

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08650

研究課題名(和文) HLA-Fによる新規腫瘍病理診断法の開発

研究課題名(英文) The development of new pathologic diagnosis system using HLA-F expression on tumor

研究代表者

王寺 典子(下嶋典子)(Ouji-Sageshima, Noriko)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30398432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：HLAクラスI分子の一つであるHLA-Fを、悪性度の高い腫瘍のマーカーとして利用する新規腫瘍病理診断法の開発をめざして本研究を行った。病理診断において広く使用されるホルマリン標本でHLA-Fの発現解析を行うため、解析方法を最適化した。大腸癌のホルマリン標本で検証したところ、HLA-Fは悪性度の高い低分化癌に100%発現し、このうち75%に高発現、中～高分化癌でも約26%にHLA-Fが高発現していた。また悪性度の異なる大腸癌細胞株を用いたmRNA解析においても、低分化癌細胞株において、HLA-FのmRNAが高くなる傾向が得られた。今後、症例数をふやし本法の有用性についてさらに検証する。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the HLA-F expression on tumor tissues to develop the new method for the tumor diagnosis using HLA-F. HLA-F is one of HLA class I molecules, but it has low polymorphism and has restricted expression pattern. The staining method of HLA-F was optimized for the formalin fixed-paraffin embedded tumor tissues. HLA-F expression was detected all poorly-differentiated colon cancer, which we have tested. Especially, the strong HLA-F expression was detected on 75% of poorly-differentiated colon cancer and 26% of moderately- or well-differentiated colon cancer. On the analysis of HLA-F mRNA on tumor cell lines, HLA-F mRNA was upregulated following with tumor malignancy. These results indicated that HLA-F expression on tumor was associated with tumor malignancy. However we need more investigation to show clearly the association between HLA-F and tumor progression and to show utility of new system for tumor diagnosis using HLA-F.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：免疫染色 腫瘍 診断 HLA-F

### 1. 研究開始当初の背景

HLA-F は、1989 年に共同研究者である Geraghty らによって発見された遺伝子であり (J Exp Med., 1989) HLA 遺伝子でありながら、多型性に非常に乏しく、非古典的 HLA クラス I 遺伝子に分類される。

HLA-F 特異的なモノクローナル抗体の作製には、世界で我々を含む 3 グループのみが成功しているが、このうち 2 グループ (Wainwright et al., J Immunol., 2000, Lepin et al., Eur J Immunol., 2000) は細胞質に発現する HLA-F のみを検出する抗体であった。いっぽうで、我々は細胞質および細胞表面に発現する HLA-F に特異的に反応するモノクローナル抗体の作製に成功した (Ishitani A et al., J Immunol, 2003)。その抗体を用いることで、我々は HLA-F が定常状態の免疫担当細胞に発現しないこと、活性化免疫担当細胞には発現すること (Ishitani A et al., Eur J Immunol, 2010)、EB virus transformed-B 細胞には発現すること (J Immunol., 2003) HLA-F が通常の HLA クラス I 分子とは異なり、多様な発現様式で発現すること (J Immunol., 2010) などを明らかにすることができた。また、HLA-F の機能として、Geraghty らは、クロスプレゼンテーションに関与すること (J Immunol., 2013) Killer Immunoglobulin-like Receptor (KIR) のリガンドとなりうること (J Immunol., 2013) を明らかにしている。

先述した抗 HLA-F モノクローナル抗体は、現時点で国内外を含め全 6 種存在し (いずれも Geraghty らによって開発され、非売品) 各抗体に認識される HLA-F の構造が、抗体ごとに異なっていることを確認している (未発表)。さらに我々の研究から、HLA-F は 2 マイクログロブリンあるいは HLA-I OC (図 1) と会合し、細胞表面あるいは細胞質など、多様な発現様式をとることが明らかになっている (図 1)。加えて、我々の予備実験から発現様式の異なる HLA-F は機能も異なることが強く示唆されている。

腫瘍細胞における HLA-F の発現については、すでに国内外において報告されているが (Ishigami S et al., J Surg Res. 2013; Zhang JG et al., Hum Immunol. 2013; Zhang X et al., Int J Cancer. 2013) いずれも市販の抗 HLA-F ポリクローナル抗体を用いた検出に限られ、HLA-F の発現が腫瘍悪性度あるいは予後と関連するとの見解を示している。HLA-F と腫瘍悪性度との関連性を調べるには、HLA-F の多様な発現様式と、腫瘍悪性度の関連性を精査すべきであるが、市販されていない抗 HLA-F モノクローナル抗体を使用できるのは、現時点で、応募者らのみであり、特に Geraghty らのグループ内でこの抗 HLA-F モノクローナル抗体の組織染色における特性を熟知しているのは応募者らのみである。すなわち、この抗体を使用した HLA-F の新規腫瘍病理診断法の開発を目指す本研究は、国

内・国外のいずれにおいても行われておらず、応募者のみが行えるものと確信し、本研究計画の申請に至った。

### 2. 研究の目的

非古典的 HLA クラス I 分子の一つである HLA-F は、活性化された細胞に強く発現し、クロスプレゼンテーションに関与する。また多様な発現様式をとることが明らかになっているが、この発現様式が HLA-F の機能にどのように関与するのかについては明らかになっていない。

一方で、近年、HLA-F が悪性腫瘍に発現すると報告されたが、腫瘍細胞における HLA-F の発現様式に関する解析はなく、腫瘍に発現する HLA-F の機能については示されていない。

そこで本研究において、

悪性腫瘍および腫瘍関連マクロファージ (tumor associated macrophage, TAM) における HLA-F の発現様式を明らかにし、これらの発現と腫瘍悪性度・予後の関連性を解析する。

CRISPR/Cas システムを用いて HLA-F ノックアウト細胞株 (マクロファージ、腺癌細胞) を樹立し、HLA-F の腫瘍細胞に対する免疫応答および腫瘍増殖能に与える影響を解析する。

上記 2 点の解析から、HLA-F による本法の有用性を検証し、新規な腫瘍病理診断法を開発する。

### 3. 研究の方法

これまでの新鮮凍結標本を用いた研究で、悪性度が高くなるにつれて HLA-F の発現が増強することが強く予想されるが、14 種の腫瘍 74 例の結果であり、統計学的な解析を行うには症例数が少ない。症例数をふやし、統計解析を行うために、ホルマリン標本を用いた HLA-F の染色方法を確立し、解析を行う。

また、HLA-F の多様な発現様式が、腫瘍分化度によっても異なる可能性もあるため、所有する全ての抗 HLA-F 抗体を用いてホルマリン標本の解析を行う。

#### 1) ホルマリン標本を使用した HLA-F 発現解析 (ホルマリン標本)

- 奈良県立医科大学医の倫理審査委員会の承認を得て本学で摘出手術を施行された大腸癌症例 31 例 (低分化癌 12 例、中・高分化癌 19 例) の病理組織標本を用いて、解析を行った。
- ホルマリン標本を用いた解析を行う。統計学的な解析を行うため、多数の症例数を解析する。(100 例程度) (比較的症例数が多く、予備実験の成績から低分化度での HLA-F 発現増強が強くみられている胃癌、大腸癌などの腺癌を中心に解析を始める。)

- ホルマリン標本の HLA-F 解析方法の確立

2) HLA-F の多様な発現様式と腫瘍悪性度の関連性を明らかにする。

- 6種の抗 HLA-F 抗体を使用して腫瘍組織標本(ホルマリン標本)の解析を行う。
- 各抗体で染色される HLA-F と腫瘍悪性度との関連を検討する。

3) HLA-F ノックアウト腺癌細胞株を樹立し、HLA-F の発現強度の違いによる増殖能・分化能の違いを精査する。

- HLA-F 陽性腫瘍細胞株をスクリーニングし、HLA-F の発現解析を行う。
- HLA-F 陽性細胞株から HLA-F ノックアウト腺癌細胞株を樹立し HLA-F の発現の有無が腫瘍細胞の増悪化に寄与するのかを検討する。

以上をもって、HLA-F による本法の有用性を検証し、新規腫瘍病理診断法を開発する。

#### 4. 研究成果

##### 研究の主な成果

1)ホルマリン標本を使用した HLA-F 発現解析(ホルマリン標本):

- ホルマリン標本における HLA-F 染色法の確立

HLA-F は正常組織において胎盤トロポブラストに発現することがあきらかになっているので(Ishitani A et al., *J Immunol*, 2003)、胎盤のホルマリン標本を用いて、ホルマリン標本における HLA-F 染色法を検討した。その結果、申請者が所有する6種の抗 HLA-F モノクローナル抗体のうち、ホルマリン標本の染色条件を最適化できたのは5種あった。

これまでの解析で、HLA-F が多様な発現様式をとることが明らかになっている(*J Immunol*, 2010)。しかし、申請者が所有する6種の抗 HLA-F 抗体のホルマリン標本における染色法を最適化した結果、使用可能な5種の抗 HLA-F 抗体の反応性に違いは見られなかったため、最も特異性の高い抗体を、腫瘍標本の解析に使用することとした。

- 腫瘍組織ホルマリン標本における HLA-F 発現解析

比較的症例数が多く、腫瘍悪性度(低分化、中分化、高分化)を判定しやすい大腸癌のホルマリン標本(大腸癌症例31例(低分化癌12例、中・高分化癌19例))を使用して解析を行った。

その結果、HLA-F は低分化癌12例中12例に陽性、このうち75%は中程度以上の陽性であった(図1)。中・高分化癌19例においては15例が陽性、4例が陰性/弱陽性であった(図)。染色強度を4段階に分け、

統計解析(t-test)を行ったところ、有意に低分化癌において HLA-F の発現が高いことが示された(図2)。

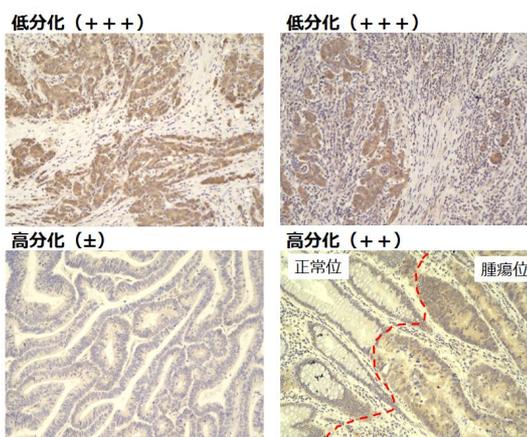


図1 大腸癌における HLA-F の発現

| HLA-F発現強度 | 標本数 | 〜± | +  | ++ | +++ | 中央値 | 平均   |
|-----------|-----|----|----|----|-----|-----|------|
| 中〜高分化     | 19  | 4  | 10 | 5  |     | +   | 1.05 |
| 低分化       | 12  |    | 3  | 6  | 3   | ++  | 2    |

(t-test; p=0.0012)

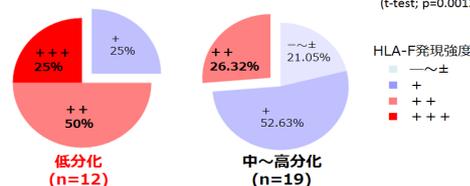


図2 大腸癌における HLA-F の発現

2) HLA-F の多様な発現様式と腫瘍悪性度の関連を明らかにする。

当初、申請者が所有する6種の抗 HLA-F 抗体を用いて、腫瘍に発現する HLA-F を解析する予定だったが、6種の抗体のうち、5種しかホルマリン標本染色に最適化できず、また最適化できた5種の抗体の反応性が同じであった。そのため、6種の抗体の反応性の違いを利用して腫瘍細胞上の HLA-F の発現様式を検討し、腫瘍悪性度との関連を明らかにすることが不可能となった。しかし、本研究成果は、HLA-F の発現様式の違いがホルマリン固定の際に影響を受ける部位にあることを示唆しているものであり、HLA-F の発現様式の違いと機能の関連を明らかにする上で、重要な結果である。

3) HLA-F ノックアウト腺癌細胞株を樹立し、HLA-F の発現強度の違いによる増殖能・分化能の違いを精査する。

HLA-F ノックアウト腺癌細胞株の樹立にあたり、初めに、HLA-F を強発現する細胞株が必要であるため、HLA-F 陽性の大腸癌細胞株を検索した。フローサイトメトリー、RT-PCR を用いて、低分化大腸癌細胞株: Colo201・Colo205・WiDr、中分化大腸癌細胞株: DLD-1、高分化大腸癌細胞株: HT-29・Caco-2・LoVo の計7株について検討したところ、低分化癌細胞株ほど mRNA 発現が高い傾向が得られた

(図3)。しかし、フローサイトメトリーでは、いずれの細胞株の細胞表面にも HLA-F の発現を検出することができなかった。従って、HLA-F ノックアウト腺癌細胞株の樹立は行っていない。腫瘍細胞株において HLA-F の mRNA が検出されているため、腫瘍細胞株における HLA-F 分子の発現および局在を検討するとともに、HLA-F 強制発現腫瘍細胞株を用いて HLA-F の発現強度の違いによる増殖能・分化能の違いを検討していく予定である。

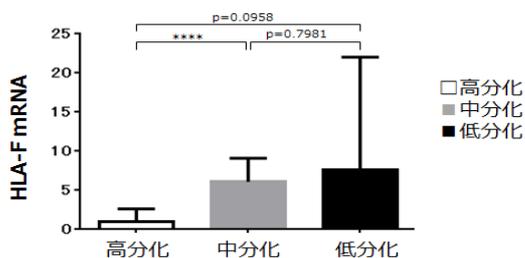


図3 大腸癌細胞株における HLA-F の発現

### 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

HLA-F が腫瘍組織・腫瘍患者血漿に発現し、予後と関連するという報告はなされているが (Martínez-Canales S, et al., PLoS One, 2017, Harada A, et al., Pathol Int., 2015, Ishigami S, et al., Anticancer Res. 2015, Xu Y, et al., Oncol Lett. 2015, Ishigami S, et al., J Surg Res. 2013, Zhang JG, et al., Hum Immunol. 2013, Zhang X, et al., Int J Cancer. 2013, Lin A, et al., Lung Cancer. 2011, Noguchi K, et al., Anticancer Res. 2004), いずれも腫瘍における HLA-F の発現と予後が関連しているという報告であり、HLA-F が腫瘍病理診断に有用な分子であることを示すものではない。

本研究成果は、HLA-F が悪性度の高い腫瘍に 100%発現することを示し、HLA-F が新規の悪性腫瘍診断法に有用であることを示唆しているが、このような結果を得ている研究は国内外において現時点でみられない。

しかし、HLA-F が新規の悪性腫瘍病理診断法に有用な標的分子であることを明らかにするには、解析した検体数が少なく、この点において、インパクトが少ないと考える。

### 今後の展望

HLA-F が新規の悪性腫瘍病理診断法に有用な標的分子であることを示すには、解析症例数を低分化癌、中・高分化癌をそれぞれ 100 例程度解析する必要があると考えており、今後も継続して解析を行う。

本研究成果から、HLA-F は悪性度の高い腫瘍に、より強く発現することが示唆された。今後、詳細な解析を必要とするが、以上の結果から、HLA-F は新規の悪性腫瘍病理診断に

