

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10533

研究課題名(和文) 乳癌におけるTIGITと可溶性CD155の臨床病理学的意義の解明

研究課題名(英文) Clinicopathological significance of TIGIT and soluble CD155 in breast cancer

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：TIGITとDNAM-1、CD155の発現を解析するため、TNBCとHER2陽性乳癌の免疫染色を行い、乳癌細胞と正常乳管上皮細胞におけるCD155、PD-L1と、TILの各分画、TIGIT、DNAM-1の発現を解析した。TNBC、HER2陽性乳癌とも腫瘍部では正常部に比べ多くのTILを認め、CD8、CD68、Foxp3の発現を多く認めた。また乳癌細胞におけるCD155の高発現と、TILにおけるTIGITの発現を認めた。TILにおけるDNAM-1の発現は確認できず、引き続き解析を継続する。さらに可溶性CD155ノックインマウスの樹立に成功し、現在発癌実験にて各分子の相互作用の解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TIGITは免疫チェックポイント分子として新しく見出された分子で、T細胞やNK細胞に発現する抑制性受容体であり、リガンドのCD155を同じくT細胞やNK細胞に発現する活性型受容体DNAM-1と共有する。CD155は膜型のほかに可溶性のアイソフォームを持ち、膜型、可溶性ともTIGIT、DNAM-1と結合することから、可溶性CD155が膜型CD155とTIGITあるいはDNAM-1との相互作用を阻害する可能性などが考えられる。癌組織におけるこれらの分子の発現局在を明らかにするこの研究は、これらの分子の複雑な相互作用を解明する一助になると言える。

研究成果の概要(英文)：To analyze the expression of the novel immune checkpoint molecule TIGIT, the paired receptor DNAM-1 and the ligand CD155, immunostaining of TNBC and HER2 positive breast cancer tissue was performed for CD155 / PD-L1 in breast cancer cells and normal ductal epithelial cells, in addition, CD4 / CD8 / CD68 / Foxp3 / TIGIT in TIL. Both TNBC and HER2 positive breast cancer showed more TIL in the tumor part than in the normal part, and more expression of CD8, CD68, and Foxp3. Moreover, the expression of CD155 in breast cancer cells and the expression of TIGIT in TIL were observed. Expression of DNAM-1 in TIL has not been confirmed, and analysis will continue. Furthermore, we succeeded in establishing a soluble CD155 knock-in mouse, and are currently analyzing the interaction of each molecule in carcinogenesis.

研究分野：外科学、腫瘍免疫学

キーワード：TIGIT DNAM-1 CD155 免疫チェックポイント分子 TIL 乳癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 免疫チェックポイント分子 TIGIT とペア型受容体 DNAM-1

近年、がん免疫療法の進歩は目覚ましく、2013年には Science 誌の Breakthrough of the year に選ばれた。特に PD-1/PD-L1 や CTLA-4 などを経路阻害剤とした免疫チェックポイント阻害剤は、がん治療の分野において現在最も注目されており、2014年に発売された抗 PD-1 抗体(Nivolumab)を筆頭に、更なる適応拡大や新規薬剤の開発が進められている。女性のがんで罹患数1位である乳癌については、国内ではトリプルネガティブ乳癌を対象に抗 PD-1 抗体(Pembrolizumab)や抗 PD-L1 抗体(Atezolizumab)の第3相試験などが行われている。

免疫チェックポイント分子のひとつとして、2009年に新しく見出された TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains)が知られている。TIGIT は T 細胞や NK 細胞に発現する抑制性受容体であり、そのリガンドは癌細胞に発現する CD155 で、TIGIT と CD155 の結合により抗腫瘍免疫応答の抑制が誘導される。CD155 は他に活性化型受容体 DNAM-1 (CD226)のリガンドでもある。DNAM-1 は応募者の研究グループが同定した分子で、T 細胞や NK 細胞に発現し、癌細胞に発現する CD155 と結合し細胞傷害活性を誘導する(Shibuya et al, *Immunity* 1996, Tahara et al, *Int.Immunol.* 2004, *Blood* 2006)。さらに応募者は DNAM-1 遺伝子欠損マウスを作製して発癌実験を行い、DNAM-1 は癌細胞に発現する CD155 を標的として免疫監視を行い、癌の発症を抑制することを明らかにした(Iguchi et al, *J.Exp.Med.* 2008)。このように TIGIT と DNAM-1 は CD155 を共有し、それぞれ抑制性シグナルと活性化シグナルの相反するシグナルを伝えるペア型受容体であり、TIGIT を阻害することにより活性化シグナルが増強され、抗腫瘍免疫応答を活性化できることが明らかとなっている(Johnston et al, *Cancer Cell* 2014)。

(2) 癌における CD155 の発現

応募者らや世界の多くの研究グループは、ヒトの胃癌・大腸癌・卵巣癌・悪性黒色腫・白血病細胞など多くの癌で膜型 CD155 が高発現することを報告している。ヒト CD155 は膜型のほかにスプライシングバリエーションの可溶型が存在するが(Koike et al, *EMBO J.* 1990)、最近応募者は、乳癌・消化器癌組織における膜型と可溶型の CD155 mRNA の発現が正常組織と比較して上昇し、また乳癌・消化器癌・肺癌・婦人科癌などの癌患者において血清中の可溶型 CD155 濃度が高値となることを明らかにした(Iguchi et al, *PLOS One* 2016)。また応募者は、乳癌患者において血清中の可溶型 CD155 濃度が病期と相関し、ER 陰性 PgR 陰性または Ki-67 高値が可溶型 CD155 濃度高値の因子となることを見出した(Iguchi et al, *Breast Cancer* 2020)。さらに The Cancer Genome Atlas (TCGA)の公開データより各種癌組織における膜型と可溶型の CD155 mRNA の発現を解析したところ、膜型と可溶型 CD155 の発現は相関する傾向にあったことから、ER 陰性 PgR 陰性乳癌は膜型・可溶型とも CD155 の発現が高いと推察した。また ER 陰性 PgR 陰性乳癌は腫瘍浸潤リンパ球が多いと報告されており(Mahmoud et al, *J.Clin.Oncol.* 2011)、これらのことから ER 陰性 PgR 陰性乳癌において TIGIT、DNAM-1 と CD155 の相互作用はより顕著に表れると考えられる。

(3) 可溶型 CD155 の DNAM-1、TIGIT に対する作用

近年、肺癌・悪性黒色腫・軟部肉腫・膵臓癌などにおいて CD155 高発現は予後不良であるという報告が出ており、CD155 高発現は TIGIT との結合による抑制性シグナルの誘導を増強させるという考察も見られる。しかし応募者らは可溶型 CD155 の存在しないマウスの腫瘍移植実験において、腫瘍の膜型 CD155 が高発現のほうが生存率は高くなることを証明している (Tahara et al, *Blood* 2006)。マウスと異なりヒトでは可溶型 CD155 が存在するため、ヒトにおいて可溶型 CD155 が抗腫瘍免疫応答に強く関与すると推察した。

可溶型 CD155 の機能を解析するため、応募者は可溶型 CD155 を強制発現させた可溶型 CD155

産生腫瘍細胞を作製し、可溶性 CD155 を産生しない Mock 腫瘍細胞と同時にマウスに移植した。野生型マウスでは、可溶性 CD155 産生細胞を移植したマウスは Mock 細胞を移植したマウスより生存率が低く、また DNAM-1 KO マウスではどちらを移植したマウスも生存率が低かった。この結果から、可溶性 CD155 が DNAM-1 に結合することにより、T 細胞や NK 細胞上の DNAM-1 と癌細胞上の膜型 CD155 の結合が阻害され、活性化シグナルの誘導が阻害されると考えられる。

可溶性 CD155 の TIGIT への作用は未だ不明であるが、予備実験において CD155-Fc 融合タンパクは TIGIT に結合したことから、可溶性 CD155 は TIGIT の機能も阻害する可能性が考えられる。抗腫瘍免疫応答においては、DNAM-1、TIGIT と膜型 CD155、可溶性 CD155 が複雑に相互作用していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では免疫チェックポイント阻害療法の適応候補疾患のひとつである乳癌において、新規免疫チェックポイント分子 TIGIT とペア型受容体 DNAM-1、リガンドの膜型 CD155、可溶性 CD155 の発現と相互作用を解明し、新規免疫チェックポイント阻害療法の開発に繋げる。

3. 研究の方法

(1) 乳癌組織の腫瘍部と非腫瘍部において、癌細胞の CD155 の発現と、腫瘍浸潤リンパ球の各免疫細胞分画と TIGIT、DNAM-1 の発現を、FFPE 組織標本より免疫染色にて解析する。乳癌のサブタイプ TNBC、HER2 について各 10 症例を目標として解析し、臨床病理学的特徴との相関を検討する。

(2) ヒト化モデルの可溶性 CD155 ノックインマウスを樹立して発癌実験を行い、*in vivo* における TIGIT、DNAM-1、膜型 CD155、可溶性 CD155 の相互作用について解析する。

4. 研究成果

(1) 新規免疫チェックポイント分子 TIGIT とペア型受容体 DNAM-1、リガンドの CD155 の発現を解析するため、乳癌のサブタイプのうち腫瘍浸潤リンパ球の浸潤を多く認める TNBC、HER2 サブタイプの FFPE 組織標本を用いて免疫染色を行い、腫瘍部の乳癌細胞と非腫瘍部の正常乳管上皮細胞における CD155、PD-L1 と、浸潤リンパ球における CD4、CD8、CD68、Foxp3、TIGIT、DNAM-1 の発現を解析した。トリプルネガティブサブタイプ、HER2 サブタイプとも腫瘍部では非腫瘍部に比較し多くのリンパ球浸潤を認め、CD8、CD68、Foxp3 の発現を多く認めた。TIGIT、CD155 に関しては、乳癌細胞における CD155 の発現と、浸潤リンパ球における TIGIT の発現を認めた。浸潤リンパ球における DNAM-1 の発現は確認できず、発現していないのか、あるいは免疫染色の問題で染色ができていないのかは解決していない。引き続き解析を継続する。

(2) さらに TIGIT とペア型受容体 DNAM-1、リガンドの膜型 CD155、可溶性 CD155 の *in vivo* における相互作用を解析するため、マウスヒト化モデルを用いる計画とした。ヒトの CD155 は膜型と可溶性のスプライシングバリエーションがあり、膜型と可溶性とも TIGIT と DNAM-1 に結合するため、可溶性 CD155 が膜型 CD155 と TIGIT あるいは DNAM-1 との相互作用を阻害する可能性などが考えられる。しかしマウスの CD155 は膜型のみのため、ヒトとは CD155 と TIGIT あるいは DNAM-1 との相互作用が異なる可能性がある。そこでヒト化モデルとして可溶性 CD155 ノックインマウスの発癌モデルを解析に用いる計画を立てた。可溶性 CD155 ノックインマウスの樹立に成功し、現在発癌実験を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iguchi-Manaka Akiko, Okumura Genki, Ichioka Emika, Kiyomatsu Hiroko, Ikeda Tatsuhiko, Bando Hiroko, Shibuya Akira, Shibuya Kazuko	4. 巻 27
2. 論文標題 High expression of soluble CD155 in estrogen receptor-negative breast cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breast cancer	6. 最初と最後の頁 92-99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12282-019-00999-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okumura Genki, Iguchi-Manaka Akiko, Murata Rikito, Yamashita-Kanemaru Yumi, Shibuya Akira, Shibuya Kazuko	4. 巻 217
2. 論文標題 Tumor-derived soluble CD155 inhibits DNAM-1-mediated antitumor activity of natural killer cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20191290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Okumura G, Iguchi-Manaka A, Murata R, Yamashita-Kanemaru Y, Shibuya A, Shibuya K
2. 発表標題 Tumor-derived soluble CD155 inhibits DNAM-1-mediated antitumor activity of natural killer cells.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥村元紀、村田力斗、井口研子、渋谷彰、渋谷和子
2. 発表標題 腫瘍免疫応答における可溶性CD155の役割
3. 学会等名 第10回血液・疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井口研子、渋谷彰、渋谷和子
2. 発表標題 癌患者血清における可溶性CD155の発現解析
3. 学会等名 第9回血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井口研子、渋谷和子、市岡恵美香、都島由希子、池田達彦、坂東裕子、渋谷彰、原尚人
2. 発表標題 乳癌における可溶性CD155の発現解析
3. 学会等名 第25回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Okumura G, Iguchi-Manaka A, Shibuya A, Shibuya K
2. 発表標題 The role of soluble CD155 in tumor immune response and metastasis.
3. 学会等名 第46回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥村元紀、井口研子、渋谷彰、渋谷和子
2. 発表標題 腫瘍免疫応答とがん転移における可溶性CD155の役割
3. 学会等名 第9回血液・免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥村元紀、井口研子、渋谷彰、渋谷和子
2. 発表標題 腫瘍免疫応答とがん転移における可溶性CD155の役割
3. 学会等名 第5回筑波大学・東京理科大学生命医科学研究所合同リトリート
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----