

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590608

研究課題名（和文） 皮膚癌の免疫監視回避機構の解析と臨床検査への応用

研究課題名（英文） Analysis of mechanism to escape from immune surveillance in tumor

研究代表者

吉田 繁 (YOSHIDA SHIGERU)

北海道大学・大学院保健科学研究院・助教

研究者番号：20431314

研究成果の概要（和文）：腫瘍の免疫監視回避機構の1つに可溶性 NKG2D リガンドの産生が報告されている。マウス皮膚腫瘍細胞で皮膚に特異的な NKG2D リガンドである H60c の可溶性 (sH60c) を産生しうる遺伝子の発現を初めて確認した。その発現量が皮膚扁平上皮癌組織で有意に増加していることを明らかにした。また、H60c モノクローナル抗体を作製し、sH60c を検出するサンドイッチ ELISA 法を開発した。本研究はヒト癌における免疫回避機構の理解を深め、癌治療の予後予測や新たな免疫療法の開発に役立つことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Soluble ligands for NKG2D are involved in escape from immune surveillance in tumor. In this study, soluble H60c (sH60c), NKG2D ligand expressed mainly in skin, was detected in skin tumor and was significantly induced in skin carcinoma. To detect sH60c protein, two monoclonal antibodies specific for H60c were generated and developed ELISA system for sH60c by using these Abs. This study is expected to be helpful in a better understanding of mechanisms to escape from immune surveillance in tumor and useful for development of novel immune therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：免疫, NKG2D

1. 研究開始当初の背景

(1) NK 細胞の主要な活性化リガンドである NKG2D リガンド (NKG2DL) は正常細胞表面には発現されていないが、腫瘍細胞で発現が誘導される。NK 細胞は NKG2DL を認識することによって活性化され腫瘍細胞を破壊する。しかし、腫瘍細胞はしばしば可溶性 NKG2D リガンド (sNKG2DL) を産生することにより、NK 細胞による免疫監視を回避している。sNKG2DL は腫瘍細胞株のみならず癌患者血清からも検出され、癌の悪性度と相関することが報告されている (*J. Hepatol.*, 43: 1013, 2005)。したがって、血中 sNKG2DL を測定することは癌の悪性度や予後の予測因子となる可能性がある。

(2) 今までの報告から sNKG2DL は肝臓癌、肺癌、乳癌、膵臓癌、胃癌、大腸癌、前立腺癌、神経芽細胞腫、造血器腫瘍患者で検出されている (*J. Hepatol.*, 43: 1013, 2005)。ULBP4 はヒト皮膚に局限して発現する NKG2DL であり、一部の腫瘍細胞株では可溶性 ULBP4 (sULBP4) が産生される。sULBP4 は NK 細胞株の細胞傷害活性を阻害することが報告されている (*J. Biol. Chem.*, 282: 18922, 2007)。しかしながら、現在まで皮膚悪性腫瘍での sULBP4 の研究報告は無く、sULBP4 が皮膚免疫監視回避機構に関与するかは不明である。

(3) 申請者は最近、新規マウス NKG2DL である H60c を同定した (*J. Immunol.*, 180: 1678, 2008)。H60c 遺伝子はほぼ皮膚に局限して転写されていることから、これまで不明であった皮膚の免疫監視に関与する NKG2DL であることが強く示唆される。

2. 研究の目的

sNKG2DL が悪性腫瘍の免疫監視回避に関与することは明らかである。ULBP4 はヒトの皮膚に局限して発現することから、皮膚免疫監視に関与する NKG2DL であると考えられる。皮膚腫瘍細胞は sULBP4 を産生し、皮膚免疫監視を回避していると推測されるため、血清中 sULBP4 量は皮膚悪性腫瘍の予後を予測する因子となる可能性がある。これを明らかにするためにはモデル動物が必要である。H60c 遺伝子はマウス皮膚に局限して転写されることから、ULBP4 の機能的カウンターパートであることが示唆される。また可溶性 H60c (sH60c) 遺伝子が皮膚で転写されていることから、皮膚免疫や免疫監視回避に関与することが示唆される。従って、皮膚免疫における H60c の役割を解析することはヒト皮膚悪性腫瘍の免疫回避可機構の解明や予後予測法の確立へと繋がる。本研究では H60c の皮膚免疫における役割を

解明し、その知見をもとにヒト皮膚悪性腫瘍の予後を予測する検査システムの構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 発現制御機構の解析

H60c 遺伝子ならび sH60c 遺伝子は皮膚上皮の腫瘍化やストレス (創傷, UV, 発癌物質, 酸化物質, 抗癌剤, 細菌やウイルス構成成分, サイトカイン) により、転写誘導されることが予想される。誘導制御機構を解析するために以下の実験をおこなった。

① 皮膚ケラチノサイトを培養後、ストレス刺激 (微生物抗原, 抗ガン剤, 紫外線, 熱) を与え H60c ならびに sH60c の誘導カインेटィックスを遺伝子・蛋白質レベルで解析した。

② DMBA/TPA やメチルコラントレン (MCA) の化学発癌物質を FVB マウス背部皮膚に塗布もしくは投与し、皮膚腫瘍ならびに皮膚癌を作製した。それら組織中の H60c ならびに sH60c 発現量を遺伝子・蛋白質レベルで解析した。

(2) H60c モノクローナル抗体の作製

分子生物学的手法を用いて、大腸菌と哺乳類細胞に H60c タンパク質もしくは H60c-Fc 融合タンパク質発現遺伝子を導入した。導入後、リコンビナント H60c タンパク質, H60c-Fc 融合タンパク質を作製し抽出精製後、ラットに免疫し、モノクローナル抗体を得た。モノクローナル抗体の特異性は H60c 発現細胞をターゲットとした FACS 解析, ウェスタンブロットティング, 免疫染色にて確認した。

(3) 生化学的性状の解析

H60c はダイマーを形成する MHC クラス I 様分子である。ダイマーを形成する NKG2D リガンドは H60c が唯一であり、MHC クラス I 分子では HLA-G のみである。ダイマー-HLA-G はモノマーと比較し、レセプターとのアフィニティーが高くなることが報告されている。ダイマー形成の意義を解析するために、細胞表面ラベリングとイムノブロットティング (抗 H60c モノクローナル抗体作成済み) により細胞表面 H60c のモノマー/ダイマー比や SPR (surface plasmon resonance) 解析による NKG2D とのアフィニティーを測定した。

(4) sH60c 測定方法の確立

サンドイッチ ELISA 法による sH60c 定量法を確立するため以下の実験をおこなった。

① FACS 解析により、異なるエピトープを認識する 2 つの抗 H60c モノクローナル抗体を選択した。それらをキャプチャー抗体, 検出抗

体としたサンドイッチ ELISA 測定系を確立した。リコンビナント H60c 蛋白の測定により測定の妥当性を検討した。

②マウス皮膚扁平上皮癌組織より sH60c タンパク質を産生しうる 2 タイプの遺伝子 (sH60c v1, sH60c v2) をクローニングした。それら sH60c タンパク質を発現しうる遺伝子を哺乳類細胞 COS-7 に導入し、sH60c タンパク質の産生を FACS ならびに ELISA 法にて確認した。

4. 研究成果

本研究により以下の結果が得られた。

(1) 皮膚での H60c 遺伝子発現細胞はケラチノサイトであった。

(2) 試験管内でマウス皮膚から培養したケラチノサイトに各種刺激を与え H60c の誘導を確認したが、明らかな発現誘導は確認されなかった。しかしながら、H60c は培養する刺激 (カルチャーショック) によりケラチノサイトで誘導される主要な NKG2D リガンドであることが確認された。

(3) マウス皮膚に作製したパピローマの H60c 免疫染色にて、H60c の発現が確認された。このことから H60c は発癌などの DNA ダメージにより誘導されることが推測された。

(4) H60c はダイマーを形成する唯一の NKG2DL であるが、H60c 強制発現細胞表面上では主にモノマーが発現していることが確認された。

(5) リコンビナント H60c ダイマー蛋白質と NKG2D との親和性は NKG2DL の中で最も低いものであったが、H60c モノマータンパク質と NKG2D との親和性は、他の高親和性を有する NKG2DL と同等であることが確認された。このことから、生体での H60c は NKG2D 陽性免疫細胞を活性化する重要な分子であることが推測された。

(6) マウス皮膚腫瘍組織から可溶型 H60c 遺伝子を検出した。可溶型 NKG2DL は免疫監視回避機構としてヒトでの報告はあるが、本研究で初めてマウス可溶型 NKG2DL の存在を確認した。

(7) 可溶型 H60c 遺伝子には 2 タイプ存在することが確認され、それらを sH60c v1, sH60c v2 と名付けた。それら遺伝子の塩基配列を決定したところ、いずれもスプライシング以上により細胞膜結合シグナルを含むエクソンが欠損していることが確認された。

(8) H60c を特異的に認識するモノクローナル

抗体を 2 種類作製した。それらは FACS や免疫染色、ウェスタンブロッティングで使用可能であり、うち 1 つは NKG2D との結合を阻害する抗体であった。

(9) 異なるエピトープを認識する 2 種類の抗 H60c モノクローナル抗体を用いて、sH60c を検出するためのサンドイッチ ELISA 法を確立した。本測定法はリコンビナント H60c タンパク質を特異的に検出した。

(10) sH60c v1, sH60c v2 タンパク質を発現する遺伝子を導入した哺乳類細胞 COS7 の培養上清を用い、sH60c タンパク質の産生を確立した ELISA 法および H60c-Fc 融合タンパク質との競合反応による FACS 解析にて確認したところ、2 種類の sH60c タンパク質が産生されていることが確認された。

(11) マウス上皮内に発癌物質である MCA を投与し、皮膚扁平上皮癌を作製した。その癌組織と正常皮膚組織での sH60c v1, sH60c v2、膜型 H60c mRNA 量を比較すると、癌組織では有意に sH60c mRNA 量が増加していた (図 1)。

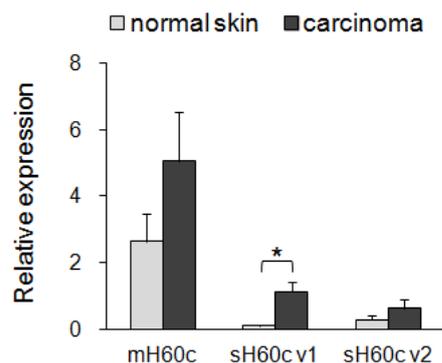


図1. 皮膚癌組織における膜型 H60c と可溶型 H60c 遺伝子の発現量

MCA 投与により FVB/N マウスの背部皮膚に誘導した皮膚癌組織から RNA を抽出した。cDNA 作製後膜型 H60c (mH60c) と 2 つの可溶型 H60c (sH60c v1, sH60c v2) を特異的に増幅するプライマーによりリアルタイム PCR をおこない、それぞれの相対発現量を測定した。なお、ハウスキーピング遺伝子には HPRT を用いた。有意差検定には student's *t*-test を用いた。* $P < 0.05$,

NKG2D システムは腫瘍細胞の監視に重要なシステムであり、実際に NKG2D 欠損マウスでは腫瘍の発生率が増加する。今までの研究から NKG2D を介した複数の免疫回避機構の存在が知られており、その内の 1 つが可溶型 NKG2D リガンドの産生である。本機序はヒト腫瘍細胞では報告されていたものの、マウス

での報告はなかった。今回の研究結果はマウスで初めて可溶性 NKG2D リガンドの存在を強く示唆するものであり、また、皮膚扁平上皮癌組織で sH60c 遺伝子発現が増加していることを示した。癌組織から直接 sH60c タンパク質の検出できなかったものの、sH60c 遺伝子導入細胞を用いた *in vitro* の実験では、sH60c タンパク質の産生を確認したことから、生体内においても産生される可能性が示唆された。マウス皮膚の表皮層には dendritic epidermal T cells (DETCs) と呼ばれる NKG2D 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が多数常在し、感染や腫瘍化に対する免疫監視、上皮恒常性の維持をおこなっている。マウス皮膚扁平上皮癌で産生された sH60c は、表皮に常在する DETCs の NKG2D と結合し、その発現を低下させることで DETCs の抗腫瘍作用を障害し、免疫回避に関与している可能性が想定される。ヒト NKG2D リガンドである ULBP4 は皮膚に多く発現しており、可溶性 ULBP4 の存在も確認されている。しかしながら、それらの皮膚における機能は不明である。現在、ヒトでは癌のスクリーニング検査として、血清中可溶性 NKG2D リガンド濃度の測定が有用であることが報告されている。しかしながら、可溶性 NKG2D リガンドの詳細な機能は不明な部分が多い。したがって、モデル動物を用いた可溶性 NKG2D リガンドの詳細な機能解析が必要である。本研究は、ヒト癌における免疫回避機構の理解を深めるとともに新たな癌免疫療法の開発にも役立つことが期待できる。

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)

- (1) Yoshida S, Mohamed RH, Kajikawa M, Koizumi J, Tanaka M, Fugo K, Otsuka N, Maenaka K, Yagita H, Chiba H, Kasahara M, Involvement of an NKG2D ligand H60c in epidermal dendritic T cell-mediated wound repair., *Journal of Immunology*, DOI:10.4049/jimmunol.1102886, March 7, 2012.

[学会発表] (計 7 件)

- (1) 吉田 繁, A critical role of NKG2D ligands in wound healing, 第 40 回日本免疫学会, 2011 年 11 月 27, 幕張メッセ, 千葉
- (2) 吉田 繁, 体表組織におけるナチュラルキラー細胞活性化リガンド H60c の役割, 第 100 回日本病理学会, 2011 年 4 月 26 日, パシフィコ横浜, 横浜

- (3) 吉田 繁, H60c is a specialized NKG2D ligand with a major role in immune surveillance at the body surface, 国際免疫学会, 2010 年 8 月 24 日, 神戸ポートピアホテル, 兵庫
- (4) 吉田 繁, 粘膜免疫におけるナチュラルキラー細胞活性化リガンド H60c の役割, 第 99 回日本病理学会, 2010 年 4 月 27 日, 京王プラザホテル, 東京
- (5) 吉田 繁, A mouse NKG2D ligand with a major role in skin immunity, 日本免疫学会, 2009 年 12 月 2 日, 大阪国際会議場, 大阪
- (6) 吉田 繁, 皮膚免疫に重要な役割を果たすと推定される新しい MHC クラス I 様分子の解析, 日本組織適合性学会, 2009 年 9 月 26 日, 名古屋国際会議場, 名古屋
- (7) 吉田 繁, 皮膚免疫におけるマウス NKG2D リガンド H60c の役割, 第 98 回日本病理学会, 2009 年 5 月 3 日, 国立京都国際会館, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 繁 (YOSHIDA SHIGERU)

北海道大学・大学院保健科学研究院・助教

研究者番号：20431314

(2) 研究分担者

富居 一範 (FUGO KAZUNORI)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20431306