

平成 23 年 3 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890157

研究課題名（和文） 腫瘍内浸潤免疫系細胞の細胞動態を指標にした口腔癌に対するオーダーメイド治療の開発

研究課題名（英文） The cellular kinetics and significance of intra-tumoral immune cells within oral squamous cell carcinomas

研究代表者

竹末 奈七子 (TAKESUE NANAKO)

広島大学・病院・歯科診療医

研究者番号：70548982

研究成果の概要（和文）：

口腔扁平上皮癌（Oral Squamous Cell Carcinoma, OSCC）の予後予測因子として、TNMなどの臨床病態因子や種々の分子が検討されているが、いまだ明確な候補因子は見いだされていない。そこで本研究では、OSCCの臨床病態とMICA、sMICAおよび腫瘍内浸潤免疫細胞との関連性を明らかにした。その結果、個人個人にあったオーダーメイド医療の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The MICA (MHC class I chain-related molecule A) is the ligand of NKG2D, which is activation receptor on most NK cells and antigen-specific effector T cells. These molecules are absent from most cells but can be induced by stress, infection, cell transformation, and are frequently expressed in epithelial tumors. On the other hand, it has been speculated that tumors have ways of evading the body's immune system. As one of the system of this, there are soluble forms of MICA (sMICA) in the serum which can affect NKG2D function by blocking recognition of membrane-bound MICA and down-regulation of NKG2D. As a result, NK cells etc. effectively become blind to the presence of tumor.

Serum sMICA level may serve as a novel molecular target/biomarker of OSCC for its diagnosis, therapy, and prognosis. Recently, it has been shown that immune cells within distinct tumor regions could provide a prognostic factor superior to and independent of criteria related to the anatomic extent of the tumor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：腫瘍免疫

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：メモリーT細胞、sMICA

1. 研究開始当初の背景

癌治療において、従来の手術・化学療法・放射線療法に、免疫療法を併用することで、治療成績がさらに向上することが報告され患者の免疫能が、癌治療やその予後に重要な役割を果たすことが明らかにされている。しかし、現在、行われている癌治療は、患者の年齢、全身状態、腫瘍の大きさ、部位、組織型、転移の有無などにより、治療計画が進められるが、患者の免疫状態を評価し、免疫状態を考慮した治療は行われていない。これは、患者の癌免疫能を評価するための良い指標がないためと考えられる。

MICA (MHC class I chain-related molecule A) は、ヒト細胞膜上に発現する糖タンパクであり、NKG2D のリガンドで、同受容体を介した活性化シグナルは多彩な免疫応答を引き起こす。MICA は、ほとんどの正常細胞では発現しておらず、紫外線、微生物感染、発がん物質などのストレスを受けた粘膜上皮細胞や腫瘍細胞に発現が誘導されることが考えられている。

一方、癌細胞が MICA を発現しているにもかかわらず、免疫細胞によって排除されないのは、生体で何らかの免疫回避システムが存在すると考えられており、その1つとして可溶性 MICA (sMICA) が報告されている。sMICA が NKG2D をマスクすることで NK 細胞や T 細胞が癌細胞を認識できなくなると考えられている。これまでに、OSCC 患者の血清 sMICA 濃度は、癌の進展に伴い上昇すること、また、再発や転移に伴い上昇することも明らかにされている。近年、大腸癌や悪性黒色腫において腫瘍内浸潤リンパ球の浸潤動態が予後に貢献していることが明らかにされており、このうち、CD45RA を表出するナイーブ T 細胞は、抗原刺激により、活性

化され、エフェクター T 細胞となり、細胞障害活性をしめした後、CD45RA を CD45RO へと構造を変化しメモリー T 細胞となる。

このメモリー T 細胞は、抗腫瘍免疫において重要な役割を果たしていると考えられている。

そこで本研究では、OSCC 組織における各種免疫系細胞および MICA の発現を免疫組織化学的に、また血清 sMICA 濃度を ELISA を用いて解析し、予後予測因子としての可能性を検討した。

2. 研究の目的

本研究は、NK 細胞や細胞障害性 T 細胞が有する受容体 NKG2D のリガンドで、癌細胞表面に発現する MICA および腫瘍内に浸潤する免疫系細胞の細胞動態を調べ、臨床病態との関連性の検討を行い、腫瘍内浸潤免疫系細胞の細胞動態を指標にした口腔癌に対するオーダーメイド治療の開発を目的とする。

3. 研究の方法

MICA、血清 sMICA および腫瘍内浸潤免疫細胞および CD45RO⁺メモリー T 細胞と口腔扁平上皮癌の臨床病態との関連性を検討するため、口腔扁平上皮癌患者の生検組織にて免疫組織化学染色を行う。

