

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390430

研究課題名(和文) 口腔癌の局所腫瘍免疫に及ぼす低酸素環境ならびにHIF-1 の影響

研究課題名(英文) Effects of hypoxic environment and HIF-1 on antitumor immune response of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

山本 哲也 (YAMAMOTO, TETSUYA)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：00200824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素環境および低酸素誘導因子HIF-1 が口腔扁平上皮癌の局所腫瘍免疫に及ぼす影響について検討した。その結果、低酸素分圧下、OSC細胞に対するNK-92およびLAK細胞の傷害能は正常酸素分圧下と比較して有意に減弱したが、OSC細胞にHIF-1 -siRNAを導入すると、その効果は抑制された。低酸素処理によりOSC細胞のMICA、CD54、CD58、NK-92細胞のNKG2D、CD11a、CD54の発現が低下し両細胞の会合が抑制された他、NK-92の細胞傷害性蛋白の発現低下が認められた。これらより、低酸素環境はHIF-1 を介して口腔扁平上皮癌の局所腫瘍免疫を負に制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：NK cells are essential effectors of antitumor immune responses, but the mechanism by which hypoxia regulates NK-mediated killing of OSC cells is poorly understood. In this study, we demonstrate that hypoxia impairs OSC susceptibility to NK-mediated lysis and these effects were decreased by knock-down of HIF-1 $\alpha$  expression. The surface expression levels of MICA, CD54 and CD58 of OSC cells and NKG2D, CD11a and CD54 of NK-92 cells were decreased and the binding of target cells to NK cells was prohibited under hypoxic conditions. Furthermore, OSC cells secreted higher levels of some immunosuppressive cytokines under hypoxic conditions. Hypoxia did not influence the ability of NK cells to degranulate in response to OSC cells, though decreased the proportion of IFN- $\gamma$  expressing NK-92 cell and the secretion of IFN- $\gamma$  into culture medium. These results suggest that hypoxia regulate the potential of both OSC cells and NK cells and attenuate antitumor immune responses by NK cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：低酸素 口腔扁平上皮癌 抗腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞障害性T細胞(CTL)やLymphokine-activated killer (LAK)細胞、樹状細胞などを用いた細胞移入療法やペプチドワクチン療法、抗体療法などの免疫療法が種々の癌に対して積極的に試みられるようになってきているが、現在、標準治療として確立されるまでには至っておらず、解決すべき課題が数多く残されている。その一つが抗腫瘍免疫応答を抑制する機構の存在・出現であり、自己免疫寛容誘導による免疫細胞の癌細胞認識低下や癌細胞が細胞傷害に対する抵抗性を獲得することによる免疫回避などが挙げられる。口腔扁平上皮癌などの固形癌はその異常な増殖のために血液・酸素供給が不十分となり腫瘍内に低酸素領域が生じているが、この低酸素環境は癌細胞の悪性度を高め、抗癌剤や放射線に対する抵抗性を増強することが知られていることから、種々の免疫担当細胞にも影響を及ぼすのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

低酸素環境ならびに低酸素応答のマスター遺伝子である低酸素誘導因子(HIF-1)が口腔癌に対する局所腫瘍免疫にどのような影響を及ぼすかについて、癌細胞ならびに免疫担当細胞の両者の面から検討する。

3. 研究の方法

- (1) 各エフェクター細胞(NK細胞、LAK細胞)の細胞傷害能に及ぼす低酸素およびHIF-1の影響を検討する。
- (2) エフェクター細胞の受容体の発現、さらには、各サイトカイン、パーフォリン、グランザイムB産生に及ぼす低酸素の影響を検討する。
- (3) 標的細胞(口腔扁平上皮癌細胞株: OSC細胞)のサイトカイン産生、MHCクラスIの発現に及ぼす低酸素の影響を検討する。

4. 研究成果

(1) OSC細胞のキラー細胞に対する感受性に対する低酸素の影響

教室で樹立した口腔扁平上皮癌細胞株(OSC細胞)を低酸素処理することによりOSC細胞のキラー細胞に対する感受性がどのように変化するかを検討した。9名の健康人の末梢血単核球を、IL-2存在下5日間培養して誘導したLAK細胞に対するOSC細胞の感受性を、クロム51リリースアッセイにて解析した結果、OSC-1、OSC-5およびOSC-9細胞では感受性に変化は認められなかったが、残りの9株のOSC細胞では、低酸素処理によりLAK細胞に対する感受性が低下した(図1A)。次に、NK細胞株であるNK-92に対するOSC細胞の感受性への低酸素の影響について検討した結果、ほとんどのOSC細胞において低酸素処理によりNK-92に対する感受性が低下した(図1B)。

