

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791443

研究課題名(和文) 新たなT細胞不活化経路を標的とした癌治療法の臨床導入を目的とした研究

研究課題名(英文) Clinical application of cancer therapy targeting newly discovered T-cell inhibitory pathways

研究代表者

右田 和寛 (Migita, Kazuhiro)

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：40570990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：Herpesvirus entry mediator (HVEM)の腫瘍における役割を検討した。RNA干渉法を用いて腫瘍のHVEM発現をノックダウンしたところ、腫瘍細胞の細胞周期停止が誘導され、増殖能が抑制された。マウス皮下腫瘍モデルにおいても、HVEMノックダウンによって、腫瘍増殖が有意に抑制された。摘出した腫瘍を免疫染色で検討したところ、HVEMノックダウン腫瘍ではコントロール治療を行った腫瘍に比べKi67陽性率が有意に低く、腫瘍浸潤CD8+リンパ球数が有意に多かった。以上の結果から、HVEMノックダウンにより細胞周期停止による増殖抑制と腫瘍局所での抗腫瘍免疫が誘導されることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the functions of herpesvirus entry mediator (HVEM) in vitro and in vivo using the small interfering RNA (siRNA) silencing technique. HVEM gene silencing significantly inhibited cancer cell proliferation through cell cycle arrest in vitro. HVEM gene silencing significantly inhibited tumor growth in mice models. The percentage of Ki-67-positive cells was found to be significantly decreased in tumors treated with HVEM siRNA compared with control specimens. In tumors treated with HVEM siRNA, CD8+ lymphocytes infiltrating into the surrounding area of the tumor were found to be significantly more abundant compared with control specimens. The antitumor effect of HVEM blockade was associated with reduced cell proliferation activity and the induction of CD8+ cells.

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：食道癌 免疫療法 HVEM

## 1. 研究開始当初の背景

新規抗癌剤や分子標的治療などの開発により近年の癌治療は飛躍的な進歩をとげ、多くの癌腫において治療成績の向上が認められる。しかしながら、食道癌をはじめとする難治性消化器癌では今なお切除不能進行症例が多く、また治癒切除後であっても再発の頻度が高く、十分な治療成績が得られていないのが現状である。したがって、これら癌腫の大幅な予後改善のためには、新たな観点からの治療法の開発が望まれる。近年、新たな癌治療戦略として免疫療法が注目されている。T細胞不活化経路は免疫応答の終息、恒常性の維持、過剰免疫の抑制など、生体にとってきわめて重要な機能を有している。これまでの基礎研究によって、T細胞不活化経路は腫瘍の免疫回避機構において重要な役割を担っており、さらには臨床的にも重要な意義を有することが明らかとされてきた。さらに近年では、T細胞不活化経路を阻害するヒト型抗体(抗CTLA-4抗体、抗PD1抗体、抗PD-L1抗体)が癌治療において臨床応用され、その有用性が報告されるに至った。近年、新たなT細胞不活化経路としてherpesvirus entry mediator (HVEM)経路が見いだされた。

## 2. 研究の目的

本研究は、近年新たに発見されたT細胞不活化経路であるHVEM経路に着目し、腫瘍におけるHVEM経路の役割を明らかにし、HVEM経路阻害の新規癌治療法としての有用性を検証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

in vitro 実験系で腫瘍におけるHVEMの役割の解明。 ヒト食道扁平上皮癌細胞株 TE-1、TE-6、マウス大腸癌細胞株 colon26 のHVEM発現をRNA干渉法を用いてノックダウンし、MTSアッセイ、FACSを行った。

in vivo 実験系で腫瘍におけるHVEMの役割の解明。 マウス大腸癌細胞株 colon26 を用いて皮下腫瘍モデルを作成し、HVEM siRNA ないしはコントロールRNAを腫瘍局所に投与した。また、摘出した腫瘍を病理組織学的に検討した。

## 4. 研究成果

in vitro 実験系で腫瘍における

## HVEMの役割の解明。

MTSアッセイの結果、いずれの細胞株においても、HVEM発現ノックダウン細胞株はコントロール細胞に比べ、有意に増殖が抑制された(図1、2)。FACSによる細胞周期解析の結果、TE-1、TE-6ではHVEMノックダウンによりG2/Mアレストが誘導されることが判明した(図3、4)。一方、colon26においてはG1アレストが誘導された(図5)。いずれの細胞株においても、アポトーシスの誘導は認められなかった。以上の結果からは、HVEMは腫瘍細胞の増殖に直接的に関与することが示唆された。

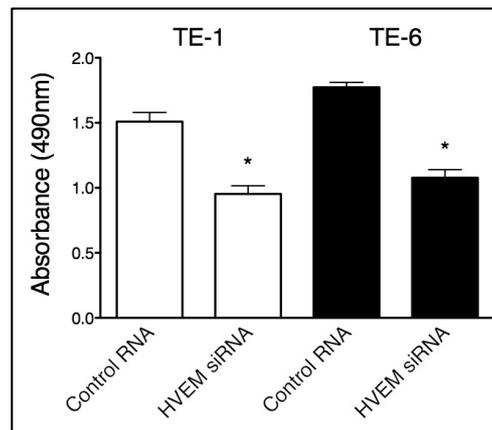


図1 MTSアッセイ (TE-1、TE-6)

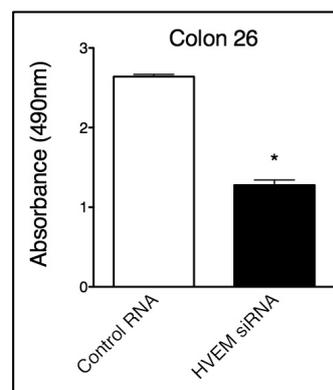


図2 MTSアッセイ (colon 26)

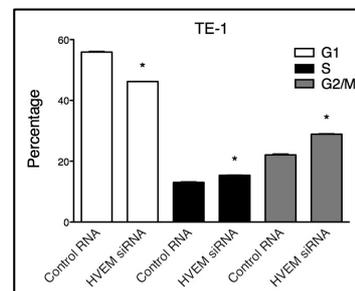


図3 細胞周期解析 (TE-1)

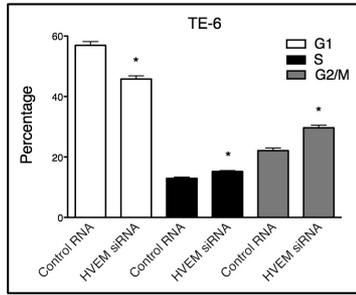


図4 細胞周期解析 (TE-6)

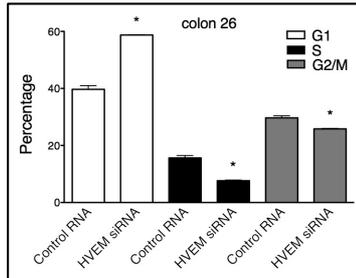


図5 細胞周期解析 (colon 26)

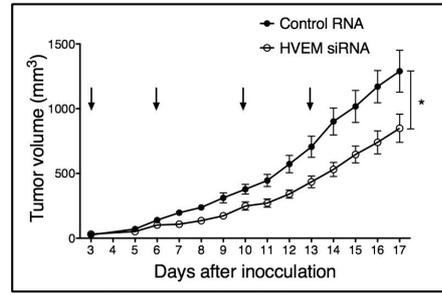


図6 腫瘍サイズの変化

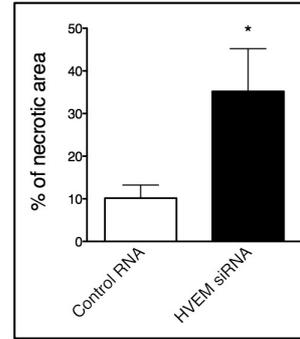


図7 腫瘍内壊死割合

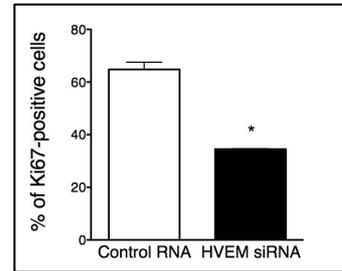


図8 Ki67 陽性率

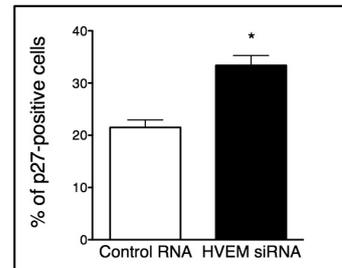


図9 p27 陽性率

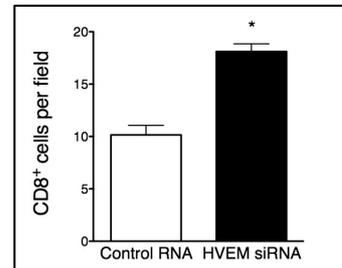


図10 腫瘍浸潤 CD8+リンパ球数

in vivo 実験系で腫瘍における HVEM の役割の解明。

腫瘍局所へ HVEM siRNA ないしはコントロール RNA を 2 回/週 × 2 週、計 4 回投与した。結果、HVEM siRNA 群ではコントロール群に比して有意に腫瘍の増大が抑制された(図 6)。治療開始 2 週間後に腫瘍を摘出し、病理組織学的検討を行った。HVEM siRNA 投与群ではコントロール群に比べ腫瘍壊死の割合が有意に高かった(図 7)。また、HVEM ノックダウン腫瘍ではコントロール群に比べ、Ki67 陽性率(図 8)が有意に低く、p27 陽性率(図 9)が有意に高かった。さらに、HVEM ノックダウン腫瘍では腫瘍浸潤 CD8+リンパ球数が有意に増加していた(図 10)。Real-time PCR の結果、IL-2 や INF- $\gamma$  の発現が HVEM ノックダウン腫瘍で有意に上昇していた。以上の結果から、HVEM ノックダウンにより細胞周期停止による腫瘍増殖抑制と腫瘍局所での抗腫瘍免疫が誘導されることが判明した。HVEM を標的とした治療では、腫瘍抗原特異的 T 細胞を活性化・誘導するだけでなく、直接的な抗腫瘍効果が得られる可能性があり、強力な抗腫瘍効果が期待できるものと考えられる。

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 1 件)

Significant involvement of herpesvirus entry mediator in human esophageal squamous cell carcinoma. Migita K, Sho M, Shimada K, Yasuda S, Yamato I, Takayama T, Matsumoto S, Wakatsuki K, Hotta K, Tanaka T, Ito M, Konishi N, Nakajima Y. Cancer 2014;120:808-17.

〔学会発表〕(計 1 件)

ヒト食道癌における HVEM 発現の臨床病理学的意義 右田和寛、庄 雅之、高山智燮、松本壮平、若月幸平、榎本浩士、田仲徹行、伊藤眞廣、中島祥介  
第 112 回日本外科学会定期学術集会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

右田 和寛 ( みぎた かずひろ )

研究者番号 : 40570990

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし