

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07246

研究課題名（和文）免疫チェックポイント分子HLA-Fを標的とした新規がん免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel cancer immunotherapy targeting the immune checkpoint molecule, 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） 3,200,000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を免疫チェックポイント分子とらえ、これを標的とした新規がん免疫療法の開発を目指し、本研究を行った。
申請者は、腫瘍細胞、腫瘍浸潤リンパ球、抗HLA-F抗体を共培養するとIFN- γ 産生増強を確認している。その機序の解明のために、HLA-Fを発現する患者由来大腸癌細胞の確立、マウスモデルの作製を行った。その結果、HLA-F陽性の患者由来大腸癌細胞の担癌モデルマウスの作製には成功したが、HLA-Fブロッキング効果検証のためのヒトNK細胞を導入したマウスモデルは確立できなかった。今後は、in vitro系でHLA-Fブロッキング効果を検証する予定である。

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は幅広い種の腫瘍細胞に発現しており、腫瘍マーカーだけでなく免疫療法の新規標的分子として期待できる。

臨床検体から継代可能な患者由来大腸癌細胞を作製し、マウスモデルを作成したことで、HLA-Fが生体内においても腫瘍細胞膜表面に発現していることが明らかとなった。本研究成果は幅広い種の腫瘍細胞に発現するHLA-Fを利用したがん免疫療法の開発につながると考える。

研究成果の概要（英文）：We performed this research with the aim of developing a new cancer immunotherapy targeting HLA-F, one of the HLA class I molecules, as an immune checkpoint molecule. We have already detected that IFN- γ production is enhanced, when tumor cells, tumor-infiltrating lymphocytes, and anti-HLA-F antibodies were co-cultured. To elucidate the mechanism, we established patient-derived colon cancer cells expressing HLA-F and produced a mouse model. As a result, although we succeeded in producing a tumor-bearing model mouse using HLA-F-positive patient-derived colon cancer cells, we were unable to establish a mouse model transfected with human NK cells to verify the HLA-F blocking effect. In the future, we plan to verify the HLA-F blocking effect in an in vitro system.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：HLA-F immunotherapy PDX SCID SCID-beige tumor

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

PD-1/PD-L1 を標的とする免疫チェックポイント阻害薬が保険適用となり、悪性黒色腫、肺がん、胃がんなど免疫チェックポイント阻害薬が適用可能ながんに対しては、一定の効果が得られている。しかし未だ、全てのがん、全ての患者に適用されておらず、その治療効果を精度高く予測するマーカーや、新たな標的分子の探索は必須である。

近年、新規免疫チェックポイント分子として、NK 細胞レセプターの Killer inhibitory receptor (KIR) が注目されている。KIR には抑制型と活性型があるが、新規免疫チェックポイント分子として注目されているのは抑制性 KIR であり、NK 細胞、T 細胞に発現している。主に HLA クラス I 分子と結合し、SHP-2 を介した脱リン酸化により細胞傷害活性を抑制する (J Immunol, 170:4539, 2003)。このうち KIR3DL2 は日本人の 99% が保有しており、非古典的 HLA クラス I 分子の HLA-F をリガンドとする (Geraghty et al., J Immunol, 2013)。

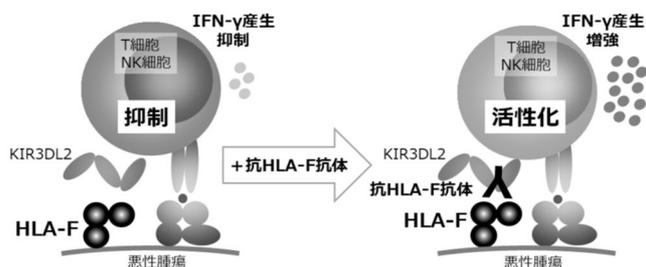
HLA-F は非古典的 HLA クラス I 遺伝子であり、(Geraghty DE et al., J Exp Med, 1989) 多型性に乏しいことが知られている。申請者は HLA-F 遺伝子を発見した Geraghty 博士らと共に、HLA-F の発現解析を行い、正常組織においては胎盤に特異的に発現すること (Sageshima N, Geraghty DE et al., J Immunol, 2003)、腫瘍においては甲状腺未分化癌などの未分化・低分化癌に HLA-F が強く発現し、大腸癌においては腫瘍悪性度に伴い発現増強すること (基盤 C、2015-2017、代表) 臨床検体 (大腸癌) のフローサイトメトリー解析により、HLA-F 陽性の腫瘍細胞集団が存在することを見だしている (基盤 C、2018-2020、代表)。さらにこの大腸癌組織の分散細胞 (腫瘍細胞、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を含む) に、抗 HLA-F 抗体を添加し、HLA-F をブロックしたところ、IFN- γ および Granzyme B の産生が増強を確認した。

この結果から HLA-F は、大腸癌組織においてキラー T 細胞の活性化と細胞傷害活性を抑制する新規免疫チェックポイント分子であることが示唆された。

2. 研究の目的

申請者は、抗 HLA-F 抗体添加による HLA-F のブロック効果は右図に示す HLA-F/KIR3DL2 を介した T 細胞および NK 細胞の抑制が解除された結果と考えている。

HLA-F を免疫チェックポイント分子としてとらえ、新規がん免疫療法を開発するには、「HLA-F は免疫チェックポイント分子であるか」「HLA-F を標的分子としたがん免疫療法は有効か」、正確に評価する必要がある。そこで本研究課題では、HLA-F を標的分子とした新規がん免疫療法の実用化に向けた基礎研究として、「HLA-F を介した腫瘍免疫抑制機構」および「HLA-F ブロッキングによる抗腫瘍効果の機序」を in vitro および in vivo で解析することを本研究の目的とした。



3. 研究の方法

患者由来大腸癌細胞の確立

市販の大腸癌細胞株 (Caco2、WiDr、Colo205、Colo201、HT-29、LoVo、DLD-1) には細胞膜表面に HLA-F の発現を見出せなかったが、臨床検体 (大腸癌) に HLA-F 陽性の腫瘍細胞集団が存在することを確認していたので、臨床検体から HLA-F を発現する大腸癌細胞を分離し、継代培養が可能な患者由来大腸癌細胞を確立した。すでに患者背景の異なる 3 種の患者由来大腸癌細胞を所有していたが、同様の方法で患者背景の異なる患者由来大腸癌細胞の追加作製を試みた。併せて、in vivo での使用を目指し、SCID マウスおよび SCID-beige マウスに皮下接種して馴化を行った。

患者由来大腸癌細胞を用いた in vivo モデルの作製

で作成した患者由来大腸癌細胞のうち、マウス馴化に成功した患者由来大腸癌細胞を、SCID マウスおよび SCID-beige マウスに皮下接種し、腫瘍を形成させた。このマウスモデルに抗 HLA-F 抗体を腹腔内投与し、抗腫瘍効果を検証した。さらに、ヒト末梢血より NK 細胞を分離し (奈良県立医科大学医の倫理委員会承認済み、No. 3565) 皮下腫瘍部位に接種して、抗 HLA-F 抗体の抗腫瘍効果および作用機序解析を可能とするマウスモデルの作製を試みた。

患者由来大腸癌細胞を用いた in vitro 実験系の確立

HLA-F と KIR3DL2 の相互作用の詳細な解析のため、患者由来大腸癌細胞を用いた in vitro 実験系の確立を検討した。得た HLA-F 陽性の患者由来大腸癌細胞をターゲット細胞とした。エフェクター細胞には KIR3DL2 陽性あるいは陰性の NK 細胞株、あるいは T 細胞株を用

いた。また健常人末梢血から採取したNK細胞、T細胞もエフェクター細胞として使用した(奈良県立医科大学医の倫理委員会承認済み、No. 3565)。これらのターゲット細胞およびエフェクター細胞を共培養し、ここに抗HLA-F抗体を添加してHLA-Fブロッキング効果を検証した。評価項目として、エフェクター細胞からのIFN- γ 、Granzym B産生およびターゲット細胞である患者由来大腸癌細胞の増殖などを検討した。

4. 研究成果

患者由来大腸癌細胞の確立

手術摘出標本を酵素処理することで継代可能な患者由来大腸癌細胞を得た。最終的に6種の患者由来大腸癌細胞を作製することができ、これらはいずれもHLA-Fを細胞膜表面に発現していることを確認した(右図)。さらに、*in vivo*での研究に使用するため、SCIDマウスおよびSCID-beigeマウスに皮下接種して馴化を行い、6種のうち5種がSCIDマウスおよびSCID-beigeマウスに腫瘍塊を形成することを確認した。

患者由来大腸癌細胞を用いた*in vivo*モデルの作製

SCIDマウスおよびSCID-beigeマウスに馴化させた患者由来大腸癌細胞を用いて、患者由来大腸癌マウスモデルを作成した。これらの腫瘍を回収し、フローサイトメトリーにてHLA-Fの発現を検討したところ、マウスモデルにおいても患者由来大腸癌細胞の細胞膜表面にHLA-Fが発現していることを確認した。使用した患者由来大腸癌細胞の元来の腫瘍悪性度は悪性度の低い高分化から、悪性度の高い低分化ものまで様々であったが、形成された腫瘍塊を回収し病理学的解析を行ったところ、いずれも中分化から低分化と悪性度の高い腫瘍を形成していた。また、SCIDマウスおよびSCID-beigeマウスにおける腫瘍塊の大きさ・重量は、由来患者ごとに異なる傾向が見られた。

抗体療法が癌細胞を傷害する機序の一つに抗体依存性細胞傷害があげられる。抗HLA-F抗体はマウス抗体であるため、マウスモデルにおいては、マウスNK細胞と腫瘍細胞上の抗HLA-F抗体が作用することで、抗体依存性細胞傷害(ADCC)による腫瘍細胞の増殖抑制効果の検証が期待できる。そこで、SCIDマウスおよびSCID-beigeマウスに両方に同程度生着する患者由来大腸癌細胞を用いて、*in vivo*モデルの解析を進めた。

SCIDマウス(T細胞/B細胞なし、NK細胞のみ)とSCID-beigeマウス(T細胞/B細胞なし、NK細胞機能不全)のそれぞれの患者由来大腸癌マウスモデルに抗HLA-F抗体およびアイソタイプコントロール抗体を腹腔内投与し、腫瘍縮小効果を比較した。その結果、患者由来大腸癌細胞SCIDモデルにおいて、抗HLA-F抗体投与による腫瘍縮小効果を確認した。また、SCID-beigeよりもSCIDマウスにおいて腫瘍縮小効果が高いことから、この効果がADCC活性によると推測された。さらに、この結果は、生体内においても患者由来大腸癌細胞にHLA-Fが発現していること、これに抗HLA-F抗体が作用しうることを示唆するものと考えられる。

次に、ヒト末梢血よりNK細胞を分離し、SCID-beigeマウスモデルの皮下腫瘍部位に接種して、抗HLA-F抗体の抗腫瘍効果を解析したところ、ヒトNK細胞と抗HLA-F抗体投与による腫瘍縮小効果は認められなかった。この原因の一つに、患者由来大腸癌マウスモデルの腫瘍部位に直接ヒトNK細胞を接種しても、ヒトNK細胞は腫瘍部位に長く生着していないことが考えられ、*in vivo*における抗HLA-F抗体の作用機序解析は困難と判断した。今後、抗HLA-F抗体投与によるNK細胞の再活性化については、*in vitro*の解析を中心に検討することとした。

患者由来大腸癌細胞を用いた*in vitro*実験系の確立

当初、エフェクター細胞として市販のNK細胞株、T細胞株を使用し、*in vitro*実験系の確立を試みたが、HLA-FのレセプターであるKIR3DL2を高発現する市販の細胞株が少なく、最もKIR3DL2を高発現するTALL104は増殖が遅く、市販のNK細胞株、T細胞株は、*in vitro*解析には適していないと判断した。そのため、ヒト末梢血NK細胞を使用して、抗HLA-F抗体の腫瘍縮小・増殖抑制の作用機序を解析することとした。ヒト末梢血リンパ球中にNK細胞は10%程度しかないため、可能な限り少ない細胞数で腫瘍増殖抑制を検討できる実験系として、リアルタイム細胞アナライザー法(Realtime cell analyzer, RTCA法)を使用して検証することとし、現在、解析条件を検証中である。

考察

臨床検体などの解析から、HLA-Fが大腸癌細胞に発現していることが明らかであり、患者由来大腸癌モデルマウスにおいても、大腸癌細胞膜表面にHLA-Fが発現していることを確認できたことから、HLA-Fは免疫療法の有用な新規標的分子となりうると思われる。一方で、腫瘍組織分散細胞(腫瘍と腫瘍浸潤リンパ球含む)に抗HLA-F抗体を添加することによりIFN- γ 、Granzym B産生が増強された機序について、これを模擬する実験系が確立できず、その機序を解明できていない。今後は、特に抗HLA-F抗体投与による腫瘍縮小効果ならびに抗腫瘍効果増強の機序を中心に解析を続けていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Noriko O uji-Sageshima, Masahiro Kitabatake, Satoki Fushimi, Satoshi Suzuki, Yuzu Fukui, Ryutaro Furukawa and Toshihiro Ito	4. 巻 68
2. 論文標題 Lipopolysaccharide from Yoshino cedar trees (<i>Cryptomeria japonica</i>) induces high levels of human macrophage polarization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Wood Science	6. 最初と最後の頁 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Sawabata Noriyoshi, Kawaguchi Takeshi, Watanabe Takashi, Yohikawa Daiki, O uji-Sageshima Noriko, Ito Toshihiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Pure Solid Pattern of Non-Small Cell Lung Cancer and Clustered Circulating Tumor Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4514 ~ 4514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14184514	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, O uji-Sageshima Noriko, Sonobe Shota, Furukawa Ryutaro, Konda Makiko, Hara Atsushi, Aoki Hiroyasu, Suzuki Yuki, Imakita Natsuko, Nakano Akiyo, Fujita Yukio, Shichino Shigeyuki, Nakano Ryuichi, Ueha Satoshi, Kasahara Kei, Muro Shigeo, Yano Hisakazu, Matsushima Kouji, Ito Toshihiro	4. 巻 76
2. 論文標題 Transition of Antibody Titers after SARS-CoV-2 mRNA Vaccination in Japanese Healthcare Workers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 72 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2022.041	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 Furukawa Ryutaro, Kitabatake Masahiro, O uji-Sageshima Noriko, Suzuki Yuki, Nakano Akiyo, Matsumura Yoko, Nakano Ryuichi, Kasahara Kei, Kubo Kaoru, Kayano Shin-ichi, Yano Hisakazu, Ito Toshihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Persimmon-derived tannin has antiviral effects and reduces the severity of infection and transmission of SARS-CoV-2 in a Syrian hamster model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 23695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-03149-3	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 Kitabatake Masahiro, Matsumura Yoko, Ouji-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 -

1. 著者名 Kitabatake Masahiro, Ouji-Sageshima Noriko, Sonobe Shota, Furukawa Ryutarō, Konda Makiko, Hara Atsushi, Aoki Hiroyasu, Suzuki Yuki, Imakita Natsuko, Nakano Akiyo, Fujita Yukio, Shichino Shigeyuki, Nakano Ryuichi, Ueha Satoshi, Kasahara Kei, Muro Shigeo, Yano Hisakazu, Matsushima Kouji, Ito Toshihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Transition of antibody titers after the SARS-CoV-2 mRNA vaccine in Japanese healthcare workers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 medRxiv	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) 10.1101/2021.12.28.21268435	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, NAKANE SHIGERU, YOSHIKAWA DAIKI, WATANABE TAKASHI, KAWAGUCHI TAKESHI, OUJI-SAGESHIMA NORIKO, KUSHIBE KEIJI, ITO TOSHIHIRO	4. 巻 1
2. 論文標題 Vein-first Lobectomy for Lung Cancer Assessed According to the Status of Clustered Circulating Tumour Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Diagnosis & Prognosis	6. 最初と最後の頁 443 ~ 450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/cdp.10059	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 Fujioka Nobuhiro, Kitabatake Masahiro, Ouji-Sageshima Noriko, Ibaraki Takahiro, Kumamoto Makiko, Fujita Yukio, Hontsu Shigeto, Yamauchi Motoo, Yoshikawa Masanori, Muro Shigeo, Ito Toshihiro	4. 巻 Volume 16
2. 論文標題 Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Elastase-Induced Emphysema in Mice by Mesenchymal?Epithelial Transition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease	6. 最初と最後の頁 2783 ~ 2793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/COPD.S324952	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 Nakazawa Tsutomu, Morimoto Takayuki, Maeoka Ryosuke, Matsuda Ryosuke, Nakamura Mitsutoshi, Nishimura Fumihiko, Ouji Noriko, Yamada Shuichi, Nakagawa Ichiro, Park Young Soo, Ito Toshihiro, Nakase Hiroyuki, Tsujimura Takahiro	4. 巻 42
2. 論文標題 CIS deletion by CRISPR/Cas9 enhances human primary natural killer cell functions against allogeneic glioblastoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13046-023-02770-6	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 Aoki Hiroyasu, Kitabatake Masahiro, Abe Haruka, Xu Peng, Tsunoda Mikiya, Shichino Shigeyuki, Hara Atsushi, Ouji-Sageshima Noriko, Motozono Chihiro, Ito Toshihiro, Matsushima Kouji, Ueha Satoshi	4. 巻 43
2. 論文標題 CD8+ T?cell memory induced by successive SARS-CoV-2 mRNA vaccinations is characterized by shifts in clonal dominance	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 113887 ~ 113887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2024.113887	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 Noriko Ouji-sageshima, Masahiro Kitabatake, Ryutaro Furukawa, Toshihiro Ito
2. 発表標題 HLA-F blockade restored the cytotoxicity of NK cells against colorectal cancer.
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会 (The 52th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 王寺 (下嶋) 典子、石谷昭子、Daniel E Geraghty、北畠正大、古川龍太郎、伊藤利洋
2. 発表標題 腫瘍細胞に発現するHLA-F分子を標的とした新規免疫療法の開発
3. 学会等名 第31回日本組織適合性学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Noriko Uji-sageshima, Masahiro Kitabatake, Ryutaro Furukawa, Toshihiro Ito
2. 発表標題 Antitumor effect of anti-HLA-F antibody on colon cancer in patient-derived xenografts (PDX) model.
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会 (The 51th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Noriko Uji-sageshima, Masahiro Kitabatake, Ryutaro Furukawa, Toshihiro Ito
2. 発表標題 HLA-F as a new target molecule for cancer immunotherapy of colon cancer
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会 (The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology)
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	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
---------	---------