

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：32409  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2017～2020  
 課題番号：17K11406  
 研究課題名(和文) 骨吸収抑制・癌免疫エディティングを考慮した新規歯肉癌治療の開発に向けた研究

研究課題名(英文) The development of new treatment for gingival cancer considering bone resorption and cancer immunoediting

研究代表者  
 中平 光彦 (Nakahira, Mitsuhiro)  
 埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：10253353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯肉上皮癌細胞株Ca9-22細胞においてMICA遺伝子およびタンパク質発現が高いことを確認した。MICA遺伝子が過剰に発現したCa9-22細胞のDNAマイクロアレイを行った結果、発現の上昇した遺伝子は830個、発現の低下した遺伝子は27個であった。マウスにおいてnetrin-4は生理的に血管内皮細胞から産生される可能性、そして閉経後骨吸収の促進に伴い濃度が低下することから生体内において骨代謝を正に制御する役割があることが示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

宿主の免疫細胞の表面にはNKG2Dという受容体があり、腫瘍はその発現を抑制する可溶性のMHC(主要組織適合遺伝子複合体)クラスI鎖関連タンパク質A(MICA)を分泌して免疫応答を回避し、抗腫瘍応答を減少させることが知られている。今回の研究からヒト歯肉上皮癌細胞において産生される免疫系細胞を攻撃する分子を制御すること、骨へ浸潤する歯肉上皮癌をnetrin-4が制御できる可能性があることから、今後の癌制御療法に有用であるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：We confirmed that human gingival cancer cell line Ca9-22 cells highly expressed MICA gene and protein. DNA microarray analysis in Ca9-22 cells forced expression of MICA gene revealed that 830 genes were upregulated and 27 genes were downregulated. TRAP-positive cells were also found in immediate vicinity of Ntn4-positive vascular endothelial cells during bone healing. We performed drill-hole injury experiments and TRAP staining followed by immunostaining for PECAM-1 at day 14. We also investigated whether Ntn4 expression was changed in the serum of ovariectomized osteoporotic mice. We found that serum Ntn4 levels were significantly decreased in ovariectomized osteoporotic mice. Ntn4 may have a critical role for bone metabolism with characteristic localization.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：癌治療 MICA netrin-4

## 1. 研究開始当初の背景

歯肉癌は早期に顎骨に浸潤し、骨破壊を呈する。病理組織学的には顎骨への浸潤様式として erosive pattern および infiltrative pattern に分類されている[Wong RJ, Laryngoscope 2000]。erosive pattern では癌と骨組織の境界に線維が介在し、平滑で連続的なパターンをとり骨吸収が癌浸潤よりも先行する。一方、infiltrative pattern では癌と骨組織の境界線が不整かつ不連続で癌が骨梁間へ浸潤するパターンをとり、癌浸潤が骨吸収よりも先行する。病理学的には infiltrative pattern では erosive pattern よりも骨吸収が著しいため破骨細胞が多いとされ、Ishikuro らは骨形態計測法により破骨細胞数を定量し、infiltrative pattern のほうが erosive pattern より破骨細胞数が多いという特徴を見出している[Ishikuro M, Bone 2008]。また、彼らは骨と癌の境界に存在する線維芽細胞様細胞に receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)が発現していることを組織学的に見出している。歯肉癌において、骨吸収を引き起こす役割者は RANKL であると考えられている[Jimi E, Int J Oncol 2013]。生理的なりモデリングの状態では、破骨細胞分化を促進する RANKL の主要な供給源は骨芽細胞・骨細胞と考えられている[Nakashima T, Nat Med 2011]。しかしながら、歯肉癌の場合には、Ishikuro らの報告のように、骨吸収に隣接して RANKL 陽性の線維芽細胞様細胞が存在していることから、骨芽細胞・骨細胞ではなく歯肉癌細胞が RANKL を産生することで infiltrative pattern のような著しい骨吸収を示すのではないかと推測している。際、研究分担者らは歯肉上皮細胞が RANKL を産生することを見出している[Fujihara R, J Periodontal Res 2014]。

