

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：84408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20300

研究課題名(和文) 小児悪性固形腫瘍における自然免疫による癌免疫治療開発の基礎的研究

研究課題名(英文) Expression and localization of MHC class I-related chain molecules A and B in human rhabdomyosarcoma cells

研究代表者

山道 拓 (Yamamichi, Taku)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター(研究所)・その他部局等・小児外科・診療主任

研究者番号：30715165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍細胞はNK細胞の活性化に重要なNKG2Dに結合するリガンドを発現しており、また免疫回避の一つとしてその一つであるMICA/Bを利用していることが示唆されている。今回「横紋筋肉腫細胞に存在するNKG2DリガンドのMICA/BがNK細胞に認識され、腫瘍細胞を制御可能である。」という仮説を通して、免疫療法の標的因子としてMICA/Bを検証した。MICA/BのmRNAとタンパク質は横紋筋肉腫細胞株の一部で発現していた。臨床検体において免疫組織学的に解析したところ、化学療法後にMICA/Bの陽性例が増加していた。特に胎児型RDのMICAにおいてはNK細胞の治療標的となりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Natural killer (NK) cells are important for the defense against tumors. The interaction of the MHC class I-related chain molecules A and B (MICA/MICB) with the corresponding NK group 2, member D receptor activates NK cells. We investigated the expression and localization of MICA/MICB in human rhabdomyosarcoma (RMS) tumors and cell lines.

The immunohistochemical staining showed that 21 of 25 clinical tumor samples were positive for either MICA or MICB. The Western blot analysis revealed that the MICA protein was presented in all RMS cell lines (RH30, RD and RMS-YM), as well as the mRNA expression, and the MICB protein was presented in the RD and RMS-YM cells. However, the surface expression of MICA and MICB was limited with only MICA being detected on RD cells. Our results suggest that RMS cells have the ability to produce the MICA and MICB proteins, whereas only RD cells expressed MICA on their cell surface. Therefore, MICA/MICB could be therapeutic targets for RMS immunotherapy.

研究分野：小児外科

キーワード：横紋筋肉腫 NK細胞 免疫療法

## 1. 研究開始当初の背景

小児悪性固形腫瘍の予後は集学的治療によりめざましい改善を見せているが、進行例や再発例は手術、化学療法や放射線療法などの集学的治療を行っても予後の劇的な改善は得られておらず、免疫療法などの他の代替治療の開発が望まれる。本来、腫瘍細胞に対する自然免疫 (NK、NKT 細胞など) と獲得免疫 (細胞傷害性 T 細胞 (CTL) など) の両者より成る免疫監視機構が存在し、発癌抑制に重要な役割を果たしている。CTL は癌細胞上の MHC class I 上に提示される癌抗原ペプチドを認識して、癌細胞を攻撃するが、ヒト癌細胞においては MHC class I の発現低下などの免疫回避機構が存在するため、CTL のみによる免疫治療には限界がある。一方、自然免疫においては NK 細胞がその中心的役割を担っている。NK 細胞は、T 細胞のように抗原特異的なレセプターは持たないものの、あらかじめゲノムにコードされた複数のレセプター群を用いて異常細胞の認識を行う。このレセプター群には機能抑制に働く抑制性レセプターと活性化に働く活性化レセプターとがあり、両者のシグナルバランスにより NK 細胞の機能は厳密に制御されている。NK 細胞の活性化に重要な活性化レセプターの代表が NKG2D である。この NKG2D レセプターに結合する NKG2D リガンドは、正常状態の細胞においてはほとんど発現しておらず、感染や腫瘍化などのストレスによって細胞表面上に発現が誘導される。発現誘導された NKG2D リガンドはレセプターを介して免疫担当細胞を活性化することにより、感染細胞や腫瘍細胞の排除に働く。ヒトの NKG2D リガンドはこれまで MICA/B、ULBP1~5 までの 7 種類の分子が同定されている。しかし興味深いことに、ある種のがん細胞では MMP プロテアーゼなどによって細胞表面上の MICA/B が切断

され、その結果、がん細胞表面上の NKG2D リガンドの存在量が減少するだけでなく、可溶性 MICA/B (sMICA/B) として放出される。この sMICA/B は放出された細胞自身に作用し、細胞表面上から NKG2D 量を減少させる。つまり癌細胞が免疫回避の手段の一つとして MICA/B を利用していることが示唆されている。また、近年では成人肝癌などで血中の可溶性 MICA/B 量と進行度や悪性度との関連が報告されている (Kohga et al. *Cancer Sci* 99: 1643-9, 2008)。しかし、希少疾患である小児固形腫瘍と NK 細胞に関するメカニズムは報告が少ない状況である。

## 2. 研究の目的

感染細胞や腫瘍細胞は、NK 細胞の活性化に重要なレセプターである NKG2D に結合するリガンドを発現しており、レセプターを介して免疫担当細胞を活性化する。これにより感染細胞や腫瘍細胞は排除されるが、癌細胞が免疫回避の手段の一つとして NKG2D のリガンドの一つである MICA/B を利用していることが示唆されている。実験的に示されているように NK 細胞の無秩序な活性化は自己免疫疾患の惹起など、生体にとって有害な現象を引き起こす可能性がある。従ってこれら NK 細胞と小児悪性固形腫瘍に関するメカニズムを明らかにできれば、腫瘍に対する秩序ある NK 細胞の活性化をもたらすことができ、新規治療が期待できると考えた。そこで自然免疫、特に NK 細胞活性化を利用した小児悪性固形腫瘍の制御に関する研究を立案した。

## 3. 研究の方法

### 1) 小児横紋筋肉腫細胞株における MICA/B 発現の検討

様々な小児悪性腫瘍細胞株を用いるが、まずは本実験に用いる小児横紋筋肉腫細胞株は胞巢型 RH30 と胎児型 RD, RMS-YM の 3 株で

ある。細胞株を培養し、RT-PCR 法にて MICA/B の mRNA レベルを測定する。また細胞表面上の MICA/B の存在をタンパクレベルで確認するため、フローサイトメトリーで検出する。抗体は MICA antibody (2C10) (Santa Cruz Biotech 社), MICB antibody (9847-1) (Santa Cruz Biotech 社)を用いる。Preliminary の実験結果として、3種類の細胞株の MICA/B の発現パターンはいずれも細胞内、細胞外でその発現パターンが異なっていた。

## 2) 臨床検体における MICA/B 発現と臨床背景との相関

肝細胞癌において、FGF-2 の血中濃度と肝細胞癌の成長に相関関係があることが報告されており IL-1 $\beta$  を添加することにより可溶性 MICA の生成が促進され、NK 細胞の感受性が亢進すると報告されている。そこで、阪大病院および関連施設での過去の横紋筋肉腫症例に関しての MICA/B の発現と患者背景の相関を検討する。これにより MICA/B の存在が実際の患児の病期や予後に寄与しているかを検討する。

## 4. 研究成果

### 1) 小児横紋筋肉腫細胞株における MICA/B 発現の検討

横紋筋肉腫細胞株 (胞巢型 RH30 と胎児型 RD, RMS-YM) において、MICA はいずれの細胞株でも mRNA の発現を認めしたが、MICB に関しては Rh30 において mRNA 発現を認めなかった。タンパクレベルにおける MICA/MICB の発現の検討では、MICB はいずれの細胞株でも発現していたが、MICA は RD のみで発現していた。またフローサイトメトリーを用いて検出された細胞表面上のタンパク発現は MICB ではいずれの細胞株でも発現を認めず、MICA では RD のみ発現を認めた。HLA は RMS-YM、RD で発現を認めしたが、Rh30 では発現を認めなかった。すなわち、MICA は全ての細胞株は遺伝子レベルでは陽性。タンパクレベルだと RD の

み陽性で、RD には細胞表面にも表出している。MICB に関しては、RD, RMS-YM は遺伝子は発現しており、タンパクに翻訳されるが、細胞表面に表出していない (表)。RH30 は Western blot で検出されているので、プライマーに問題があるかバリエーションである可能性が考えられた。以上より、横紋筋肉腫において、MICA/MICB の発現を制御することで NK 細胞活性を制御できる可能性が示された。特に胎児型 RD の MICA においては NK 細胞の免疫療法における治療標的となりうる可能性が示唆された。

	MICA			MICB		
	PCR	WB	FACS	PCR	WB	FACS
RH30	+	-	-	-	+	-
RD	+	+	+	+	+	-
RMS-YM	+	-	-	+	+	-

PCR : Real time PCR, WB : Western blot.

FACS : Flow cytometry

(表: 横紋筋肉腫細胞株における、MICA/B の遺伝子、タンパク発現)

### 2) 臨床検体における MICA/B 発現と臨床背景との相関

横紋筋肉腫の臨床検体において、化学療法の前後における MICA, MICB の発現を手術検体を用いて免疫組織学的に解析した。化学療法前の生検組織では 7 検体中 5 例で MICA が陽性、1 例で MICB が陽性であり、化学療法後の 16 検体については 15 例で MICA 陽性で、8 例で MICB 陽性であった。細胞内局在は不明であった。したがって化学療法前より化学療法後の検体のほうが MICA、MICB いずれも陽性率が増加していることが確認された。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山道 拓 (Yamamichi Taku)  
大阪母子医療センター 小児外科  
研究者番号：30715165

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし