, Wang LZ, Matsumura N, Mandai M, Konishi I, Goh BC, Chang JT, Thiery JP, Mori S.	Functional genomics identifies five distinct molecular subtypes with clinical relevance and pathways for growth control in epithelial ovarian cancer.	EMBO Mol Med.	5(7)	983-98	2013
Khurma B, Baba T, Mandai M, Matsumura N, Murphy SK, Kang HS, Yamanoi K, Hamanishi J, Yamaguchi K, Yoshioka Y, Konishi I.	Utilization of genomic signatures to identify high-efficacy candidate drugs for chemorefractory endometrial cancers.	Int J Cancer	133(9)	2234-44.	2013
濱西 潤三	卵巣癌の腫瘍局所における包括的な免疫環境の解析と治療応用への基礎的研究	産科と婦人科	80(4)	510-512	2013
濱西 潤三	がん免疫療法の最前線再発・進行卵巣がんに対する抗 PD-1 抗体を用いた免疫療法	産科と婦人科	Vol.81	No.2	2014

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

# The activated transforming growth factor-beta signaling pathway in peritoneal metastases is a potential therapeutic target in ovarian cancer

Shogo Yamamura<sup>1</sup>, Noriomi Matsumura<sup>1</sup>, Masaki Mandai<sup>1</sup>, Zhiqing Huang<sup>2</sup>, Tomonori Oura<sup>3</sup>, Tsukasa Baba<sup>1</sup>, Junzo Hamanishi<sup>1</sup>, Ken Yamaguchi<sup>1,2</sup>, Hyun Sook Kang<sup>1</sup>, Takako Okamoto<sup>1</sup>, Kaoru Abiko<sup>1</sup>, Seiichi Mori<sup>4</sup>, Susan K. Murphy<sup>2</sup> and Ikuo Konishi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan

<sup>2</sup>Division of Gynecologic Oncology, Department of Obstetrics and Gynecology, Duke University Medical Center, Durham, NC

<sup>3</sup>Department of Biostatistics, Graduate School of Public Health, Kyoto University, Kyoto, Japan

<sup>4</sup>Genomic Oncology Programme, Cancer Science Institute Singapore, National University of Singapore, Singapore

Peritoneal dissemination including omental metastasis is the most frequent route of metastasis and an important prognostic factor in advanced ovarian cancer. We analyzed the publicly available microarray dataset (GSE2109) using binary regression and found that the transforming growth factor (TGF)-beta signaling pathway was activated in omental metastases as compared to primary sites of disease. Immunohistochemical analysis of TGF-beta receptor type 2 and phosphorylated SMAD2 indicated that both were upregulated in omental metastases as compared to primary disease sites. Treatment of the mouse ovarian cancer cell line HM-1 with recombinant TGF-β1 promoted invasiveness, cell motility and cell attachment while these were suppressed by treatment with A-83-01, an inhibitor of the TGF-β signaling pathway. Microarray analysis of HM-1 cells treated with TGF-β1 and/or A-83-01 revealed that A-83-01 efficiently inhibited transcriptional changes that are induced by TGF-β1. Using gene set enrichment analysis, we found that genes upregulated by TGF-β1 in HM-1 cells were also significantly upregulated in omental metastases compared to primary sites in the human ovarian cancer dataset, GSE2109 (false discovery rate (FDR)  $q = 0.086$ ). Therapeutic effects of A-83-01 in a mouse model of peritoneal dissemination were examined. Intraperitoneal injection of A-83-01 (150 μg given three times weekly) significantly improved survival ( $p = 0.015$ ). In summary, these results show that the activated TGF-β signaling pathway in peritoneal metastases is a potential therapeutic target in ovarian cancer.

Ovarian cancer is the most lethal gynecologic cancer in the Western world. Because of its absence of obvious symptoms, the diagnosis of ovarian cancer is often made when the disease is at an advanced stage, resulting in a survival rate of only 20–30%.<sup>1</sup> Peritoneal dissemination is the most frequent route of spread and is the most significant prognostic factor in ovarian cancer.<sup>2</sup> Although many efforts have been made to treat peritoneal dissemination of ovarian cancer, such as debulking sur-

gery and systemic or intraperitoneal chemotherapy, effective eradication of peritoneal dissemination remains challenging. Therefore, there is an urgent need to develop new treatment modalities, especially targeted molecular therapies, through the study of basic biology underlying peritoneal disease spread.

