

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：94416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10458

研究課題名(和文) 骨軟部腫瘍転移における自然免疫応答回避の分子メカニズム

研究課題名(英文) Understanding molecular mechanism underlying innate immune system escape for metastasis in sarcoma

研究代表者

笹川 覚 (Sasagawa, Satoru)

医療法人徳洲会野崎徳洲会病院(附属研究所)・研究所・部長

研究者番号：80345115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では滑膜肉腫が免疫監視機構をすり抜けて肺転移を成立させるメカニズムについて解析を行った。その結果、滑膜肉腫細胞に発現するMICA/BはTwist1の発現、低酸素環境、浮遊培養環境により発現低下し、これによりNK細胞による監視網をくぐり抜けられていると考えられた。また、MICA/Bのタンパク質安定化にはN型糖鎖修飾が重要であり、MICA/Bの発現が消失している細胞株ではN型糖鎖修飾に重要な糖転移酵素の発現を伴っていた。滑膜肉腫はMICA/Bの発現を抑制する複数のメカニズムを併用してNK細胞による監視網を欺き転移を成立させていると推測された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the mechanism how the synovial sarcoma cells escape from immune surveillance and found that MICA/B molecules in synovial sarcoma cells were disappeared when the cells were in hypoxia and floating conditions. Twist1 transcription factor also depressed MICA/B expression. On the other hand, low-dose of HDAC inhibitors markedly up-regulated MICA/B expression. MICA/B expression was N-glycosylation sensitive and tunicamycin treatment rapidly killed MICA/B expression. We also found that MICA/B negative synovial sarcoma cells was also sensitive to HDAC inhibitor treatment and confirmed weak MICA/B protein expression. Here, we found that MICA/B mRNA sequence in MICA/B negative cells were not uniform and most of that disrupted N-glycosylation site in protein level. In conclusion, low-dose of HDAC inhibitor treatment could improve anti-tumor-effect by NK cells by MICA/B stimulation.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：滑膜肉腫 転移

## 1. 研究開始当初の背景

骨軟部腫瘍は腫瘍全体の1%に満たない希少がん分類されるが25歳までの弱年齢層に限れば15%近くを占める。骨軟部腫瘍の一つである滑膜肉腫は数百例/年程度のレアながんであり、高頻度に肺転移を生じるため、予後不良となるケースが少なくない。特に、初診時に肺転移が見つかった場合の5年生存率は0%となっており、予後改善の方策が強く望まれているが、決定的なものは未だ見出されていない。

骨軟部腫瘍は発症例数が少なく、それに伴い研究者数も少ないため、抗がん剤の開発は他の腫瘍に比べて遅れている。また、腫瘍種に限らず、転移を抑制するための薬剤や治療方法は現在までに確立されたものはなく、臨床現場からは抗転移治療のための薬剤や治療戦略の確立が求められている。

がんの浸潤・転移は、細胞の運動能やアノキス耐性などの細胞自身の特性に加えて、腫瘍を取り巻く微小環境、免疫システムとの相互作用、遠隔臓器へのホーミングなどが関与していることが知られている。がん免疫はマクロファージや好中球、NK細胞による自然免疫応答と、T細胞やB細胞が関与する獲得免疫応答により構成される。加齢により免疫力が低下することががんの発生に繋がることはよく知られているが、近年の研究からがん細胞はT細胞などの免疫細胞に干渉し、積極的に免疫システムを抑制することが明らかになっている。一方、骨軟部腫瘍の発症は若年齢層に発症ピークがあることから免疫力の低下によって発がんや転移を生じている可能性は低く、何らかの方法で免疫監視機構を回避していると考えられた。

## 2. 研究の目的

骨肉腫、ユーイング肉腫、滑膜肉腫など骨軟部腫瘍は上皮系腫瘍と比べて転移の頻度が高い。転移の抑制は予後改善に直結するため、転移メカニズムの解明は分子標的の探索や転移抑制治療を考える上でも必然性が高い。

本研究では自然免疫を担うNK細胞によって認識される腫瘍細胞表面に発現する分子MICA/Bの動態に着目し解析を行った。

MICA/B分子は放射線、ウイルス感染、がん化に応答して発現が上昇し、NK細胞により認識される。これは生体内で生じた異常細胞を排除する仕組みであり、このことからMICA/Bは“Kill me signal”として知られている。一方、NK細胞は全身に分布しており、状態異常に陥った細胞の検出、排除を常時行っていると考えられるが、特に肺組織に集積していることが明らかになっている。肺は骨軟部腫瘍の転移先の8割を占める臓器であり、転移成立のために骨軟部腫瘍細胞はNK細胞による免疫監視機構を回避していると考えられる。

本研究では滑膜肉腫細胞がNK細胞による

免疫監視機構を回避するメカニズムの明らかにし、新規治療法としてこのメカニズムに対して干渉するアプローチを模索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では細胞材料として、共同研究者らによって樹立された滑膜肉腫細胞株Yamato-SS、Aska-SSと、細胞バンクなどから入手可能なSYO-1およびHS-SY-IIを用いている。解析手段として生化学的手法、および分子生物学的手法を用いてMICA/Bおよび細胞動態について解析を行った。

## 4. 研究成果

滑膜肉腫におけるMICA/Bの発現

4種の滑膜肉腫細胞株についてMICA/Bの発現を確認した結果、Aska-SS細胞にはMICA/Bは強く発現していたが、Yamato-SS、SYO-1、HS-SY-II細胞ではほとんど検出されないか非常に弱い発現であった。一方、転移能に関わる分子としても知られるTwist1はMICA/Bの発現と負の相関を示し、Aska-SSではほとんど発現が見られず、それ以外の細胞では強い発現が観察された。このことから、Twist1の発現はMICA/Bの発現を抑制する可能性があると考えた。この仮説を確認するため、Twist1を発現していないAska-SSにTwist1を強制発現させた。その結果MICA/Bの発現低下がタンパク質レベルで確認された。このことからTwist1はMICA/Bの発現抑制を介しても転移促進に寄与していると推測された。興味深いことにTwist1に強制発現によるMICA/Bの抑制はmRNAレベルでは抑制されていなかった。このことから、Twist1によるMICA/Bの抑制はタンパク質ターンオーバー、タンパク質分解促進などのタンパク質安定化機構が関与していると推測された。

MICA/Bの発現変化と環境応答

腫瘍細胞の転移能活性化は腫瘍の微小環境状態が大きく関与することが知られている。特に低酸素環境ではHIF1 $\alpha$ の安定化によりTwist1やVEGFの発現が亢進し転移を促進すると考えられている。そこで、低酸素環境下におけるMICA/Bの発現を確認したところ、いずれの細胞においてもMICA/Bの発現は低下していた。Twist1の発現がほとんど見られないAska-SSにおいてもMICA/Bの発現低下がみられたことからTwist1に依存しない応答であると推測された。

骨軟部腫瘍は血行性に遠隔臓器へと転移していくと考えられている。血中においてアノキス耐性を獲得した細胞は浮遊状態で血中を循環していると考えられることから、滑膜肉腫細胞を浮遊環境下で培養し、MICA/Bの発現を観察した。その結果、浮遊状態で培養するとMICA/Bの発現は低下することが明らかとなった。

滑膜肉腫細胞における MICA/B の発現制御

MICA/B が ASKA-SS 以外の細胞株には発現していない。Aska-SS を様々な阻害剤で処理した結果、N 型糖鎖修飾酵素阻害剤でもあるツニカマイシンで処理した場合に急速に発現が消失した。このことから MICA/B の安定化には糖鎖修飾が重要であると考えられた。そこで、Aska-SS と Yamato-SS の間で糖鎖修飾酵素について発現比較したところ Yamato-SS で FUT8 の発現が低下していた。Aska-SS の MICA/B 分子を PNGase で処理し、糖鎖を外して MICA/B をウェスタンブロットで検出したところ、Yamato-SS においても糖鎖修飾のない MICA/B の位置にバンドが確認された。このことから Yamato-SS における MICA/B の発現低下の理由の一つとして、糖鎖修飾活性の低下による MICA/B タンパク質の不安定化が示唆された。