MICA 発現の評価は、発現強度を negative = 0, weak = 1, moderate = 2, strong = 3 の 4 段階で表し、0 を陰性症例、1-3 を陽性症例とした。また 250 μ m \times 250 μ m を 1 視野とし、各 3 視野内における陽性腫瘍細胞の陽性率を % で表し、発現強度と陽性率を掛け合わせ、3 視野を平均したものを、Expression score とした。

免疫細胞発現の評価は、各検体において、腫瘍中心部 (center of the tumor; CT) および腫瘍浸潤部 (invasive margin; IM) における

陽性細胞数を測定することにより行った。CT および IM 部において、 $250\mu\text{m}\times 250\mu\text{m}$ の視野を各 3 視野測定し、1 視野における平均各抗体陽性免疫細胞数を細胞密度とした。また、それぞれの検討ごとに、全症例を浸潤細胞密度順に並べ、腫瘍内浸潤細胞密度の高い症例上位 50% を高密度群 (Hi 群) とし、腫瘍内浸潤細胞密度の低い下位 50% を低密度群 (Lo 群) とし、それぞれの群と臨床病態との相関性を検討した各検体において腫瘍中心部・浸潤部をそれぞれ CT, IM とし、この 2 部位について免疫細胞の発現を検討する。また、生検材料より抽出した RNA を用い各種腫瘍内浸潤免疫細胞の遺伝子発現解析を定量 PCR を用いて行う。次に、CD45 分子の選択的スプライシングの制御因子と報告されている hnRNPLL を、リンパ球において過剰発現または発現抑制させ、フローサイトメーターにて CD45 分子の発現を確認する。また、hnRNPLL のその他の分子のスプライシングに与える影響を解析する。

4. 研究成果

これまでの研究で、再発症例では、腫瘍内浸潤細胞密度は低下していた。特に腫瘍中心部および腫瘍辺縁部における CD45RO の発現低下と再発には有意な相関関係を認めた。

浸潤免疫細胞密度が高いほど、生存期間の延長を示した。特に CD45RO 陽性細胞浸潤密度と生存期間には有意な相関関係が認められた。

また浸潤免疫系細胞密度が高いほど、無病生存率も高いことが明らかとなった。Stage I や II 症例であっても、CD45RO 発現が低い症例の無病生存率は低下していた。一方、stage IV 症例であっても、CD45RO の高発現症例では高い無病生存率を示した。

また、MICA は NKG2D の活性化リガンドであるため MICA の発現が低い癌細胞は免疫

細胞を活性化できないため、免疫細胞密度が低下したと考えられた。一方、血清中の sMICA は、NKG2D をマスクすることから、血清 sMICA 濃度が高い症例では免疫細胞密度は低下したと考えられた。

このように、腫瘍が発現する MICA や血清 sMICA は、各種腫瘍内浸潤免疫細胞の発現を制御していることが強く示唆された。

口腔扁平上皮癌組織において、腫瘍細胞による MICA の発現と、腫瘍内浸潤免疫細胞の浸潤密度は正の相関関係がある事が示された。特に CD45RO 陽性メモリー T 細胞の浸潤動態は、口腔扁平上皮癌の再発、無病生存率および生存率と有意に相関していたことから、MICA および CD45RO 分子は、口腔扁平上皮癌の腫瘍免疫において重要な機能を果たしているとともに、口腔扁平上皮癌の予後予測因子として非常に有用であることが示された。

メモリー T 細胞の表出する CD45 分子の選択的スプライシングにおいて、ヘテロ核リボ核蛋白質 L 様分子 (hnRNPLL) が誘導性制御因子として機能している可能性が報告されている。刺激を受けた T 細胞では、hnRNPLL の発現量が上昇する。また hnRNPLL の発現を抑制すると CD45RA の発現量は上昇し、CD45RO 発現量は低下すること、一方 hnRNPLL の過剰発現で、CD45RA の発現量は低下し、CD45RO 発現量は高くなることが報告されている。実際 OSCC 組織由来 RNA を用い、リアルタイム定量 PCR 法にて hnRNPLL の発現を検討した結果、CD45RO 遺伝子発現量と正の相関関係 ($P<0.01$) を認めしたが、hnRNPLL の発現を制御することによりメモリー CD8⁺T 細胞の分化維持促進を制御することが可能ではないかと考えられた。さらに本分子の制御は先に述べたようなメモリー T 細胞を用いた免疫細胞治

療を行う際に、移入細胞の活性を腫瘍組織内で長期間維持させるためにも有用と考えられた。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹末 奈七子 (TAKESUE NANAKO)

広島大学・病院・歯科診療医

研究者番号：70548982

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：