癌細胞では NKG2D ligand が発現しており[Smyth MJ, J Exp Med 2005]、NKG2D ligand の受容体である NKG2D 受容体は NK 細胞・T 細胞などに発現している。ヒト癌細胞の NKG2D ligand として、MHC class I chain-related protein A (MICA), MICB, UL16-binding proteins (ULBP) 1-6 が知られており、口腔扁平上皮癌患者では血中の MICA, MICB レベルが高いことが報告されている[Tamaki S, Clin Immunol 2009; Tamaki S, Anticancer Res 2010]が、実際の NKG2D ligand が歯肉癌細胞において発現しているのかを検討した報告はない。研究代表者は予備実験でヒト歯肉癌の免疫染色を行ったところ、MICA/MICB が発現していることを見出している。

近年、癌免疫エディティングという概念が提唱され、癌の進行は排除 (elimination)・均衡状態 (equilibrium)・逃避 (escape) の3つの相に分けられている[Schreiber RD, Science 2011]。"elimination" は、癌の免疫監視機構であり、自然免疫系と獲得免疫系の両方の免疫細胞が関与して癌細胞を排除する。"equilibrium" では、一部の癌細胞が排除を逃れて長期に生存して均衡状態に至っている。この状態は、癌細胞が遺伝子変異の蓄積等により増殖能と免疫逃避能を向上させるのに対して、獲得免疫系が抑え込んでいる休止期の状態である。ここで決定的な遺伝子変異の獲得あるいは環境の変化により均衡状態が崩れると、免疫監視から逃避して "escape" に入り、癌細胞が異常増殖して腫瘍が形成される。"elimination" 相の開始で重要なプロセスは自然免疫である。癌細胞の存在を知らせる MIC ligand (MICA および MICB) は「danger signal」であり、NK 細胞・CD8+T 細胞の NKG2D 受容体に結合し癌免疫応答を活性化し、"elimination" 相への開始に重要な役割を果たす。ところが、この段階で NKG2D 受容体の down-modulation が起こると、MIC ligand は癌免疫応答を誘導せず、"elimination" は不十分なものとなる。NK 細胞・T 細胞における NKG2D 受容体の down-modulation は、CD4+T 細胞・CD8+T 細胞などリンパ球自体の MIC ligand が NKG2D 受容体の down-modulation に関与している[Cerboni C, Blood 2009]。また、ユビキチンリガーゼである c-Cbl は NK 細胞における MICA の受容体の down-modulation を誘導することが報告された[Molfetta R, Eur J Immunol 2014]。MICA が NK 細胞の NKG2D 受容体に作用すると、ユビキチンリガーゼである c-Cbl がリン酸化され、細胞質内への移行 (internalization) が起こる。その結果として、MICA の受容体の down-modulation を誘導する。一方、"escape" 相での最も知られている現象は癌免疫を阻害する PD-L1 の発現である。抗原提示細胞の PD-L1 は T 細胞の PD-1 受容体に結合して癌免疫応答を抑制する。また、癌細胞にも PD-L1 が発現しており、T 細胞が IFN $\gamma$  を介して癌細胞の PD-L1 発現を誘導している [Pardoll DM, Nat Rev Cancer 2012]。

癌組織には豊富な血管が認められることから、われわれは血管形成を制御するサイトカインである netrin family に着目している[Arakawa H, Nat Rev Cancer 2004]。netrin family は神経突起を制御する因子として発見されたが、近年、発癌に関わる知見が散見されている。胃癌患者において血中 netrin-1 濃度が上昇しており、化学療法後に低下すること[Kefeli U, Biomarkers 2012]、乳癌・腎臓癌・前立腺癌などで血中 netrin-1 濃度が上昇していること (Ramesh G, Biomarkers 2011) などが報告されている。また、netrin-1 は受容体 Unc5b と転写因子 p53 を介してアポトーシスを抑制することが in vitro で示されている[Tanikawa C, Nat Cell Biol 2003]。netrin-4 については乳癌で発現が亢進していること[Esseghir S, Clin Cancer Res 2007]、netin-4 が膠芽腫細胞の増殖を促進することが報告されている[Hu Y, Neoplasia 2012]。一方で、netrin の受容体の1つである deleted in colorectal cancer (DCC) のシグナルを介してアポトーシスが誘導されること[Mehlen P, Nature 1998]、乳癌モデルマウスにおいて DCC が p53 非依存性に転移を抑制する機能を有することが報

告されている[Krimpenfort P, Nature 2012]。しかしながら、netrin family が骨肉癌に関与するかどうかはまだ不明である。われわれは以前 netrin family が骨代謝に影響することを見いだしている。具体的には netrin-1 が骨芽細胞の分化抑制に関わること、netrin-4 が破骨細胞の分化を抑制することを見いだした。

## 2. 研究の目的

骨肉癌上皮細胞が MICA 遺伝子を発現するかどうかを調べ、骨肉癌上皮細胞に MICA を過剰発現させることで発現が誘導される遺伝子を網羅的に調べ、免疫系に影響を与える分子が産生されるかどうか検討する。netrin-4 の生体における局在を調べるとともに、卵巣除去マウスを作製し、netrin-4 の血中濃度を調べる。

## 3. 研究の方法

### (1)細胞培養

骨肉上皮細胞株として、理化学研究所バイオリソースセンターより購入したマウス由来 Ca9-22 細胞を用いた。1% fetal bovine serum(Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan)、100 U/mL penicillin G、100 µg/mL streptomycin、10 ng/mL epithelial growth factor(Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan)を添加した培養液 SFM-101 (Nissui, Tokyo, Japan) で培養した。すべての細胞培養は、2~3 日毎に培地交換を行い、二酸化炭素濃度 5%、33 °C の環境下で培養を行った。

### (2)定量 reverse transcription polymerase chain reaction (定量 RT-PCR)

回収した細胞を氷冷 PBS で洗浄し QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Hilden, Germany)を 1 mL 加えてスクレイパー (AGC TECHNO GLASS, Sizuoka, Japan) で回収し、プロトコールに従って全 RNA を抽出した。NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA) で定量した。全 RNA を High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific)により cDNA に変換し、TaqMan Gene Expression Assays(Thermo Fisher Scientific)を含む反応液 20 µL を用いて TaqMan 法による定量 PCR を行った。StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて 95 °C で 20 秒間、続いて 95 °C で 1 秒、60 °C で 20 秒の 40 サイクルを行った。定量 PCR の分析に関して、比較 Ct 法を用いて glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を内部標準とした。

### (3)ウェスタンブロッティング

回収した細胞氷冷 PBS で洗浄し ProteoGuard EDTA- Free Protease Inhibitor Cocktail (タカラバイオ社)を含む 0.1 % Triton X-100 で溶解し、20 分間氷上でインキュベート後、4 °C で 15,000 ×g で 5 分間遠心分離しタンパク質を含む上清を回収した。7.5 %および 10 % アクリルアミド の分離ゲルおよび 4 %アクリルアミドの濃縮ゲルを作成し、等量のタンパク質をローディングした。ATTO 社製の電気泳動装置を用いて 40 ミリアンペアの定電流にて電気泳動を行った。その後、タンク式転写装置(Cleaver scientific 社)を用いて 100 ボルトの定電圧にて Immobilon P VDF メンブレン(Merck Millipore 社)へ転写を行った。メンブレンをスキムミルク(9999S; Cell Signaling 社)に浸漬してブロッキング後、目的タンパク質をそれぞれに対する抗体で標識し、Clarity Western ECL Substrate(Bio-Rad 社)を使用して発光させ、Chemi-Doc XRS system (Bio-Rad 社)を用いてバンドを検出した。用いた抗体は次の通りである。1 次抗体としてヒトモノクローナル抗 MICA 抗体(MAB13001, R&D 社)を使用した。また、2 次抗体として抗マウス IgG HRP 標識抗体(#7074; Cell Signaling 社)を使用した。内部標準としてラビットポリクローナル抗  $\alpha$ -tubulin 抗体(PM054; MBL 社)を使用した。

### (4)実験動物・Drill-hole を利用した大腿骨骨折モデルマウス・卵巣除去マウス

実験に用いたすべてのマウスは C57BL/6 で、東京実験動物株式会社より購入し、埼玉医科大学口腔外科学教室の環境的に制御された研究室の部屋で飼育した。また、実験は埼玉医科大学動物実験委員会による動物実験規程に従った (No. 1165)。

エーテル麻酔下にて 7 週齢の雄のマウスの大腿骨前面の筋肉および骨膜を剥離し、骨面を露出させ、大腿骨中央部に直径 1 mm の穴を骨髓腔まで形成し大腿骨骨折モデルマウスを作製し、形成後、6 日間の治癒経過後に分析を行った。

生後 7 週齢のメスマウスに対して、卵巣除去 (OVX) を施行した。対照群は皮膚に切開を加える偽手術 (Sham) とした。

### (5)免疫組織化学染色

マウスはペントバルビタールナトリウム (50mg/kg) の腹腔内注射により麻酔を行い、4% のパラホルムアルデヒド (pH 7.4) にて環流固定した。採取した大腿骨は、ドライアイスを加えたヘキサンをを用いて、5 % のカルボキシメチルセルロースジェルに埋めて、Leica CM1900 cryostat

(Leica Microsystems 社)にて薄切した。得られた5 $\mu$ mの大腿骨の非脱灰切片は、Kawamoto's film method を用いて固定し、血小板内皮細胞粘着力分子 PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1) の抗体 PECAM-1 antibody(AF3628, R&D)および Ntn4 の抗体 Ntn4 antibody (AF1132, R&D)を用い染色した。その後、TRAP とヘマトキシリン (HE) で対比染色を行った。

#### (6)遺伝子導入

ScreenFect A (WAKO, Japan) を用いて、細胞に MICA 遺伝子を組み込んだプラスミドをトランスフェクションした。コントロールとして、GFP 遺伝子を組み込んだプラスミドを用いた。

#### (7)組織学的形態計測分析

卵巣除去および偽手術マウスを術後9週間で安楽死をさせて、腰椎の非脱灰切片を作製し発泡スチロールに貼り付け、4%PFAに浸漬して固定、エタノール置換後に Methyl Methacrylate Monomer にて脱水を行い、引き続き embedding を行なった。ライカ RM2255 にて脊椎骨の L3 及び L4 の7 $\mu$ mの切片を作製し、von Kossa 染色を行なった。形態計測分析は、American Society for Bone and Mineral Researchにより定義された OsteoMeasure Analysis System(OsteoMetrics 社)を用いて分析した。骨密度の骨量/組織量 (BV/TV; %) を調べた。

#### (8)ELISA 法

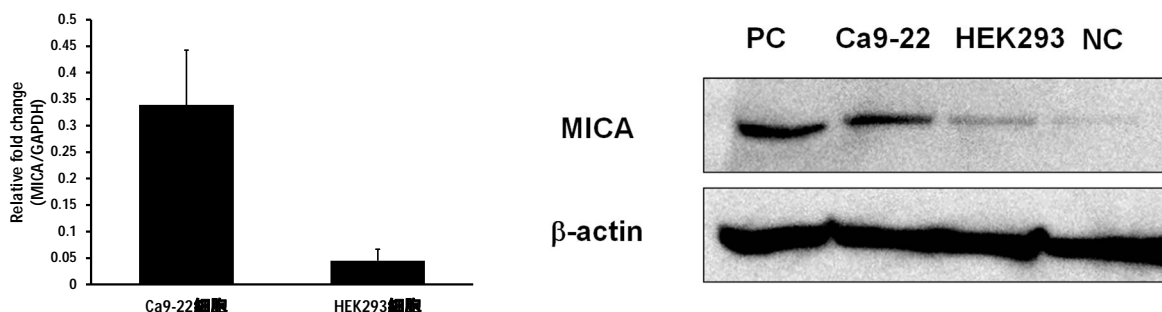
回収した培養液中の Ntn4 タンパク質濃度について、mouse Ntn4 ELISA kit (CUSABIO)を用いてプロトコルに従い測定した。

#### (9)DNA microarray

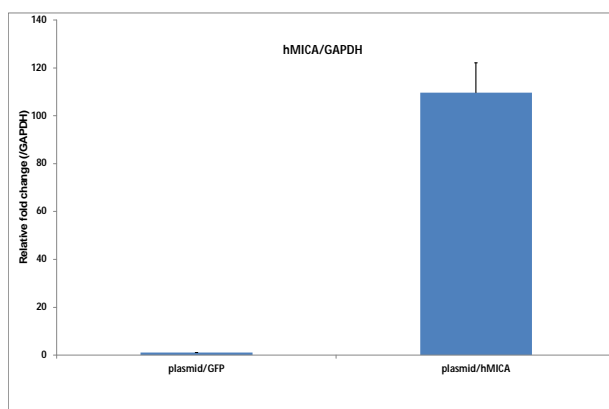
抽出した RNA について、3D-gene (TORAY, Japan) による遺伝子発現の網羅的解析を行った。

### 4. 研究成果

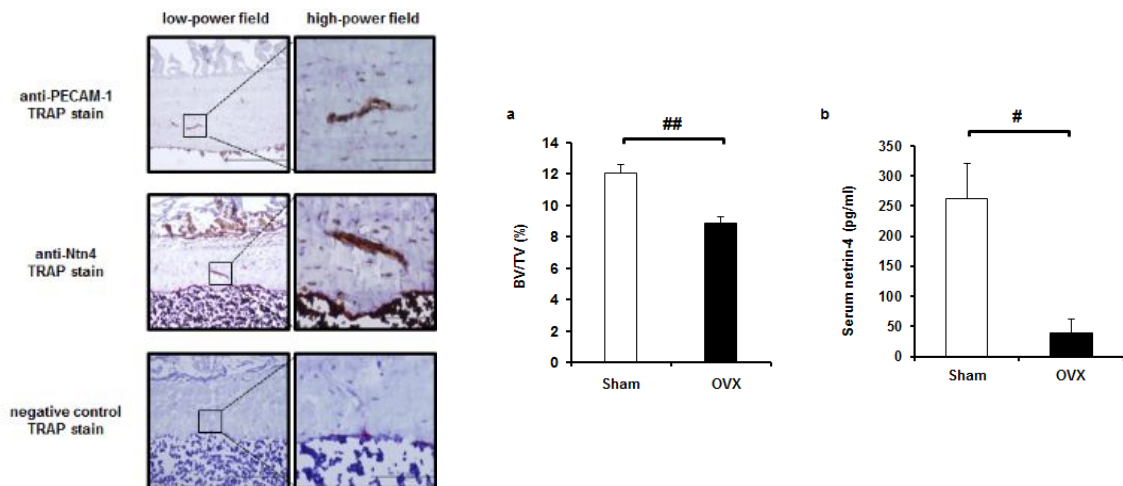
ヒト歯肉癌細胞である Ca9-22 細胞に MICA 遺伝子が存在するかどうかリアルタイム PCR 法で検討した。ヒト細胞株である HEK293 細胞と Ca9-22 細胞において、MICA 遺伝子発現を比較検討したところ、Ca9-22 細胞での発現が高いことを確認した。次にタンパク質発現の確認を行った。抗 MICA 抗体を用いて Western blotting を行なったところ、MICA タンパク質発現の確認ができた (PC;positive control, NC;negative control)。



次に、ヒト歯肉癌上皮細胞である Ca9-22 細胞について、MICA を過剰発現させることにした。MICA 遺伝子のプラスミドベクターを購入した (Vector Builder 社)。まず、ScreenFect A (WAKO 社) を用いて Ca9-22 細胞に GFP 遺伝子が導入されることを確認した。次に MICA 遺伝子を Ca9-22 細胞に導入した。MICA 遺伝子が過剰発現をしているかどうかを確認するために、RNA を抽出し定量 RT-PCR を行ったところ、MICA 遺伝子の過剰発現を確認できた。

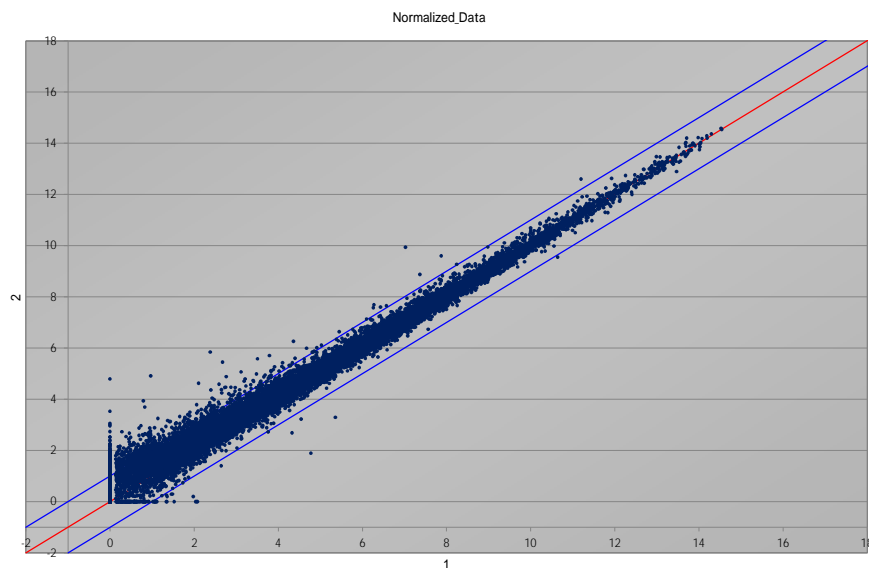


netrin-4 の生体における局在を調べるとともに、卵巣除去マウスを作製し、netrin-4 の血中濃度を調べた。まず、C57BL/6 マウスの大腿骨に直径 1 mm の穴をドリルにて骨髓まで開けて、14 日目に血管内皮細胞、破骨細胞、netrin-4 陽性細胞の位置関係を免疫染色にて調べた。netrin-4 陽性細胞は PECAM-1 陽性である血管内皮細胞に局在することがわかった。また、TRAP 陽性の破骨細胞は血管内皮細胞の近傍に存在することが確認された。次に生後 7 週齢のメスマウスに対して卵巣除去手術を施行した。対照群は背部に切開を入れる偽手術群とした。Osteomeasure にて海綿骨骨量を測定したところ、卵巣除去マウスで有意に骨量が低下していることを確認できた。そこで、netrin-4 の血中濃度を測定したところ卵巣除去マウスにおいて低下していた。つまり netrin-4 は生理的に血管内皮細胞から産生される可能性、そして閉経後骨吸収の促進に伴い濃度が低下することから生体内において骨代謝を正に制御する役割があることが示唆された。



In vitro で NK 細胞に c-Cbl の siRNA を導入し NKG2D 受容体の発現を抑制できるか検討することを予定していたが、NK 細胞への遺伝子導入がうまくいかずに断念した。

プラスミドベクターを用いて、MICA 遺伝子を導入し過剰発現させた細胞とコントロールベクターを導入した細胞について RNA を抽出した。この total RNA を DNA マイクロアレイに供し、網羅的遺伝子発現の解析を行った。global normalization をシグナル強度 (総和) の中央値が 25 になるように補正したときの各数値、Log2 global normalization をシグナル強度 (総和) の中央値が 25 になるように補正したときの各数値の log2 値、Log2 ratio をサンプル間の "Log2 global normalization" の差を計算した値、ratio を "Log2 ratio" を真数に変換した値と定義した。比較した結果、発現の上昇した遺伝子として、ratio(y/x) で 8 倍以上 (LOG2(y/x) 値で 3 以上) 亢進した遺伝子は 7 個、ratio(y/x) で 4 倍以上 (LOG2(y/x) 値で 2 以上) 亢進した遺伝子は 31 個、ratio(y/x) で 2 倍以上 (LOG2(y/x) 値で 1 以上) 亢進した遺伝子は 792 個であった。一方、発現の低下した遺伝子として、ratio(x/y) で 4 倍以上 (LOG2(y/x) 値で -2 以下) 亢進した遺伝子は 5 個、ratio(x/y) で 2 倍以上 (LOG2(y/x) 値で -1 以下) 亢進した遺伝子は 22 個であった。発現が上昇した遺伝子のうち、免疫系を攻撃する遺伝子を見出した (具体的な遺伝子名は公表できない)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	臼井 通彦  (Usui Michihiko)  (10453630)	九州歯科大学・歯学部・准教授    (27102)	
研究分担者	佐藤 毅  (Sato Tsuyoshi)  (60406494)	埼玉医科大学・医学部・准教授    (32409)	
研究分担者	星島 宏  (Hoshijima Hiroshi)  (90536781)	埼玉医科大学・医学部・講師    (32409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関