

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592321

研究課題名（和文） 難治性口腔粘膜疾患における免疫抑制分子の解析と新規制御法開発のための基礎的研究

研究課題名（英文） The analysis of the immune-inhibitory molecules in refractory inflammatory oral mucous disease and the basic research for development of new therapy.

研究代表者

津島 文彦（TSUSHIMA FUMIHIKO）

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：90456210

研究成果の概要（和文）：ヒトケラチノサイトプロモーター（K14）のコントロール下に角化細胞上に B7-H1 を過剰発現させたトランスジェニック（tg）マウスを作成し、B7-H1 の機能を解析した。DNFB をハプテンとした接触性過敏症皮膚炎モデルにおいては、誘発後のすでに抗原感作されているエフェクターCD8T 細胞の皮膚局所における活性化反応に対し、直接的に抑制シグナルを与え皮膚炎を抑制することが示唆された。また、メチルコラントレン誘導発癌モデルでは、角化細胞上の E-カドヘリンの発現を抑えることによって、上皮間葉移行を調節することにより、癌発生を促進している事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, to investigate the function of B7-H1 on KC, we generated transgenic (tg) mice overexpressing B7-H1 under the control of human keratin 14 (K14) promoter (B7-H1 tg). In DNFB hapten-induced contact hypersensitivity model, it suggests that B7-H1 on KC may directly downregulate the effector function of CD8 T cells at skin inflammatory site. Furthermore, it indicates that B7-H1 on KC accelerates carcinogenesis by promoting epithelial-mesenchymal transition via down-regulation of E-cadherin on KC in a methylcholantrene(MCA)-induced model of squamous cell carcinoma(SCC).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：口腔外科一般・口腔粘膜疾患

1. 研究開始当初の背景

癌免疫療法においては、これまで癌に対するエフェクター細胞を強化するという戦略が主流であり、腫瘍特異的細胞障害性T細胞(CTL)の誘導という意味においては、正の共刺激分子CD28-CD80/CD86, CD137(4-1BB)/4-1BBL やT細胞活性化サイトカインの賦与によるCTLの誘導や強化、さらには抑制シグナル分子CTLA-4の阻害や抑制性T細胞の制御によるCTL活性の誘導など様々な試みが報告されてきた。しかしながら、癌に対する宿主免疫応答を効果的に誘導するには、これらにくわえて、癌の免疫回避機構を積極的に解除する必要がある。

1999年に新規B7ファミリー分子として抑制シグナルを伝達するPD-1のリガンドであるB7-H1が同定された。B7-H1は、その発現をすでに癌細胞に認めること、また発現を認めない癌細胞においてもIFN- γ により発現が誘導されることが明らかになっており、これはCD80、CD86などの他の共刺激分子とは大きく違う特色である。実際、我々は口腔扁平上皮癌細胞株上にB7-H1が発現していること、さらに生検口腔扁平上皮癌組織上にB7-H1が発現していることを確認してきた。さらには、同系マウス可移植性のマウス扁平上皮癌細胞株NRS1の癌生着におけるPD-1:B7-H1経路の関与を検討したところ、抗PD-1あるいは抗B7-H1抗体の全身投与により、癌増大が抑えられることを確認した。癌細胞上におけるB7-H1の発現が、CTLからの免疫応答を逃れ、癌の免疫回避機構として重要な役割を果たしているということが他にも多く報告されている(Iwai Y, et al. 2002 Proc Natl Acad Sci USA 99:12293; Hirano F et al. 2005 Cancer Res.

65:1089)。また、手術時生検のB7-H1発現は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)数と逆相関し、TNM分類による臨床状態と相関し、予後予測の指標になることを、我々は肺癌、食道癌においていち早く報告し、その後、膵臓癌、尿路上皮癌などにおいても報告してきた。最近では、パラフィン包埋切片に使用可能なモノクローナル抗体が使用可能になったことにより、長期間のフォローアップが可能になり、腎細胞癌においてB7-H1発現は独立予後因子となることが報告された(Thompson R et al. Cancer Res 66:3381, 2006)。これらから、癌細胞上のB7-H1発現は、抗腫瘍免疫において非常に重要な役割を果たしていることが示唆される。また、極最近では、癌細胞におけるB7-H1の誘導自体が、癌細胞の増殖シグナルや癌抑制遺伝子PTENの発現を制御し癌原性に影響を与えることも報告されている(Parsa AT et al. Nature Med 2006)。

口腔粘膜上皮を構成する主細胞である角化上皮細胞は、タイトジャンクションを形成し、外来からの病原微生物に対しその侵入を防ぐのみならず、病原体を認識し、Toll様受容体からのシグナル伝達により様々な炎症性サイトカインやケモカインを産生し、引き続く自然免疫および適応免疫応答に深く関与している。免疫が関与するとされている難治性口腔粘膜疾患である口腔扁平苔癬では、上皮、特に上皮下にT細胞の浸潤を認める。我々は、口腔扁平苔癬において角化上皮細胞上にB7-H1が発現誘導されてくることを明らかにし、また上皮下浸潤T細胞におけるPD-1の選択的な発現を報告した。さらには、シェーグレン症候群患者の唾液腺上皮細胞にB7-H1が

発現しているという報告もある (Kobayashi M, et al.2005 J Reumatol)。

しかしながら、これらの口腔粘膜疾患において誘導される上皮細胞上のB7-H1 の役割については明らかになっていない。以上の研究から、B7-H1 が発現誘導された口腔癌細胞または口腔粘膜上皮細胞は、PD-1 を発現している局所浸潤抗原特異的CD8T 細胞に対して、末梢局所においてアナージー状態を誘導・維持し、末梢粗機における免疫寛容に関わっている可能性を強く考えさせる。さらには、このようなPD-1:B7-H1 経路による抑制シグナルを解除することで、抗がん免疫応答の強化や口腔粘膜疾患病変におけるアナージー解除による病態制御という可能性も考えられる。

本研究が達成されれば、難治性口腔粘膜疾患の病態解明のみならず、末梢局所における免疫回避 (免疫寛容) を阻止する新規免疫制御法の開発につながり、その医療分野における貢献も多大であると考えられる。

2 . 研究の目的

口腔癌および口腔粘膜上皮細胞に発現する免疫抑制分子B7-H1 の癌および口腔粘膜疾患の病態形成における役割を解析するとともに、新しい免疫制御法開発の可能性を探ることである。

3 . 研究の方法

(1)上皮細胞に誘導されるB7-H1 の局所免疫寛容への関与の検討

マウス接触性皮膚炎モデルにおける検討 : ハプテン抗原としてDNFB を用いてまず腹部に2 日間連続で塗布し感作させた後、耳に再刺激を行いその耳介腫脹を野生型対照群とK14/B7-H1Tg群で比較する。得られた結果に対してのメカニズム解析を進行させる。

化学発癌物質塗布による発癌実験 : メチルコラントレン誘導化学物質発癌モデルを用い

て、野生型対照群とK14/B7-H1Tg群で発癌に差があるかを比較検討する。得られた結果に対してのメカニズム解析を進行させる。

(2) 口腔扁平上皮癌における B7-H1 発現と臨床状態・予後との関連の検索

(3) 口腔扁平苔癬およびシェーグレン症候群口唇腺における PD-1, B7-H1 発現と臨床病態との関連の検索

協力が得られる口腔外科診療科および臨床病理診断科の協力を得て、病歴を検索し、検体の有無を確認し、本研究へのエントリー対象を決定する。口腔扁平上皮癌、口腔扁平苔癬、シェーグレン症候群口唇腺生検材料の切片を用いて、B7-H1 の免疫組織染色を行う。必要に応じて、他の抗原PD-1, CD8, CD3, CD45, CD11c, CD68 の発現を蛍光抗体法および酵素抗体法で検討することにより浸潤している免疫細胞を同定する。

