

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593032

研究課題名(和文)NK細胞活性化受容体リガンドをターゲットとした口腔癌に対する個別化治療の開発

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・大学病院・助教

研究者番号：10291486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：当科で樹立したOSCC細胞株であるKO細胞の培養上清中から抗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の精製を行い、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。MICA蛋白およびsMICAの発現に及ぼすTGF- $\beta$ 1/2の影響をWestern Blot法およびELISA法により検討した結果、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2のいずれもsMICAの産生を濃度依存的に促進した。さらにTGF- $\beta$ 1/2siRNA導入KO細胞では細胞表面MICA蛋白の発現は亢進し、培養上清中へのsMICAの産生は著しく抑制された。

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. As we have purified sMICA produced by KO cells, the molecular weight of sMICA produced by KO cells was 24,000. Furthermore, TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 was concentration-dependent manner to promote the production of sMICA. Expression of cell surface MICA protein was enhanced and production of sMICA into the culture supernatant was significantly suppressed in KO cells transfected with TGF- $\beta$ 1/2 siRNA.

研究分野：口腔外科

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 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 chain-related)遺伝子は、HLAクラスⅡ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)があり、MICAの遺伝子多型とパーチェット病(Mizuki, N., *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 1298-1303, 1997)やⅡ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。

また、HCV陽性肝癌患者721名と健常人2890人について約43万箇所の一塩基多型を比較したゲノムワイド関連解析の結果、MICA遺伝子の遺伝子多型が、慢性C型肝炎から肝癌の発症リスクに関係する遺伝子であることが報告され(Vinod Kumar, *Nature genetics* 43:455-459, 2011)、MICA遺伝子が、肝癌感受性遺伝子であることが明らかにされた。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( $\chi^2=16.203$ ,  $Pvalue=0.00006$ )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蛋白の産生機構の解析を行う。さらに、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

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した。

#### 4. 研究成果

基礎的検討として当科で樹立した 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。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 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。そこで、同領域で MICA 切断能を有する蛋白分解酵素について検討すると 210 番目のアスパラギン(N)と 211 番目のバリン(V)間を切断する MMP-3 と 215 番目のグルタミン酸(E)と 216 番目のアラニン(A)間を切断する MMP-8 および 243 番目のグリシン(G)と 244 番目のバリン(V)間を切断する MMP-2/9 の 3 つの MMPs が候補として考えられた。また、それぞれ産生される sMICA の分子量は 20,600、21,100、24,200 と予測され、MMP-2/9 が最も関与している可能性が考えられた。さらに MICA 蛋白および sMICA の発現に及ぼす TGF- $\beta$ 1/2 の影響を Western Blot 法および ELISA 法により検討した結果、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 のいずれも、sMICA の産生を濃度依存的に促進することが明らかになった。さらに TGF- $\beta$ 1/2 siRNA 導入 KO 細胞では細胞表面 MICA 蛋白の発現は亢進し培養上清中への sMICA の産生は著しく抑制された。

臨床的検討として、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、各治療(外科療法、化学療法、放射線療法、免疫療法)の奏効性や臨床病態などとの関連性を検討し、統計処理が可能となるように症例を蓄積している。

#### 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. 早期舌癌における FDG-PET

(18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography) の原発巣 SUVmax(maximum standardized uptake value) を用いた頸部リンパ節転移予測: 虎谷茂昭, 鍋島巧, 谷亮治, 笹原妃佐子, 岡本哲治: 広島大学歯学雑誌、査読有 (46 巻1号 Page36-41(2014.06)

##### 2. Generation of Human Induced Pluripotent Stem (Ips) Cells in Serum- and Feeder-Free Defined Culture and TGF- $\beta$ 1 Regulation of Pluripotency.

Yamasaki S, Taguchi Y, Shimamoto A, Mukasa H, Tahara H, Okamoto T. PLoS One. 査読有 2014 Jan 29;9(1):e87151. doi: 10.1371/journal.pone.0087151. eCollection 2014.

PMID: 24489856 [PubMed - in process] **Free PMC Article**

##### 3. Long-term serial cultivation of mouse induced pluripotent stem cells in serum-free and feeder-free defined medium.

Yamasaki S, Nabeshima K, Sotomaru Y, Taguchi Y, Mukasa H, Furue MK, Sato JD, Okamoto T. Int J Dev Biol. 査読有 2013; 57(9-10):715-24. doi: 10.1387/ijdb.130173to.

PMID: 24307297 [PubMed - in process] **Free Article**

##### 4. Okamoto T, Sato JD, Barnes DW, Sato GH. Cytotechnology. 査読有 2013 Dec;65(6):

967-71. doi: 10.1007/s 10616-013-9591-1.

Epub 2013 Jul 5. PMID:23828098 [PubMed]

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称 : Generation of human induced pluripotent stem (iPS) cells in serum- and feeder-free defined culture and TGF- $\beta$ 1 regulation of pluripotency.

発明者 : Tetsuji Okamoto, Sachiko Yamasaki

権利者 : Hiroshima University,

種類 : PTC 出願

番号 : PCT/JP2014/006454

出願年月日 : December 25, 2013.

国内外の別 : 米国特許申請

## 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・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号 : 00169153

虎谷 茂昭 (TORATANI SHIGEAKI)

広島大学・医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号 : 90172220