

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18790250

研究課題名（和文） エピジェネティックレベルでの癌の免疫逃避機序の解明

研究課題名（英文） Analysis of cancer immune escape by epigenetic mechanism

研究代表者

針生 寛之 (HARIU HIROYUKI)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：40404587

研究成果の概要：

さまざまな正常組織と腫瘍組織における HLA class I 関連分子の発現を検索し、ほとんどの癌種で約 3 割に発現低下があることを見出した。乳癌と前立腺癌では約 8 割に HLA 発現消失または発現低下が認められた。乳癌と前立腺癌における HLA 発現低下の分子機序を解析した結果、主に B2-microglobulin 遺伝子のヒストン脱アセチル化が原因であることが判明した。Genetic な変化や遺伝子メチル化の関与は低かった。ヒストン脱アセチル化機序による乳癌細胞の免疫逃避の解析を行い、HLA class I 分子以外に、NK 細胞標的分子、Immunodominant な癌抗原分子、Death 受容体分子なども発現低下していることを見出した。ヒストン脱アセチル化阻害剤を作用させるとこれら分子の発現が回復した。ヒストン脱アセチル化阻害剤自体は T 細胞機能に影響を及ぼさないことを証明し、癌免疫逃避を抑制する新たな免疫療法を提唱した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	210,000	3,610,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：(1) MHC class I (2) 乳癌 (3) 前立腺癌 (4) ヒストン脱アセチル化
(5) DNA マイクロアレイ (6) ベータ 2 マイクログロブリン

1. 研究開始当初の背景

1990 年代にメラノーマを中心として癌抗原が明らかにされて以来、ヒト癌免疫応答の

分子メカニズムが解明され、その理論的根拠に基づいた癌免疫治療の臨床試験が実施されている。しかし、国内外の試験結果を振り

返ってみるとその抗腫瘍効果は約3%と振るわず、大部分の症例では免疫応答は著しく低い。この原因には大きく分けて宿主免疫系不応答の問題と、癌の免疫逃避の問題とがある。真に有効な免疫療法を樹立するためには、担癌宿主における癌免疫逃避の分子機序を解明し、それを制御する方法を見出すことが重要である。

2. 研究の目的

本研究では癌の免疫逃避機序を解明し、これを制御する方法を見出すことを目的とする。特に、MHC class I分子発現制御におけるエピジェネティック機序の関与について解明し、新たな癌免疫治療の開発に貢献する。

3. 研究の方法

I. 各種成人正常臓器および各種癌組織におけるHLA class I発現の解析

- ホルマリン固定標本が染色可能な抗HLA class Iに対する単クローン抗体の樹立
- 免疫組織染色によるHLA class I発現解析
- レーザーマイクロダイセクションを用いたHLA発現解析

以上のデータを集めることによって、組織におけるHLA発現レベルの違いが、DNAレベル、RNAレベル、蛋白質レベルのどのレベルで制御されているかをつきとめる。

II. 各種癌組織における抗原処理提示分子、免疫制御分子のDNAアレイ解析

遺伝子発現を正常組織と癌組織の間で網羅的に比較解析。癌組織の遺伝子発現プロファイリングを解析する。

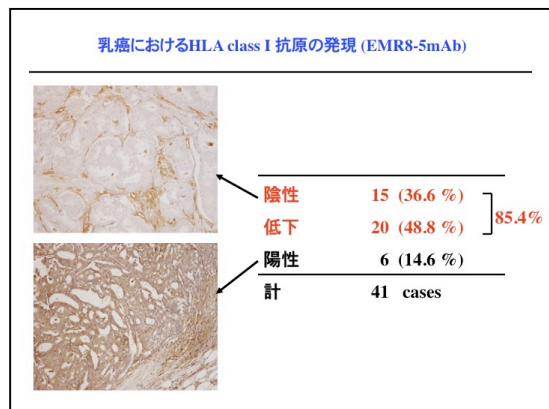
III. MHC class I遺伝子発現制御の分子メカニズム解析

プロモーター領域のメチル化、ヒストン脱アセチル化等の染色体リモデリングの解析を行う。

4. 研究成果

① ホルマリン固定標本の免疫染色に適した抗HLA class I抗体の樹立と癌組織の免疫染色

抗pan-HLA class I重鎖抗体EMR8-5に加えて、抗Beta2-microglobulin (B2M)抗体EMRB12を樹立した。これら2種類の抗体を用いて、腎癌、前立腺癌、膀胱癌、骨肉腫、乳癌、肺癌、大腸癌の各腫瘍サンプルの免疫染色を行い、HLA class I抗原の発現が消失している腫瘍は有意に再発率が高く、患者の予後が不良であることを明らかにした。前立腺癌と乳癌では、HLA class I発現低下もしくは消失の頻度は約8割に昇り、その原因の大部分はHLA軽鎖B2Mの発現低下であることを見出した。



