

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：23701072

研究課題名(和文)可溶性CD155による癌免疫逃避機構の解明と新規癌診断・治療法開発のための研究

研究課題名(英文)Involvement of soluble CD155 in cancer immune escape

研究代表者

井口 研子(間中研子)(Iguchi, Akiko)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50575644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：マウスのCD155は膜型のみであるが、ヒトのCD155は膜貫通領域を欠失する可溶性のアイソフォームも存在する。本研究では癌患者血清の可溶性CD155濃度が健常人と比較して高くなることを明らかにした。また腫瘍免疫における可溶性CD155の機能解析のため、マウス可溶性CD155産生細胞を樹立しマウスに移植したところ、Mock細胞を移植したマウスと比較して腫瘍の増大が早く生存率は低かった。これらの結果より、可溶性CD155は腫瘍免疫逃避に機能することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mouse CD155 has only a membrane-bound form, but human CD155 has also soluble splice isoforms (sCD155) lacking the transmembrane region. Here, we show that cancer patients showed significantly higher concentration of sCD155 in the sera than healthy donors. To analyze the functional role of sCD155 in tumor immunity, we established MethA transfectant expressing sCD155. Mice inoculated with MethA transfectant expressing sCD155 showed increased tumor development and shorter survival, compared with mice inoculated with mock transfectant. These results suggest that sCD155 is involved in cancer immune escape in human.

研究分野：腫瘍免疫学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：細胞免疫 免疫逃避

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌免疫監視における DNAM-1 と膜型 CD155 の機能

癌の発症には免疫応答が関与し、免疫系が癌細胞を排除しようとする「免疫監視」と、癌細胞が免疫監視から逃れて増殖しようとする「免疫逃避」のバランスが癌の発症を決めると考えられている (Dunn et al, *Nat. Rev. Immunol.* 2006)。しかしその詳細な分子メカニズムの全貌はいまだ明らかではない。

DNAM-1 は、研究代表者のグループで同定した免疫系受容体で、CTL や NK 細胞に発現し、癌細胞などを標的として細胞傷害活性を誘導する活性化受容体である (Shibuya et al, *Immunity* 1996)。また我々は、DNAM-1 のリガンドが CD155 と CD112 であることを同定し、DNAM-1 が癌細胞に高発現する CD155 または CD112 と結合して、CTL や NK 細胞に細胞傷害活性を誘導し、癌細胞を排除することを明らかにした (*Int. Immunol.* 2004, *Blood* 2006)。

DNAM-1 と癌細胞に発現する CD155 または CD112 との、生体内での相互作用を明らかにするため、研究代表者は DNAM-1 遺伝子欠損マウスを作製した。DNAM-1 遺伝子欠損マウスに膜型 CD155 を高発現する MethA 細胞を移植すると、このマウスでは腫瘍が拒絶されずに増大し、生存率が低下した。さらに DNAM-1 遺伝子欠損マウスにメチルコラントレンなどの化学発癌物質を投与し発癌を誘導すると、このマウスでは発癌率が高く生存率が低下した。これらの結果から、DNAM-1 は癌細胞に発現する膜型 CD155 を標的として免疫監視を行い、癌の発症を阻止することを明らかにした (Iguchi et al, *J. Exp. Med.* 2008)。

(2) 可溶性 CD155 による癌免疫逃避の可能性
研究代表者のグループでは、DNAM-1 リガンドの膜型 CD155 はヒトの胃・大腸の正常組織では発現していないが、胃癌や大腸癌組織では高発現していることを見いだした (*Blood* 2006)。また世界の研究グループより、ヒトの白血病細胞 (Pende et al, *Blood* 2005)、卵巣癌 (Carlsten et al, *Cancer Res.* 2007)、多発性骨髄腫 (El-Sherbiny et al, *Cancer Res.* 2007)、悪性黒色腫 (Lakshmi kanth et al, *J. Clin. Invest.* 2009) などの多くの癌で膜型 CD155 が高発現すると報告されている。前述のように、膜型 CD155 を発現する癌細胞は DNAM-1 による免疫監視の標的となるにもかかわらず、ヒトに発症した癌ではこのように膜型 CD155 の高発現が見られる。このことから研究代表者は、膜型 CD155 を発現する癌

細胞が、DNAM-1 による免疫監視に対する逃避機構を持っている可能性を考えた。

ヒト CD155 は膜型のほかにスプライシングバリエーションとして可溶性 CD155 が存在し、大腸癌において膜型と可溶性の CD155 mRNA が発現することが報告されている (Masson et al, *Gut* 2001)。研究代表者は本研究開始前に、HeLa 細胞が可溶性 CD155 蛋白を産生することを明らかにし、さらに進行期の卵巣癌患者において血清中の可溶性 CD155 濃度が高値を示す傾向を見いだした。癌細胞が産生する可溶性 CD155 が DNAM-1 に結合することにより、DNAM-1 と癌細胞上の膜型 CD155 の結合が阻害され、癌細胞が DNAM-1 による免疫監視から逃避している、つまり可溶性 CD155 が癌免疫逃避に機能することが推察された。

2. 研究の目的

- (1) 可溶性 CD155 による癌免疫逃避機構を解明する。
- (2) 可溶性 CD155 による癌免疫逃避機構を制御するための新規分子標的治療法を検討する。
- (3) CD155 の新規腫瘍マーカーとしての有用性を検討する。

3. 研究の方法

- (1) 可溶性 CD155 による癌免疫逃避機構の解明

①マウス in vivo 解析

・膜型 CD155 を内因性に発現するマウス MethA 細胞株に遺伝子導入を行い、可溶性 CD155 産生 MethA 細胞と Mock-MethA 細胞を作製、野生型マウスに移植し、生体内における可溶性 CD155 産生の有無による腫瘍増殖への影響を解析した。

・DNAM-1 遺伝子欠損マウス、NOD/Scid マウスを用いて同様の腫瘍移植実験を行い、生体内において DNAM-1 による免疫監視がない場合には、可溶性 CD155 産生の有無が腫瘍増殖に影響しないかを解析した。

②マウス in vitro 解析

MethA 特異的 CTL を誘導し、可溶性 CD155 産生 MethA 細胞に対する細胞傷害活性を細胞内 IFN γ 染色法にて解析し、CTL の細胞傷害活性が可溶性 CD155 により抑制されるかを検討した。

- (2) 可溶性 CD155 による癌免疫逃避機構を制御するための新規分子標的治療法の検討

①可溶性 CD155 産生 MethA 細胞が産生する可溶性 CD155 には FLAG 蛋白を付けてあることを利用し、抗 FLAG 抗体を用いて可溶性 CD155 を標的としたマウス治療モデルの樹立に取り組んだ。

②ヒト可溶性 CD155 蛋白をマウスに免疫し、

抗ヒト可溶性 CD155 特異的抗体 の作製 に取 り組 んだ。

(3) CD155 の新規腫瘍マーカーとしての有用性の検討

各種癌症例における膜型・可溶性 CD155 の発現を解析し、新規腫瘍マーカーとしての有用性を検討した。

①手術により採取された婦人科癌組織約 15 症例を用い、RNA を抽出、DNA を合成し、PCR により膜型・可溶性 CD155 遺伝子の発現を解析した。

②癌患者約 300 症例の血清中の可溶性 CD155 濃度を、sandwich ELISA system を用いて解析し、健常人との比較、治療前後の比較を行った。Sandwich ELISA system は研究代表者が樹立した系を用いた。

4. 研究成果

(1) 可溶性 CD155 による癌免疫逃避機構の解明

①可溶性 CD155 産生 MethA 細胞と Mock-MethA 細胞を野生型マウスに移植したところ、可溶性 CD155 産生 MethA 細胞を移植したマウスは全匹で腫瘍が拒絶されずに増大し移植後約 80 日において生存率は 10%未満であったのに対し、Mock-MethA 細胞を移植したマウスは 8 割以上で腫瘍が拒絶され生存率は 80%以上であった (図 1)。

これらの細胞を DNAM-1 遺伝子欠損マウスに移植したところ、両者ともほぼすべてのマウスで腫瘍が増大し、NOD/Scid マウスに移植した場合も同様であった。これらは *in vivo* において可溶性 CD155 が癌免疫逃避に機能していることを示す重要な結果である。

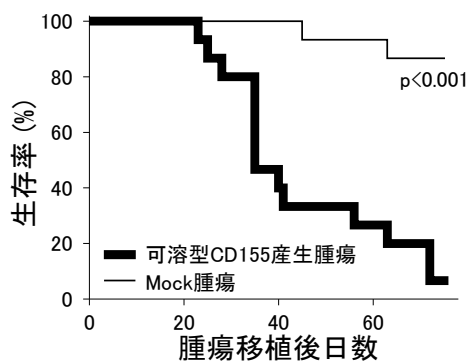


図 1. 野生型マウスに可溶性 CD155 産生腫瘍を移植すると拒絶されず、生存率は低下する。

②MethA 特異的 CTL を誘導し、*in vitro* にて可溶性 CD155 産生 MethA 細胞に対する細胞傷害活性を細胞内 IFN γ 染色法にて解析したところ、Mock-MethA 細胞に対するよりも有意に細胞傷害活性が低かった。この結果は前

述の *in vivo* 解析つまり可溶性 CD155 産生 MethA 細胞を移植した野生型マウスは Mock-MethA 細胞を移植したマウスより生存率が低いという結果を支持している。

(2) 可溶性 CD155 による癌免疫逃避機構を制御するための新規分子標的治療法の検討

①可溶性 CD155 産生 MethA 細胞が産生する可溶性 CD155 は FLAG 蛋白付きであることを利用し、抗 FLAG 抗体を用いて可溶性 CD155 を標的としたマウス治療モデルの樹立に取り組んだが難渋した。引き続き抗体投与方法や投与量などについて検討する。

②抗ヒト可溶性 CD155 特異的抗体の作製に取り組む、ヒト可溶性 CD155 蛋白を抗原としてマウスに免疫したが可溶性特異的抗体は得られなかった。引き続き可溶性に特異的な蛋白を抗原とし抗体作成に取り組む。

(3) CD155 の新規腫瘍マーカーとしての有用性の検討

①手術により採取された婦人科癌組織約 15 症例を用い、PCR により膜型・可溶性 CD155 遺伝子の発現を解析し、全例において膜型・可溶性 CD155 の発現を認めた。この結果は癌組織が可溶性 CD155 の産生源となることを示すものである。

②卵巣癌、子宮頸癌、子宮体癌、乳癌、肺癌、胃癌、大腸癌、肝臓癌、胆管癌、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの癌患者血清、約 300 例を用い、sandwich ELISA system により可溶性 CD155 濃度を解析したところ、健常人と比較して癌患者血清では可溶性 CD155 濃度が有意に高いという結果を得た (図 2)。

また癌患者血清の治療前後の可溶性 CD155 濃度を解析したところ、治療後に有意に低下するという結果を得た。これらの結果は血清可溶性 CD155 濃度が腫瘍マーカーとして有用であることを示唆している。

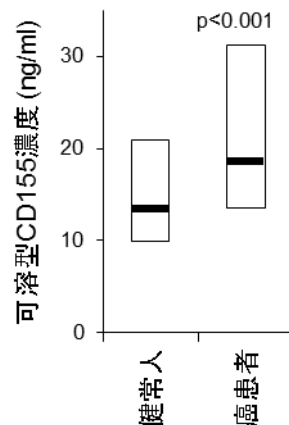


図 2. 癌患者では血清中の可溶性 CD155 濃度が高い。

(4) 今後の展望

本研究では、可溶性 CD155 が癌免疫逃避において重要な機能を持つこと、また癌患者血清

の可溶型 CD155 濃度は高くなることを明らかにした。このことは、可溶型 CD155 の制御が癌への抑制効果につながると期待できるものであり、今後は可溶型 CD155 を標的とした癌分子標的治療薬の開発に向けて研究を進めたい。

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)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 井口 研子、腫瘍免疫逃避機構における可溶型 CD155 の役割、第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014 年 4 月 3-5 日、国立京都国際会館、京都市
- ② Akiko Iguchi、Involvement of soluble CD155 in cancer immune escape、2013 日本免疫学会総会・学術集会、2013 年 12 月 11-13 日、幕張メッセ、千葉市
- ③ Akiko Iguchi、Involvement of soluble CD155 in cancer immune escape、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3-5 日、パシフィコ横浜、横浜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井口 研子 (IGUCHI, AKIKO)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：50575644

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし