

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07300

研究課題名(和文)HLA-Fを標的とした新規がん免疫療法およびがん診断マーカー開発

研究課題名(英文)Development of new tumor diagnosis marker and new cancer immunotherapy targeting HLA-F

研究代表者

王寺 典子(下嶋典子)(Ouji-sageshima, Noriko)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30398432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：HLAクラスI分子の一つであるHLA-Fを標的とした新規がん免疫療法およびがん診断マーカー開発を目指し、本研究を行った。大腸癌病理標本における検討では、検討症例の約90%にHLA-Fが発現していた。また再発症例の80%にHLA-Fが高発現しており、HLA-Fが腫瘍マーカーおよび再発リスクのマーカーとなる可能性が示唆された。臨床検体を用いたin vitroのHLA-Fのブロッキング効果については、検討した症例の約80%でIFN- γ 産生増強を確認した。今後は、in vivoモデルでの検証、HLA-Fブロッキング効果の機序解明を行い、新規がん免疫療法の開発に繋げる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫療法は、第3のがん治療法として期待されているが、適用のないがん種もあるため、新たな標的分子の探索は継続して必要である。HLA-Fは腫瘍細胞に広く発現しており、腫瘍マーカーとして期待できる分子である。また本研究成果からHLA-Fが再発リスクのマーカー、免疫療法の新規標的分子にもなりうる可能性が示唆された。本研究成果は、腫瘍の早期発見と治療の両方に有用な新規標的分子の提供につながると考える。

研究成果の概要(英文)：To develop new cancer diagnostic marker and cancer immunotherapy targeting HLA-F, which is one of the HLA class I molecules, we have performed histological analysis of HLA-F expression on colorectal cancer, and investigated the ability of IFN-gamma production through blocking HLA-F in vitro. HLA-F was detected about 90% of colorectal cancer tissue which we have tested. In addition, HLA-F was highly expressed in 80% of recurrent cases, suggesting that HLA-F may be a marker for tumors and risk of recurrence. IFN-gamma production through blocking HLA-F was enhanced in 80% of case we have tested. In the future, to develop new immunotherapy and prognostic marker using HLA-F, we would like to confirm the mechanism how HLA-F regulates IFN-gamma production and examine the HLA-F blocking effect in mouse cancer model.

研究分野：免疫学

キーワード：HLA-F 免疫療法 腫瘍マーカー 病理組織標本

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HLA-F は、研究協力者の Geraghty らによって発見された HLA 遺伝子の一つであるが (*J Exp Med*.1989)、一般的な移植抗原等で知られる HLA-A、-B、-C などの古典的 HLA クラス I 遺伝子と区別され、HLA-E、HLA-G とともに非古典的 HLA クラス I 遺伝子とよばれている。

HLA-F を含む非古典的 HLA クラス I 遺伝子は多型性に乏しく、タンパクとしての発現部位も限られており、このうち HLA-F は、正常組織では妊娠後期胎盤の絨毛外栄養膜細胞のみに発現し、その他、EB ウイルスにより形質転換された B 細胞などにも発現する。申請者は、これまでに、HLA-F が甲状腺未分化癌、低分化型扁平上皮癌 (歯肉)、腎細胞癌 (乳頭型) など、未分化・低分化癌に HLA-F が強く発現することを免疫組織染色法により見出しており、これまでの当該研究費で HLA-F が腫瘍悪性度に伴い発現増強することも確認している。また大腸癌細胞株において、腫瘍悪性度に伴い HLA-F の遺伝子発現が増強することを確認している。

腫瘍細胞における HLA-F の発現と予後の関連は、非小細胞肺癌、食道扁平上皮癌、胃癌、肝癌、乳癌において、市販の抗 HLA-F 抗体を使用した報告があり、HLA-F の発現が予後に関連するとしているが腫瘍悪性度との関連は報告されていない。低分化・未分化癌などの悪性腫瘍に HLA-F が非常に強く発現していることを確認しているのは申請者らのグループのみである。

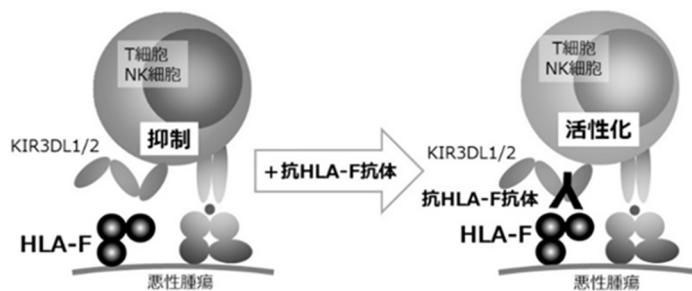
HLA-F の抗原提示能は証明されておらず、発現様式も多様な報告がされている (*J Immunol*. 2010、*Nat Immunol*. 2016、*Immunity* 2017)。一方で、HLA-F が抑制性レセプターの KIR3DL1/2 と相互作用し、NK 細胞、T 細胞の機能を抑制すること (*J Immunol*. 2013、*PLoS One*, 2016) は明らかになっている。

