

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07742

研究課題名(和文) HMGB1の抗腫瘍免疫における機能解明とがん免疫療法への応用

研究課題名(英文) Role of HMGB1 on anti-tumor immunity and its application for cancer immunotherapy

研究代表者

山田 亮 (Yamada, Akira)

久留米大学・付置研究所・教授

研究者番号：50158177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：HMGB1は細胞死により核内から細胞外へ放出されるダメージ関連分子パターンであるが抗腫瘍免疫における役割は明確ではなかった。本研究では、ゲノム編集によりHMGB1欠損マウス腫瘍株を樹立し、抗腫瘍免疫における役割を検討した。HMGB1欠損株は野生株に比べ腫瘍形成が抑制され、この増殖抑制は宿主のCD8T細胞によることが判明した。HMGB1欠損株ではT細胞や樹状細胞の腫瘍内浸潤が亢進していることから、腫瘍由来HMGB1は腫瘍組織内への免疫細胞の浸潤を抑制することにより細胞傷害性T細胞を介した抗腫瘍免疫を抑制していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害療法は今やがんの主たる治療法の一つとなった。しかしながら、がん微小環境中には種々の免疫阻害因子が存在することから未だ十分な治療成績が得られず、他の治療法との複合療法が模索されている。本研究ではがん細胞に由来するHMGB1が抗腫瘍免疫に抑制的に作用し、HMGB1を阻害することにより抗腫瘍免疫が増強されることを示した。このことは、免疫チェックポイント阻害剤やがんワクチン等の免疫療法へのHMGB1阻害療法の応用可能性を示唆するものであり、今後のがん治療に大いに貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：HMGB1 has been reported as a damage-associated molecular pattern (DAMP) molecule that is released from damaged or dead cells and induces inflammation and subsequent innate immunity. However, the role of HMGB1 in the anti-tumor immunity is unclear. In the present study, we established HMGB1-knockout clones from murine tumors by genome editing and investigated the role of HMGB1 in anti-tumor immunity. We found that 1) knockout of HMGB1 in the tumor cells suppressed in vivo tumor growth, 2) the suppression was mediated by CD8 T cells, and 3) infiltration of T cells and dendritic cells into the tumor tissues was accelerated in HMGB1-knockout tumors. These results suggested that HMGB1 act as negative role in anti-tumor immunity through the inhibition of immune cell infiltration to the tumor microenvironment.

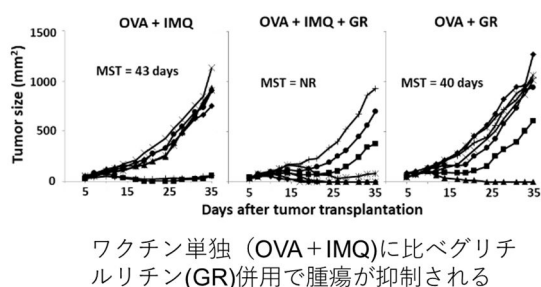
研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：HMGB1 ゲノム編集 腫瘍免疫 免疫療法 ダメージ関連分子パターン 腫瘍微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

HMGB1 (High mobility group box 1)は細胞死により核内から細胞外へ放出される内因性危険シグナルであり、ダメージ関連分子パターン (DAMPs) もしくは alarmin と呼ばれる分子ファミリーに属する。HMGB1 は炎症を誘導するとともに TLR2 や TLR4、あるいは RAGE を介して自然免疫を惹起することが知られている。一方で免疫チェックポイント分子である TIM-3 への結合を介して免疫抑制に働くことも報告されている。

申請者らは OVA ペプチド抗原を用いたマウスのモデル実験系において HMGB1 の選択的阻害剤であるグリチルリチンを抗原ペプチド及びアジュバントとともに皮下投与すると、抗原特異的 CTL 誘導が増強されること、この増強効果は CpG やリピッド A 等の TLR 作動性アジュバントと併用した場合にのみ観察されることを示した。さらに EG.7 皮下移植腫瘍を用いた治療ワクチンのモデル実験系においてもグリチルリチンにより腫瘍増殖が抑制されること、グリチルリチン以外の HMGB1 阻害剤 (gabexate, nafamostat, sivelestat) においても同様の効果が得られることを示した (Waki and Yamada, *Cancer Sci*, 2016)。



末梢血中の HMGB1 レベルはがんを含む種々の疾患において上昇していることが報告されている。大腸がん、膀胱がんや肝細胞癌等においては進展や悪性度と相関する一方で、食道がんや胃がん等では予後良好マーカーであるとの報告もあり、統一見解は得られていない。申請者らは再発卵巣がん患者において、がんペプチドワクチン療法により末梢血中 HMGB1 レベルが低下し、この変動は末梢血中のミエロイド由来抑制性細胞 (MDSC) の減少と相関することを見出した (Waki et al. *J Immunol Res*, 2017)。

申請者らの以上の研究結果からは HMGB1 が免疫抑制的に作用することが予想されが、一方で、TLR2 や TLR4、あるいは RAGE を介した自然免疫の惹起は、樹状細胞等の抗原提示細胞の活性化とそれに続く特異免疫応答の誘導に重要であると考えられており、「HMGB1 が抗腫瘍免疫において善玉なのか？あるいは悪玉なのか？」は明確ではなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、「HMGB1 が抗腫瘍免疫において善玉なのか？あるいは悪玉なのか？」の問いに対し明確な回答を得るとともに、その成果をがん免疫療法へ応用することである。

HMGB1 は自己免疫疾患や間質性肺炎、敗血症、虚血性再環流等で研究がなされており、がん領域においても多くの研究がなされている。HMGB1 は核内において DNA シャペロンとして働き、核の恒常性維持やゲノムの安定化に寄与しており、また、がんの細胞死に伴い放出された HMGB1 は腫瘍微小環境中でエネルギー代謝の変化をもたらす ATP 産生の増加及びがん細胞の増殖に寄与することが報告されている。HMGB1 の末梢血中濃度とがんの悪性度や進展に関する研究も多数なされている。一方で、抗腫瘍免疫系に関する研究はきわめて限定的である。上述の申請者らの HMGB1 阻害剤による抗腫瘍免疫の増強や、マクロファージ由来樹状細胞のアポトーシス誘導、抑制性 T 細胞 (Treg) を介した CTL 抑制、腫瘍組織内へのマクロファージ浸潤と血管新生への作用など HMGB1 のネガティブな効果に関する報告がある一方で、抗がん剤や放射線照射により誘導される免疫原性細胞死における重要性等ポジティブな効果も示唆されており、抗腫瘍免疫にお

ける HMGB1 の評価は定まっていない。

本研究では、HMGB1 過剰発現及びノックアウト腫瘍細胞を用いて免疫関連サイトカインやケモカイン、チェックポイント分子の発現等に及ぼす HMGB1 の作用を調べるとともに、これらの細胞株をマウスに移植し、in vivo で誘導される免疫応答の違いを解析する。さらに HMGB1 阻害剤を用いて同様の効果が得られるかを確認する。

申請者らは、がん抗原の遺伝子クローニング・エピトープ同定・動物実験等からがんペプチドワクチン療法の臨床試験に至るまで、20 年以上にわたりがんワクチン療法の実地医療への実用化を目指し基礎及び臨床研究を行っている。本研究においてもこの独自路線上で研究を進め、次世代複合免疫療法の開発を目指していく。

現在、Treg や MDSC 等を阻害する薬剤の開発が世界中で行われているが、腫瘍から放出される HMGB1 を制御することにより腫瘍微小環境を修飾し、腫瘍特異免疫応答を増強しようとする取り組みは独創的といえよう。

### 3. 研究の方法

#### (1) HMGB1 ノックアウト腫瘍細胞株の作製と in vitro 性状解析

Origene社のKN2.0 non-homology-mediated CRISPR knockout Kitを用いたゲノム編集によりマウス腫瘍細胞株 (B16F10、CT26) よりHMGB1ノックアウト (HMGB1-KO) 株を樹立した。ノックアウトの確認は、ウエスタンブロットングによりタンパク質レベルで行った。in vitroでの細胞増殖はcell counting kit-8を、グルコース代謝はGlucose Assay Kit-WSTを用いて測定した。ノックアウト細胞へのHMGB1遺伝子の再導入はレンチウイルスシステムを用いて行った。

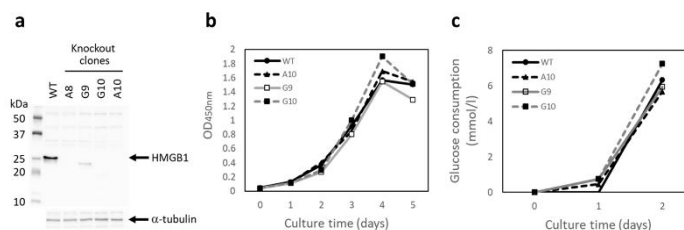
#### (2) 皮下移植モデルにおける解析

HMGB1-KOもしくは野生株をB6マウスに皮下移植し、腫瘍増殖を測定した。腫瘍増殖に及ぼす免疫細胞の関与についてはヌードマウス及び抗体 (CD4、CD8、CD25) 投与により特定のT細胞サブセットを除去したマウスを用いて解析した。腫瘍組織におけるがん免疫関連遺伝子発現の網羅的解析はNanoString社のPanCancer Mouse Immune Profiling panelと nCounter digital analyzerを用いて解析した。ホルマリン固定標本の免疫組織化学染色にはCD4、CD8、F4/80、CD11c、およびFoxp3抗体を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) HMGB1の腫瘍細胞に対する作用

In vitroの細胞増殖スピードはHMGB1ノックアウト (HMGB1-KO) 株と野生株の間で差はみられなかった。グルコース代謝についても検討したが、両者の間で差は見られなかつ



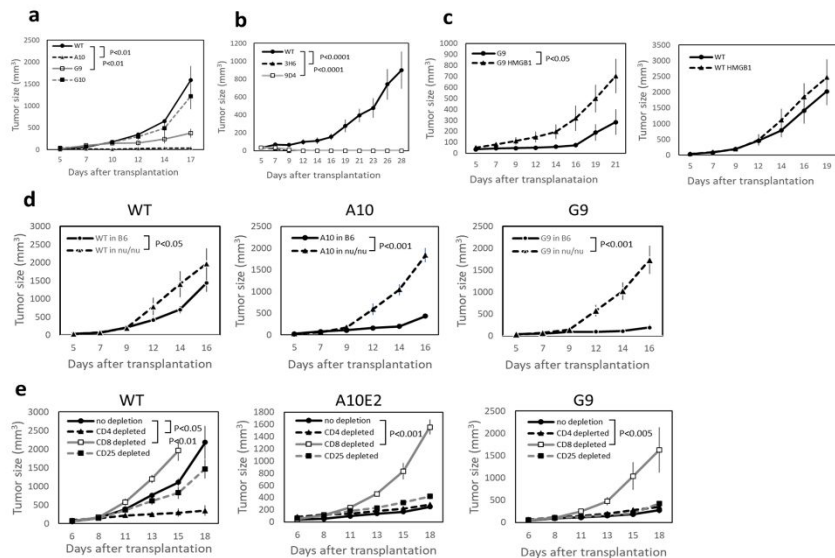
a) ウエスタンブロットング、b) in vitro 細胞増殖、c) グルコース消費

た。位相差顕微鏡による観察でも形態学的な差はなかった。

#### (2) 皮下移植モデルにおける解析

##### HMGB1 ノックアウトによる腫瘍増殖の抑制

メラノーマ細胞 B16F10細胞より作製した2つの HMGB1-KO細胞クローンおよび野生株を B6 マウスに皮下移植し、経時的に腫瘍サイズを測定した。その結果、野生株に比べ、HMGB1-KO株では腫瘍増殖が著明に抑制された。HMGB1-KO細胞で

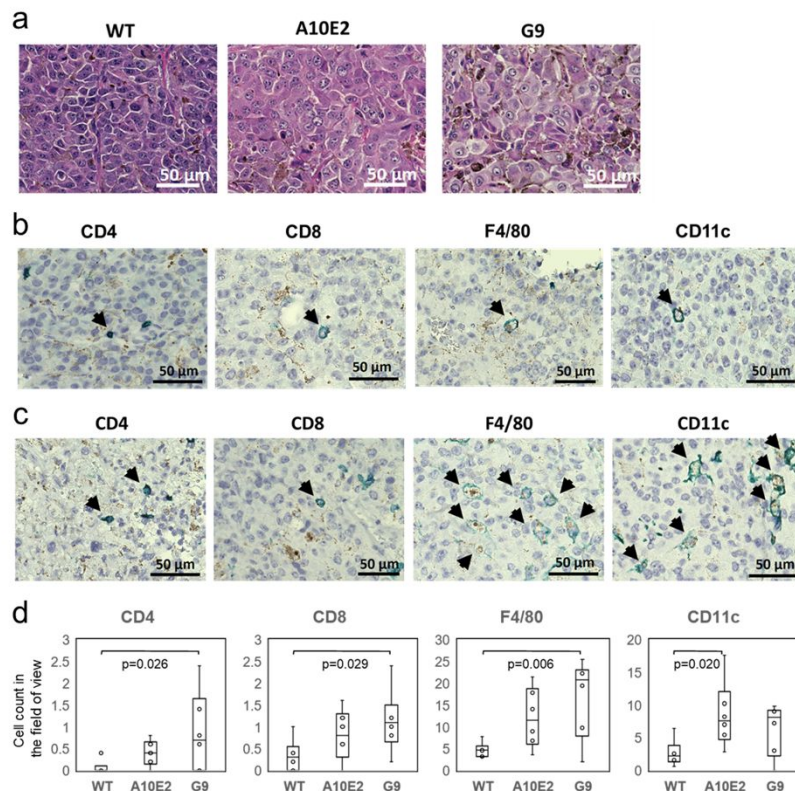


a) B16F10 細胞由来 HMGB1-KO と野生型 (WT) の *in vivo* 腫瘍増殖、b) CT26 由来 HMGB1-KO と WT の腫瘍増殖、c) HMGB1 再発現による抑制解除、d) ノードマウスにおける腫瘍増殖、e) T 細胞サブセット除去マウスにおける腫瘍増殖

みられた増殖抑制はHMGB1遺伝子の再導入により解除された。大腸がん細胞CT26細胞より異なるガイドRNAを使用して作製したHMGB1-KOクローンにおいても同様の増殖抑制が認められたことから、オフターゲット作用の可能性が否定された。

#### 増殖抑制に関与する細胞集団の解析

HMGB1-KOもしくは野生株を胸腺の欠損するノードマウスに皮下移植したところ、B6マウスで見られたMGB1-KO細胞の増殖抑制は解除された。このことより、HMGB1-KOによる腫瘍増殖抑制には宿主のT細胞が関与していることが示された。そこで、抗体投与によりT細胞サブセットを除去したマウスを用



いてHMGB1-KO細胞株および野生株の腫瘍増殖能を検討した。その結果、CD8細胞除去マウスでHMGB1-KOによる腫瘍増殖抑制が解除された。これらのことより、HMGB1はCD8陽性T細胞、すなわち細胞傷害性T細胞(CTL)を抑制することにより腫瘍増殖に促進的に作用していることが示された。

#### 腫瘍組織における遺伝子発現の網羅的解析

B6マウスに皮下移植14日後の腫瘍組織におけるがん関連遺伝子750個の発現解析を行った



ところ、野生型に比べHMGB1-KO株で10倍以上発現が亢進していたものが28遺伝子、5倍以上が130遺伝子であり、マクロファージやT細胞の腫瘍内浸潤を示唆するものであった。またケモカインリガンドの発現が増強していた。がん免疫関連遺伝子の発現解析では抗腫瘍免疫にポジティブに関与する遺伝子発現の増強がHMGB1-KO株組織で認められた。これらのことより抗腫瘍免疫関連細胞の腫瘍組織へ浸潤ならびに活性化が示唆された。

### 腫瘍組織における免疫関連細胞の浸潤

免疫組織化学染色の結果、野生型(b)に比べHMGB1-KO株(c)ではF4/80マクロファージ及びCD11c樹状細胞の浸潤の著明な増加が認められた。

また、CD4およびCD8T細胞の腫瘍内浸潤も増加していた。一方、Foxp3制御性T細胞の浸潤は野生型、HMGB1-KO株のいずれにおいてもわずかであった。

### HMGB1-KO株共存による野生株の増殖抑制

HMGB1-KO株と野生株を混合して移植したところ、同数の野生株を移植した場合に比べ腫瘍増殖の抑制が認められた。次に、HMGB1-KO株と野生株を同一個体の異なる部位に別々に移植した。その結果、野生株の増殖は、HMGB1-KO株異所移植により抑制された。