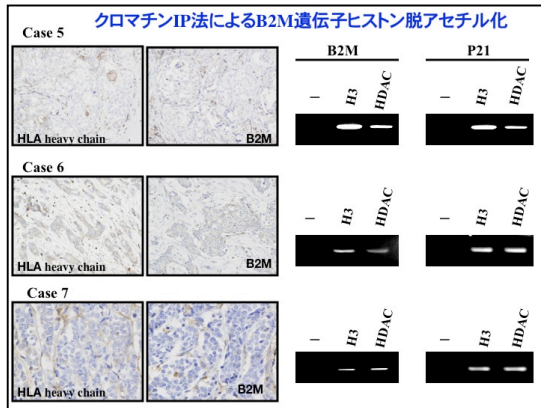
各種癌のHLA class I染色結果

Origin	症例数	陽性	低下・陰性 (%)
口腔癌	78	33	45 (58%)
乳癌	41	6	35 (85%)
肺癌	35	28	7 (20%)
大腸癌	15	11	4 (27%)
腎癌	45	29	16 (36%)
膀胱癌	53	35	18 (34%)
前立腺癌	49	9	40 (82%)

② 乳癌、前立腺癌における遺伝子変化とエピジェネティック変化の解析

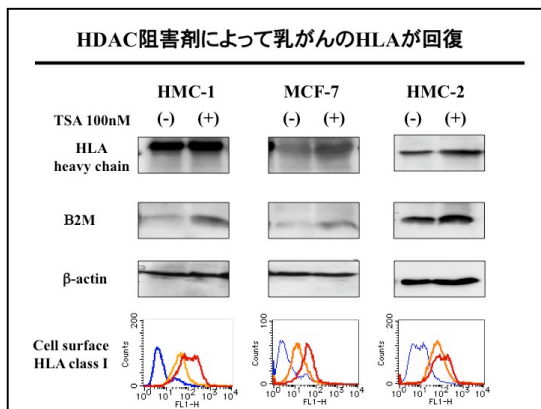
乳癌、前立腺癌それぞれにおいて、B2M遺伝子の遺伝子配列をシーケンスしたが、遺伝子欠失や変異は認められなかった。遺伝子メチル化阻害剤とヒストン脱アセチル化阻害剤を用いた培養がん細胞株の解析を行い、

B2M発現低下の原因はヒストン脱アセチル化であることが判明した。凍結乳癌組織のクロマチン免疫沈降法によって、ヒト乳癌組織においてB2M遺伝子領域のヒストン脱アセチル化が亢進していることを証明した。



③ ヒストン脱アセチル化(HDAC)阻害剤を用いたHLA class I抗原発現の回復

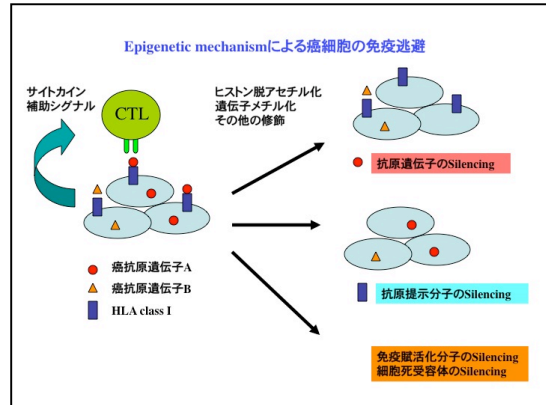
HLA class I抗原の発現が低下している乳癌細胞株をSCIDマウスに移植し、HDAC阻害剤を経口投与したところ、B2Mの発現回復とともに、HLA class I抗原の細胞表面発現が回復した。



④ DNAアレイを用いた網羅的解析

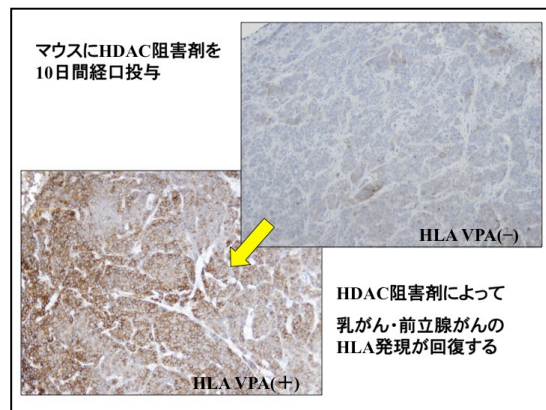
乳癌細胞において、ヒストン脱アセチル化によって発現が低下している遺伝子群をDNA マイクロアレイ解析によって網羅的に解析した。その結果、細胞性免疫を活性化するサイトカイン、細胞性免疫の標的抗原、MHC関連分子など、いくつかの免疫関連遺伝子が

同定された。クロマチン免疫沈降法によってヒストン脱アセチル化の亢進が確認された。



⑤ HDAC 阻害剤のがん組織 HLA 発現レベルと T 細胞機能に与える影響

クローン化された細胞障害性 T 細胞を HDAC 阻害剤存在下で培養し、標的がん細胞に対する障害活性を比較検討した。その結果、HDAC 阻害剤の中でもバルプロ酸は、T 細胞の細胞障害活性に全く影響を及ぼさないことが判明した。マウスに移植したヒト乳がん組織の HLA 発現レベルは、マウスにバルプロ酸を経口投与することによって回復が認められた。



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4件)

- ① 井野田智子、鳥越俊彦：腫瘍細胞におけるMHCクラスI表出のepigenetic機序による免疫回避. 臨床免疫・アレルギー科、特集1 腫瘍の免疫回避機構と抗腫瘍免

疫の誘導、50 (4) : 373-377, 2008. 査読あり

- ② Kikuchi E, Yamazaki K, Torigoe T, Cho Y, Miyamoto M, Oizumi S, Hommura F, Dosaka-Akita H and Nishimura M: HLA class I antigen expression is associated with a favorable prognosis in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 98: 1424-1430, 2007. 査読あり
- ③ Kitamura H, Honma I, Torigoe T, Asanuma H, Sato N and Tsukamoto T: Down-regulation of HLA class I antigen is an independent prognostic factor for clear cell renal cell carcinoma. *J Urol* 177: 1269-1272, 2007. 査読あり
- ④ Kitamura H, Torigoe T, Asanuma H, Honma I, Sato N, Tsukamoto T: Down-regulation of HLA class I antigens in prostate cancer tissues and up-regulation by histone deacetylase inhibition. *J Urol* 178:692-696, 2007. 査読あり

[学会発表] (計2件)

- ① Torigoe, T., Asanuma, H., Hirohashi, Y., Iwayama, Y., Toyoda, N., Honma, I., Kitamura, H., Tsukamoto, T., Hirata, K. and Sato, N. : Impact of HLA class I down-regulation in the immune escape of cancer and its prevention by histone deacetylase inhibitors. 12th World Congress on Advances in Oncology and 10th International Symposium on Molecular Medicine 11-13 October 2007, Crete, Greece. 査読あり
- ② Torigoe T, Asanuma H, Sato N: Epigenetic mechanism of cancer immune escape and its regulation by histone deacetylase inhibitors. 日本癌学会 International Session、10月3日-5日、横浜、2007. 査読なし

[図書] (計2件)

- ① 平田公一、九富五郎、奥谷浩一、豊田宣彦、岩山祐司、亀嶋秀和、鶴間哲弘、古畑智久、鳥越俊彦、佐藤昇志、癌免疫監視機構のエスケープ機序としての HLA クラス I の発現低下、ハイパーサーミック・イムノロジー、診断と治療社、p102-109、2008. 査読なし
- ② 中津川宗秀、鳥越俊彦、エピジェネティクスにより制御される腫瘍の免疫逃避機構、Annual Review 免疫 2008、中外医学社、p203-209、2008. 査読なし

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: POTENTIATION OF CELLULAR IMMUNITY USING HISTONE DEACETYLASE (HDAC)

INHIBITORS

発明者: 鳥越俊彦、佐藤昇志、淺沼 広子、藤井 暢弘、石埜 正穂

権利者: 科学技術振興機構、札幌医大

種類:

番号: PCT/JP2007/074067

出願年月日: 2007年12月6日

国内外の別: 国際特許

6. 研究組織

(1) 研究代表者

針生 寛之 (HARIU HIROYUKI)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 40404587