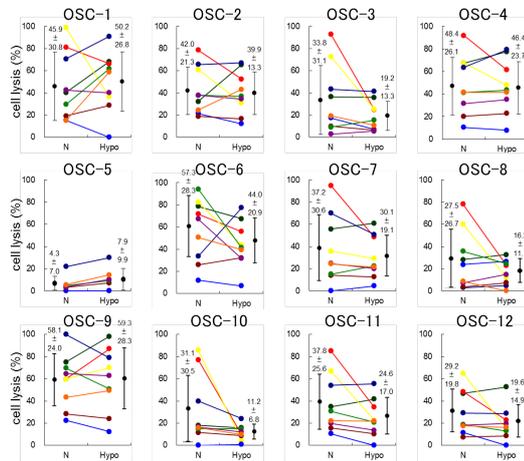


図1A: OSC細胞のLAK細胞に対する感受性に及ぼす低酸素の影響

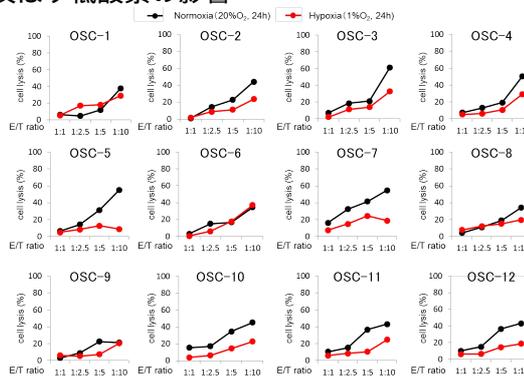


図1B: OSC細胞のNK-92細胞に対する感受性に及ぼす低酸素の影響

(2) NK-92の細胞表面抗原の発現に対する低酸素の影響

NK-92細胞の標的細胞傷害に関わるNKG2D、NKp44受容体、パーフォリン、グランザイムB、IFN- $\gamma$ 及び標的細胞認識に関わるCD2、CD54、CD58、CD11aの発現に及ぼす低酸素の影響を検討するため、正常酸素分圧および低酸素分圧下で24時間培養したNK-92におけるそれらの発現をフローサイトメトリー法にて検討した。その結果、低酸素処理によりIFN- $\gamma$ 、パーフォリン、CD11a、CD54、の発現低下が認められた(図2)

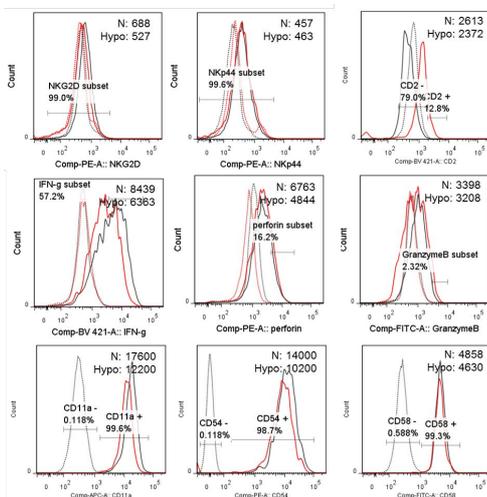


図 2 : NK-92 細胞の細胞表面抗原の発現に及ぼす低酸素の影響

(3) OSC 細胞の細胞表面抗原の発現に対する低酸素の影響

OSC 細胞のキラー細胞に対する被傷害性に関わる MHC クラス I、CD80、MICA、MICB、CD2、CD11a、CD54、CD58 の発現が低酸素処理によりどのように変化するかフローサイトメトリーにて検討した。その結果、細胞株によって多少の違いはあるものの、MHC クラス I、CD80、MICA、MICB、CD54、CD58 は低酸素処理によりその発現強度が減弱した (図 3)。

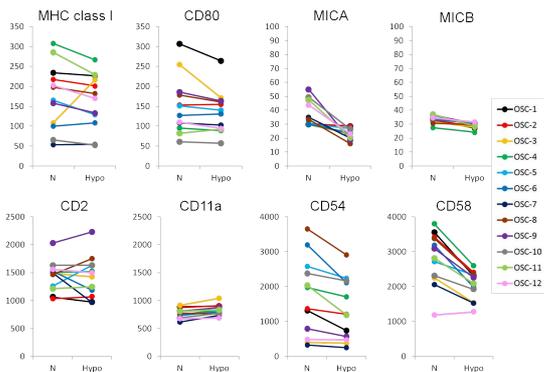


図 3 : OSC 細胞の細胞表面抗原の発現に及ぼす低酸素の影響

(4) OSC 細胞と NK-92 細胞との結合に及ぼす低酸素の影響

低酸素処理により OSC 細胞とキラー細胞の表面抗原の発現が減弱することが明らかとなったが、これらの抗原はお互いカウンターパートであるものもあることから、両細胞の結合が低酸素処理によりどうなるかを検討した。両細胞を蛍光色素で標識した後、非接着 Dish を用いて、正常および低酸素分圧下で 24 時間培養し、その後 NK-92 細胞が結合した OSC 細胞の割合をフローサイトメトリー法にて解析した。その結果、低酸素処理により NK-92 細胞が結合している OSC 細胞の割合はいずれの OSC 細胞においても減少した (図 4)。