Recently, the roles of the transforming growth factor (TGF)-beta signaling pathway in cancer have been studied in great depth, particularly in the progression of cancer and metastasis.<sup>3,4</sup> In the early phases of cancer development, TGF-β is thought to suppress the proliferation of tumor cells. In the advanced phases, however, TGF-β may promote cancer progression. Inhibition of TGF-β2 production by antisense oligonucleotides (AP12009) is a promising therapeutic strategy against glioma<sup>5</sup> and a phase III clinical trial is currently underway. However, little is known about the role of the TGF-β signaling pathway in ovarian cancer.

In our study, we performed gene expression microarray analysis and revealed that the TGF-β signaling pathway is activated in omental metastases of ovarian cancer. Activated TGF-β signaling promoted metastatic properties of ovarian cancer cells, including adhesion to extracellular matrix, cell motility and invasiveness. In addition, we examined the potential efficacy of A-83-01, a small molecule inhibitor of TGFBR1 kinase activity, in the treatment of ovarian cancer

**Key words:** ovarian cancer, metastasis, TGF β

Additional Supporting Information may be available in the online version of this article.

**Grant sponsor:** Japan Society for the Promotion of Science; **Grant numbers:** 21791551, 19890114, 21390452; **Grant sponsor:**

Department of Defense CDMRP Ovarian Cancer Research Program; **Grant number:** W81XWH-05-1-0053

**DOI:** 10.1002/ijc.25961

**History:** Received 25 May 2010; Accepted 20 Dec 2010; Online 3 Feb 2011

**Correspondence to:** Masaki Mandai, Department of Gynecology and Obstetrics, Graduate School of Medicine, Kyoto University, 54 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan, Tel: +81-75-751-3269; Fax: +81-75-761-3967, E-mail: mandai@kuhp.kyoto-u.ac.jp

metastases, both *in vitro* and *in vivo*. This report describes for the first time that the activated TGF- $\beta$  signaling pathway in omental metastases of ovarian cancer is a potential therapeutic target.

## Material and Methods

### Cell line

The OV2944-HM-1 (HM-1) mouse ovarian cancer cell line, purchased from the RIKEN BioResource Center (Tsukuba, Japan), was cultured as previously described.<sup>6</sup> The culture medium consists of minimum essential medium (MEM) alpha (Invitrogen, Carlsbad) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (v/v; Biowest, France) and penicillin-streptomycin (100 IU/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). SK-OV-3 human ovarian cancer cell line was purchased from the ATCC (Rockville, MD) and cultured in RPMI1640 (Nikken Biomedical Laboratory, Kyoto, Japan) supplemented with the same reagents as MEM alpha.

### Reagents

A-83-01, a small molecule inhibitor of TGF- $\beta$  receptor type I kinase activity, was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Recombinant human TGF- $\beta$ 1 was purchased from Peprotech (Rock Hill, NJ).

### Microarray analysis

HM-1 cells were treated with A-83-01 (1  $\mu$ M) or vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO) for 2 hr followed by the addition of TGF- $\beta$ 1 (1 ng/ml) or vehicle phosphate buffered saline (PBS). Four hours later, HM-1 cells were harvested, and RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). Gene expression data were generated at Singapore University as previously described.<sup>7</sup> We used 200 ng total RNA per sample on Affymetrix Mouse ST v1.0 GeneChips containing probes for over 28,000 well-annotated genes.

Microarray datasets were obtained from the Gene Expression Omnibus website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Serous ovarian cancer samples (primary;  $n = 88$ , omental metastasis;  $n = 38$ ) in GSE2109 were used for the analysis. Of these, 15 cases had received chemotherapy prior to the operation. Samples used in the study are listed in Supporting Information Table 1.

### Bioinformatics analyses

**Normalization.** Data with the MAS5 format were used for binary regression analyses, whereas other analyses were performed using robust multi-array average (RMA)-normalized data. R version 2.8.2 was used for the normalization.<sup>8</sup>

Genes differentially expressed between control and TGF- $\beta$ 1-treated samples were identified using significance analysis of microarrays (SAM).<sup>9</sup> Gene probes with FDR  $q < 0.25$  were selected for further analyses.