### (3) まとめと考察

本研究により、がん細胞死に伴い腫瘍

微小環境中に放出されるHMGB1がCD8陽性CTLを介した抗腫瘍免疫応答を抑制していることが明らかとなった。HMGB1ノックアウトにより腫瘍組織内への免疫細胞の浸潤、特に樹状細胞とマクロファージの浸潤が増加したことから、HMGB1は腫瘍内への免疫細胞の浸潤抑制によりその後の抗腫瘍免疫応答を抑制していることが判明した。このことは、免疫細胞の腫瘍内浸潤の乏しい“Cold tumor”であってもHMGB1を抑制することにより“Hot tumor”へと変換できる可能性を示唆している。

### (4) 国内外における位置づけとインパクト

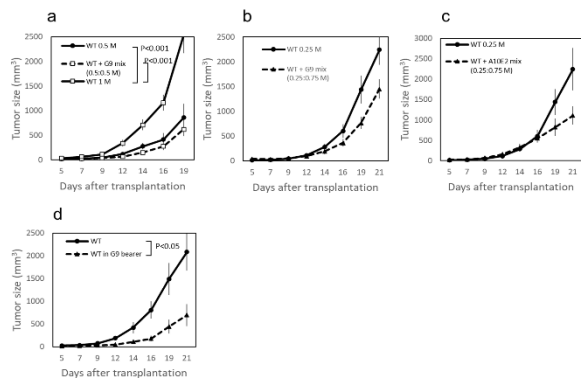
HMGB1抑制剤やsiRNAを用いた間接的研究は従来からなされていたが、本研究ではゲノム編集によりダイレクトなエビデンスを示すことができ、臨床応用への可能性も示された。

### (5) 今後の展望

腫瘍微小環境中のHMGB1を抑制することにより、“Cold tumor”から“Hot tumor”へと変換できる可能性が示唆されたことより、免疫チェックポイント阻害剤やがんワクチン等の免疫療法と併用することにより、免疫療法の臨床効果を向上させることが期待される。

Expression of anti-tumor immunity-related genes

Protein/gene	Expression index (Clone/WT)		Expected expressing cells
	G9	A10E2	
<b>Negatively associated</b>			
Arg-1	5.7	2.2	MDSC
TGF-β1	2.3	1.7	Treg, MDSC
IDO1	1.4	0.9	MDSC
Foxp3	1.3	1.2	Treg
IL-10	1.2	0.8	Treg
<b>Positively associated</b>			
Perforin 1	5.9	2.7	CTL, NK
CD8α	5.5	1.5	CTL, NK
IFN-γ	3.1	1.7	CTL
CD8β	3.1	1.2	CTL



a) ◯ HMGB1-KO株と野生株を混合移植、d) HMGB1-KO株と野生株を同一個体の異なる部位に別々に移植

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yokomizo Kanako, Waki Kayoko, Ozawa Miyako, Yamamoto Keiko, Ogasawara Sachiko, Yano Hirohisa, Yamada Akira	4. 巻 39
2. 論文標題 Knockout of high-mobility group box 1 in B16F10 melanoma cells induced host immunity-mediated suppression of in vivo tumor growth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Oncology	6. 最初と最後の頁 58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12032-022-01659-2	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横溝香奈子、和氣加容子、山田 亮
2. 発表標題 Role of tumor-derived high-mobility group box 1 (HMGB1) on anti-tumor immunity
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横溝香奈子、和氣加容子、山田 亮
2. 発表標題 腫瘍由来ダメージ関連分子パターンHMGB1の抗腫瘍免疫における役割
3. 学会等名 日本がん免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横溝香奈子、和氣加容子、山田 亮
2. 発表標題 腫瘍由来ダメージ関連分子パターンHMGB1の抗腫瘍免疫における役割
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2021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	和氣 加容子  (Waki Kayoko)  (40649597)	久留米大学・付置研究所・講師    (37104)	

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
---------	---------