

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16308

研究課題名(和文) 胃癌における新規免疫チェックポイント機構NKG2A/HLA-Eの制御因子の解析

研究課題名(英文) Analysis of regulatory mechanism of NKG2A / HLA-E pathway in gastric cancer

研究代表者

山下 晃平 (Yamashita, Kohei)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員

研究者番号：00867202

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)：新規免疫チェックポイント機構のNKG2A/HLA-E経路は、がんの免疫逃避に関与することが報告されている。この経路の阻害により、NK細胞やT細胞の再活性化が促され抗腫瘍効果を示すことから、様々ながん種で新規免疫治療標的として期待されている。

本研究では、胃癌のHLA-E高発現、NK細胞の低浸潤が胃癌患者の予後不良因子であることが明らかとなった。また、胃癌細胞のHLA-E発現がIFNの刺激で上昇し、その後、がん細胞膜表面から切断され、可溶性HLA-Eとなることがわかった。さらに、胃癌患者の血中の可溶性HLA-E濃度が胃癌ステージの進行に伴い上昇することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行胃癌は依然として予後不良であり、新たな治療標的やバイオマーカーの創出が急務である。本研究により、胃癌のHLA-E発現及びNK細胞浸潤のバイオマーカーとしての意義が明らかとなり、NKG2A/HLA-Eを治療標的とした創薬の展望が開けた。また、胃癌細胞のHLA-E発現がダイナミックに変化する制御機構が明らかとなり、その結果生成される可溶性HLA-Eを血液検査での低侵襲なリキッドバイオプシーとして利用することで、がんの早期発見、がん治療の効果の評価、がん再発の早期発見につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The NKG2A / HLA-E pathway of the novel immune checkpoint machinery has been reported to be involved in cancer immune escape. Inhibition of this pathway can promote reactivation of NK cells and T cells and exhibits antitumor effects, which is considered a promising immunotherapeutic target in various types of cancer.

In this study, it was demonstrated that high expression of HLA-E and low invasion of NK cells in local tumor site had a poor prognosis in patients with gastric cancer. Moreover, it was also clarified the regulation mechanism of HLA-E, in which HLA-E expression in gastric cancer cell was upregulated by IFN stimulation and then cleaved from the cell surface, results in the production of soluble HLA-E. Finally, it was revealed that the soluble HLA-E concentration in the blood of gastric cancer patients increases as the gastric cancer stage progresses.

研究分野：腫瘍生物学、消化器外科学

キーワード：胃癌 NK細胞 HLA-E 可溶性HLA-E

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進行胃癌は依然として予後不良であり、新たな治療標的やバイオマーカーの創出が急務である。本邦の胃癌診療において、PD-1 阻害剤である Nivolumab が臨床応用されるに至ったが、単剤での奏効率は依然として 10%程度に留まっており、新規免疫チェックポイント阻害剤の開発、免疫チェックポイント阻害剤の併用療法、既存の抗腫瘍薬との併用療法が検討されている。NKG2A/HLA-E 経路は、主に NK 細胞の活性化を制御する免疫チェックポイント機構で、この経路を標的とした anti-NKG2A 抗体(Monalizumab)の前臨床段階での抗腫瘍効果が報告されたが、胃癌についての報告はまだない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規免疫チェックポイント機構である NKG2A/HLA-E に注目し、胃癌の抗腫瘍免疫応答における NKG2A/HLA-E の発現やその制御に関わる分子メカニズムを明らかにする事である。

3. 研究の方法

(1) 胃癌切除検体を用いた HLA-E 及び腫瘍浸潤 NK 細胞の評価と臨床病理学的因子/予後解析

胃癌切除検体 232 例を用い、HLA-E の免疫組織染色を行い、染色強度と染色エリアにより HLA-E の発現の半定量評価を行う。また同時に CD56 及び CD3 の二重免疫組織染色を行い、CD56 陽性/CD3 陰性の腫瘍浸潤 NK 細胞を半定量評価する。これら HLA-E 発現と腫瘍浸潤 NK 細胞と胃癌患者の臨床病理学的因子や予後との相関についての統合解析を行う。

(2) in vitro での NKG2A 及び HLA-E の発現変化と発現制御の分子メカニズムの同定

胃癌細胞株と NK 細胞との共培養による HLA-E の発現変化の確認

HLA-E 高発現の胃癌細胞株 NUGC4、KATOIII とヒト末梢血単核細胞(PBMC)から分離した NK 細胞と共培養し、HLA-E 発現の経時的変化を観察する。

発現変化に応じた HLA-E 制御の分子メカニズムの解明

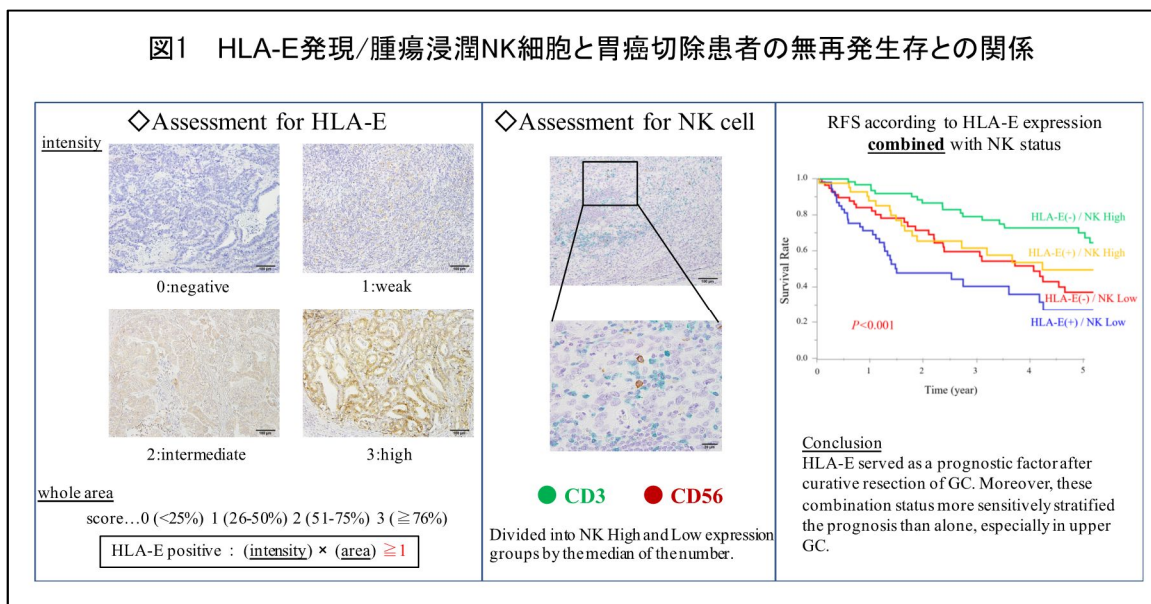
胃癌患者の血液を用いたリキッドバイオプシーの検討

4. 研究成果

(1) 胃癌切除検体を用いた HLA-E 及び腫瘍浸潤 NK 細胞の評価と臨床病理学的因子/予後解析

対象症例 232 例のうち、HLA-E 陽性例は 104 例(41.3%)、112 例(48.2%)を NK 細胞高浸潤に分類された。HLA-E 陽性と NK 細胞高浸潤例の間に相関はなかった。HLA-E 陽性群は HLA-E 陰性群と比較し、上部胃癌、分化型胃癌が有意に多かった。一方で、NK 細胞高浸潤群は NK 細胞低浸潤群と比較し、女性に多く、腫瘍マーカー低値、リンパ節転移による N ステージや腫瘍ステージが早期の症例が有意に多かった。予後解析においては、HLA-E 陽性群は HLA-E 陰性群と比較し有意に無再発生存において予後不良であることが示された。同様に腫瘍浸潤 NK 細胞が少ない群も有意に無再発生存において予後不良であった。これらを統合解析すると、HLA-E 陽性かつ NK 細胞低浸潤群は他の群と比較し有意に無再発生存において予後不良であった(図 1)。さらに、多変量解析においても、HLA-E 陽性かつ NK 細胞低浸潤群は、全生存率及び無再発生存率で独立した予後不良因子であることが示された。これらの結果から、胃癌ではじめて HLA-E 発現と NK 細胞の統合解析が予後予測のバイオマーカーとなることが示された。

図1 HLA-E発現/腫瘍浸潤NK細胞と胃癌切除患者の無再発生存との関係



(2) in vitro での NKG2A 及び HLA-E の発現変化と発現制御の分子メカニズムの同定 (図 2)

胃癌細胞株とNK細胞との共培養によるHLA-Eの発現変化の確認

HLA-E高発現の胃癌細胞株 NUGC4、KATOIII とヒト末梢血単核細胞(PBMC)から分離したNK細胞と共培養し、HLA-E発現をFlow cytometryで解析すると、細胞膜表面のHLA-E発現が経時的に上昇し、一定時間後に発現低下に転じることが判明した。