口腔扁平苔癬においては臨床視診型とB7-H1 の発現量と発現細胞、PD-1 陽性T 細胞の浸潤度について、口腔癌においては手術時の臨床状態 (TMN 分類)、病理診断および予後とB7-H1 発現の関係、シェーグレン症候群では口唇腺へのリンパ球浸潤の程度とB7-H1 の発現量を解析し、統計学的に検討する。

4 . 研究成果

(1) ヒトケラチノサイトプロモーター (K14) のコントロール下に角化細胞上に B7-H1 を過剰発現させたトランスジェニック (tg) マウスを作成し、BALB/c および C57BL/6 系統に戻し交配をおこなった。DNFB をハプテンとした接触性過敏症皮膚炎モデルにおいて、B7-H1tg マウスにおける過敏反応は野生型マウスと比較し明らかに抑制された。しかし、感作後の皮膚樹状細胞の遊走や所属リンパ節内の CD4 および CD8T 細胞のハプテン特異的な細胞増殖および IFN- 産生については野生型マウスと比較し明らかな抑制は認め

られなかった。このことより、角化細胞上に過剰発現した B7-H1 は、感作時応答には関与していないことが示唆された。次に感作 T 細胞の表皮下への移入実験では、tg マウスが宿主となった場合には明らかな反応抑制を認められた。さらに tg マウス由来の角化細胞と感作 CD8T 細胞との共培養による IFN- γ 産生は明らかに低下するが、B7-H1 抗体投与によりその産生量は回復した。以上のことから、角化細胞上に過剰発現した B7-H1 は誘発後のすでに抗原感作されているエフェクター n CD8T 細胞の皮膚局所における活性化反応に対し、直接的に抑制シグナルを与え、皮膚局所における外来ハプテン抗原に対する末梢免疫応答に関与している可能性が示された。このことより、扁平苔癬や乾癬など難治性の皮膚疾患の治療において、皮膚における免疫応答をコントロールするために上皮に発現した B7-H1 を標的にすることは、有用であると考えられた。現在、人の口腔扁平苔癬において、臨床視診型と B7-H1 の発現量と発現細胞、PD-1 陽性 T 細胞の浸潤度について解析検討中である。

メチルコラントレン誘導発癌モデルモデルを用いて、B7-H1tg および野生型マウスにおける発癌頻度と癌増大を比較したところ、メチルコラントレン皮下投与 7 週後において、tg マウスは野生型マウスと比較し、癌の大きさが 3 倍にもなっている事が観察され、28 週後における生存率も有意に低かった。これは、tg マウスの角化細胞および癌細胞上の E-カドヘリンの発現が、野生型マウスと比較すると有意に低く、また転写リプレッサーである Slug や Twist の発現が、tg マウスの癌細胞において有意高いことから、角化細胞および癌細胞上の B7-H1 が上皮間葉移行を調節することにより、癌発生を促進している事が示唆された。これにより、扁平上皮癌の治療にお

いて癌細胞上に発現している B7-H1 をコントロールすることにより、癌の増大を抑制できる可能性が示唆された。今後、人の扁平上皮癌において、B7-H1 の発現量と E-カドヘリン、Slug や Twist の発現量について解析する予定である。

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 7 件)

Cao Y, Zhang L, Kamimura Y, Ritprajak P, Hashiguchi M, Hirose S, Azuma M. B7-H1 overexpression regulates epithelial-mesenchymal transition and accelerates carcinogenesis in skin. *Cancer Res.* 査読有 2011, 71(4), 1235-43.

Patcharee p, Hashiguchi M, Tsushima F, Azuma M. Keratinocyte-associated B7-H1 Directly Regulates Cutaneous Effector CD8+T Cell Responses. *J. Immunology.* 査読有 2010, 184(9), 4918-4925.

[学会発表](計 3 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津島 文彦 (TSUSHIMA FUMIHIKO)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：90456210

(2) 研究分担者

東 みゆき (AZUMA MIYUKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
研究者番号：90255654

桜井 仁亨 (SAKURAI JINKYO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・講師

研究者番号：30361710

伊東 大典 (ITO DAISUKE)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・非常勤講師

研究者番号：40286844