

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：24601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：平成 23 ～ 24 年度
 課題番号：23792371
 研究課題名（和文）口腔がんに対する MICA 遺伝子に関連した新規ペプチドワクチンの同定
 研究課題名（英文）Identification of a new MICA peptide vaccine for oral cancer
 研究代表者 玉置 盛浩（TAMAKI SHIGEHIRO）
 奈良県立医科大学・医学部・研究員
 研究者番号：90382316

研究成果の概要（和文）：本研究はMICA遺伝子に関連したペプチドワクチンの開発を目的としている。同意を得た口腔がん患者の静脈血からDNAの抽出を行い、MICA遺伝子のマイクロサテライト多型解析を行った。さらに血清中のMICAタンパク濃度測定を行ったところ、進行がん患者のMICAタンパク濃度が上昇傾向であった。また、MICAタンパクとCD4/CD8などの各種抗体の測定を行い、MICA遺伝子に関連したペプチドの合成を行っているが、有効なペプチドの合成には至っていない。今後は、がん免疫に関与している $\gamma\delta$ T細胞とMICA遺伝子に関連したペプチドの検討を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop a MICA peptide vaccine. DNA was extracted from the venous blood of consenting patients with oral cancer, and MICA gene microsatellite polymorphism analysis was performed. Examination of serum MICA protein levels revealed a trend of increased MICA protein levels in patients with advanced cancer. While we evaluated various MICA and CD4/CD8 antibodies and attempted to synthesize effective MICA peptides, these efforts were unsuccessful. We plan to carry out studies on $\gamma\delta$ T cells, which are involved in cancer immunity, and MICA peptides in the future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度	2,100,000	630,000	2,730,000
平成24年度	1,200,000	360,000	1,560,000
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：遺伝子多型 免疫療法

1. 研究開始当初の背景
がん細胞やウイルスなどを非自己として認

識して生体内から排除する免疫監視機能には抗原提示能力をもつ樹状細胞(DC)や

Natural Killer (NK) 細胞などさまざまな細胞やサイトカインが関与している。その代表的ながん免疫監視機能として、(1)CD8 陽性細胞障害性 T 細胞(CTL)が樹状細胞から発現する MHC Class I 由来のペプチドを認識して活性化することでがん細胞を攻撃する。(2) CD4 陽性ヘルパーT 細胞(Th)が樹状細胞から発現する MHC Class II 由来のペプチド複合体を認識し、CTL の活性化サイトカインを放出する。(3) CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞が、がん細胞表面に発現した The major histocompatibility complex (MHC) class I chain-related gene A 以下 (MICA) タンパクを NKG2D を介して認識することでがん細胞を攻撃するがん免疫監視機能がある。しかし、このようながん免疫監視機能をすり抜けて回避、増殖することで固形がんが発症するとされているが、いまだにその免疫回避機能は明らかにされていない。また、MICA 遺伝子は第 6 染色体に位置しており、遺伝子多型が高度であるためさまざまな疾患感受性遺伝子が報告されている(申請者: Tamaki. Genetic testing and biomarkers 2009)。また、マイクロサテライトマーカーを用いて MICA 遺伝子の多型解析を行った結果、特定の遺伝子を有する患者において腫瘍再発、口腔がん発症と関与している可能性を報告した(申請者: Tamaki. J Oral Pathol Med 2007)。この MICA-A5.1 型遺伝子は、塩基配列においてグアニンの挿入により遺伝子変異を引き起こしている。そのため、他の遺伝子型と比較して、MICA-A5.1 型の遺伝子産物である MICA タンパクは可溶性成分が増大し癌細胞膜に定着することができず、容易に血清中に遊離していると示唆される。そこで申請者らは口腔がん患者の血清中 MICA タンパク濃度を測定したところ、進行がん患者において傾向を認め、さらに MICA-A5.1 型遺伝子を有する口腔

