

## 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 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592553

研究課題名（和文）NK 細胞活性化受容体リガンドを標的とした口腔癌に対するオーダーメイド治療の開発

研究課題名（英文）Exploitation of MICA gene polymorphism for development of personalized medicine in oral cancer patients

研究代表者

谷 亮治 (TANI Ryouji )

広島大学・病院・助教

研究者番号：10291486

研究成果の概要（和文）：

当科で樹立した OSCC 細胞株で Western Blot 法および Northern Blot 法を用いて細胞抽出液中の MICA 蛋白および MICA mRNA の発現を検討し、いずれの OSCC 細胞株も MICA mRNA を同程度発現していたが、Western Blot 法の結果から KO 細胞では MICA 蛋白の発現は非常に低いことが明らかになった。一方、ELISA 法を用いて培養上清中の sMICA (soluble MICA) 濃度を検討した結果、sMICA の産生量は KO 細胞において最も高いことを明らかにした。さらに無血清培養系で KO 細胞を大量培養し、培養上清中から抗 MICA 抗体結合アフィニティーカラムを用いて KO 細胞が産生する sMICA の精製を行った。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we examined the expression of MICA protein in cell extracts using the Western Blot and the expression of MICA mRNA using Northern Blot in OSCC cell lines. We found expression of MICA mRNA in all OSCC cell lines, and expression of MICA protein in KO cell lines was lowest.

The soluble MICA (sMICA) in conditioned medium was measured by ELISA and we found the high level of sMICA in KO cells. We have purified sMICA produced by KO cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
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：歯学・外科系歯学

キーワード：MICA gene polymorphism oral cancer soluble MICA  
personalized medicine

## 1. 研究開始当初の背景

近年、自然免疫において発癌抑制に重要な役割を果たすナチュラルキラー(NK)細胞を活性化するレセプターとしてNKG2D分子が報告された(Wu, J., *Science*. 285:730-732, 1999)。このNKG2D分子は、ホモダイマーの形をとり、シグナル伝達物質であるImmunoreceptor Tyrosine based activation motif (ITAM)をもつDAP10分子と会合して、そのリガンドであるMICA(MHC class I chain-related molecule A)を認識すると傷害活性を誘導することが明らかにされている(Bauer, S., *Science*. 285:727-729, 1999)。MIC(MHC class I chain-related)遺伝子は、HLAクラス I 領域に同定された遺伝子群であり、A-Gまでの7つの遺伝子座が知られている。1994年に発見されたMICA (Bahram, S., *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 6259-6263, 1994)は43Kdaのタンパク質をコードし、細胞膜上に発現する糖タンパクである。MICAは、消化管上皮細胞や一部の胸腺細胞を除いては正常細胞には発現しておらず、ストレスを受けた細胞やトランスフォームした上皮細胞で発現が誘導される(Groh, V., *Science*279:1737-1740, 1998)。MICA遺伝子には、膜貫通領域をコードするエクソン5内のGCT繰り返し配列の違いにより、5つの遺伝子多型(GCTの4回繰り返しA4型, 5回がA5型, 6回がA6型, 9回がA9型, さらに2回目と3回目の間にG塩基が変則的に入るものがA5.1型)(**図2**)があり、MICAの遺伝子多型とベーチェット病(Mizuki, N., *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 1298-1303, 1997)やI型糖尿病の発症(Kawabata, Y., *Hum Immunol*. 61: 624-629, 2000)との関連性が明らかにされている。したがって、NK細胞を活性化するリガンドであるMICAの遺伝子多型は、自己免疫疾患の発症や癌の免疫監視機構と深い関連性があると考えられる。さらに担癌生体には癌細胞が免疫担当細胞から攻撃されることを回避するシステムがあり、その1つとして腫瘍細胞が産生する可溶性MICA(soluble MICA, sMICA)の存在が明らかにされている(Groh, V., *Nature*. 419:734-738, 2002)。この可溶性MICAがNKG2Dを被覆することによりNKG2D+ NK細胞などによる癌細胞の認識を阻害する、あるいはNK細胞表面のNKG2Dの発現を負に制御することにより、NK活性の低下を引き起こしていることが報告されている。

我々は、自然免疫において中心的な役割を果たすナチュラルキラー(NK)細胞を活性化するレセプター(NKG2D)分子のリガンドであるMICAの遺伝子多型に関する検討を行い、100名の口腔癌患者および103名の健常人についてChi-square methodお

よびfisher's P value testを用いて統計学的に検討した結果、5.1型のMICA遺伝子型を持つ個体の口腔癌感受性は、他の遺伝子多型と比較して有意に高い( $P=16.203$ ,  $Pvalue=0.00006$ )ことを報告している(Park, E.J., et al. *The Journal of Immunology* 171: 4131-39. 2003, 第49回口腔外科学会総会, 第59回日本口腔科学会総会)。

また、我々は、口腔扁平上皮癌患者22名の初診時の血清中の可溶性MICA濃度は平均4.5ng/mlと、対照と比較して有意に高い値であることや、口腔癌患者の血清中の可溶性MICA濃度が、口腔癌の進展、再発や転移などの臨床病態の悪化に伴い上昇することも明らかにしている(第32回日本免疫学会総会, 第49回口腔外科学会総会, 第59回日本口腔科学会総会)。さらに、当科では、活性化自己リンパ球療法と放射線療法、化学療法を併用した症例に対して、レチノイド(ビタミンA)療法を追加することにより、より高い抗腫瘍効果を得られることを明らかにしている。この抗腫瘍効果増強の機序を検討した結果、レチノイドが、腫瘍細胞に作用することによりMICAのmRNAが上昇させ、NKG2D活性化レセプターを介した細胞傷害活性の誘導が増強することを既に明らかにしている(第58回口腔科学会総会)。

## 2. 研究の目的

本研究期間内に、基礎的検討として、抗癌剤や放射線照射で処理した口腔癌細胞株のMICA遺伝子発現や培地中に産生する可溶性MICA蛋白量を検索し、これらの治療による影響や同細胞を標的としたLAK細胞の細胞傷害活性試験を行い、免疫療法を化学療法や放射線療法と併用した場合のMICA遺伝子の関連性を検討する。臨床的検討として、当科を受診した口腔癌患者のMICA遺伝子多型や口腔癌治療前後の血清中の可溶性MICA濃度を検索し、口腔癌治療(外科療法、化学療法、放射線療法、免疫療法)の奏功性や予後との相関関係を解析し、MICA遺伝子多型や血清中の可溶性MICA濃度が、治療法の選択、治療の評価、予後の予測を行う上で有用な分子腫瘍マーカーとなりうるかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 口腔癌細胞株が産生するプロテアーゼによる可溶性MICA蛋白産生機構の解析

口腔癌細胞の可溶性MICA蛋白の産生機構を解析する目的として、癌細胞自身が産生するMMP(Matrix metalloproteinase)などのプロテアーゼのうち、どのプロテアーゼによって、癌細胞表面のMICAが切断されて血清中に産生されているかを検討する。口腔癌細

胞癌株をさまざまなプロテアーゼで処理した後、培養上清中に放出される可溶性 MICA 蛋白濃度を検索する。検索の結果、プロテアーゼを特定できた場合は、そのプロテアーゼを中和する抗体や MMP 阻害剤を培地中に添加し、口腔癌細胞の産生する可溶性 MICA 蛋白量がどのように変化するか検討する。また、特定できたプロテアーゼが、口腔癌細胞株が浸潤転移する際に産生するプロテアーゼと一致するかを検討する。

#### 4. 研究成果

ナチュラルキラー(NK)細胞は、自然免疫において発癌抑制に重要な役割を果たすことが知られている。近年、NK細胞を活性化するレセプターとして NKG2D 分子が明らかになり、NKG2D は、そのリガンドである MICA (MHC class I chain-related molecule A) を認識すると細胞傷害活性を誘導することが報告された。一方、癌細胞が細胞表面に MICA を発現しているにも関わらず、NK 細胞など MICA-NKG2D を介した免疫監視機構から逃れ、排除されないのは何らかの免疫回避システムが存在していることが考えられており、その1つとして sMICA (soluble MICA) が報告されている。当科で樹立した OSCC 細胞株で Western Blot 法および Northern Blot 法を用いて細胞抽出液中の MICA 蛋白および MICA mRNA の発現を検討し、いずれの OSCC 細胞株も MICA mRNA を同程度発現していたが、Western Blot 法の結果から KO 細胞では MICA 蛋白の発現は非常に低いことが明らかになった。一方、ELISA 法を用いて培養上清中の sMICA 濃度を検討した結果、sMICA の産生量は KO 細胞において最も高いことを明らかにした。また、無血清培養系で KO 細胞を大量培養し、培養上清中から抗 MICA 抗体結合アフィニティーカラムを用いて KO 細胞が産生する sMICA の精製を行った。精製 sMICA を脱糖鎖処理し、Western Blot 法で検討したところ sMICA の分子量は 24000 であった。さらに、精製した sMICA を MALDI/TOF-MS により質量解析を行い、MICA 分子と一致するアミノ酸配列を検索した結果、sMICA は、MICA 分子の  $\alpha$  3 ドメインの中央付近で切断されている可能性が考えられた。

#### 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 6 件)

1. Mimura S, Kimura N, Hirata M, Tateyama D, Hayashida M, Umezawa A, Kohara A, Nikawa H, Okamoto T, Furue MK. Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem

cells. : Int J Dev Biol. 2011 Feb 3. [Epub ahead of print] (査読有り)

2. Kobayashi M, Huang Y, Jin C, Luo Y, Okamoto T, Wang F, McKeenan WL. FGFR1 abrogates inhibitory effect of androgen receptor concurrent with induction of androgen-receptor variants in androgen receptor-negative prostate tumor epithelial cells. : Prostate. 2011 Mar 28. doi:10.1002/pros.21386. [Epub ahead of print] (査読有り)

3. Deraz EM, Ogawa I, Miyauchi M, Kudo Y, Nakamoto T, Tani R, Takata T. Central giant cell granuloma of mandible : presentation of a rare case with prominent Osteoblastic differentiation mimicking osteosarcoma. , Oral Med Pathol. 14(2010); 117-120. (査読有り)

4. Matsumoto S, Fumoto K, Okamoto T, Kaibuchi K, Kikuchi A. , Binding of APC and disheveled mediated Wnt5a-regulated focal adhesion dynamics in migrating cells. : EMBO J. 29(7):2010; 1192-204. (査読有り)

5. Sato GH, Sato JD, Okamoto T, McKeenan WL, Barnes DW. , Tissue Culture: the unlimited potential. : In Vitro Cell Dev Biol Anim. ; 46(7) 2010; 590-4. (査読有り)

6. Furue MK, Na J, Okamoto T, Sato JD. et al. Advantages and difficulties in culturing human pluripotent stem cells in growth factor-defined serum-free medium. , In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2010 Jul; 46(7):573-6. (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

1. 谷亮治, 虎谷茂昭, 岡本哲治, 機能性食品ケフィアの放射線化学療法による副作用の予防効果の検討: 第63回日本口腔科学会学術集会、2009年4月17日、浜松市

2. Okamoto T, Developmental Signaling Disorders in Craniofacial Anomalies and Cancers : Annual Meeting of Association for Dental sciences of the Republic of China, in Kaohsiung, Nov. 13, 2009(招待講演)

○取得状況 (計 1 件)

名称 : BASAL MEDIUM FOR ES CELL CULTURING  
発明者 : Okamoto T, Ashasima, M, Furue M  
権利者 : Okamoto T, Ashasima, M  
種類 : European Patent  
番号 : 1,698,690  
取得年月日 : 2010年4月28日  
国内外の別 : 国外

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 亮治 (TANI RYOUJI)

広島大学・病院・助教

研究者番号：10291486

(2) 研究分担者

岡本 哲治 (OKAMOTO TETSUJI)

広島大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00169153

虎 谷茂昭 (TORATANI SHIGEAKI)

広島大学・病院・講師

研究者番号：90172220