おける標的分子となるだけでなく、悪性腫瘍に対する免疫療法などの標的分子にもなり得ると考えており、HLA-F 分子の腫瘍病理診断、免疫療法における有用性を検討していく予定である。

### 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 3 件)

1. Matsumura Y, Kitabatake M, Ouji-Sageshima N, Yasui S, Mochida N, Nakano R, Kasahara K, Tomoda K, Yano H, Kayano SI, Ito T. Persimmon-derived tannin has bacteriostatic and anti-inflammatory activity in a murine model of Mycobacterium avium complex (MAC) disease. PLoS One. 2017 Aug 21;12(8):e0183489.doi:10.1371/journal.pone.0183489. eCollection 2017.
2. Ouji-Sageshima N, Geraghty DE, Ishitani A, Hatake K, Ito T. Establishment of optimized ELISA system specific for HLA-G in body fluids. HLA. 2016Dec;88(6):293-299. doi: 10.1111/tan.12919.
3. Ouji-Sageshima N, Yuui K, Nakanishi M, Takeda N, Odawara Y, Yamashita M, Iwayama H, Awai K, Hashimoto H, Geraghty DE, Ishitani A, Hatake K, Ito T. sHLA-G and sHLA-I levels in follicular fluid are not associated with successful implantation. J Reprod Immunol. 2016 Feb;113:16-21. doi:10.1016/j.jri.2015.10.001.

[学会発表](計 7 件)

1. Ouji-Sageshima Noriko, Ishitani Akiko, Imakita Natsuko, Sonobe Shota, Kitabatake Masahiro, Daniel E Geraghty, Ito Toshihiro, The critical role of HLA class Ib proteins, HLA-E and HLA-F, expressed on tumor cells, The 46th Japanese Society for Immunology, 2017
2. 王寺-下嶋 典子, 石谷 昭子, Daniel E Geraghty, 伊藤 利洋, 腫瘍細胞株における HLA-E、-F、-G 分子の発現、第 26 回日本組織適合性学会大会、2017
3. Noriko OUJI-SAGESHIMA, Akiko ISHITANI, Daniel E Geraghty, Toshihiro ITO, Does HLA-G in plasma from pregnant woman inhibit the rejection of fetus? The 45th Japanese Society for Immunology, 2016
4. 下嶋典子, Daniel E Geraghty, 石谷昭子, 伊藤利洋, 改良 ELISA 法による体外受精卵培養上清および妊婦血漿等体液中の HLA-G の測定とその意義、第 25 回日本組織適合性学会大会、2016

5. Noriko OUJI-SAGESHIMA, Akiko ISHITANI, Daniel E Geraghty, Toshihiro ITO, Is HLA-G present in body fluids including maternal plasma and supernatant of in vitro fertilization? 第 31 回日本生殖免疫学会総会・学術集会、2016
6. 下嶋典子、貝森淳哉、市丸直嗣、吉澤淳、一戸辰夫、森井武志、長谷川淳、米田龍生、高原史郎、上本伸二、吉田克法、羽竹勝彦、伊藤利洋、Daniel E Geraghty、石谷昭子、移植患者末梢血における HLA-F、HLA-G の発現解析 移植片生着との関連性について、第 24 回日本組織適合性学会大会、2015
7. Noriko O uji-Sageshima, Daniel E Geraghty, Akiko Ishitani, Toshihiro Ito, The relation between the expression of both HLA-F and HLA-G on PBMC from pretransplant and posttransplant patients and the graft survival. The 44th Japanese Society for Immunology, 2015

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

王寺(下嶋) 典子(Ouji-Sageshima Noriko)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30398432

### (2) 研究分担者

伊藤 利洋(Ito Toshihiro)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00595712

石谷 昭子(Ishitani Akiko)  
奈良県立医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号：40112544

### (3) 連携研究者

大林 千穂(Obayashi Chiho)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90223940

中井 登紀子(Nakai Tokiko)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00619538