

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861038

研究課題名(和文) 癌免疫逃避機構の制御による新規分子標的治療の開発のための研究

研究課題名(英文) The development of a new molecular target treatment by control of cancer immune escape

研究代表者

井口 研子(間中研子)(Iguchi, Akiko)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50575644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：活性化受容体DNAM-1のリガンドであるCD155は、ヒトでは膜型と可溶性のアイソフォームを持つ。本研究では癌組織と正常組織における膜型・可溶性CD155の発現定量解析を行い、正常組織と比較し癌組織では膜型・可溶性CD155の発現量が上昇することを明らかにした。また胃癌患者血清中の可溶性CD155濃度解析を行い、胃癌病期と可溶性CD155濃度の正の相関を認めた。さらにマウスモデルにて腫瘍の大きさと血清中の可溶性CD155濃度の正の相関を認めた。本結果より、癌の進行に伴い癌患者血清中の可溶性CD155濃度が高くなると考えられ、可溶性CD155は腫瘍マーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The DNAM-1 ligand CD155 has isoforms of membrane-bound and soluble form. Here, by quantitative real-time PCR, we compared the expression of CD155 isoforms among various cancers and their adjacent non-tumor tissues; the expression of membrane-bound and soluble CD155 were higher in the cancers than in non-tumor tissues. In addition, we show that the soluble CD155 (sCD155) levels were higher in patients with advanced stage gastric cancer than in patients with early stage. Moreover, sCD155 levels in sera were dependent on tumor burden in a mouse model. Our results suggest that sCD155 levels in the sera of cancer patients are possibly dependent on tumor progression. Serum sCD155 level may be potentially useful as a tumor marker.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：可溶性CD155 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍免疫における DNAM-1 と膜型 CD155 の機能

DNAM-1 は、研究代表者のグループで同定した免疫系受容体で、CTL や NK 細胞に発現し、癌細胞などを標的として細胞傷害活性を誘導する活性化受容体である (Shibuya et al, *Immunity* 1996)。また我々は、DNAM-1 のリガンドが CD155 と CD112 であることを同定し、DNAM-1 が癌細胞に高発現する CD155 または CD112 と結合して、CTL や NK 細胞に細胞傷害活性を誘導し、癌細胞を排除することを明らかにした (*Int. Immunol.* 2004, *Blood* 2006)。

DNAM-1 と癌細胞に発現する CD155 または CD112 との、生体内での相互作用を明らかにするため、研究代表者は DNAM-1 遺伝子欠損マウスを作製した。DNAM-1 遺伝子欠損マウスに膜型 CD155 を高発現する癌細胞を移植すると、このマウスでは腫瘍が拒絶されずに増大し、生存率が低下した。さらに DNAM-1 遺伝子欠損マウスにメチルコラントレンなどの化学発癌物質を投与し発癌を誘導すると、このマウスでは発癌率が高く生存率が低下した。これらの結果から、DNAM-1 は癌細胞に発現する膜型 CD155 を標的として免疫監視を行い、癌の発症を阻止することを明らかにした (Iguchi et al, *J. Exp. Med.* 2008)。

(2) 可溶性 CD155 による腫瘍免疫逃避の可能性

研究代表者のグループでは、DNAM-1 リガンドの膜型 CD155 はヒトの胃・大腸の正常組織では発現していないが、胃癌や大腸癌組織では高発現していることを見いだした (*Blood* 2006)。また世界の研究グループより、ヒトの神経芽細胞腫 (Castriconi et al, *Cancer res.* 2004)、白血病細胞 (Pende et al, *Blood* 2005)、卵巣癌 (Carlsten et al, *Cancer Res.* 2007)、多発性骨髄腫 (El-Sherbiny et al, *Cancer Res.* 2007) などの多くの癌で膜型 CD155 が高発現すると報告されている。前述のように、膜型 CD155 を発現する癌細胞は DNAM-1 による免疫監視の標的となるにもかかわらず、ヒトに発症した癌ではこのように膜型 CD155 の高発現が見られる。このことから研究代表者は、膜型 CD155 を発現する癌細胞が、DNAM-1 による免疫監視に対する逃避機構を持っている可能性を考えた。ヒト CD155 は膜型のほかにスプライシングバリエーションとして可溶性 CD155 が存在するが (Koike et al, *EMBO J.* 1990)、癌における可溶性 CD155 の発現については大腸癌において膜型と可溶性の CD155 mRNA が発現するという報告 1 件のみである (Masson et al, *Gut* 2001)。最近研究代表者は、HeLa 細胞が可溶性 CD155 タンパクを産生することを明らかにした。さらに肺癌、消化器癌、乳癌、婦人科癌、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫など各種の癌患者約 300 例の血清を解析し、

血清中の可溶性 CD155 濃度が高値となることを見いだした。癌細胞が産生する可溶性 CD155 が DNAM-1 に結合することにより、DNAM-1 と癌細胞上の膜型 CD155 の結合が阻害され、癌細胞が DNAM-1 による免疫監視から逃避していることを推察した。

この仮説を検証するため、可溶性 CD155 を強制発現させた可溶性 CD155 産生細胞を作製し、可溶性 CD155 を産生しない Mock 細胞と同時に野生型マウスに移植した。Mock 腫瘍は 8 割以上が拒絶されたのに対し、可溶性 CD155 産生腫瘍は全匹において拒絶されず生存率が低下した。この結果は可溶性 CD155 が免疫逃避に働くという仮説を支持するものである。

2. 研究の目的

- (1) CD155 の癌バイオマーカーとしての有用性を検討する。
- (2) 可溶性 CD155 を標的とした新規癌分子標的治療法を検討する。

3. 研究の方法

(1) PCR による CD155 発現解析
ヒト大腸癌、子宮頸癌、白血病、肉腫などの癌細胞株より RNA を抽出、DNA を合成し、PCR により膜型・可溶性 CD155 の発現を解析した。

(2) 定量 PCR による CD155 発現解析
ヒト胃癌、大腸癌、乳癌計 16 症例の新鮮癌組織と隣接正常組織より RNA を抽出、DNA を合成し、定量 PCR にて膜型・可溶性 CD155 の発現量を解析した。

(3) 癌組織の CD155 免疫染色
抗 CD155 抗体を用いて、胃癌組織パラフィン切片の免疫染色を行った。

(4) 血清可溶性 CD155 濃度解析
健康人約 60 例と胃癌患者約 50 例の血清を用い、sandwich ELISA system にて可溶性 CD155 濃度を解析した。Sandwich ELISA system は研究代表者が樹立した系を用いた。

(5) マウスモデルによる血清可溶性 CD155 濃度と腫瘍の大きさとの相関解析

遺伝子導入により作製した、可溶性 CD155 を強制発現させた可溶性 CD155 産生 MethA 細胞を野生型マウスの背部皮下に移植し、腫瘍の大きさと血清中の可溶性 CD155 濃度を解析した。可溶性 CD155 濃度解析は研究代表者が樹立した sandwich ELISA system を用いた。

(6) 抗可溶性 CD155 特異的抗体の作製
ヒト CD155 細胞内領域を抗原としてマウスに免疫し、抗ヒト可溶性 CD155 特異的抗体の作製に取り組んだ。また可溶性 CD155 産生 MethA-FLAG 細胞をマウスに移植したマウスモデルで抗 FLAG 抗体投与と実験を行った。

4. 研究成果

- (1) 癌細胞株の CD155 発現解析

ヒト大腸癌、子宮頸癌、白血病、肉腫などの癌細胞株を用いて PCR を行い、全ての癌細胞株において膜型と可溶型 CD155 の発現を認めた。これまでの知見から癌細胞では膜型 CD155 が高発現することが示されており、本結果から癌細胞では可溶型 CD155 も高産生されることが推察された。

(2) 癌組織の CD155 発現解析

ヒト胃癌、大腸癌、乳癌計 16 例の新鮮癌組織と隣接正常組織を用い、定量 PCR にて膜型・可溶型 CD155 の発現量を解析したところ、正常組織と比較し癌組織では膜型・可溶型 CD155 の発現量が有意に上昇していた。また上記で解析した胃癌のパラフィン切片を用いて抗 CD155 抗体にて免疫染色を行ったところ、癌細胞の染色強陽性を認め、定量 PCR による発現解析との一致性が示唆された。

さらに TCGA open access data を用いて膜型 CD155 と可溶型 CD155 の発現相関解析を行ったところ、膜型 CD155 と可溶型 CD155 の発現比は癌部・隣接正常部ともに相関し、また肺癌、乳癌、大腸癌、肝癌、腎癌などにおいて可溶型 CD155 の発現が正常部よりも癌部で高い傾向が見られた。

本結果より癌組織では可溶型 CD155 が高産生され、癌患者血清中に認める可溶型 CD155 の産生源は癌組織であることが推察された。

(3) 癌患者血清中の可溶型 CD155 濃度と癌の進行度との相関

健常人約 60 例と胃癌患者約 50 例の血清を用い、sandwich ELISA system にて可溶型 CD155 濃度を解析したところ、胃癌病期と可溶型 CD155 濃度の有意な正の相関を認めた。本結果は、癌細胞では可溶型 CD155 が高産生され、癌患者血清中に認める可溶型 CD155 の産生源は癌組織である、という推察を裏付けており、癌の進行に伴い癌組織から産生される可溶型 CD155 の絶対量が増加すると考えられた。

(4) 血清中の可溶型 CD155 濃度と腫瘍の大きさととの相関

これらの結果をさらに裏付けるため、マウスモデルを用いて実験を行った。可溶型 CD155 を強制発現させた可溶型 CD155 発現マウス MethA 細胞を用い、野生型マウスに移植し、腫瘍の大きさと可溶型 CD155 血中濃度を解析したところ、腫瘍の大きさと可溶型 CD155 濃度の有意な正の相関を認めた。本結果により、癌の進行に伴い血清中の可溶型 CD155 濃度が高くなるという推察が裏付けられた。可溶型 CD155 は腫瘍マーカーとして有用である可能性が示唆された。

(5) 抗可溶型 CD155 特異的抗体の作製

可溶型 CD155 は膜貫通領域を欠失するスプライシングバリエーションであり、C 末端側に細胞内領域を持っている。膜型 CD155 は認識しない抗可溶型 CD155 特異的抗体を作製するため、CD155 細胞内領域を抗原とした抗体の作製に取り組んだが難渋している。また前

述のマウスモデルで用いた可溶型 CD155 発現マウス MethA 細胞は N 末端側に FLAG が付いているため、マウスモデルで抗 FLAG 抗体投与実験を行ったが抗腫瘍効果は認められなかった。原因のひとつとしては FLAG が N 末端側にあるため、DNAM-1 と可溶型 CD155 の結合を阻害できないことが考えられる。今後も引き続き抗可溶型 CD155 特異的抗体の作製に取り組む。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

- (1) Iguchi-Manaka A, Okumura G, Kojima H, Cho Y, Hirochika R, Bando H, Sato T, Yoshikawa H, Hara H, Shibuya A, Shibuya K, Increased Soluble CD155 in the Serum of Cancer Patients, PLOS ONE 2016 Apr 6, 11(4): e0152982, 査読有

[学会発表](計 10 件)

- (1) Iguchi-Manaka A, Shibuya A, Shibuya K, Increased soluble CD155 in patients with various cancers, 2015 日本免疫学会総会・学術集会、2015 年 11 月 18-20 日、札幌コンベンションセンター、札幌市
- (2) Shibuya K, Iguchi-Manaka A, Kojima H, Cho Y, Hirochika R, Shibuya A, The role of DNAM-1 and CD155 in tumor immunity and escape, International Symposium on Immune Regulation, 2015 年 10 月 30 日、大洗パークホテル、大洗町
- (3) Iguchi-Manaka A, Kojima H, Cho Y, Shibuya A, Shibuya K, Increased soluble CD155 in the serum of cancer patients, 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8-10 日、名古屋国際会議場、名古屋市
- (4) 井口 研子、渋谷 彰、渋谷 和子、癌患者血清における可溶型 CD155 の上昇、第 7 回血液疾患免疫療法研究会、2015 年 9 月 26 日、東京大学、東京都
- (5) Iguchi A, Shibuya A, Shibuya K, Soluble CD155 is involved in the escape from tumor immunity, 第 3 回筑波大学・東京理科大学生命医科学研究合同リトリート、2015 年 3 月 20 日、東京理科大学、野田市
- (6) Iguchi-Manaka A, Shibuya A, Shibuya K, Soluble CD155 is involved in the escape from tumor immunity, 第 5 回新学術発がんスパイラル国際シンポジウム、2015 年 2 月 26 日、神戸ポートピアホテル、神戸市
- (7) Iguchi A, Shibuya A, Shibuya K,

- Soluble CD155 is involved in the escape from tumor immunity, 2014 日本免疫学会総会・学術集会、2014年12月10-12日、国立京都国際会館、京都市
- (8) Iguchi A, Kojima H, Yoshikawa H, Shibuya A, Shibuya K, Involvement of soluble CD155 in cancer immune escape, 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25-27日、パシフィコ横浜、横浜市
- (9) 井口研子、渋谷彰、渋谷和子、腫瘍免疫逃避における可溶性 CD155 の役割、第23回乳癌基礎研究会、2014年7月26-27日、筑波山ホテル青木屋、つくば市
- (10) 井口研子、清松裕子、池田達彦、坂東裕子、渋谷彰、渋谷和子、原尚人、腫瘍免疫逃避機構における可溶性 CD155 の役割、第114回日本外科学会定期学術集会、2014年4月3-5日、国立京都国際会館、京都市

〔産業財産権〕

取得状況（計1件）

名称：可溶性 CD155 タンパク質を用いた癌の検出方法

発明者：渋谷彰、渋谷和子、井口研子

権利者：国立大学法人 筑波大学

種類：特許

番号：特許第 5850508 号

取得年月日：2015年12月11日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

井口 研子 (IGUCHI, AKIKO)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50575644

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし