

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590441

研究課題名(和文) NKG2Dリガンドのがん抗体療法における役割解明とこれを用いた治療効果予測

研究課題名(英文) Role of NKG2D ligands in prediction of response to cancer antibody therapy

研究代表者

松野 吉宏 (Matsuno, Yoshihiro)

北海道大学・大学病院・教授

研究者番号：00199829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗体療法の治療効果におけるNKG2DLの関与の可能性を考察するため、乳癌および悪性リンパ腫およびにおけるNKG2DLのタンパク発現プロファイリングを行い、臨床病理学的因子や生存予後との関係を検討した。乳癌では分子サブタイプの違いにより、NKG2DLの臨床病理学的意義が異なることが明らかとなった。またリツキサン既治療のDLBCLにおけるNKG2DLの臨床病理学的意義はがん免疫応答やストレス状態に依存する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the protein expression profile of NKG2DL in breast cancer and malignant lymphoma, and examined the relationship with clinicopathological factors and patient survival to estimate an impact of NKG2DL modulation in antibody therapies. We showed that the clinicopathological significance of NKG2DL was different depending on molecular subtypes in breast cancer. Moreover, it was suggested that the significance of NKG2DL in rituximab-treated DLBCL might depend on cancer immunoresponse or cellular stress.

研究分野：医歯薬学

キーワード：NKG2Dリガンド 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

がん分子標的治療の柱となっている抗体治療薬は、現在では乳癌をはじめ多くの悪性腫瘍で標準治療として用いられるようになり、がん治療の個別化において不可欠となっている。抗体治療薬の作用機序としては、標的分子に結合することによって、1) 下流への細胞増殖シグナル伝達を抑制し、さらに標的分子の細胞内部への取り込みを促進してその分子の数的減少を誘導するほか、2) NK 細胞や単球などのエフェクター細胞による抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性を介した抗腫瘍効果が重要であることが知られている。

また抗体治療の適応判定として、コンパニオン診断 (治療対象患者選別のための治療感受性・抵抗性予測診断) が欠かせなくなっており、がん組織を対象とした効果予測としては、標的分子のタンパク過剰発現やこれの原因となる遺伝子増幅、遺伝子変異等の検索が挙げられ、すでにルーチン検査化されている。一方エフェクター細胞に関係した効果予測では、抗体治療薬が結合する Fc γ 受容体遺伝子の一塩基多型 (SNP) が報告されている。しかしながら、がん-エフェクター細胞間の細胞傷害作用に直接関与する効果予測因子になりえる分子は未だ報告されていない。

こうしたなか、主要なエフェクター細胞のひとつである NK 細胞の活性化受容体 NKG2D とそれに対するリガンド (NKG2DL) ファミリーが腫瘍免疫に深く関与することが明らかとなった。また最近、*in vitro* の研究において NKG2DL の ADCC 活性に対する関与を強く示唆する結果が報告された。さらに我々は、現在 8 種類の存在が確認されているこの NKG2DL 群 (MICA, MICB, ULBP1~6) に関する研究を進め、どのような腫瘍組織でそれぞれの分子がどのような発現パターンを示すかを、組織マイクロアレイを用いた網羅的タンパク発現解析に明らかにした (Fujita H et al. 2015)。

2. 研究の目的

本研究では、抗体療法が精力的に行われている 2 つのがん種にフォーカスし、本治療における効果予測と NKG2DL の関係を明らかにするため、乳癌および悪性リンパ腫およびにおける NKG2DL のタンパク発現プロファイリングを行い、臨床病理学的因子や生存予後との関係を検討した。

3. 研究の方法

(1) 乳癌および悪性リンパ腫検体を用いた組織マイクロアレイの作製

生検採取および手術切除され、浸潤性乳癌と診断された 167 症例およびびまん性大細胞性 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) と診断された 138 症例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織ブロックをそれぞれ用いて、組織マイクロアレイ (TMA) を作製した。乳癌 TMA については、ER, PgR, HER2, EGFR, Ki-67 の IHC 染色を、また DLBCL TMA については、CD20, CD3, CD56, CD5, CD10, MUM1, BCL6 の IHC 染色, EBER の ISH 染色を行い、免疫フェノタイプの確認を行った。

(2) NKG2DL の免疫組織化学的 (IHC) 解析およびタンパク発現レベルの評価

FFPE 組織ブロックより作製された 5 μ m 厚の薄切標本に対し、脱パラフィン・親水化を行い、その後抗原賦活処理を行った。内因性パーオキシダーゼの不活化を行ったのち、NKG2DL (ULBP1, ULBP2/6, ULBP3, ULBP4, ULBP5, MICA/B) およびに対する抗体と反応させ、その後ポリマー試薬 (EnVision FLEX+, Dako) 用いて検出した。

(3) リアルタイム RT-PCR 解析

TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を用い、各細胞から総 RNA を抽出し、その後、Transcript First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) を使用して cDNA を調製した。cDNA を template とし、QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) を用いて、変性: 94°C・30 秒、

アニーリング：60℃・30秒，伸長：72℃・30秒を40サイクル実施する反応条件でqPCRし，mRNA発現量の解析を行った。

(4) ノックダウン解析

5 x 10⁶の培養細胞をトランスフェクション用試薬 (Nucleofector Solution, Lonza) に懸濁後，30nM siRNA (Silencer® Select siRNA, Thermo Fisher Scientific)を添加し，トランスフェクション装置 (Nucleofector, Lonza) を用いて導入を行った。

4. 研究成果

(1) 乳癌における NKG2DL 発現

各 NKG2DL 発現の陽性割合は，それぞれ ULBP1 が 75%，ULBP2 が 52%，ULBP3 が 69%，ULBP4 が 60%，ULBP5 が 75%，MICA/B が 46% であった。また ULBP1，ULBP2，ULBP4 は野生型 p53 発現と正相関が認められた。そこで p53 とのこれら発現制御の関係性を明らかにするため，野生型 p53 発現株である MCF-7 細胞を用いて TP53 のノックダウン解析を行ったところ，ULBP1，ULBP2，ULBP4 発現の有意な低下が認められた。

(2) 乳癌 NKG2DL 発現と予後との関連性

6種の NKG2DL について，生存期間解析を行ったところ，いずれのリガンドにおいても無病生存期間 (DFS) の有意な期間延長は認められなかった。

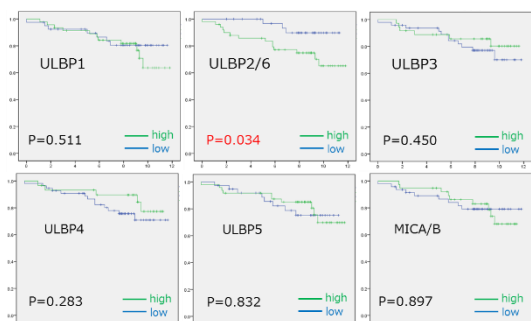


図1 HER2陰性 luminal型乳癌における NKG2DL の無病生存期間解析

サブグループ解析では，興味深いことに HER2 陰性 luminal 型乳癌では，ULBP2/6 高発現群において DFS の有意な期間短縮は認めら

れた一方，HER2 陽性乳癌では ULBP2/6 高発現群において有意な DFS の延長が，さらに ULBP5 高発現群において有意な DFS の短縮が認められた。

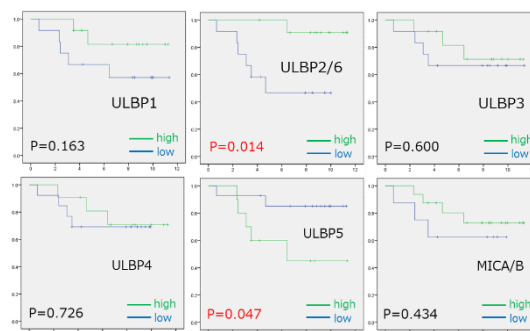


図2 HER2陽性乳癌における NKG2DL の生存期間解析

(3) DLBCL における NKG2DL 発現

DLBCL TMA を用いた IHC 解析における，NKG2DL の陽性割合は，ULBP1 は 31%，ULBP2 は 18%，ULBP5 は 50%となり，ULBP3，ULBP4，MICA/B では陽性例は認められなかった。

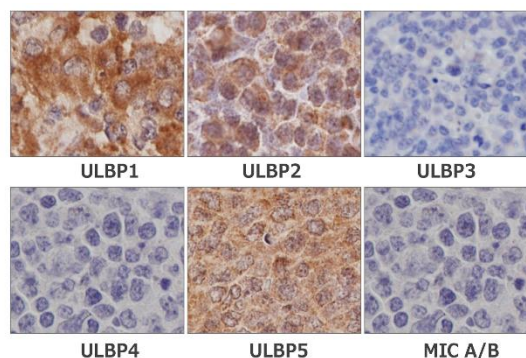


図3 DLBCLにおける NKG2DL 発現

また ULBP1 および ULBP2 は，転写因子である BCL6 と有意な関連性が認められた。そこで ULBP1 と ULBP2 発現と BCL6 制御の関連性を明らかにするため，DLBCL 細胞株である SU-DHL-4 細胞および SU-DHL-6 細胞を用いて BCL6 のノックダウン解析を行ったところ，それらにおいて両遺伝子発現の有意な変動は認められなかった。また ULBP1 はストレス応答分子である ATM リン酸化および HIF-1a 発現，そしてがん免疫関連分子である PD-L1 発現と有意な相関関係が認められた。

(4) DLBCL NKG2DL 発現と予後との関連性

リツキシマブ既治療DLBCL症例のTMAを用いたIHC解析において、陽性群および陰性群の2群化が可能となったULBP1, ULBP2, ULBP5について、生存期間解析を行ったところ、無増悪生存期間(PFS)および全生存期間(OS)において、有意な期間延長は認められなかった。

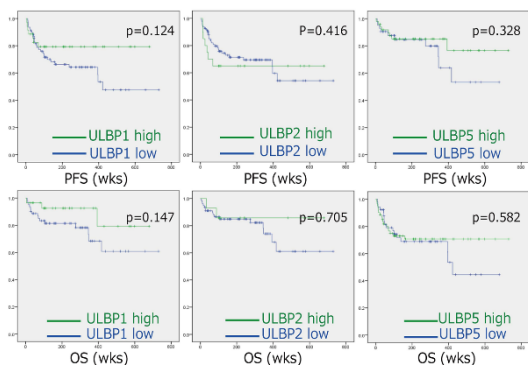


図4 DLBCLにおけるULBP1, ULBP2, ULBP5の生存期間解析。上段：無増悪生存期間，下段：全生存期間

一方、がん免疫関連分子であるMHC class IおよびPD-L1において前層別化を行った場合、それぞれ陽性群において、ULBP1高発現群において、有意なPFSの延長が認められた。

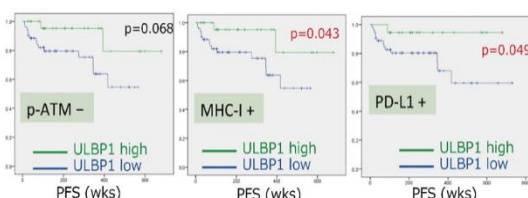


図5 ATMリン酸化, MHC-I発現, PD-L1発現状態に基づく前層別化におけるULBP1の生存期間解析

本研究において、乳癌では分子サブタイプの違いにより、NKG2DLの臨床病理学的意義が異なることが明らかとなった。またリツキサン既治療のDLBCLにおけるNKG2DLの臨床病理学的意義はがん免疫応答やストレス状態に依存す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] Shiratori S, Fujimoto K, Nishimura M, Hatanaka KC, Kosugi-Kanaya M, Okada K, Sugita J, Shigematsu A, Hashimoto D, Endo

T, Kondo T, Abe R, Hashino S, Matsuno Y, Shimizu H, Teshima T. Allogenic hematopoietic stem cell transplantation following reduced-intensity conditioning for mycosis fungoides and Sezary syndrome. Hematol Oncol. 34:9-16, 2016, 査読有

[2] Fujita H, Hatanaka Y, Sutoh Y, Suzuki Y, Oba K, Hatanaka KC, Mitsuhashi T, Otsuka N, Fugo K, Kasahara M, Matsuno Y. Immunohistochemical validation and expression profiling of NKG2D ligands in a wide spectrum of human epithelial neoplasms. J Histchem Cytochem. 63:217-227, 2015, 査読有

[3] Yamaguchi M, Tanaka K, Yoshino T, Ishizuka N, Oguchi M, Kobayashi Y, Isobe Y, Ishizawa K, Kubota N, Itoh K, Usui N, Miyazaki K, Wasada I, Nakamura S, Matsuno Y, Oshimi K, Kinoshita T, Tsukasaki K, Tobinai K. Prognostic biomarkers in patients with localized natural killer/T-cell lymphoma treated with concurrent chemoradiotherapy. Cancer Sci. 105:1435-1441, 2014, 査読有

[4] Ogura M, Ando K, Suzuki T, Ishizawa K, Oh SY, Itoh K, Yamamoto K, Au WY, Tien HF, Matsuno Y, Terauchi T, Yamamoto K, Mori M, Tanaka Y, Shimamoto T, Tobinai K, Kim WS. A multicenter phase II study of vorinostat in patients with relapsed or refractory indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma. Br J Haematol. 165:768-776, 2014, 査読有

[5] Kim SW, Yoon SS, Suzuki R, Matsuno Y, Yi HG, Yoshida T, Imamura M, Wake A, Miura K, Hino M, Ishikawa T, Kim JS, Maeda Y, Lee JJ, Kang HJ, Lee HS, Lee JH, Izutsu K, Fukuda T, Kim CW, Yoshino T, Ohshima K, Nakamura S, Nagafuji K, Suzumiya J, Harada M, Kim CS. Comparison of outcomes between autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for peripheral T-cell lymphomas with central review of pathology. Leukemia. 27:1394-1397, 2013, 査読有

[学会発表] (計 10件)

[1] 藤澤 孝志, 畑中 豊, 畑中 佳奈子, 三橋 智子, 松野 吉宏, 藤本 勝也. びまん性大細胞型B細胞リンパ腫のNKG2Dリガンド発現に関する免疫組織化学的検討. 日本癌学会学術総会. 2015年10月8日-10日, 名古屋国際会議場(名古屋市)

[2] 松野 吉宏, 丸川 活司, 畑中 豊. 病理検体を用いるコンパニオン診断の精度保証. 日本臨床腫瘍学会学術集会(招待講演). 2015年7月16日-18日, ロイトン札幌(札幌市)

[3] 中澤 温子, 大隅 朋生, 鶴澤 正仁, 小林 良二, 岩淵 英人, 大島 孝一, 田丸

淳一, 中峯 寛和, 中村 栄男, 藤本 純一郎, 北條 洋, 松野 吉宏, 吉野 正. Pediatric diffuse large B-cell lymphoma - A report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). 日本リンパ網内系学会総会. 2015年7月9日-11日, 岡山コンベンションセンター (岡山市)

[4] 畑中 佳奈子, 藤本 勝也, 野口 寛子, 高桑 康成, 畑中 豊, 松野 吉宏, Lymphoma Clinico-Pathologic Conference. 自己免疫性疾患患者に生じたリンパ増殖性疾患 63 例の臨床病理学的検討. 日本病理学会総会. 2015年4月30日-5月2日, 名古屋国際会議場 (名古屋市)

[5] 松野 吉宏. 悪性リンパ腫の病理. Tokyo FDG-PET Imaging Conference (招待講演). 2015年2月21日, ベルサール神保町 (東京都)

[6] 松野 吉宏. コンパニオン診断薬; 開発及び評価の考え方と課題. PMDA ワークショップ (招待講演). 2014年9月1日, 全社協・灘尾ホール (東京都)

[7] 畑中 佳奈子, 藤本 勝也, 辻 隆裕, 笠原 郁美, 山本 聡, 中田 匡信, 高桑 康成, 西尾 充史, 小山田 ゆみ子, 長谷山 美仁, 鈴木 宏明, 米積 昌克, 野口 寛子, 酒井 基, 西原 広史, 盛 暁生, 畑中 豊, 豊嶋 崇徳, 松野 吉宏. 自己免疫性疾患患者に発生した悪性リンパ腫を含むリンパ増殖性疾患に関する臨床病理学的解析. リンパ網内系学会. 2014年6月19日-21日, 山形国際ホテル (山形市)

[8] 菅野 宏美, 藤田 裕美, 畑中 佳奈子, 田川 義晃, 南場 研一, 三橋 智子, 松野 吉宏. 眼内悪性リンパ腫および鑑別疾患における硝子体液を用いた病理診断の有用. 日本病理学会総会. 2014年4月24日-26日, 広島国際会議場 (広島市)

[9] 畑中 佳奈子, 畑中 豊, 小林 浩之, 菅野 宏美, 西原 広史, 田中 伸哉, 三橋 智子, 松野 吉宏. 中枢神経系原発びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫におけるDNAメチル化に関する解析. 日本病理学会総会. 2014年4月24日-26日, 広島国際会議場 (広島市)

[10] 畑中 豊, 鈴木 雄太, 藤田 裕美, 畑中 佳奈子, 大庭 幸治, 三橋 智子, 山下 啓子, 笠原 正典, 松野 吉宏. ヒトHER2陰性 luminal タイプ乳癌におけるNKGD2リガンドの発現解析. 日本病理学会総会. 2013年6月6日-8日, ロイトン札幌 (札幌市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等 (なし)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松野 吉宏 (MATSUNO, Yoshihiro)
北海道大学・北海道大学病院・教授
研究者番号: 00199829

(2) 研究分担者

畑中 豊 (HATANAKA, Yutaka)
北海道大学・北海道大学病院・特任講師
研究者番号: 30589924