

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：平成 23 年度～平成 24 年度

課題番号：23800036

研究課題名（和文）ニューロピリン-1 発現ナチュラルキラー細胞の乳がん治療における意義に関する研究

研究課題名（英文）A role of neuropilin-1 expressing natural killer cells in breast cancer treatment

研究代表者 鈴木栄治（SUZUKI EIJI）

京都大学 医学研究科 助教

研究者番号：00612897

研究成果の概要（和文）：ニューロピリン-1 発現の高い単球はヒト乳癌細胞株に対するトラスツズマブを介した細胞傷害活性を増強することが判明した。形態的特徴を確認するとニューロピリン-1 発現の高い単球は球形で癌細胞を取り囲むように形態をなしていた。一方、ニューロピリン-1 発現の低い単球は樹枝状の突起を有し形態的にはマクロファージ様であった。このように単球はニューロピリン-1 の発現状況で細胞傷害性単球とそうでないサブセットに分類することができる可能性を示した。今後さらに詳細な単球におけるニューロピリン-1 の意義ならびに乳癌治療効果との相関について検討を積み重ねていく。

研究成果の概要（英文）：We found that neuropilin-1 highly expressing monocyte showed trastuzumab mediated strong antibody dependent cellular cytotoxicity in human breast cancer cell line.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
23 年度	1300000	390000	1690000
24 年度	1000000	300000	1300000
年度			
年度			
年度			
総計	2300000	690000	2990000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：臨床腫瘍学

キーワード：乳癌 トラスツズマブ ニューロピリン 単球

## 1. 研究開始当初の背景

乳がんトラスツズマブ治療において、抗体依存性細胞傷害活性（ADCC）は効果発現の重要なメカニズムの一つであると考えられている。NK 細胞や単球は ADCC において重要なエフェクター細胞であり、トラスツズマブ治療において、ニューロピリン（NRP）-1 発現免疫細

胞の比率の差によりその治療効果が影響を受けることが予測される。

## 2. 研究の目的

乳がん治療での NRP-1 発現免疫細胞のバイオマーカーとしての意義の探索と、NRP-1 の治療ターゲットとしての可能性について研究を行う。

## 3. 研究の方法

健常者の末梢血単核球（PBMC）をフローサイトメーターでNRP-1発現解析を行う。NRP-1発現陽性陰性細胞の単離をFACSを用いて行う。この細胞を用いてヒト乳癌細胞株に対するトラスツズマブを介したADCCの程度を確認する。乳がん患者におけるNRP-1発現の程度をフローサイトメーターを用いて解析する。

#### 4. 研究成果

①健常者のPBMC解析で、NK細胞にはほとんどNRP-1は発現していない。一方で単球にNRP-1の発現が認められた。FACS Ariaを用いてNRP-1陽性単球と陰性単球に分離し（図1）、この細胞をエフェクター細胞としてADCCアッセイを行った。NRP-1陽性細胞は陰性細胞と比較して有意に細胞傷害活性が高かった。さらにVEGFを添加するとこの細胞傷害活性は増強された（図2）。現在NRP-1の他のリガンドであるSEMA3Aを用いて同様の実験を施行中である。また、NRP-1陽性細胞は球形で標的癌細胞を密に取り囲んでおり細胞傷害活性で得られた結果と合致していた。一方NRP-1陰性細胞は樹枝状の突起を有し形態学的にはマクロファージ様の形態へと分化している様子が確認された（図3）。さらにCD107a抗体を用いたADCC活性評価においてもNRP-1高発現単球群はより高いCD107a発現を有することが確認された（図4）。

図1.

健常者の単球をFACS Ariaを用いてNRP-1陽性、陰性細胞に分離した。

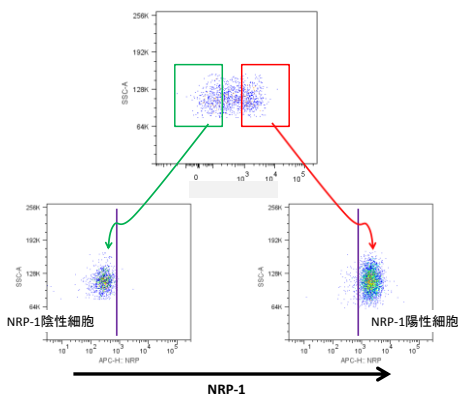


図2.

NRP-1陽性細胞は陰性細胞と比較してトラスツズマブを介したヒト乳癌細胞株への細胞傷害活性が有意に高い。VEGFを添加するとさらに細胞傷害活性は増強した。

標的細胞をSKBR3とNRP陽性、陰性細胞を用いてトラスツズマブによるADCCを確認

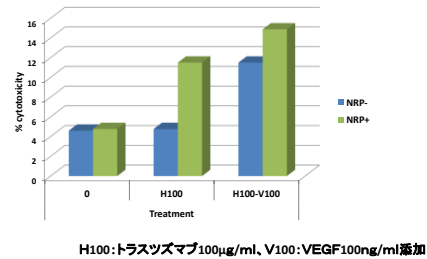


図3.

NRP-1陽性細胞は形態的にADCCを担当し、NRP-1陰性細胞は形態的に抗原提示能を有するマクロファージ等の細胞へ変化する可能性が示唆された。

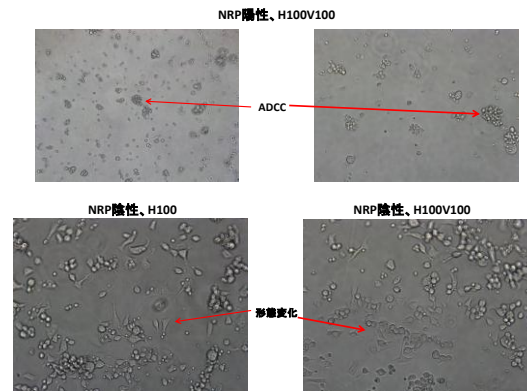
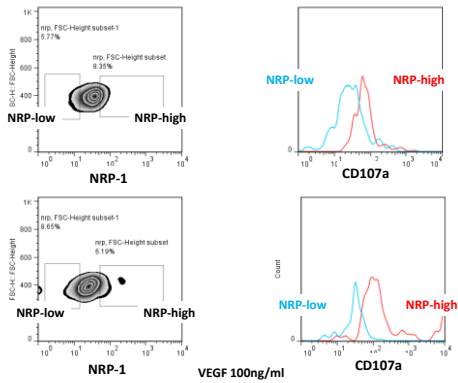


図4.

NRP-1陽性細胞はNRP-1陰性細胞と比較して有意にCD107a発現が高く強い細胞傷害活性を表していると考えられた。



②患者解析では6人のうち単球のNRP-1発現増強が認められたのは2人であった。化学療法に対する反応性について、治療前にNRP-1高値であった患者が減弱する症例が1例(図5)、治療前に低値であった患者が増強する患者が1例存在した(図6)。ごく少数での解析であるがこのNRP-1増強例は化学療法に対して腫瘍細胞の完全消失が確認された。

図5.

症例1では化学療法前に高いNRP-1は化学療法により減じていた。

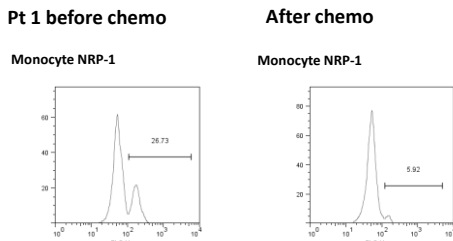
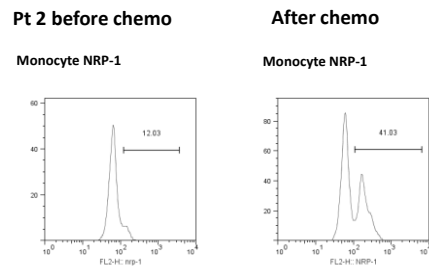


図6.

症例2では化学療法前に低いNRP-1は化学療法により増加していた。



【まとめ】NRP-1高発現はトラスツズマブによるADCC活性を増強する。その程度はVEGFにより正の修飾を受ける。乳がん患者間でNRP-1発現状況に高低が存在する。化学療法によりNRP-1発現単球が増加する患者と減弱する患者が存在する。【今後】NRP-1発現の意義を単球において解析する。具体的にはNRP-1に影響を与え得る各種タンパク質の細胞傷害活性への影響を実験的に検証する(図7)。またNRP-1発現とトラスツズマブ治療効果との関連を臨床検体を用いて明らかにする(図8)。

図7.

基礎的データの蓄積によりさらにNRP-1の単球における発現意義を解明する。

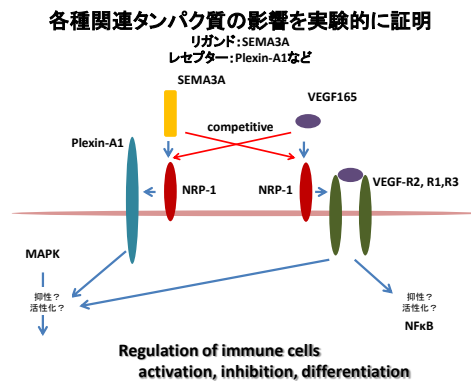
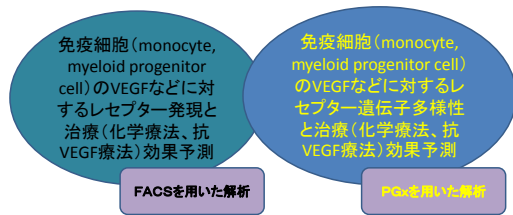


図8.

下図のごとくFACSを用いた解析とPGxを用いた解析を患者に対して行い治療効果とNRP-1発現との相関を検討する。



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 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ①鈴木栄治、Upregulation of neuropilin-1 in human monocyte is induced by RANKL and may be associated with trastuzumab mediated antibody dependent cellular cytotoxicity、米国癌学会、2013年04月06日～2013年04月10日、ワシントンDC、米国
- ②河川浩介、鈴木栄治、Neuropilin-1 high monocytes play an important role in trastuzumab mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in HER2 positive breast cancer cell lines、米国癌学会、2013年04月06日～2013年04月10日、ワシントンDC、米国

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：

発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木栄治 (SUZUKI EIJI)

京都大学 医学 (系) 研究科 (研究院) ・助教

研究者番号：00612897

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：