Binary regression was performed as previously described.<sup>10-12</sup> This is a tool to determine the probability of gene signature for

individual samples to examine pathway activity. Training set had been developed by overexpression of oncogenes (Src, Myc, Ras,  $\beta$ -catenin and E2F3) or addition of cytokines (tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TGF- $\beta$ 1) onto cultured human cells. Differentially expressed genes by the treatment were identified and designated as the gene signature. Probabilities of the gene signature can be determined for individual samples in external datasets. In this research, we determined gene signature probabilities for the serous ovarian cancer samples (Figs. 1 and 2a).

Gene set enrichment analysis (GSEA) was conducted as previously reported.<sup>13</sup> We used C2 curated gene sets of the MSigDB (<http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/>) to determine the enriched pathways in omental metastases of ovarian cancer. Briefly, we performed the GSEA analysis to compare between primary sites ( $n = 88$ ) versus omental metastases ( $n = 38$ ) of GSE2109. At first, we applied all the C2 curated gene sets ( $n = 1892$ ) with the following parameters; "Number of permutations = 10" and "Permutation type = phenotype." All other parameters were default. As a result, 657 gene sets showed statistically significant (FDR  $q$  value  $< 0.25$ ) enrichment among the omental metastases. To analyze selected gene sets relevant to the TGF- $\beta$  pathway more accurately, we downloaded several gene sets (that appears in the Results section) from the MSigDB and analyzed individually with the following parameters; "Number of permutations = 1000" and "Permutation type = phenotype". Genes upregulated by TGF- $\beta$ 1 ( $n = 173$ ) in HM-1 cells (Supporting Information Table 2) were also used to generate a gene set for a GSEA analysis. Genes downregulated by TGF- $\beta$ 1 ( $n = 12$ ) were not used for this purpose because this gene set did not meet the gene set size threshold ( $\geq 15$ ) to run the GSEA software.

An average-linkage hierarchical clustering analysis was performed using Cluster 3.0 available from <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>. Java TreeView (<http://jtreeview.sourceforge.net/>) was used to visualize the heat map.

### Immunohistochemical staining

Ovarian cancer specimens taken from women who received primary tumor resection at the Department of Gynecology and Obstetrics of Kyoto University Hospital from 2003 through 2006 were used for immunohistochemical staining. Prior written informed consent from all the patients was received, and approval was given by the Kyoto University Graduate School and Faculty of Medicine Ethics Committee. For our study, we used only serous ovarian cancer samples with no prior treatment. Immunohistochemical staining of TGFBR2 was carried out using the streptavidin-biotin-peroxidase method. Briefly, formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections were deparaffinized and antigen retrieval was performed in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) at 120°C for 5 min. The slides were incubated with primary anti-TGFBR2 antibody at a 1:100 dilution (Abcam, Cambridge, MA) overnight at 4°C, followed by incubation with biotinylated goat anti-rabbit secondary antibodies (Nichirei). For staining of phosphorylated SMAD2 (pSMAD2), anti-pSmad2 antibody (Novus Bio, Littleton, CO) was used at a 1:100



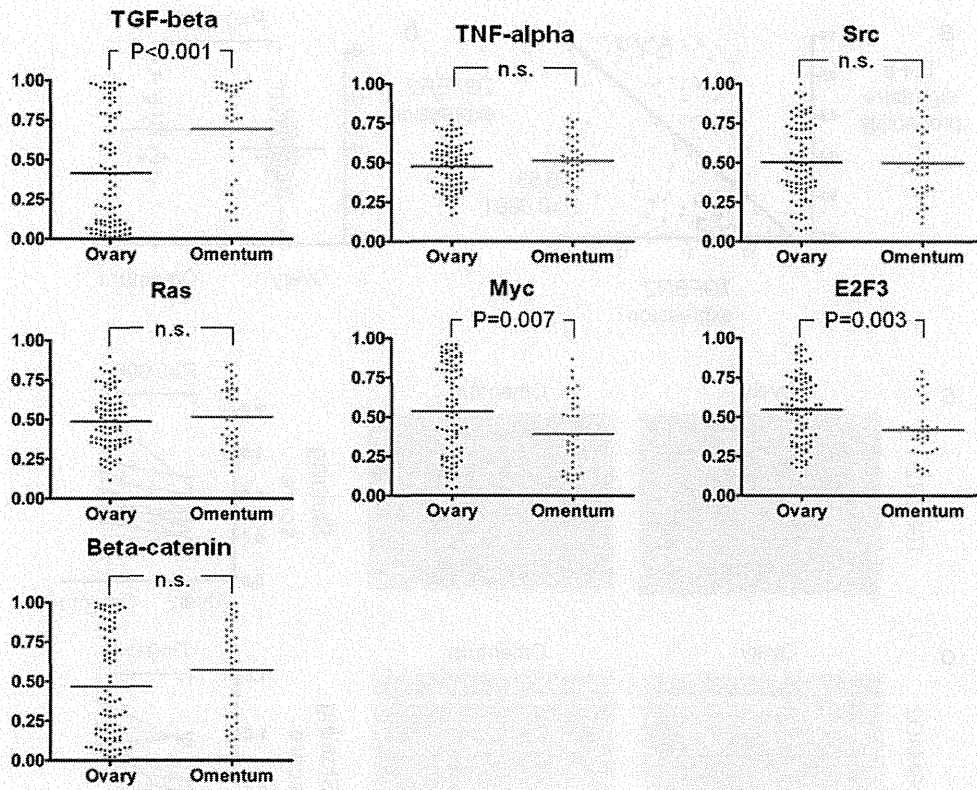


Figure 1. Activities of signaling pathways in primary sites and metastatic sites of ovarian cancer. Activities of seven signaling pathways including TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Src, Ras, Myc, E2F3 and  $\beta$ -catenin were analyzed using binary regression in the GSE2109 dataset. In each scatter diagram, individual dots show the activity of the signaling pathway for 88 primary sites (left) and 38 omental metastases (right) of ovarian cancers. Y axis; signature probabilities. n.s.; not significant.

dilution with the same subsequent procedure as TGFBR2. Two independent gynecological pathologists examined the immunohistochemistry slides without any prior information about the clinical history of the patients. TGFBR2 and pSMAD2 expression was evaluated according to staining intensity and was scored as follows: 0, negative, no staining in cancer cells (same or weaker than the cancer stroma); 0.5, weakly positive (staining of the cancer cells is slightly stronger than that of the cancer stroma); 1, positive (staining of the cancer cells is stronger than that of the cancer stroma); 2, strongly positive (staining of the cancer cells is much stronger than that of the cancer stroma).

