

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791293
 研究課題名（和文） 悪性黒色腫で特異的に発現する Histatin-1 の機能解析、診断、治療への応用
 研究課題名（英文） The role of Histatin-1 ectopically expressed in human melanoma cells
 研究代表者
 谷口 智恵（YAGUCHI TOMONORI）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：40424163

研究成果の概要（和文）：

Histatin-1(HTN-1)は、正常では唾液腺に発現している抗菌ペプチドであるが、ヒト悪性黒色腫(MM)で異所性に発現していた。HTN-1 は、癌細胞の移動能を亢進させる事で転移に、また、樹状細胞を抑制することで免疫抑制に関与し、患者予後に影響を与える可能性が示された。HTN-1 は腫瘍マーカーとして、及び転移の予防や癌による免疫抑制の解除を目的とした治療法の標的として有望であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

HTN-1, a saliva-specific antimicrobial secretory peptide, was ectopically expressed in human MM and contributed to its metastatic capacity and immunosuppressive activity, suggesting that HTN-1 was an attractive diagnostic marker and a therapeutic target for human MM.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫

1. 研究開始当初の背景

Histatin-1(HTN-1)は、38 塩基のアミノ酸からなる抗菌ペプチドで、人体では、唾液腺のみに特異的に発現しており、生理的には、真菌や細菌に直接結合し、免疫細胞を介さずに殺菌作用を発揮する事で、口腔内の感染防御に働いている。HTN-1 の癌細胞での発現、機能を報告したものはこれまでに全くない。HTN-1 の報告されている機能は、殆どが抗菌作用に関してであるが、最近、口腔内の線維芽細胞に作用し細胞遊走を亢進させるとの報告があった。申請者は予備実験の結果から、HTN-1 はヒト悪性黒色腫(MM)に異所性に発現し、癌細胞の遊走、転移能に関与している可能性、免疫抑制作用を持つ可能性、この機

能が MM の免疫逃避にも関与している可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究では、上記の可能性を検証し、HTN-1 の新たな生理機能、及びヒト MM の悪性形質への関与を解明する事を目的とする。さらに、これら基礎医学的な知見を元に MM の新たな診断・治療法を開発する事を目標とする

3. 研究の方法

(1) 試薬

HTN-1 の合成ペプチドは sigma-aldrich で合

成した。

(2)HTN-1 の定量

ヒト MM パラフィン切片より、RNA を抽出し、定量 PCR を用いて、HTN-1 の発現量を解析した。

(3)遺伝子のノックアウト、強制発現

遺伝子のノックアウトは、invitrogen 社の siRNA (stealth select RNA)の導入、もしくは、レンチウイルスベクターを用いた、shRNA 導入を用いて行った。強制発現は、レンチウイルスベクターを用いて行った。

(4)細胞移動能の測定

細胞移動能は Roche 社の xcelligence システムを用いて測定した。

(5)樹状細胞の作製

ヒト末梢血単核球から Miltenyi 社の MACS ビーズを用いて CD14 陽性細胞を分離した。分離した細胞を GM-CSF と IL-4 の存在下で培養し樹状細胞に分化させた。

(6)動物モデル

MM 細胞株を、ヌードマウスの側腹部に皮下移植し、3-4 週後に樹状細胞を脾臓、腫瘍組織から分離した。転移を解析する場合は、腫瘍細胞に GFP を強制発現させ、3-4 週間後に FACS でリンパ節、肺組織での GFP 陽性細胞数を測定した。

4 . 研究成果

ヒト MM 組織で HTN-1 遺伝子の発現量と患者の予後との相関を解析したところ、HTN-1 高発現群は低発現群に比較して、有意に予後不良であることが分かった。

HTN-1 遺伝子のノックアウト実験、強制発現実験、および合成 HTN-1 ペプチド添加実験では、HTN-1 はヒト MM の細胞移動能を *in vitro* で亢進させた。

ヒト単球由来樹状細胞 (Mo-DC) に HTN-1 を作用させて、HTN-DC を作製すると、炎症性サイトカインの産生低下、免疫抑制性サイトカインの産生亢進を認め、T 細胞に対する活性能が Mo-DC に比較して著しく低下していた。

HTN-1 を強制発現したヒト MM 細胞株をヌードマウスに皮下移植し、3-4 週後に脾臓及び腫瘍浸潤の樹状細胞を解析した所、マウス樹状細胞の機能低下が見られた。また、所属リンパ節及び肺転移している癌細胞数の増加が見られた。一方で、HTN-1 を高発現しているヒト MM 細胞株で shRNA を用いて HTN-1 の発現をノックアウトすると、マウス樹状細胞の機能回復が見られた。

HTN-DC と Mo-DC の発現遺伝子を Gene Chip

を用いて網羅的に解析した結果、両者で発現遺伝子が大きく異なり、IL10 などの HTN-DC で高発現する遺伝子を発見した。

以上より、ヒト MM で異所性に発現している HTN-1 は、転移能、免疫抑制能に関与してい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 12 件)

1. 谷口智恵、河上裕 化学療法・分子標的薬による免疫応答増強 医学のあゆみ 2013; 244: 817-823. (査読なし) <http://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiArticleDetail.aspx?BC=924409&AC=12297>
2. Tsujikawa T, Yaguchi T, Ohmura G, Ohta S, Kobayashi A, Kawamura N, Fujita T, Nakano H, Shimada T, Takahashi T, Nakao R, Yanagisawa A, Hisa Y, Kawakami Y. Autocrine and paracrine loops between cancer cells and macrophages promote lymph node metastasis via CCR4/CCL22 in head and neck squamous cell carcinoma. Int J Cancer. 2013; 132: 2755-2766 (査読あり) 10.1002/ijc.27966
3. 谷口智恵、西尾浩、里見良輔、川村直、小林明日香、河上裕 特集 がん免疫学と免疫療法の新展開 7 . 分子標的薬を用いたがん免疫応答の制御 血液フロンティア 2012; 22: 1229-1238. (査読なし) https://www.iyaku-j.com/iyakuj/system/M2-1/summary_viewer.php?trgid=25341
4. 河上裕、谷口智恵、中村公子、川瀬芳恵、野路しのぶ、大泉梓、南雲春菜、長谷川舞、徐明利、岡本正人、桜井敏晴、藤田知信 特集 がん免疫学と免疫療法の新展開 1 . がん免疫病態と免疫動態の評価 血液フロンティア 2012; 22: 1183-1190. (査読なし) https://www.iyaku-j.com/iyakuj/system/M2-1/summary_viewer.php?trgid=25335
5. Yaguchi T, Goto Y, Kido K, Mochimaru H, Sakurai T, Tsukamoto N, Kudo-Saito C, Fujita T, Sumimoto H, Kawakami Y. Immune Suppression and Resistance Mediated by Constitutive Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling in Human Melanoma Cells. J. Immunol 2012; 189: 2110-2117. (査読あり)

10.4049/jimmunol.1102282

6. Shimizu T, Ishikawa T, Iwai S, Ueki A, Sugihara E, Onishi N, Kuninaka S, Miyamoto T, Toyama Y, Ijiri H, Mori H, Matsuzaki Y, Yaguchi T, Nishio H, Kawakami Y, Ikeda Y, Saya H. Fibroblast Growth Factor-2 Is an Important Factor that Maintains Cellular Immaturity and Contributes to Aggressiveness of Osteosarcoma. *Mol Cancer Res* 2012; 10: 454-68. (査読あり) [10.1158/1541-7786.MCR-11-0347](http://www.kahyo.com/item/ON201111-085)
7. 河上裕、小室美紗、小林明日香、梶原-岩田知子、宮崎潤一郎、川村直、谷口智憲。ヒトがん細胞に対する免疫応答機構と免疫制御の可能性。腫瘍内科 2011; 8: 409-416. (査読なし) <http://www.kahyo.com/item/ON201111-085>
8. Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Ueda R, Iwata-Kajihara T, Nishio H, Kawamura N, Kawakami Y. The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies. *Int J Hematol* 2011; 93: 294-300. (査読なし) [10.1007/s12185-011-0799-6](http://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758100687/)
9. 植田良、Li Qian、中村公子、谷口智憲、宮崎潤一郎、川村直、河上裕 特集「ヒト誕生・老化・疾患を運ぶエクソソーム」癌細胞由来エクソソームによる免疫系への作用とその臨床応用。実験医学 2011; 29: 410-414. (査読なし) <https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758100687/>
10. 宮崎潤一郎、川村直、梶原-岩田知子、谷口智憲、河上裕 SEREX 法によるヒト腫瘍抗原の単離と免疫療法への応用。細胞 2011; 43: 88-91. (査読なし) http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/archives/2011/02/20113_2.html
11. 川村直、宮崎潤一郎、梶原-岩田知子、谷口智憲、河上裕 特集：膵癌・胆道癌に対する免疫治療、ワクチン療法の新展開 樹状細胞抑制による抗腫瘍免疫増強。胆と膵 2011; 32: 123-127. (査読なし) http://www.igakutosho.co.jp/magazine/t_s/2011/zt3202.html
12. 川村直、谷口智憲、桜井敏晴、河上裕 癌微小環境における PD-L1/PD-1 による免疫抑制病態とその是正。臨床免疫・アレルギー科 2011; 56: 1-6. (査読なし) <http://www.kahyo.com/item/M201107-561>

〔学会発表〕(計7件)

1. Yaguchi T Altered Wnt/ β -catenin signal in human melanoma induces immunosuppressive and tumor promoting tumor microenvironment 第71回日本癌学会総会 2012年09月19日~2012年09月21日 札幌
2. 谷口智憲 悪性黒色腫に異所性に発現する Histatin-1 は in vivo で細胞運動能と免疫抑制能を亢進させる 第16回日本がん免疫学会 2012年07月26日~2012年07月28日 札幌
3. Yaguchi T Novel mouse models for analysis of in vivo interaction of immune system and human cancer 2011年11月27日~11月29日 第40回日本免疫学会(招待講演)千葉
4. Yaguchi T The Immunosuppressive Role of WNT/beta-catenin signals in melanoma cancer microenvironments 26th Annual Meeting Society for Immunotherapy of Cancer 2011年11月4日~11月6日 North Bethesda, Maryland USA
5. Yaguchi T Analysis of human immune responses using newly developed murine MHC class I and II-deficient NOG mice by human PBMC inoculation 3rd International Workshop on HUMANIZED MICE 2011年10月28日~2011年10月31日 Pittsburgh, Pennsylvania USA
6. 谷口智憲 悪性黒色腫に異所性に発現する Histatin-1 は細胞運動能と免疫抑制能を亢進させる 第70回日本癌学会 2011年10月3日~2011年10月5日 名古屋
7. 谷口智憲 悪性黒色腫に異所性に発現する Histatin-1 は細胞運動能と免疫抑制能を亢進させる 第15回日本がん免疫学会 2011年6月30日~2011年7月1日 大阪

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称:MMの診断マーカー、ヒスタチン-1タンパク質の機能抑制物質を含有する医薬組成物、および、免疫抑制剤

発明者：谷口智慧 河上裕
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2011/068702
出願年月日：2011年08月18日
国内外の別：日本、米国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 智慧 (YAGUCHI TOMONORI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40424163