MICA/B 発現の賦活化

MICA/B の発現は NK 細胞による排除効率に深く関わる。従って、MICA/B の発現亢進は腫瘍抑制、延いては転移抑制に繋がる可能性がある。そこで MICA/B の発現を亢進する薬剤について探索した結果、低用量の HDAC 阻害剤による処理が滑膜肉腫細胞において効率的に MICA/B の発現を亢進することが明らかとなった。MICA/B の発現を亢進する HDAC 阻害剤の最低濃度は IC50 をはるかに下回り、ヒストンのアセチル化亢進が観察される最低限の濃度とほぼ一致していた。

重要なことに、低用量 HDAC 阻害剤処理は MICA/B の発現が見られない Yamato-SS においても糖鎖修飾されたものと同じ分子量のバンドが観察された。すなわち、MICA/B の発現が消失している細胞においても HDAC 阻害剤による刺激は MICA/B の発現を回復させ、NK 細胞による排除が期待できると考えられた。

HDAC 阻害剤について、複数の薬剤が臨床で用いられている。担癌マウスに対して HDAC 阻害剤を低用量で投与し、生体内においても HDAC 阻害剤処理による MICA/B の発現不活化を確認中である。

総括

滑膜肉腫は様々な環境応答や Twist1 などの細胞内因子により MICA/B の発現を低下させ、NK 細胞による免疫監視機構を回避していると推測された。これに対し、低用量 HDAC 阻害剤は MICA/B の発現を亢進させることができることから、滑膜肉腫に対する抗癌、抗転移作用が期待される。

## 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4件)

- 1) Evidence for intrathecal sodium butyrate as a novel option for leptomeningeal metastasis.  
Nakagawa H, Yui Y, Sasagawa S, Itoh K.  
*J. Neuro-oncol.* 2018. (in press)  
doi: 10.1007/s11060-018-2852-2.
  - 2) Sodium butyrate induces senescence and inhibits the invasiveness of glioblastoma cells.  
Nakagawa H, Sasagawa S, Itoh K.  
*Oncol. Lett.* 15(2), 1495-1502, 2018.  
doi: 10.3892/ol.2017.7518.
  - 3) Trabectedin is a promising antitumour agent for synovial sarcoma.  
Yasui H, Imura Y, Outani H, Hamada K, Nakai T, Yamada S, Takenaka S, Sasagawa S, Araki N, Itoh K, Myoui A, Yoshikawa H, Naka N.  
*J. Chemother.* 28(5), 417-424, 2016.  
doi: 10.1080/1120009X.2015.1133013.
  - 4) Taspase1-dependent TFIIA cleavage coordinates head morphogenesis by limiting Cdkn2a locus transcription.  
Takeda S, Sasagawa S, Oyama T, Searleman AC, Westergard TD, Cheng EH, Hsieh JJ.  
*J. Clin. Invest.* 125(3), 1203-1214, 2015.  
doi: 10.1172/JCI77075.
- [学会発表](計4件)
- 1) 骨軟部腫瘍における Twist1 による転移能調節  
笹川覚、由井理洋、中川秀光、伊藤和幸  
第 75 回日本癌学会学術総会
  - 2) 滑膜肉腫における Twist1 による転移能の解析  
笹川覚、由井理洋、渡邊健太、中川秀光、伊藤和幸  
第 76 回日本癌学会学術総会
  - 3) アンドロゲンとビタミン D3 による前立腺癌の細胞増殖調節  
五十嵐晃、渡邊健太、由井理洋、笹川覚、平田美智子、稲田全規、宮浦千里、伊藤和幸  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会
  - 4) アンドロゲンとビタミン D3 による前立腺癌の細胞増殖調節  
五十嵐晃、渡邊健太、由井理洋、笹川覚、平田美智子、稲田全規、宮浦千里、伊藤和幸  
第 39 回日本分子生物学会年会

## **6 . 研究組織**

### (1)研究代表者

笹川 覚 (SASAGAWA, Satoru)  
医療法人徳洲会野崎徳洲会病院 (附属研  
究所)・分子生物学研究部・主任研究員  
研究者番号： 80345115

### (3)研究協力者

伊藤和幸 (ITOH, Kazuyuki)  
医療法人徳洲会野崎徳洲会病院・検診セ  
ンター・センター長  
研究者番号： 20301806