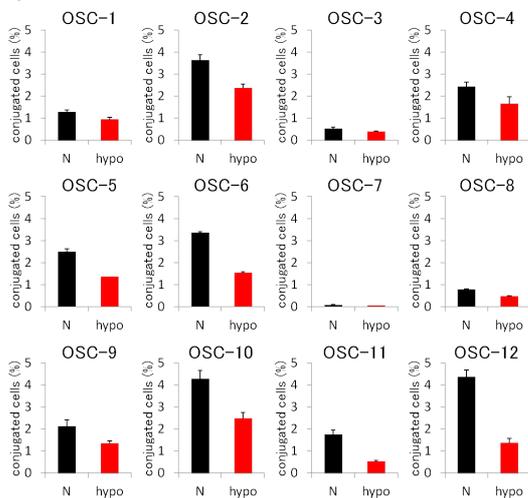


図 4 : OSC 細胞と NK-92 細胞との結合に及ぼす低酸素の影響

(5) OSC-4 細胞のキラー細胞に対する感受性に及ぼす HIF-1 ノックダウンの影響

キラー細胞による OSC 細胞傷害は低酸素処理により減弱することが明らかとなったが、それには低酸素応答のマスター遺伝子である HIF-1 が関与していることが考えられる。そこで、HIF-1 の発現を siRNA にてノックダウンした OSC 細胞の LAK 細胞あるいは NK-92 細胞に対する感受性が低酸素処理によってどのような影響を受けるか検討した。その結果、低酸素処理によりコントロール細胞では両キラー細胞に対する感受性が低下したが、HIF-1 をノックダウンしておく低酸素処理しても両キラー細胞に対する感受性はほとんど低下しなかった (図 5)。

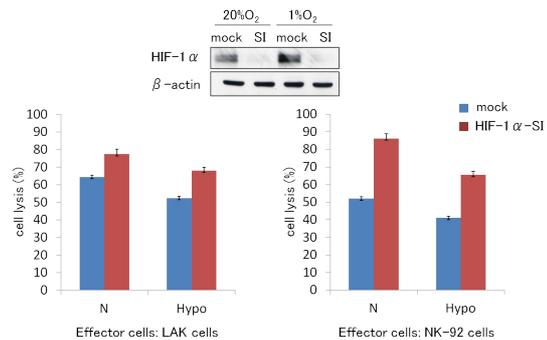


図 5 : OSC-4 細胞のキラー細胞に対する感受性に及ぼす HIF-1 ノックダウンの影響

以上の結果より、腫瘍局所の低酸素環境は口腔扁平上皮癌の局所腫瘍免疫を負に制御しており、それには HIF-1 を介した細胞傷害性蛋白の産生低下やキラー細胞による標的細胞の認識力の低下などが考えられた。

## 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)

[学会発表](計 3 件)

笹部衣里、村田智子、仙頭慎哉、大野清二、山本哲也

低酸素環境が口腔扁平上皮癌の局所抗腫瘍免疫に及ぼす影響

第 58 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会 (2013 年 10 月 11-13 日、福岡国際会議場、福岡マリンメッセ、福岡)

笹部衣里、村田智子、山本哲也

口腔扁平上皮癌における低酸素環境ならびに HIF-1 の局所腫瘍免疫に及ぼす影響

第 17 回日本がん免疫学会総会 (2013 年 7 月 3-5 日、ANA クラウンプラザホテル宇部、宇部)

笹部衣里、吉村友秀、汪建国、山田朋弘、山本哲也

口腔扁平上皮癌の局所腫瘍免疫に対する低酸素環境ならびに低酸素誘導因子 HIF-1 の影響

第 65 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (2011 年 4 月 21-22 日、タワーホール船堀、東京)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm\\_dntst/index.htm](http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_dntst/index.htm)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 哲也 (YAMAMOTO TETSUYA)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：00200824

### (2) 研究分担者

宇高 恵子 (UDAKA KEIKO)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：40263066

山田 朋宏 (YAMADA TOMOHIRO)

九州大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60335619

笹部 衣里 (SASABE ERI)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：40363288

北村 直也 (KITAMURA NAOYA)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：70351291

李 康弘 (RI YASUHIRO)

高知大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70587526

(H23-H23：研究分担者)

大野 清二 (OHNO SEIJI)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：40624995

(H24.4-H25.8：研究分担者)