がん患者は有意に MICA タンパク濃度が上昇し、生存率が低下していることを報告した。しかし口腔がん患者の血清中 MICA タンパクの濃度が上昇しているのに関わらず NKG2D や CD8 陽性 T 細胞によるがん免疫監視機構が十分に成立せずながんが進行しているがん免疫回避機能は解明されていない。また現在さまざまながんワクチンが開発されており、第 II～III 相試験の段階にあるもの少なくない。特に進行がんに対して CD8 陽性 T 細胞に認識される HLA-A24 拘束性ペプチドワクチンの効果が注目されており、HLA 遺伝子と強く関連している MICA 遺伝子も同様にペプチドを同定することが可能と思われる。

2. 研究の目的

現在、各領域の癌においてさまざまな新規がんペプチドワクチンが開発されており、その中でも進行がん患者に対する HLA class I 拘束性ペプチドワクチンの有効性が報告されている。しかし、口腔がんに対するペプチドワクチンの有効性の報告は少ない。そこで口腔がんに対して HLA 遺伝子と強く関連している MICA 遺伝子に関連した新規ペプチドワクチンの開発を目的とする。MICA 遺伝子は HLA 遺伝子の近傍に位置しており、お互いに強く関連している。そのため、すでに臨床応用され、進行がんに対して治療効果を示している HLA-A24 拘束性ペプチドワクチンと同様に MICA ペプチドワクチンが同定できる可能性が高いと思われる。また本研究により口腔がん患者で MICA-A5.1 型を有する血清中の MICA タンパク濃度は上昇していると予測されるため、容易に MICA 抗体が測定できると思われる。また、臨床応用として HLA Class I 拘束性(HLA-A24)の対象患者の中からさらに MICA-A5.1 型遺伝子を有する患者を限定し採血し、得られた MICA-A5.1 型由来の MICA 抗体から MICA ペプチドワクチンを合成する。

その MICA ペプチドワクチンを皮内に投与すること樹状細胞上の HLA class I 複合体に結合した MICA タンパクを CD8 陽性細胞が認識、活性化する。活性化された CD8 陽性細胞は口腔がん細胞表面に発現している MICA タンパクを標的として攻撃する。MICA-A5.1 型遺伝子由来のペプチドワクチンは HLA-A24 拘束性ペプチドワクチンの相乗効果によりさらなる免疫治療の効果が期待される。

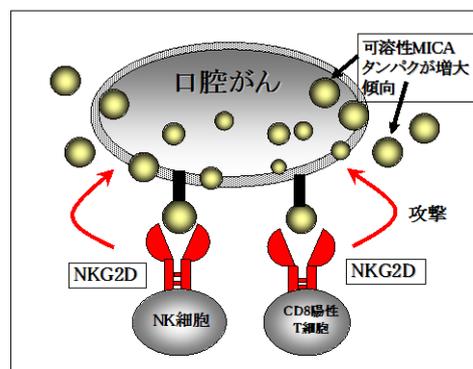
3. 研究の方法

本研究は以下の 5 項目を研究期間に明らかにすることを目的とする。(1) 遺伝子倫理委員会で承認された同意書を用いて口腔がん患者または健常者から静脈血を採取し DNA を抽出する。具体的には、外来にて、倫理委員会で承認された説明文と同意書を用いて行う。インフォームドコンセントを得た後に本疾患患者および健常者の前腕部から 10ml の採血を行う。また資料提供者から採取した試料の個人情報は大学の定めた個人情報管理者により連結可能匿名化措置を行う。これらの個人情報はインターネットに接続していないコンピューターにより整理され、漏洩しないように厳重に管理される。(2) 抽出した DNA から全 HLA 領域における塩基多型 (SNPs) タイピングを行い、口腔がん遺伝子変異を検索する。(3) マイクロサテライトマーカーを用いて MICA 遺伝子多型解析と HLA タイピングを行う。GeneAmp-PCR システム 9700 にて MICA 遺伝子の膜貫通領域をコードする exon 5 のマイクロサテライト領域を増幅し、DNA シークエンサーにてマイクロサテライトタイピングを行い遺伝子多型を解析する。DNA シークエンサーは総合研究施設に現有する。また HLA タイピングも同様に行う。(4) 血清成分から ELISA 法を用いて MICA タンパクの測定を行い、フローサイトメトリー法にて MICA 抗体の測定およびペプチドの同定を行