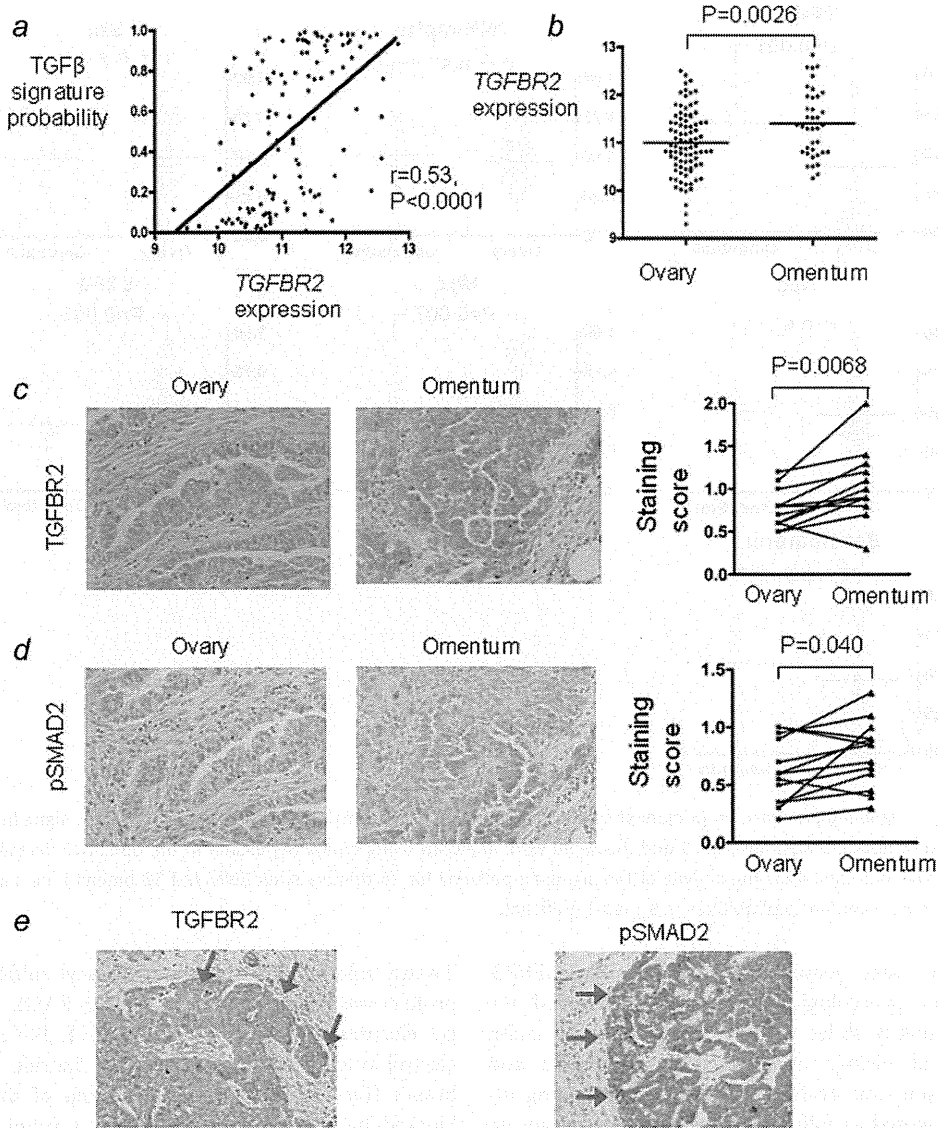
#### Western blot analysis

A-83-01 (1 or 10  $\mu$ M) or vehicle (DMSO) control were added to HM-1 cells followed by TGF- $\beta$ 1 (1 or 10 ng/ml) or vehicle control 30 min later. Cells were harvested 60 min later and lysed in radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) with a protease inhibitor cocktail (EMD, Madison, WI) and a phosphatase inhibitor cocktail (Nacalai Tesque). Protein was quantified using the DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA).

Twenty micrograms of sodium dodecyl sulfate (SDS)-treated protein was loaded onto a 10% SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) gel (Ready Gels J, Bio-Rad). Gels were electroblotted onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad). Nonspecific binding of the antibody was blocked by incubating for 30 min at room temperature in Blocking One-P (Nacalai Tesque). The membranes were incubated overnight at 4°C with antiphosphorylated Smad3 antibody (1:1,000, pSmad3 Rabbit mAb, Immuno-Biology Laboratories, Japan), which reacts with both human and mouse protein. After washing in tris-buffered saline (TBS)-T, the blots were incubated with the appropriate peroxidase-coupled secondary antibody (1:10,000; Anti-rabbit HRP, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden). An anti-human  $\beta$ -actin antibody (1:5,000; Rabbit mAb, Abcam) were used for the endogenous controls. Specific proteins were detected using ECL Plus Western Blotting Reagent (GE Healthcare Life Sciences).

#### Cell proliferation assay

HM-1 cells were seeded into a 96-well plate (Asahi Glass, Japan) and were incubated for 18 hr. A-83-01 (1  $\mu$ M) or vehicle were then added for 12 hr followed by the addition of



**Figure 2.** TGFBR2 expression and TGF- $\beta$  pathway activity in primary ovarian carcinomas and omental metastases. (a) Expression of *TGFBR2* (208944\_at) is positively correlated with TGF- $\beta$  signature probabilities in the GSE2109 dataset. TGF- $\beta$  signature probability for the individual tumor sample was determined as previously described.<sup>12</sup> (b) Expression of *TGFBR2* (208944\_at) was significantly higher among the omental metastases in the GSE2109 dataset. (c) Immunohistochemical expression of TGFBR2. Scatter diagram shows staining scores of the paired samples. (d) Immunohistochemical expression and scatter diagram of pSMAD2. The sections of TGFBR2 and pSMAD2 are serial sections. (e) Representative figures of TGFBR2 and pSMAD2 expression in the invasive front (red arrows).

TGF- $\beta$ 1 (1 ng/ml) or vehicle for 60 hr. The number of viable cells in each well was examined using the WST-1 assay (Takara Bio) following the manufacturer's instructions.