発現変化に応じたHLA-E制御の分子メカニズムの解明

先行文献に基づき、ELISA法にて胃癌細胞株とNK細胞株の共培養上清中のIFN- γ を測定すると、IFN- γ 濃度が経時的に上昇していた。リコンビナントIFN- γ (以下、rhIFN- γ)を胃癌細胞株へ曝露すると、同様のHLA-E変化が観察され、IFN- γ が胃癌細胞株のHLA-Eの制御因子のひとつであることが示唆された。

次に、胃癌細胞株のHLA-Eの発現が低下する機序を明らかとすることとした。まず、rhIFN- γ 曝露後の胃癌細胞株のHLA-EのmRNAレベルをPCR法で、細胞内HLA-Eをintracellular flow cytometry法で測定すると、いずれもHLA-Eの発現レベルは曝露により上昇し、一定時間後からの発現は維持されていた。そのため、何らかの機構により細胞膜表面上のHLA-E発現が切断され、可溶性HLA-E(以下、Soluble HLA-E)が産生されるという仮説をたてた。実際に、細胞上清中のSoluble HLA-EをELISA法にて測定すると、時間依存的にSoluble HLA-E濃度が上昇していることが判明した。これはrhIFN- γ の曝露実験でも同様であった。さらに、胃癌細胞株へのrhIFN- γ 曝露に加えて、ADAM17を阻害するTAPI-1を添加すると、培養上清中のSoluble HLA-Eの濃度が有意に低下したことから、この細胞膜表面のHLA-Eの切断にはADAM17が関与していることが示唆された。

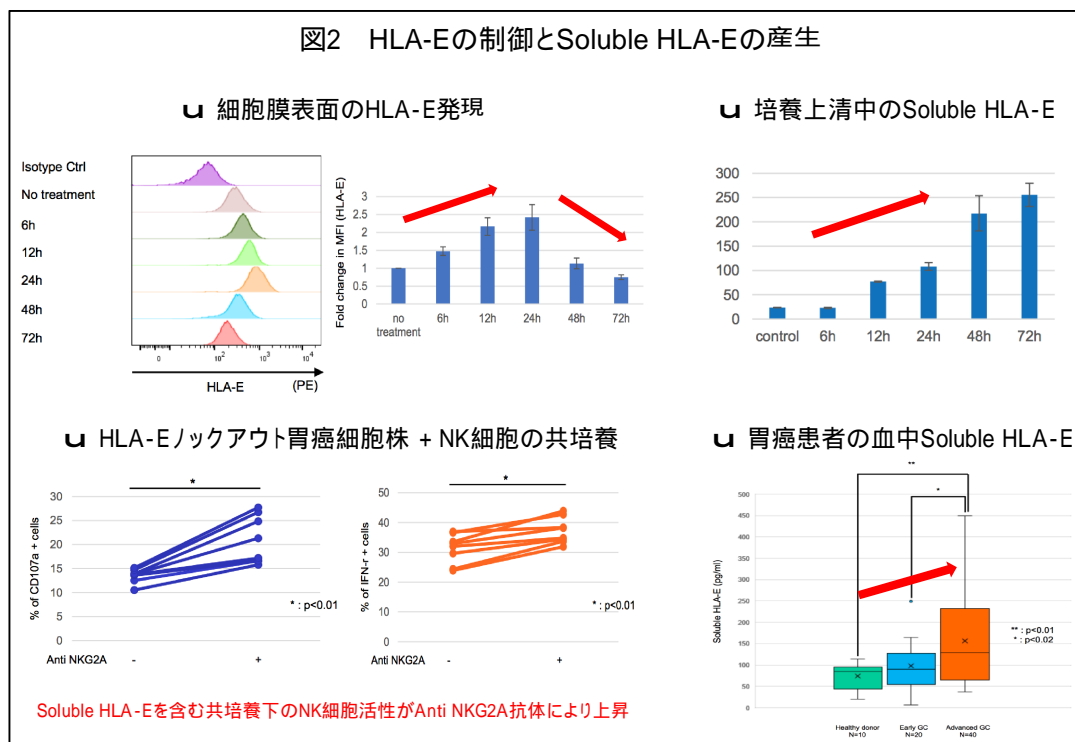
次に、このSoluble HLA-EがNK細胞活性に影響を与えるかを検討した。胃癌細胞膜表面のHLA-Eによる影響を排除し、Soluble HLA-Eのみに焦点を絞るために、CRISPR/Cas9 systemによりHLA-Eをknock outした細胞をクローニングした。このHLA-E knock out胃癌細胞株とNK細胞をSoluble HLA-Eを含むCondition mediumで共培養を行い、Anti NKG2A抗体を添加することで、NK細胞の活性化に変化が起きるかを観察した。Flow cytometryを行い、共培養中のNK細胞でNKG2A陽性細胞をゲーティングし、活性化マーカーであるCD107aやIFN- γ 産生をみると、Anti NKG2A抗体の添加によりこれらのNK細胞の活性化マーカーが上昇することがわかった。この結果より、既知のNKG2A/HLA-E経路ではなく、NKG2A/Soluble HLA-Eを介しNK細胞活性が低下し、さらにNKG2A阻害剤によりNK細胞が再活性化する可能性が示唆された。

胃癌患者の血液を用いたリキッドバイオプシーの検討

最後に、胃癌患者60例と健常ドナーの血液を用いSoluble HLA測定を行うと、健常者に比較し胃癌患者で有意にSoluble HLA-E濃度が高く、さらに早期癌と比較し進行癌でさらにSoluble HLA-E濃度が高いことがわかった。

本研究により、胃癌細胞のHLA-E発現がダイナミックに変化すること、Soluble HLA-Eを血液検査での低侵襲なリキッドバイオプシーとして利用することで、がんの早期発見、がん治療の効果の評価、がん再発の早期発見につながる可能性が示唆された。

図2 HLA-Eの制御とSoluble HLA-Eの産生



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 0件）

1. 著者名 Morinaga Takeshi, Iwatsuki Masaaki, Yamashita Kohei, Matsumoto Chihiro, Harada Kazuto, Kurashige Junji, Iwagami Shiro, Baba Yoshifumi, Yoshida Naoya, Komohara Yoshihiro, Baba Hideo	4. 巻 -
2. 論文標題 Evaluation of HLA-E Expression Combined with Natural Killer Cell Status as a Prognostic Factor for Advanced Gastric Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-022-11665-3	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森永 剛司、岩槻 政晃、山下 晃平、山根 大侍、松本 千尋、中村 健一、江藤 弘二郎、岩上 志朗、馬場 祥史、宮本 裕士、吉田 直矢、馬場 秀夫
2. 発表標題 胃癌におけるHLA-E発現の臨床病理学的意義の検討
3. 学会等名 第28回日本消化器関連学会週間/第18回日本消化器外科学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Morinaga, Masaaki Iwatsuki, Kohei Yamashita, Taishi Yamane, Tasuku Toihata, Kenichi Nakamura, Yoshifumi Baba, Shiro Iwagami, Yuji Miyamoto, Naoya Yoshida, Hideo Baba
2. 発表標題 The clinicopathological significance of HLA-E expression in advanced gastric cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Morinaga, Masaaki Iwatsuki, Kohei Yamashita, Taishi Yamane, Tasuku Toihata, Kenichi Nakamura, Yoshifumi Baba, Shiro Iwagami, Yuji Miyamoto, Naoya Yoshida, Hideo Baba
2. 発表標題 The clinicopathological significance of HLA-E and NK expression in gastric cancer
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森永 剛司、岩槻 政晃、山下 晃平、山根 大侍、松本 千尋、中村 健一、江藤 弘二郎、岩上 志朗、馬場 祥史、宮本 裕士、吉田 直矢、馬場 秀夫
2. 発表標題 The elucidation of regulatory mechanism of HLA-E expression in gastric cancer
3. 学会等名 第32回日本消化器癌発生学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森永 剛司、岩槻 政晃、山下 晃平、山根 大侍、松本 千尋、中村 健一、江藤 弘二郎、岩上 志朗、馬場 祥史、宮本 裕士、吉田 直矢、馬場 秀夫
2. 発表標題 Evaluation of HLA-E expression combined with natural killer cell status as a prognostic factor for advanced gastric cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森永 剛司、岩槻 政晃、山下 晃平、山根 大侍、松本 千尋、中村 健一、江藤 弘二郎、岩上 志朗、馬場 祥史、宮本 裕士、吉田 直矢、馬場 秀夫
2. 発表標題 胃癌におけるHLA-E発現制御機構とsoluble HLA-Eの臨床的意義の検討
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森永 剛司、岩槻 政晃、山下 晃平、山根 大侍、松本 千尋、中村 健一、江藤 弘二郎、岩上 志朗、馬場 祥史、宮本 裕士、吉田 直矢、馬場 秀夫
2. 発表標題 胃癌におけるHLA-E発現制御機構とsoluble HLA-Eの臨床的意義の検討
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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