

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870633

研究課題名(和文) 口腔がんに対する T細胞とMICA遺伝子に関連した免疫細胞療法の検討

研究課題名(英文) Investigation into an immune cell therapy for oral cancer associated with gamma delta T cells and the MICA gene

## 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： T細胞はがん排除免疫を担うリンパ球であるが、ヒト末梢血中に数%しか存在していないため抗腫瘍作用を発揮できていない。本研究は、 T細胞を体外で活性化培養して口腔がん細胞に対する細胞障害性とMICA遺伝子との関連を検討することである。研究結果として(1)末梢血を用いてゾレドロン酸とIL-2を用いて T細胞の活性化培養を行った。(2) T細胞の口腔がん細胞に対する細胞障害性とMICA遺伝子多型との関連を検討した。(3) T細胞と分子標的薬であるセツキシマブを併用することで細胞障害性が増大し、免疫細胞療法の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： T cells are lymphocytes responsible for anti-cancer immunity; however, because they only comprise a small percentage of the peripheral blood cells in humans, their anti-tumor action has not been sufficiently demonstrated. The present study investigated the cytotoxicity of in-vitro cultured T cells towards oral cancer cells. The methods and results were as follows: (1) Peripheral blood was cultured and the T cells activated using zoledronic acid and IL-2. (2) The cytotoxicity of T cells towards oral cancer cells appeared to be related to MICA gene polymorphisms. (3) Combining T cells with the molecular targeted drug cetuximab increased their cytotoxicity, suggesting the utility of these agents in immunotherapy.

研究分野：免疫学

キーワード： T細胞 口腔がん 免疫細胞療法 MICA遺伝子

1. 研究開始当初の背景

日本人において最も多い死亡原因はがんであり、治療法として外科療法、化学療法、放射線療法が選択されるが、治療効果や副作用などの問題がある。一方、第4の治療法として免疫細胞療法が注目されている。免疫細胞療法とは、樹状細胞ワクチンや抗原ペプチドを標的とした抗原特異的療法とがん細胞に共通して発現している分子を標的とする非特異的療法の1つであるガンマ・デルタ T(以下 T)細胞療法は食道がん、膵がんなどの進行がん臨床応用され、その有用性が報告されている。T細胞はリンパ球の1種であり、がん細胞や細菌から生体から防御する役割を担っている。主な抗腫瘍作用は、サイトカインである INF- $\gamma$  を放出してがん細胞を攻撃する。イソペンテニルピロリン酸(以下 IPP)を蓄積したがん細胞を認識することで攻撃する。がん細胞表面に発現している Major histocompatibility complex (MHC) class I related gene A(以下 MICA)を認識してがん細胞を攻撃することが報告されている(図1、2)。しかし、T細胞は強力な抗腫瘍作用をもつが末梢血中にわずか1%程度しか存在しておらず、効率的にがん排除免疫に作用していない。

しかし、近年ビスホスホネート製剤であるゾレドロン酸を用いることで、体外で T細胞を増殖させる培養法が報告された。ゾレドロン酸が、メバロン酸代謝を阻害して抗原提示細胞からの IPP 分泌を促進し、T細胞は IPP と IL-2 の刺激を受けることで大量に活性化増殖する(図3)。一方で、ゾレドロン酸は下顎骨髄炎を引き起こすなどの問題点もあり口腔がんの T細胞療法に関して積極的に検討されていない。さらに再発を繰り返したがん患者は免疫抑制状態にあり、MICA タンパクの発現量が低下しているため T細胞が正常に機能せず、抗腫瘍作用が回避され、がん細胞が増殖していると考えられている。

一方、T細胞の抗腫瘍作用に関与している MICA タンパクは、がん細胞表面に発現しており、このタンパクを認識して NKG2D ががん細胞を直接攻撃することが報告されている。また、MICA 遺伝子は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。そこで口腔がん患者の MICA タンパク濃度を測定したところ、進行がん患者に上昇傾向を認めていた。これらの研究成果から T細胞は MICA タンパクを認識して抗腫瘍作用を発揮することから MICA タンパクが過剰に発現していると T細胞の抗腫瘍作用が効率よく発揮されることが示唆される。また、MICA タンパクの増加と T細胞の抗腫瘍作用のメカニズムを解析すれば、T細胞免疫治療の治療効果の増大が期待される。

図1: T細胞の抗腫瘍作用

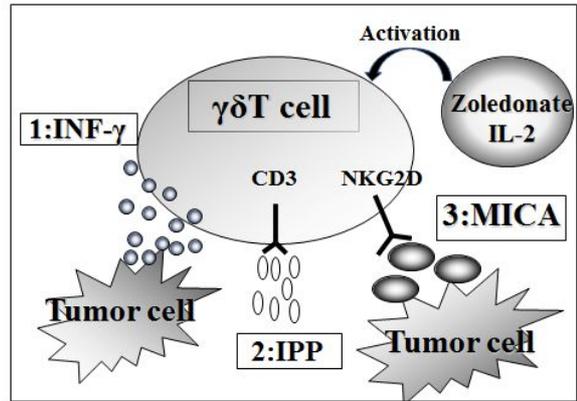


図2: MICA タンパクの抗腫瘍作用

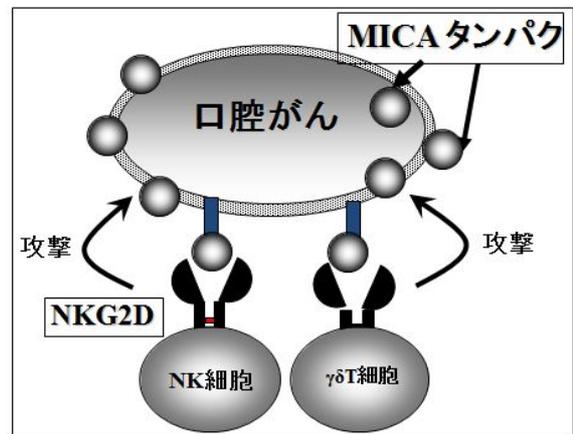
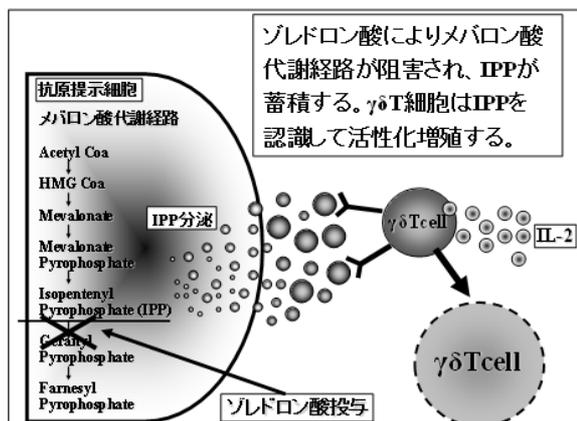


図3: ゾレドロン酸と IL-2 を用いた T細胞の活性化



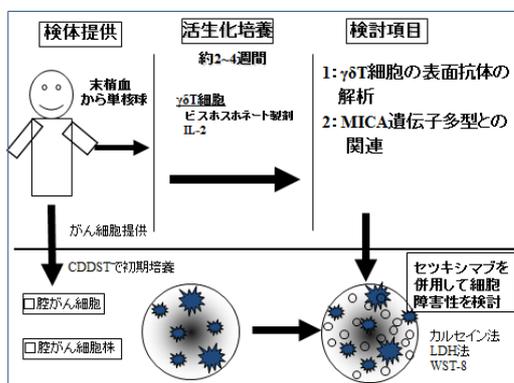
## 2. 研究の目的

本研究の目的は、T細胞の抗腫瘍作用に関与している MICA タンパクの遺伝子多型と T細胞のがん細胞に対する細胞障害性を検討し、さらなる強力な効率のよい T細胞療法の開発を目的としている。具体的には、(1)がん患者の血清を用いて、ゾレドロン酸と IL-2 による T細胞の活性化培養を行い、Flow cytometry 法で T細胞の表面抗体に関して検討する。(2)活性化培養した T細胞を用いて in vitro でがん細胞株に対する細胞障害性を検討する。(3)MICA 遺伝子多型と T細胞の細胞障害性の関連を検討する。(4)口腔がん患者の血清中、培養液中の MICA 濃度を測定し T細胞の細胞障害性との関連を検討する。(5) T細胞療法の臨床応用に向けて活性化培養を行った T細胞に TS-1、セツキシマブなどの各種抗がん剤を併用し細胞障害性を検討することを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1)試料収集ヒトゲノム・遺伝子解析倫理委員会で承認されている説明文と同意書を用いてインフォームドコンセントを得た後に採血を行う。採取した試料の個人情報、連結可能匿名化措置を行い漏洩しないように厳重に管理する。(2)DNA 抽出はフェノールクロロホルム法で行う。(3)MICA 遺伝子マイクロサテライトタイピングは、全 HLA 領域における 1塩基多型(SNPs)タイピングと PCR システムにて 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遺伝子多型を解析する。(4)MICA タンパクの抗体測定は、血清中の MICA タンパクの測定は、フローサイトメトリー法で行い、可溶性 MICA タンパクの定量は ELISA 法で行う。(5) T細胞の活性化培養に関しては、ゾレドロン酸と IL-2 を用いて約 2 週間の活性化培養を行い、T細胞活性化培養後の表面抗体をフローサイトメトリー法にて測定を行う(図 4)。

図 4 : MICA 遺伝子多型と T細胞培養



## 4. 研究成果

本研究は、T細胞を体外で培養して口腔がん細胞に対する細胞障害性と MICA 遺伝子との関連を検討することである。

### 研究結果として

- (1)末梢血単核球からゾレドロン酸と IL-2 を用いて約 2 週間の T細胞の活性化培養を行い、フローサイトメトリー法にて各種表面抗体の発現を確認した。
- (2) T細胞のがん細胞株に対する細胞障害性と MICA 遺伝子多型との関連を検討した結果、MICA-A5.1 型遺伝子と各種口腔癌がん細胞株に対する細胞障害性との関連が示唆された。
- (3)活性化培養を行った T細胞と分子標的薬であるセツキシマブを併用することで口腔がん細胞株に対して細胞障害性が増大していた。T細胞と抗体依存性細胞障害活性をもつセツキシマブを併用する細胞免疫療法の有用性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 5 件)

口腔がんに対する活性化 NK 細胞を用いた免疫細胞療法の有効性の検討  
中村泰士 玉置盛造 その他 6 名  
第 59 回 日本口腔外科学会総会・学術大会  
2014 年 10 月 17 ~ 19 日 幕張メッセ

セツキシマブと活性化 NK 細胞を併用した免疫療法の検討  
中村泰士 玉置盛造 その他 6 名  
第 33 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会  
2015 年 1 月 29、30 日 奈良県新公会堂

口腔癌細胞に発現する EGFR とセツキシマブを介した ADCC 活性との関連  
中村泰士 玉置盛造 その他 5 名  
第 60 回 日本口腔外科学会総会・学術大会  
2015 年 10 月 16 ~ 18 日 名古屋国際会議場

口腔癌細胞株における cetuximab を介した抗体依存性細胞障害(ADCC)活性と細胞表面 EGFR 発現との関連  
中村泰士 玉置盛造 その他 4 名  
第 34 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会  
2016 年 1 月 21、22 日 横浜市開港記念会館

Rituximab が奏功した口腔・咽頭部原発の悪性リンパ腫の 2 例  
中村泰士 玉置盛造 その他 3 名  
第 70 回 NPO 法人 日本口腔科学会学術大会  
2016 年 4 月 15、16 日 福岡国際会議場

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 研究員

研究者番号：9 0 3 8 2 3 1 6