

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791444

研究課題名(和文)膵癌における HMGB-1 の役割解明と新規標的治療の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the role of HMGB-1 in the pancreatic cancer

研究代表者

赤堀 宇広 (Akahori, Takahiro)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10423922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：High Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1)は、核内蛋白であるが、侵襲存在下では細胞外に放出され、DIC の発症に大きな役割を果たすことが知られている。一方で、癌の発育、転移に関与することも報告されているが、その生理活性は十分に解明されていない。本研究は、ヒト膵癌における High-Mobility Group Box1 の発現および局所免疫機構への影響とそのメカニズムを解明し、それらの制御による新たな癌治療戦略の開発を目的としたものである。当初より、安定した実験結果を残すことができず、現在もなお、目的とする検討項目を評価し得ていない。

研究成果の概要(英文)：High Mobility Group Box Protein (HMGB1) is protein in the nuclei, but it is released outside a cell under the presence of severe inflammation, and it is widely known that it play big roles in the onset of the DIC. On the other hand, it is reported that it participate in the progression and metastasis of cancer, but the bioactivity is unknown enough. The principal aim of this study was to elucidate the expression of High-Mobility Group Box1 in the human pancreatic cancer and the influence of local anti-cancer immunity, and to develop therapeutic strategy effective for pancreatic cancer. But the experiment did not advance according to assumption and we can not achieve an original purpose.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科

キーワード：HMGB-1

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌は5年生存率が5%と、最も予後の悪い癌腫の一つであり、ジェムザールなど新規化学療法が導入されているが、その効果は未だ満足できるものではない。従って、現在に至るまで、外科切除が唯一、長期生存を得られる可能性のある治療法である。しかしながら、膵癌は進行が早く診断時には、約80%の患者が切除不能である。そこで、さらなる膵癌の予後向上のためには、新たな観点からの癌治療法の確立が必須である。

(2) 癌細胞は、ひとたび宿主に出現してからは、その宿主の免疫機構の監視が開始される。そのため、癌細胞は、様々なメカニズムを用いて宿主の免疫の網から逃れることが知られている。膵癌においても、我々が報告を行ってきたような T-cell negative pathway の賦活などでの癌細胞の免疫機構回避の報告は散見され、従って膵癌の免疫機構回避の機序を解明することは、新規治療法を開発するうえできわめて重要と考えられる。最近、各種癌細胞の High Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) の発現が、癌局所における免疫回避機構と関連していると報告されつつある。

(3) High Mobility Group Box1 Protein (HMGB1) は核内 DNA 結合蛋白の一つであり、DNA の転写などに働く重要な蛋白であるが、最近、強い生体への侵襲が加わった際には、細胞外に放出され、DIC の強力なメディエーターとなることが報告され、HMGB1 を標的とした DIC 治療薬がすでに臨床応用されている。また、終末糖化産物受容体 (receptor for advanced glycation end-product) に作用することにより、癌の発生、転移や進展の中での重要な役割を果たすことも知られており、具体的には、胃癌、大腸癌などでの報告が認められる。さらに、HMGB1 は、regulatory T cell を介し、特に、IL-10 産生を促進することによって、癌局所における免疫回避を誘導し得ることが新たに報告され、ある種のヒト癌腫では、HMGB が転写の促進とともに宿主免疫機構抑制にも作用し、癌細胞の発育、進展に、重要な役割を担っている可能性があることが証明されつつある。

(4) ヒト膵癌においても、HMGB1 は宿主免疫抑制に関与していると仮定し、膵癌における HMGB1 の発現とその役割を解明することで宿主免疫抑制を制御し、新規治療および膵癌の予後改善がもたらされる可能性があるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 多くの悪性腫瘍の中でも予後が極めて不良である膵癌を対象疾患として、HMGB-1 の膵癌進展、転移、発育における役割を明らかにし、HMGB-1 阻害の新規癌治療法として

の有用性を検証し、臨床応用への可能性を検討すること。

(2) 患者血清中 HMGB-1 発現測定による新規バイオマーカーとしての有用性の検討や In vitro での機序の解析による HMGB-1 阻害による抗腫瘍効果の有効性の裏づけ。さらには、In vivo での機序の解析による HMGB-1 阻害による抗腫瘍効果の有効性の裏づけ。HMGB-1 および他の T-cell negative pathway (B7/CTLA-4, PD-L/PD-1) 同時阻害による相乗効果の検討。HMGB-1 阻害と他の癌治療法との併用効果についての検討および機序の解析を行い、次世代の癌治療法としての臨床上の有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 膵癌の切除標本を用いて、HMGB-1 染色を行い、イメージングアナライザーを用いて定量化を行う。HMGB-1 発現と予後、再発形式、臨床病理学的因子との関連について解析する。患者末梢血中の発現についても FACS により解析し、再発、転移、予後等に関する評価を行い、臨床的意義を明らかにする。

(2) ヒト膵癌細胞株 (PANC-1, MIAPaCa-2 など) を用い、HMGB-1 発現の有無を RT-PCR, Western blot で確認する。発現を認めた場合には、siRNA の手法で、HMGB-1 を knock down させ、その knock down 効率を、リアルタイム PCR, Western blot で定量化する。

(3) ヒト膵癌細胞株 (PANC-1, MIAPaCa-2 など) に対する HMGB-1 knock down 時の細胞増殖抑制の有無を、それぞれフローサイトメトリー解析、MTS アッセイで検証し、膵癌のアポトーシス抵抗性と増殖能への関与を検討する。

(4) ヒト膵癌細胞株 (PANC-1, MIAPaCa-2 など) を免疫不全マウス (SCID マウス) に皮下移植し、腫瘍を確立させる。HMGB-1 siRNA をアテロコラーゲン (siRNA デリバリー用バイオマテリアル) 局所投与用とともに、腫瘍に直接摂取し、in vivo モデルにおける HMGB-1 knock down を試み、HMGB-1 knock down による抗腫瘍効果を経時的に比較する。HMGB-1 knock down 効率は、摘出腫瘍の免疫染色および Western blot 解析で検証し、さらに細胞増殖抑制効果は TUNEL 染色、Ki67 染色で検討する。

(5) ヒト膵癌細胞株 (PANC-1, MIAPaCa-2 など) に対する HMGB-1 阻害抗体投与時の細胞増殖抑制の有無をそれぞれフローサイトメトリー解析、MTS アッセイで検証し、データの裏付けを行う。

(6) ヒト膵癌細胞株 (PANC-1, MIAPaCa-2 な

ど)を免疫不全マウス(SCID マウス)に皮下移植し,腫瘍を確立させる. HMGB-1 knock down による抗腫瘍効果を経時的に比較する. HMGB-1 knock down 効率は,摘出腫瘍の免疫染色および Western blot 解析で検証し,さらに細胞増殖抑制効果は TUNEL 染色, Ki67 染色で検討する.

(8) 予備実験として, T 細胞 Negative Pathway の代表である B7/CTLA-4 経路の阻害に関する研究を行い, 特に抗 CTLA-4 抗体および抗 PD-1 抗体の併用投与が相乗効果を発揮し, 極めて強力な抗腫瘍効果を in vivo において誘導する事を確認している. これらの効果とこれらの効果と HMGB-1 阻害の効果の相乗効果を確認し, さらに種々の癌モデルを用いた実験データの再現性の確認と機序の解析を行い, 临床上の有用性を検討する.

(9) これまでに, 我々は血管新生に関する研究を続けてきた (J Clin Invest. 112(11): 1655-65. 2003. Br J Cancer. 79(9-10):1553-63.1999 等). 免疫療法と抗血管新生療法との併用については, 未だ十分に解明されていない. 一部に抗血管新生療法により腫瘍による病的血管の正常化が免疫療法の効果を高めるとの (Drugs Today 41(7):471-94. 2005.) 報告もあり, HMGB-1 阻害と抗 VEGFR 抗体や血管新生抑制因子 Endostatin との併用効果について検討する.

(10) 難治性癌を対象とした癌治療を想定した場合に, HMGB-1 阻害単独の免疫療法よりも, 既存の癌治療, 特に化学療法との併用がより臨床上的抗腫瘍効果をあげる可能性がある. 実際, 化学療法によって, 免疫療法の効果が相殺される場合も予想されるので, 詳細な解析を要するものと考えられる.

そこで HMGB-1 阻害と現在臨床で使用されている化学療法剤 (Gemcitabine, TS-1, Taxotel など)との併用効果について, 臨床を想定した in vivo の治療実験を行う. この実験により, 膵癌等の消化器癌においてどのような組み合わせが, 相乗効果あるいは拮抗作用を示すかを明らかにできるものと思われる. 相乗効果が得られた場合には, 最適な化学療法薬剤と抗 HMGB-1 抗体の投与スケジュールを検討する. さらに, 上記計画(2)と同様に相乗効果の得られた抗腫瘍効果について, ELISPOT, Real-time PCR あるいは FACS 解析等により, in vitro での機序の解析を行う.

4. 研究成果

(1) 膵癌の切除標本を用い, HMGB-1 の発現を確認する目的で, HMGB-1 の免疫染色を施行するも, 安定した免疫染色を施行するに至

っていない. そのため, 染色に用いる一次, 二次抗体の変更, さらには, 染色条件の変更など詳細にわたり, 再検討を行っているところである. 結果として, 膵癌切除検体を用いた HMGB-1 発現と予後, 再発形式, 臨床病理学的因子との関連が評価できるに至っていない.

(2) ヒト膵癌細胞株 (PANC-1, MIAPaCa-2) における HMGB-1 発現の有無の検討においても, RT-PCR, Western blot の手法を用いて, 開始しているところであるが, 発現の多寡に大きなばらつきが生じており, 発現の有無を評価するに至っていない. そのため, 膵癌細胞株を用い行う siRNA の手法を用いた HMGB-1 knock down による研究は進行しておらず, よって, 免疫不全マウス(SCID マウス等)に皮下移植し, in vivo における HMGB-1 knock down による抗腫瘍効果を経時的に比較することは施行できていない.

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 0 件)

[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 0 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

赤堀 宇広 (AKAHORI TAKAHIRO)
奈良県立医科大学・消化器外科・助教
研究者番号 : 10423922

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：