このことから申請者は腫瘍増悪化の一端にある抗腫瘍免疫活性の低下に、腫瘍細胞に高発現する HLA-F と NK 細胞・T 細胞上の KIR との相互作用が関連しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

申請者は、腫瘍悪性化に伴い強発現する HLA-F と KIR の相互作用も、CTL の細胞傷害活性の低下に関与しているのではないかと考えた (下図)。そこで、「HLA-F と KIR の相互作用を抗 HLA-F 抗体でブロックすることにより、T 細胞、NK 細胞を再活性化する新規免疫療法 (抗 HLA-F 抗体療法) は可能か」、「HLA-F は新規悪性腫瘍診断マーカーとなるか」の 2 点を問いとして、抗 HLA-F 抗体療法 (下図) および新規診断マーカー開発のため、以下について検証することを目的とした。

- 1.腫瘍細胞上の HLA-F は腫瘍悪性度だけでなく、予後・再発にも関連するのか
- 2.抗 HLA-F 抗体療法は有用か (in vitro、in vivo)



抗HLA-F抗体療法

3. 研究の方法

本研究では、抗 HLA-F モノクローナル抗体を使用し、HLA-F を標的分子とした新規免疫療法（抗 HLA-F 抗体療法）ならびに新規診断マーカー開発のため、上記目的について解析を進めた。

（1）腫瘍細胞上の HLA-F は腫瘍悪性度のみならず、予後・再発にも関連するのか

腫瘍組織標本を用いて HLA-F の発現解析を行う。HLA-F の発現強度と、腫瘍進行度・腫瘍悪性度・予後・術後再発様式・TNM 分類・5 年生存率などの臨床情報との関連を解析する。また 6 種の抗 HLA-F モノクローナル抗体のうち、最も腫瘍特異性の高いクローンを選定する。抗 HLA-F 抗体療法の適用範囲を定める上で必要な情報を収集する。

（2）抗 HLA-F 抗体療法は有用か（in vitro、in vivo）

抗 HLA-F 抗体療法による腫瘍細胞増殖抑制効果の機序として、①CTL の再活性化、②補体依存性細胞傷害（CDC）活性の増強および抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性の増強が考えられるので、この 2 点について検証する。

①腫瘍細胞上の HLA-F と KIR 相互作用により抑制された T 細胞および NK 細胞の細胞傷害活性が、HLA-F ブロックにより再活性化されるのかをサイトカイン産生により確認する（in vitro）。

②HLA-F 陽性大腸癌細胞株を移入した SCID-beige マウスあるいは SCID マウスに、抗 HLA-F モノクローナル抗体を投与し、CDC 活性あるいは ADCC 活性増強による腫瘍増殖抑制効果を検証する（in vivo）。

以上を検証し、抗 HLA-F 抗体療法の適用範囲を規定するための有用な情報を収集し、HLA-F を標的とした新規がん免疫療法ならびにがん診断マーカー開発につなげる。

4. 研究成果

（1）腫瘍細胞上の HLA-F は腫瘍悪性度のみならず、予後・再発にも関連するのか

低分化大腸癌 11 例、中～高分化大腸癌 28 例のホルマリン標本病理組織において HLA-F の免疫染色を行った。その結果、HLA-F は低分化癌 11 例中 11 例に陽性、このうち約 75%は中程度以上の陽性であった。中・高分化癌 28 例においては 23 例が陽性、5 例が陰性/弱陽性であった。染色強度を 4 段階に分け、統計解析 (t-test) を行ったところ、有意に低分化癌において HLA-F の発現が高いことが示された。

HLA-F の発現強度と、臨床情報（予後・術後再発様式・TNM 分類）について解析したところ、再発症例が HLA-F 強陽性を示す傾向が見られた。

（2）抗 HLA-F 抗体療法は有用か（in vitro、in vivo）

HLA-F 陽性の大腸癌細胞株の作製が困難であったため、大腸癌臨床検体（奈良県立医科大学医の倫理審査委員会承認済み、No.1784）を酵素処理により分散し、得られた腫瘍分散細胞を使用して HLA-F のブロッキング効果を検討した。検討した 26 例中、9 例に HLA-F 陽性の腫瘍細胞集団を確認した（約 35%）。また HLA-F ブロッキングによる IFN- γ 産生増強効果は検討した 13 例中 10 例（約 80%）に見られ、平均して約 1.3 倍の増強を確認した。

現在、市販大腸癌細胞株および臨床検体から得られ継代可能な大腸癌細胞を SCID-beige マウ

スおよびヌードマウスに接種し、HLA-F 陽性細胞株の作製と、HLA-F ブロッキング効果検証のためのマウスモデルの作製を行っている。マウスモデルができ次第、in vivo における解析を行っていく予定である。

(3) 考察

HLA-F が脳、咽頭、肝臓がんなどに発現し、腫瘍悪性度、予後と関連するという報告が増えつつある。申請者らも大腸癌において、HLA-F が腫瘍の 90% に発現し、さらに悪性度の高い低分化大腸癌に 100% 発現することを確認した。この結果は、HLA-F が新規の悪性腫瘍診断法に有用であることを示唆するものと考えられる。さらに再発の予測にもつながる結果を得ており、今後、症例数を増やして、再発リスクとの関連を詳細に解析する。その他の臨床情報との関連も継続して解析し、HLA-F が腫瘍診断のあらゆる指標に有用であるか、検証していく予定である。

大腸癌臨床検体の分散細胞を用いて HLA-F のブロッキング効果を検証した結果、13 例中 10 例(約 80%)に IFN- γ 産生増強効果が見られた一方、実際の臨床検体では 26 例中 9 例(約 35%)にしか HLA-F 陽性腫瘍細胞を検出できなかった。HLA-F ブロッキング効果と腫瘍細胞における HLA-F の発現に乖離が見られることから、HLA-F ブロッキング効果の機序を解明するとともに、やはり腫瘍細胞上の HLA-F の発現機構の解明が必須であると考えられた。

今後は、臨床検体の症例数を増やし、HLA-F の腫瘍マーカー、予後予測マーカーとしての精度を検証するとともに、腫瘍細胞における HLA-F の発現機構およびその意義を明らかにする。またマウスモデルを作成し、HLA-F ブロッキング効果の機序の検討を継続して行い、HLA-F を標的とした新規がん免疫療法ならびにがん診断マーカー開発につなげる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kira Tsutomu, Akahane Manabu, Ouji-Sageshima Noriko, Shimizu Takamasa, Onishi Tadanobu, Omokawa Shohei, Ito Toshihiro, Tanaka Yasuhito	4. 巻 27
2. 論文標題 Osteogenesis of osteogenic matrix cell sheets preserved in culture medium in a rat model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 1281 ~ 1288
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0963689718786233	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Imakita Natsuko, Kitabatake Masahiro, Ouji-Sageshima Noriko, Hara Atsushi, Morita-Takemura Shoko, Kasahara Kei, Matsukawa Akihiro, Wanaka Akio, Mikasa Keiichi, Ito Toshihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Abrogated Caveolin-1 expression via histone modification enzyme Setdb2 regulates brain edema in a mouse model of influenza-associated encephalopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-36489-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Terada-Ikeda Chiyoko, Kitabatake Masahiro, Hiraku Akari, Kato Kumiko, Yasui Satsuki, Imakita Natsuko, Ouji-Sageshima Noriko, Iwabuchi Noriyuki, Hamada Kaoru, Ito Toshihiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Maternal supplementation with Bifidobacterium breve M-16V prevents their offspring from allergic airway inflammation accelerated by the prenatal exposure to an air pollutant aerosol	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0238923
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0238923	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sawabata Noriyoshi, Nakamura Toshitaka, Kawaguchi Takeshi, Watanabe Takashi, Ouji Noriko, Sageshima, Ito Toshihiro, Taniguchi Shigeki	4. 巻 12
2. 論文標題 Circulating tumor cells detected only after surgery for non-small cell lung cancer: is it a predictor of recurrence?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Disease	6. 最初と最後の頁 4623 ~ 4632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-86608-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitabatake Masahiro, Matsumura Yoko, O uji-Sageshima Noriko, Nishioka Tatsuki, Hara Atsushi, Kayano Shin-ichi, Ito Toshihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Persimmon-derived tannin ameliorates the pathogenesis of ulcerative colitis in a murine model through inhibition of the inflammatory response and alteration of microbiota	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-86608-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 王寺-下嶋 典子、石谷 昭子、Daniel E Geraghty、伊藤 利洋
2. 発表標題 HLA-F分子を標的とした免疫療法の開発に向けて
3. 学会等名 第28回 日本組織適合性学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriko O uji-Sageshima, Tatsuki Nishioka, Masahiro Kitabatake, Daniel. E Geraghty, Akiko Ishitani, Toshihiro Ito
2. 発表標題 HLA-F could be a specific target for both pathological diagnosis and cancer immunotherapy of malignant colon cancer
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriko O uji-sageshima, Akiko Ishitani, Daniel E Geraghty, Natsuko Imakita, Shota Sonobe, Masahiro Kitabatake, Toshihiro Ito
2. 発表標題 Enhanced expression of HLA-F is critically related with tumor malignancy
3. 学会等名 The 47th Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 王寺(下嶋)典子、石谷昭子、Daniel E Geraghty、伊藤利洋
2. 発表標題 悪性腫瘍におけるHLA-F発現について
3. 学会等名 第16回日本組織適合性学会近畿地方会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊藤 利洋 (Ito Toshihiro) (00595712)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	計画の助言 腫瘍組織の病理診断 データ解析

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------