う。(5) 口腔がん細胞上において免疫染色にて ICA タンパクの発現量を測定し CD8 陽性 T 細胞に認識される抗原の同定を行い、HLA-A24 を有する患者に限定して CTL を誘導できる MICA-A5.1 由来の MICA ペプチドワクチン抗体を同定する。

4. 研究成果

研究成果としては、口腔がん患者から採血を行い MICA 遺伝子の膜貫通領域をコードする exon5 のマイクロサテライト領域の多型解析を行った。さらに血清中の MICA タンパク濃度の測定を行い検討したところ、口腔がん患者において可溶性 MICA タンパクの濃度が上昇傾向にあった。また、最終年度に血清中の MICA タンパクに対して CD4/CD8、MICA などの各種抗体の発現量の解析をフローサイトメトリー法で行い、遺伝子多型に関連したペプチド合成を試みたが MICA タンパクが微量であるため有用なペプチド同定の結果を得られなかった。今後の展開としては、引き続き MICA 遺伝子多型に関連したペプチド合成を行う。さらに



MICA と強く関与し、がん細胞排除免疫に重要な役割を果たしている $\gamma\delta$ T 細胞と MICA タンパク発現量に関して検討を行う予定である。

図 1 : MICA のがん免疫監視機能

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 5 件）

- (1) 玉置 盛浩、山中康嗣、他 7 名中 1 番目、透析患者における抜歯に関する臨床的検討、日本口腔科学会雑誌、査読有り、61 巻、2012 211-217
- (2) 玉置 盛浩、山中康嗣、他 4 名中 1 番目、顎顔面外傷に続発した外傷性内頸動脈血栓症の 1 例、日本口腔外科学会学会雑誌、査読有り、58 巻、2012 723-727
- (3) 玉置 盛浩、山中康嗣、他 7 名中 1 番目、唾液腺原発粘表皮癌の臨床病理学的検討、日本口腔腫瘍学会雑誌、査読有り、24 巻、2012 137-145
- (4) 玉置 盛浩、山中康嗣、他 8 名中 1 番目、抗凝固薬内服患者に対する抜歯における INR 即時測定装置コアグチェックの有用性、日本口腔診断学会雑誌、査読あり、2013 26 巻掲載内定
- (5) Wataru Kawashima、Shigehiro Tamaki、他 7 名中 6 番目、Asphyxial death related to postextraction hematoma in an elderly man、Forensic science international、査読あり、2013 228 47-49

〔学会発表〕（計 4 件）

- ①玉置 盛浩、ワルファリン内服患者に対する INR 即時測定装置 Coagu Chek XS の有用性、第 22 回日本有病者歯科医療学会総会 学術大会、2013 年 3 月 30、31 日、東京
- ②玉置 盛浩、当科において超選択的動脈塞栓術を行った 15 例の臨床検討、第 31 回日本口腔腫瘍学会総会 学術大会、2013 年 1 月

24、25 日、東京

- ③玉置 盛浩、他 9 名、第 6 染色体上の HLA 領域に存在する MICA、B 遺伝子は口唇口蓋裂発症に関与しているか？ 第 24 回日本小児口腔外科学会総会 学術大会、2012 年 11 月 24 日～25 日、愛知県
- ④玉置 盛浩、ゾレドロン酸で活性化した $\gamma \delta T$ 細胞を用いた口腔がんに対する免疫細胞療法の検討、第 57 回日本口腔外科学会総会 学術大会、2012 年 10 月 19～21 日、神奈川県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉置 盛浩 (TAMAKI SHIGEHIRO)
奈良県立医科大学・医学部・研究生
研究者番号：90382316

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし