

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14629

研究課題名(和文) がん免疫逃避関連分子を標的とした新規がん治療法の開発

研究課題名(英文) Increased soluble CD155 in the serum of cancer patients

研究代表者

渋谷 和子 (Shibuya, Kazuko)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00302406

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)：私達は、CD155にはバリエーションの可溶性CD155 (sCD155)が存在しており、これがヒトの腫瘍から分泌されていることを観察した。さらに私達は、がん患者血清中のsCD155の値は健常人に比較して有意に高値であること、初期胃がん患者に対して進行性胃がん患者では血清中のsCD155が有意に上昇していることを明らかにした。マウスモデルでは、血清中のsCD155値と腫瘍サイズに相関を認めた。これらのことからがん患者血清中のsCD155値ががんの病態を反映するマーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：DNAM-1 plays an important role in the recognition of tumor cells and their lysis by CTL and NK cells. Although the DNAM-1 ligand CD155 is ubiquitously expressed in various tissues, many tumors significantly upregulate the expression of CD155. We demonstrated that the interaction of DNAM-1 on CTL and NK cells and CD155 on tumors was involved in mouse tumor immunity. However, unlike those in mice, human tissues also express soluble isoforms of CD155 (sCD155) that lack the transmembrane region. Here, we show that sCD155 levels were significantly higher in the sera of patients with cancers than in sera from healthy donors. In addition, the sCD155 levels were significantly higher in patients with advanced stage disease than in patients in those with early stage disease. Moreover, the sCD155 levels were significantly decreased after surgical resection of cancers. Thus, sCD155 level in serum may be potentially useful as a biomarker for cancer development and progression.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫系受容体 腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

これまでに、私たちはマウスモデルを用いて免疫細胞上に発現する活性化受容体 DNAM-1 が、腫瘍に高発現する膜型 CD155 に結合して腫瘍を排除することを明らかにした。一方、最近私たちは、ヒトにはマウスに存在しないバリエーションの可溶性 CD155 (sCD155) が存在しており、これがヒトの腫瘍から分泌されていることを観察した。しかし、sCD155 ががんの病態においてどのように機能しているかは不明であった。

2. 研究の目的

可溶性 CD155 (sCD155) が腫瘍から産生されることより、sCD155 ががんの病態の指標となる可能性が考えられた。そこで、私達はがん患者血清中の sCD155 値を測定し、この値が病態を反映しているかどうかを検証すると同時に、マウスモデルを用いて血清中 sCD155 と腫瘍サイズの相関を検討することとした。

3. 研究の方法

(1) がん患者血清中の sCD155 値の測定

血清中 sCD155 を測定するために、抗ヒト CD155 モノクローナル抗体とポリクローナル抗体を作製し、sCD155 検出用 ELSA 系を樹立した。

がん患者 262 名と健常人 60 名の血清中 sCD155 を上記 ELISA 系を用いて測定した。また、胃がんに関しては、ステージと血清中 sCD155 値の相関を検討した。また、同一患者の術前術後で sCD155 値を比較検討した。

(2) 担がんマウスの血清中 sCD155 値と腫瘍サイズの検討

マウスの CD155 の細胞外領域に FLAG をつないで人工的にマウス sCD155 を作製し、これを分泌する腫瘍株を樹立した。sCD155 産生腫瘍株をマウスの皮内に移入し、血清中 sCD155 値と腫瘍サイズの相関を検討した。

(3) ヒト化マウスを用いた血清中ヒト sCD155 値とヒト腫瘍サイズの検討

ヒト腫瘍細胞株の培養上清中の sCD155 を測定し、ヒト腫瘍株 HeLa 細胞が sCD155 を分泌していることを確認した。超免疫不全マウス NOG マウスの皮内に HeLa 細胞を移入し、

血清中 sCD155 値と腫瘍サイズの相関を検討した。

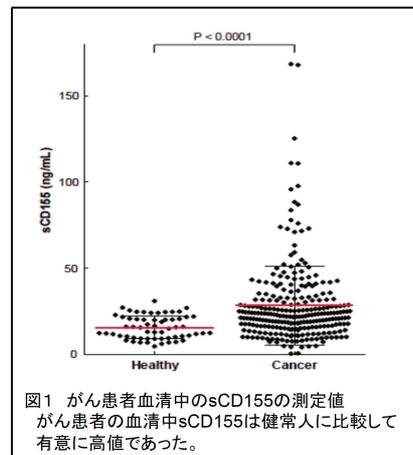
4. 研究成果

(1) がん患者血清中の sCD155 値の測定

これまでに sCD155 が腫瘍から分泌されることを観察していたことから、私達はがん患者の血清中に sCD155 が検出されるとの仮説をたて、これを検証した。

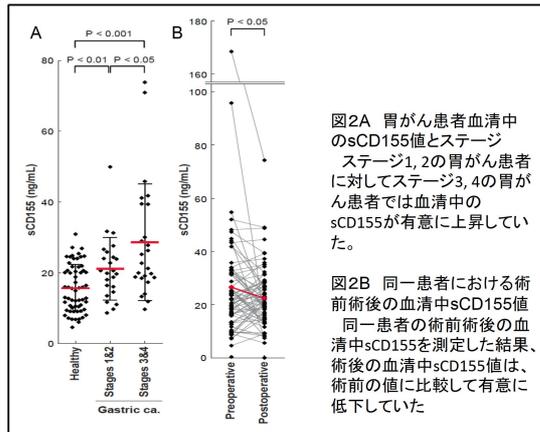
最初に、sCD155 の検出用 ELISA の系を立ち上げるため、ヒト CD155 に対するモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を作製した。モノクローナル抗体はマウスにヒト CD155 タンパクを免疫し、抗ヒト CD155 抗体産生細胞と骨髓腫瘍細胞を細胞融合することによって得た。ポリクローナル抗体はウサギにヒト CD155 タンパクを免疫し、その血清を採取することにより得た。

次にがん患者 262 名と健常人 60 名の血清中 sCD155 の値を比較検討した。その結果、がん患者血清中の sCD155 の値は健常人に比較して有意に高値であることが明らかとなった ($p < 0.0001$) (図 1)。このことから、血清中 sCD155 が腫瘍マーカーとなる可能性が示唆された。



次に、ステージ 1, 2 の初期胃がん患者とステージ 3, 4 の進行性胃がん患者の血清中 sCD155 を比較検討し、血清中 sCD155 値とステージの相関を検討した。その結果、ステージ 1, 2 の初期胃がん患者に対してステージ 3, 4 の進行性胃がん患者では血清中の sCD155 が有意に上昇していることを認めた ($p < 0.001$) (図 2 A)。このことから、血清中 sCD155 値ががんの病態を反映する可能性が考えられた。

さらに、同一患者の術前術後の血清中 sCD155 を測定した結果、術後の血清中 sCD155 値は、術前の値に比較して有意に低下していた($p < 0.05$) (図 2B)。この結果より、血清中 sCD155 値が腫瘍量を反映していることが示唆された。



(2) 担がんマウスの血清中 sCD155 値と腫瘍サイズの検討

がん患者血清中の sCD155 値測定結果より血清中 sCD155 値が腫瘍量を反映している可能性が示唆されたため、次に私達はマウスモデルを用いてこれを検証することとした。まず、私達はマウス CD155 の細胞外領域に FLAG を付加することで人工的にマウス sCD155 を作製した。さらに、マウス sCD155 を産生する腫瘍株を樹立し、同系マウスに移入して、血清中のマウス sCD155 値と腫瘍径を測定した。その結果、血清中のマウス sCD155 値と腫瘍径に正の相関を認めた。このことから、マウス腫瘍モデルにおいて、担がんマウスの血清中 sCD155 が腫瘍の大きさを示す指標となることが示された。

(3) ヒト化マウスを用いた血清中ヒト sCD155 値とヒト腫瘍サイズの検討

上述のように、マウスモデルでは血清中マウス sCD155 とマウス腫瘍サイズに相関を認めたが、種が異なることと、使用した腫瘍株が sCD155 強制発現系であったことより、次にヒト sCD155 を内因性に発現し分泌しているヒト腫瘍株 HeLa 細胞を超免疫不全マウス NOG マウスの皮内に移入し、血清中のヒト sCD155 値とヒト腫瘍径を測定した。その結果、血清中のヒト sCD155 値と腫瘍径に正の相関を認めた。このことから、ヒトにおいても、血清中 sCD155 が腫瘍量を示す指標とな

ることが強く示唆された。

(4) まとめ

以上の結果より、がん患者血清中の sCD155 値ががんの病態を反映するマーカーとなる可能性が示唆された。

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 5 件)

1. Sato K, Honda SI, Shibuya A, Shibuya K. Improved protocol for the isolation of naïve follicular dendritic cells. *Mol Immunol*, 78:140–145, 2016 査読有 (DOI: 10.1016/j.molimm.2016.09.011)
2. Haraguchi N, Kikuchi N, Morishima Y, Matsuyama M, Sakurai H, Shibuya A, Shibuya K, Taniguchi M, Ishii Y. Activation of murine invariant NKT cells promotes susceptibility to candidiasis by IL-10-induced modulation of phagocyte antifungal activity. *Eur J Immunol*, 46(7):1691-1703, 2016 査読有 (DOI: 10.1002/eji.201545987)
3. Kanaya M, Shibuya K, Hirochika R, Kanemoto M, Ohashi K, Okada M, Wagatsuma Y, Cho Y, Kojima H, Teshima T, Imamura M, Sakamaki H, Shibuya A. Soluble DNAM-1, as a predictive biomarker for acute graft-versus-host disease. *PloS One*, 11(6): e0154173, 2016 査読有 (DOI: 10.1371/journal.pone)
4. Honda S, Sato K, Totsuka N, Fujiyama S, Fujimoto M, Miyake K, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Marginal zone B cells exacerbate endotoxic shock via interleukin-6 secretion induced by Fcα/μR-coupled TLR4 signalling. *Nat Commun*, 7:11498, 2016 査読有 (DOI: 10.1038/ncomms11498)
5. 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*, 11(4), 2016 査読有

(DOI: 10.1371/journal.pone.0152982)

〔学会発表〕(計7件)

1. Vo AV, Takenaka E, Yamashita-Kanemaru Y, Shibuya A, Shibuya K. Involvement of DNAM-1 (CD226) expressed on small peritoneal macrophages in antigen presentation. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 2016.12.5
2. Okumura G, Abe F, Ito M, Shibuya A, Shibuya K. Development of molecular targeted therapy for human acute GVHD in humanized mice. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 2016.12.5
3. 渋谷 和子、阿部 史枝、伊藤 守、渋谷 彰 ヒト化マウスを用いた抗ヒトDNAM-1抗体によるヒト急性GVHDの治療法開発 第8回血液疾患免疫療法学会学術集会 北海道大学医学部学友会館(北海道札幌市) 2016.9.3
4. 會田 雄一、山内 一由、上妻 行則、渋谷 和子、上杉 憲子、中川 嘉、吉田 文代、山下 年晴、小池 朗、二宮 治彦 筑波大学における臨地実習前OSCEの開発に向けた取組 第11回日本臨床検査学教育学会学術大会 神戸常盤大学(兵庫県神戸市) 2016.9.1
5. Nakahashi-Oda C, Udayanga K. G. S, Nakamura Y, Nakazawa Y, Totsuka N, Miki H, Iino S, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control the abundance of regulatory T cells at barrier surfaces. International Congress of Immunology 2016, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Australia, 2016.8.25
6. Yamashita-Kanemaru Y, Bernhardt G, Shibuya A, Shibuya K. CD155 (PVR/Necl5) mediates a costimulatory signal in CD4+ T cells and regulates allergic inflammation. International Congress of Immunology 2016, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Australia, 2016.8.25
7. 岸 美紀子、井内 康輝、坂井 建雄、高桑 雄一、堤 寛、柳澤 輝行、鯉淵 典之、渋谷 和子、中島 昭、熊ノ郷 淳

“今後の基礎医学教育のあり方”に関するアンケート調査 第48回日本医学教育学会大会 大阪医科大学(大阪府高槻市) 2016.7.30

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体及びその使用

発明者: 渋谷 彰、渋谷 和子、阿部 史枝、広近 玲、奥村 元紀

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2016-84170

出願年月日: 平成28年4月20日

国内外の別: 国内

○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: 同上

種類: 特許

番号: 特許第5995117号

出願年月日: 平成22年1月28日

取得年月日: 平成28年9月2日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://immuno-tsukuba.com/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渋谷 和子 (SHIBUYA, KAZUKO)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号: 00302406

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし