

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591963

研究課題名(和文) HMGB1による癌化学療法の免疫学的効果予測

研究課題名(英文) HMGB1 is a new immunological biomarker for prognosis in patients with digestive cancer.

研究代表者

鈴木 伸明 (SUZUKI, Nobuaki)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50526910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：HMGB1は核蛋白として、アポトーシスに陥った細胞から放出され、効果的に抗原提示し細胞障害性T細胞を活性化する。本研究の目的は、切除組織におけるHMGB1の免疫染色を行いバイオマーカーとして、また再発・予後との関連について明らかにする。胃癌90症例、大腸癌30症例、膵癌10症例等で免疫染色を行い、胃癌で癌部のHMGB1の発現の有無が予後予測因子となることを確認した。NKG2D, NKG2DL, B7-H3等も染色しており、複合的な染色強度の発現の組み合わせで、prognostic markerとならないか検討し、胃癌患者におけるULBP1/NKG2D間は抗腫瘍効果増強が示唆された。

研究成果の概要(英文)：High mobility group box 1 (HMGB1) plays a role in many clinical conditions such as autoimmunity, acute ischemia-reperfusion injury, cardiovascular disease and cancer. HMGB1 is a nuclear protein and released from the apoptotic cells to activate cytotoxic T cells and antigen-presenting cells effectively. The aim of this study was to clarify HMGB1 is associated with recurrence or prognosis as a biomarker, and we performed immunohistochemistry of HMGB1 in resected specimen. We performed immunohistochemistry for 90 gastric cancer cases, 30 cases of colorectal cancer, and 10 cases as pancreatic cancer, the expression of HMGB1 in cancer tissues is a good prognostic factor in gastric cancer patients. B7-H3, NKG2D, NKG2DL are also stained, with a combination of expression of staining intensity, ULBP1/NKG2D interaction was suggested as good prognostic marker for the patients in gastric cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：HMGB1 バイオマーカー NKG2D ULBP1 B7-H3

1. 研究開始当初の背景

- (1) 免疫療法の歴史は古く、William Coley が 1800 年代の終わりから Memorial Hospital で Sarcoma の患者に streptococcal broth を治療として使うなどの試みが続けられてきた。その後もサイトカインの発見や癌抗原の発現などの免疫学的Breakthroughがある度に、有効性の高いものや期待できるものが開発されつつある。これまでも化学療法の免疫療法的側面の示唆はされてきたが、深く踏み込んだ Scientific evidence が無いため、その特性は、発揮しきれていない。
- (2) 近年、フランスの Zitvogel らのグループから、化学療法や放射線療法によって癌細胞が壊死すると、死にゆく細胞から high mobility group box 1(HMGB1)が細胞外に流出し、これが TLR(Toll-like receptor) - 4 の経路を介して免疫系を活性化するという報告がなされた (Nature Med. 2007)。さらにいくつかの施設から免疫担当細胞からの HMGB1 の分泌が周囲の免疫系に影響を及ぼしている報告がある。そこで我々は、high mobility group box 1(HMGB1)という分子に着目し、化学療法の免疫学的効果を科学的に明らかにするシステムを構築することを目標とする。

2. 研究の目的

今回、HMGB1 を中心に化学療法の免疫学的効果をより詳細に明らかにすることで、様々な化学療法の中で、どの化学療法において免疫学的抗腫瘍効果がより強いかを検討するとともに、特定の化学療法における抗腫瘍効果を予測するバイオマーカーとして治療効果判定との相関を探索する。さらに症例を積み重ね再発・予後との関連も明らかにする。本研究の最大のメリットは、既存の抗癌剤の

抗腫瘍効果に関して免疫学的観点から明らかにするため、従来のバイオマーカーとは全く異なる新しいバイオマーカーとなりうる可能性があることである。

3. 研究の方法

- (1) BALB/c mice, C57BL/6 と CT26 (BALB/c mice 由来の大腸癌細胞) ,B16-KY8 (C57BL/6 由来メラノーマの肝親和性の高い細胞) を用いる。我々は独自に開発したマウス癌肝転移モデルを用いて研究を進める (Cancer Res. 2006) (図 1)。簡潔に述べると、麻酔下にマウスを開腹し、脾臓をクリッピングし 2 分割する。この片方の脾臓から腫瘍を注入後、片脾を取り除く。洗浄後閉腹。片脾を残存することで、免疫学的なホメオスタティックにも有利に働き、後の脾臓を用いた分析にも有用である。

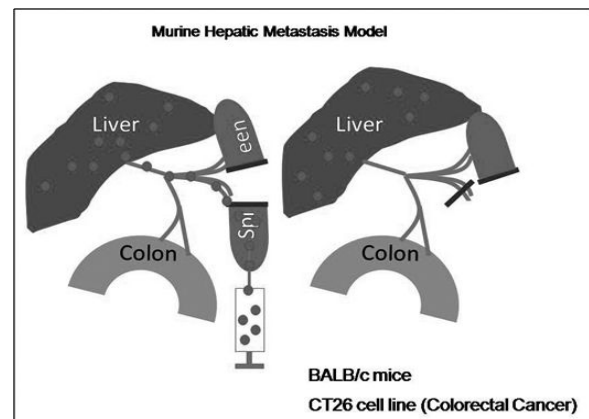
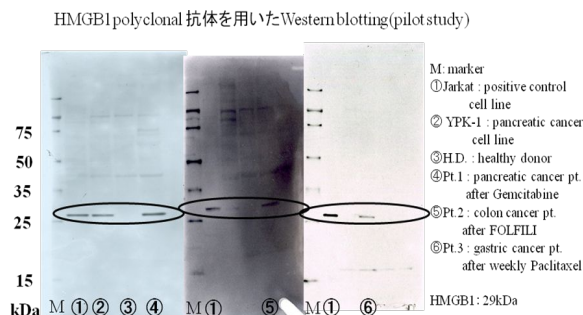


図 1 . マウス肝転移モデル

- (2) マウスに肝転移樹立後、各種抗癌剤を低量にて intraperitoneally 及び、intravenously に投与し治療効果の判定と次に述べる免疫学的反応を確認する。
- (3) マウスの抗原提示細胞における HMGB1 の発現を Intracellular Staining Method (ICS), Western Blotting, ELISA を用いて検討する。

- (4) マウスの肝浸潤リンパ球をアイソレートし、(a) NK, NKT, Macrophage, DC, CD4+, and CD8+ T cells の絶対数の経時的変化を調べる。(b) CT26 における Immunodominant antigen である AH-1 特異的な CD8+ T cells、KY8 では Trp2 特異的な CD8+ T cells に関してテトラマーを用いて調べる。これには CD8+ T cell を MACS beads でソーティングし、CD8+ T cells が rich な環境で staining をすることで、より鮮明に抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞の割合を調べる。
- (5) 癌患者の末梢血単核球中の抗原提示細胞における HMGB1 の発現を Intracellular Staining Method (ICS) を用いて検討する。
- (6) 上記(4)の方法で Detection が上手く得られない場合は Western Blotting, ELISA を用いる(下図)。



- (7) ICS により CD4+ T, CD8+ T 細胞における IFN-gamma, IL-4, IL-10, IL-17, TNF-alpha を検討する。これにより、どのようなサイトカインプロファイルが、抗腫瘍効果に適しているかをタイミングとともに検討する。CD8+ T 細胞においては、抗原特異的な T 細胞の数よりもその活性が重要か否かに着目する。CD4+ T 細胞においては Th1, Th2, Th17, regulatory T 細胞の functional な割合に注目し、どこに Survival との相関性があるかを検討する。
- (8) 胃癌・大腸癌または膵癌症例で、化学療法前後に末梢血単核球中の HMGB1 を

ELISA で測定し、抗原提示細胞の成熟化 (CD11c 陽性細胞の CD80 陽性率、CD83 陽性率) が HMGB1 の発現と相関しているかを調べる。またそれと並行して、胃癌・大腸癌・膵癌切除標本にて、HMGB1 の癌部、非癌部での発現を免疫染色にて確認し、その発現の強弱が予後との相関があるかを検討する。

- (9) 化学療法後に T 細胞の in vitro での Killing ability が抗原提示細胞の HMGB1 発現と相関するかを検討する。
- (10) これらの免疫学的反応と再発率・生存率との間に相関があるかを検討する。

4. 研究成果

これまでに胃癌 90 症例、大腸癌 30 症例、膵癌 10 症例等で免疫染色を行い、胃癌においては癌部の HMGB1 の発現の有無が予後との相関があり、多変量解析でも独立した予後予測因子となりえることを確認した。この内容で現在論文を執筆中である。それと並行して NKG2D, NKG2DL, B7-H3 等も染色しており、複合的な染色強度の発現の組み合わせで、prognostic marker とならないか検討中である。具体的には胃癌患者における単核球の NKG2D 発現が良好な予後に関連があった。そのリガンドの一つである ULBP1 については、NKG2D と共に発現しているものが最も予後が良い傾向にあった。一般的には、ULBP1 の発現と臨床データとの関連、あるいはそのメカニズムについては未だに不明な点が多いが今回の結果から、ULBP1/NKG2D 間は抗腫瘍効果において Positive な関係であることが示唆された。今後は、引き続き HMGB1, NKG2D, NKG2DL, B7-H3 等を染色し、複合的な染色強度の発現の組み合わせで、prognostic marker となるか検討を行うとともに、その結果について論文にまとめる予定である。

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0件)

[学会発表](計3件)

鈴木伸明、胃癌に対する新規免疫学的バイオマーカーとしての High Mobility Group Box 1 の有用性、第 17 回日本がん免疫学会総会、2013.7.3-5, ANA クラウンプラザホテル宇部(山口)

鈴木伸明、吉村清、胃癌に対する High Mobility Group Box 1 の新規免疫学的バイオマーカー、第 85 回日本胃癌学会総会、2013.2.27-3.1, 大阪国際会議場(大阪)

Kiyoshi Yoshimura, Nobuaki Suzuki, Expressions of NKG2D ligand/NKG2D are related to their clinicopathological outcome in patients with gastric cancer, 第 85 回日本胃癌学会総会、2013.2.27-3.1, 大阪国際会議場(大阪)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等:なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 伸明(SUZUKI, Nobuaki)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号:50526910

(2)研究分担者

吉村 清(YOSHIMURA, Kiyoshi)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号:30346564

(3)連携研究者

なし