**Cell adhesion assay**

HM-1 cells were treated with A-83-01 (1  $\mu$ M) or vehicle for 12 hr followed by treatment with TGF- $\beta$ 1 (1 ng/ml) or vehicle for 8 hr. Next, 10<sup>5</sup> cells were seeded into each well of collagen IV-coated 96-well plates (Asahi Glass) and incubated for 2 hr.

After that, wells were washed twice with PBS, and the number of attached cells was evaluated using the WST-1 assay.

**Cell migration assay**

HM-1 cells were seeded onto 10 cm tissue culture dishes (Greiner bio-one, Monroe, NC) and incubated until cells were confluent. Next, scratch lines (1000–1200  $\mu$ m width) were introduced using a plastic tip and A-83-01 (1  $\mu$ M) or vehicle was added. Six hours later, TGF- $\beta$ 1 (1 ng/ml) or

vehicle was added. The widths of the gaps in the cell monolayers were measured 20 hr after scratch introduction.

### Cell invasion assay

HM-1 cells were treated with 1  $\mu$ M of A-83-01 for 12 hr followed by treatment with 1 ng/ml of TGF- $\beta$ 1 for 8 hr. Next, 10<sup>5</sup> cells were seeded into Boyden chambers with 8.0  $\mu$ m pore PET membranes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) coated with Matrigel. After 20 hr, membranes of the Boyden chambers were fixed with 99% methanol and stained in hematoxylin. The number of cells that invaded through the membrane were visually counted in five high power fields (200 $\times$ ) and averaged. To confirm the effect of TGF- $\beta$ 1 and A83-01 on human ovarian cancer cell lines, we did invasion assay with SK-OV-3 cells.

### ELISA assay of TGF- $\beta$ 1

Ascites were retrieved from the abdominal cavity of mice 10 days after inoculation with 1  $\times$  10<sup>6</sup> HM-1 cells. The concentration of TGF- $\beta$ 1 in ascites was determined with the Quantikine human TGF- $\beta$ 1 immunoassay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) following manufacturer's instructions. The optical density of each well was read with an Emax microplate reader (Molecular Devices, Silicon Valley, CA).

### In vivo experiments

Female B6C3F1 mice used for the *in vivo* studies were purchased from CLEA Japan (Tokyo, Japan) and maintained under specific pathogen-free conditions. All animal experiments were approved by the Kyoto University Animal Research Committee. To evaluate the effect of A-83-01 on the survival of mice bearing peritoneal dissemination, HM-1 cells (1  $\times$  10<sup>6</sup>) were injected into the abdominal cavity *via* the left flank of the mouse. Starting the next day, A-83-01 (150  $\mu$ g/body) or vehicles (PBS with 0.5% DMSO) were injected into the abdominal cavity three times per week. Mice were euthanized before reaching the moribund state.

### Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Prism 4.0b. Student's *t*-test was used unless indicated in the text. *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Identification of the TGF- $\beta$ activated signaling pathway in the omental metastases of ovarian cancer by gene expression profiling analysis

To investigate signaling pathways that may differ between the primary site and the omental metastases of ovarian cancer, we conducted gene expression microarray analysis using the publically available dataset GSE2109. Based on the previously reported gene signatures of seven signaling pathways (Src, Myc, Ras, TNF- $\alpha$ ,  $\beta$ -catenin, TGF- $\beta$  and E2F3),<sup>10-12</sup> we evaluated signature probabilities on behalf of each pathway in this data. Among the seven pathways, only the TGF- $\beta$  signaling pathway was more active in the omental metastases

than the primary sites (Fig. 1, *p* < 0.0001). In contrast, the Myc and E2F3 pathways were more activated in the primary sites (*p* < 0.007 and *p* < 0.003, respectively).

Consistent with the result from the binary regression, GSEA revealed that "TGF\_BETA\_SIGNALING\_PATHWAY" was enriched in the omental metastases (FDR *q* value = 0.03). Furthermore, the characteristic *in vitro* effects of TGF- $\beta$  on cancer cells<sup>14-16</sup> such as "CELL\_MOTILITY," (FDR *q* < 0.001) "CELL\_ADHESION" (FDR *q* < 0.001) and "MATRIX\_METALLOPROTEINASES" (FDR *q* = 0.006) were also enriched in the omental metastases (data not shown).

### Comparison of TGFBR2 and pSMAD2 expression in paired samples of primary site and omental metastases by immunohistochemistry

Among the core components of the TGF- $\beta$  signaling pathway, *TGFBR2* (208944\_at) showed a significant positive correlation with TGF- $\beta$  signature probability scores (*r* = 0.53, *p* < 0.0001, Pearson's correlation) (Fig. 2a). In addition, *TGFBR2* expression was significantly upregulated in the omental metastases compared to primary sites (*p* = 0.0026; Fig. 2b).

We next examined expression of TGFBR2 and phosphorylated SMAD2 (pSMAD2) in ovarian cancer tissue samples by immunohistochemistry. We used samples for which both primary and omental metastasis sites were available (*n* = 14), and we compared their expression using paired analysis. Both TGFBR2 and pSMAD2 were upregulated in the omental metastases (*p* = 0.0068 and *p* = 0.040, respectively, Figs. 2c and 2d). In addition, among the cancer tissues, expression of both TGFBR2 and pSMAD2 tended to be stronger at the invasive front and in the small cancer nests rather than the center of tumor nodules (Fig. 2e).

### Effect of TGF- $\beta$ 1 and the TGF- $\beta$ pathway inhibitor A-83-01 on the *in vitro* metastatic properties of ovarian cancer cells

The *in vitro* effects of recombinant TGF- $\beta$ 1 or the TGF- $\beta$  pathway inhibitor A-83-01 were examined using the HM-1 mouse ovarian cancer cell line.<sup>6</sup> First, we examined the expression of phosphorylated Smad3 (pSmad3) by Western blotting. As expected, expression of pSmad3 was increased by the addition of TGF- $\beta$ 1, and the effects of TGF- $\beta$ 1 were inhibited by A-83-01 (Fig. 3).

Addition of TGF- $\beta$ 1 or A-83-01 did not alter proliferation of HM-1 cells (Fig. 4a). Thus, we next examined the influence of TGF- $\beta$ 1 or A-83-01 on cell motility, adhesion and invasion. TGF- $\beta$ 1 increased cell motility, adhesion and invasion, while A-83-01 decreased these behaviors (Figs. 4b, c and d). When only A-83-01 was added, cell motility, adhesion and invasion were decreased (Figs. 4b, c and d). This appears to be a consequence of inhibition of autocrine/paracrine TGF- $\beta$  signaling in HM-1 cells because the concentration of TGF- $\beta$ 1 in the culture medium (1,260  $\pm$  17 pg/ml) increased after HM-1 cells were cultured for 18 hr (3,395  $\pm$  15 pg/ml; data not shown).

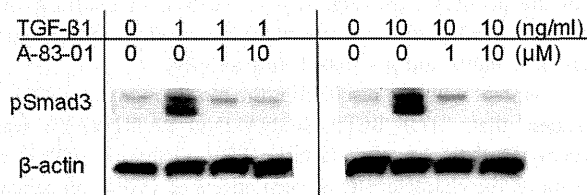


Figure 3. Transcriptional changes of HM-1 cells with TGF-β1 and/or A-83-01. Western blotting for pSMAD3 of HM-1 cells in reaction to TGF-β1 (1 or 10 ng/ml) and/or A-83-01 (1 or 10 μM).

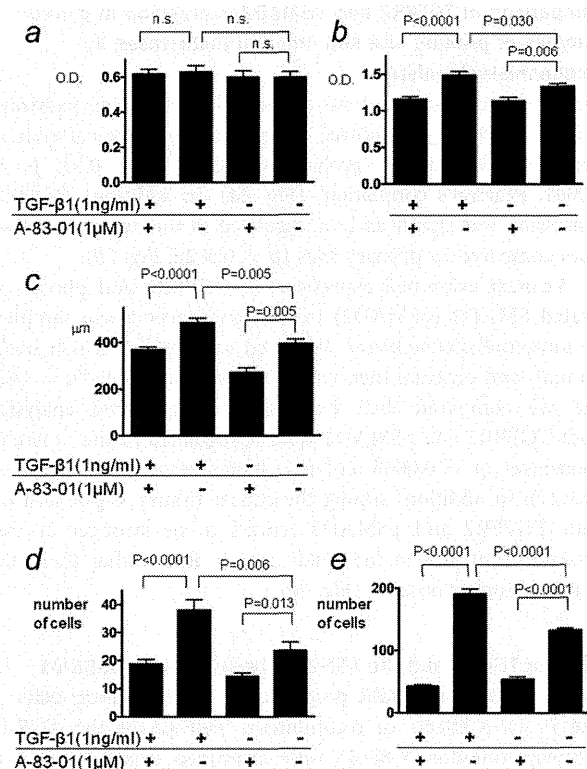


Figure 4. *In vitro* treatment of HM-1 cells and SK-OV-3 cells with TGF-β1 and/or A-83-01. (a) WST-1 assay of HM-1 cells to analyze proliferation of cells 60 hr after treatment ( $n = 12$  each). (b) WST-1 assay of HM-1 cells to analyze the adhesion of cells onto collagen type IV-coated dishes, 150 min post-treatment ( $n = 20$  each). (c) Wound healing assay of HM-1 cells to analyze cell motility ( $n = 12$  each). The y axis indicates the distance of migration 20 hr post-treatment. (d) Boyden chamber assay of HM-1 cells to analyze cell invasion. Invaded cells were counted 20 hr post-treatment ( $n = 12$  each). Y axis indicates the average of invading cell numbers in high power fields (200×). (e) Boyden chamber assay of SK-OV-3 cells to analyze cell invasion.

As to invasion assay, SK-OV-3 cells, human ovarian cancer cells, showed same tendency as HM-1 cells with addition of TGF-β1 or A-83-01 (Fig. 4e).

**Identification of genes that are regulated by TGF-β**

We next conducted microarray analysis using HM-1 cells to compare gene expression among vehicle ( $n = 3$ ), TGF-β1 ( $n = 3$ ), TGF-β1 + A-83-01 ( $n = 3$ ) or A-83-01 treatments ( $n = 1$ ). Differentially expressed genes between vehicle and TGF-β1-treated samples were identified using SAM. A cut-off of FDR  $q < 0.25$  identified 241 probes, including 218 probes (173 genes) upregulated and 23 probes (12 genes) downregulated by TGF-β1 (Supporting Information Table 1).

An average-linkage hierarchical analysis of the 10 HM-1 samples using the above 241 probes was performed. As expected, these genes were found to distinguish TGF-β1-treated samples from the other samples (Fig. 5). The similarity of the TGF-β1 + A-83-01 group with vehicle and not the TGF-β1 group indicates that A-83-01 efficiently reversed gene expression changes induced by TGF-β1.

The 173 upregulated genes were used in a GSEA analysis to determine if they were differentially expressed between primary sites and the omental metastases of ovarian cancer in the GSE2109 dataset. These genes were significantly enriched among the omental metastases (FDR  $q$  value = 0.086 < 0.25).

**Therapeutic effects of A-83-01 in a mouse model of peritoneal dissemination of ovarian cancer**

We first examined side effects of A-83-01 in B6C3F1 mice. Peritoneal injection of A-83-01 twice a week for 4 weeks at doses of 50, 150 and 500 μg did not influence body weight or neurobehavioral appearances. No change was found in the histopathological appearance of lung, heart, liver or kidney (data not shown).

We then investigated the therapeutic potential of A-83-01 in a mouse model of peritoneal dissemination of ovarian cancer. Intraperitoneal injection of  $1 \times 10^6$  HM-1 cells into B6C3F1 mice led to ascites accumulation with diffuse disseminated tumors on the peritoneum within 2 weeks (Fig. 6a). The ascites contained abundant TGF-β ( $26.993 \pm 0.068$  ng/ml, data not shown). A-83-01 was injected into the peritoneal cavity ( $150 \mu\text{g}/\text{mouse} \times 3$  times/week) starting 1 day postinjection of HM-1 cells. Formation of ascites tended to be slower in the A-83-01-treated group (Supporting Information Fig. 1), and A-83-01 significantly improved survival of the mice (Fig. 6b,  $p = 0.0148$ ).

**Discussion**

Ovarian cancer is the most lethal malignancy among the gynecological cancers because most cases are diagnosed only after the disease has reached an advanced stage. Peritoneal dissemination, which frequently involves the omentum, is the most typical mode of spread of ovarian cancer.<sup>2</sup> To clarify the molecular mechanisms underlying the metastasis of ovarian cancer, we compared the primary site and omental metastases of ovarian cancer. We have recently used bioinformatics approaches such as binary regression to elucidate