

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24249091

研究課題名(和文) 抗腫瘍T細胞を利用した口腔癌の早期診断法およびオーダーメイド免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of early diagnostic method and order-made immunotherapy for oral cancer by using anti-tumor T cells

研究代表者

中村 誠司 (Nakamura, Seiji)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：60189040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,000,000円

研究成果の概要(和文)：RCAS1は活性化したリンパ球のアポトーシスを誘導し、免疫監視機構からの回避に関与することが知られている。本研究では、口腔扁平上皮癌(OSCC)におけるRCAS1のアポトーシス誘導能について検討を行った。その結果、膜型RCAS1は全てのOSCC細胞株において発現しており、特に高転移株SQUU-Bで強く発現していた。全てのOSCC細胞株との共培養により、K562のアポトーシスが誘導された。さらにRCAS1をノックダウンさせた細胞株とK562を共培養すると、アポトーシス誘導の著明な減弱が認められた。以上よりRCAS1はアポトーシスを誘導することにより、免疫監視機構の回避に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cell (RCAS1) is derived from uterine adenocarcinoma and can induce apoptosis in lymphocytes. In this study, we investigated expression patterns of RCAS1 and the effect on apoptosis in oral squamous cell carcinoma (OSCC). RCAS1 mRNA and proteins were expressed in all of OSCC cell lines. Membranous pattern were expressed in all cell lines, while soluble pattern was detected in all supernatants. RCAS1 mRNA, membranous and soluble RCAS1 were significantly seen in SQUU-B more than the other 3 cell lines. K562 apoptosis was induced in co-culture with each of all cell lines, particularly with SQUU-B. Apoptosis was markedly reduced in co-culture with RCAS1 knockdown cells, but was induced in co-culture without cell contract of SQUU-B. Our study suggests that RCAS1 has an apoptotic function via membranous/soluble expression pattern in OSCC cells. RCAS1 may thus affect tumor escape from immune surveillance in OSCC by inducing apoptosis.

研究分野：口腔外科学

キーワード：オーダーメイド免疫療法 口腔扁平上皮癌 RCAS1 PD-L1 腫瘍会合性マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

腫瘍関連抗原の RCAS1 (receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells) は子宮腺癌由来細胞株 SiSo に発現する腫瘍関連抗原として同定され、今までに子宮頸癌を含む 15 種類の悪性腫瘍での発現が報告されている。発現動態として、細胞膜に発現する膜型 RCAS1 と、ectodomain shedding 機構によって分離される分泌型 RCAS1 が存在することが分かっている。また RCAS1 が、活性化したリンパ球のアポトーシスを誘導し、免疫監視機構からの回避に関与することが知られている (図 1)。

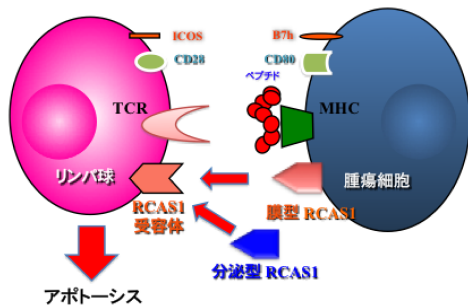


図 1. RCAS1 の発現動態とリンパ球に対するアポトーシス誘導

臨床的には、いくつかの癌において健常者と比較して癌患者の血清中に高濃度の RCAS1 が検出され、さらに治療後にその濃度が有意に減少したことから、RCAS1 がバイオマーカーとしても有用であるという知見も得られている。これまでにわれわれは、口腔扁平上皮癌 (OSCC) 生検組織における RCAS1 の発現に関する報告をしたが、渉猟し得た限りでは、OSCC における分泌型 RCAS1 については検討されておらず、さらにはリンパ球へのアポトーシス誘導能に関しても不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、OSCC 由来細胞株における膜型および分泌型の 2 つの発現動態について検討した。さらにその結果をもとに、OSCC における RCAS1 のアポトーシス誘導能の解析と、発現動態がアポトーシス誘導能に及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

OSCC 細胞株 (HSC-2, HSC-3, SQUU-A, SQUU-B) を用いて、RCAS1 の mRNA 量および局在を RT-PCR 法と免疫化学染色法で検索した。膜型 RCAS1 については flow cytometry 法を用いて測定し、分泌型 RCAS1 については培養上清を ELISA にて測定した。また、4 種類の OSCC 細胞株と RCAS1 受容体を有する赤芽球様白血病由来細胞株 K562 との共培養を行い、flow cytometry を用いて K562 に対する RCAS1 のアポトーシス誘導能を解析した。最後に、RCAS1 をノックダウンさせた細胞株と K562 を共培養し、RCAS1 の発現動態がアポトーシス誘導

能へ及ぼす影響について検討した。

4. 研究成果

OSCC 細胞株における RCAS1 発現動態の解析

本研究では OSCC 細胞株 (HSC-2, HSC-3, SQUU-A, SQUU-B) を使用した。まず RCAS1 の発現を、RT-PCR 法と免疫細胞化学的染色法を用いて解析した。その結果、全ての OSCC 細胞株において RCAS1 mRNA および蛋白の発現を認めた (図 2)。

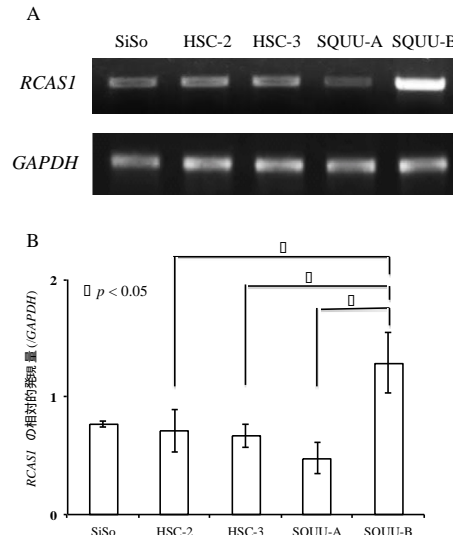


図 2. OSCC 細胞株と SiSo における RCAS1 mRNA の発現

次に、OSCC 細胞株における膜型 RCAS1 の発現を flow cytometry を用いて、各細胞の培養上清中の分泌型 RCAS1 を dot blotting と enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて解析した。膜型 RCAS1 は全ての OSCC 細胞株において発現しており、特に高転移株 SQUU-B において他 3 種の細胞と比較して有意に強く発現していた (図 3)。

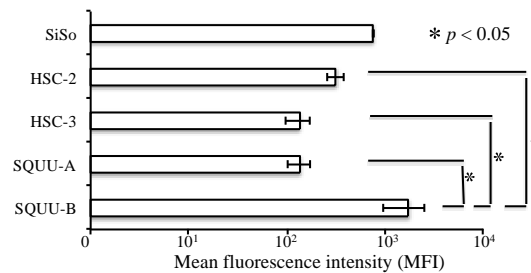


図 3. OSCC 細胞株と SiSo における膜型 RCAS1 の発現

また、分泌型 RCAS1 は全ての OSCC 細胞株の培養上清中に検出され、特に SQUU-B の培養上清中に有意に高濃度に検出された。

OSCC 細胞株における RCAS1 のアポトーシス誘導能の解析

全ての OSCC 細胞株との共培養により K562 のアポトーシスが誘導された。次に誘導されたアポトーシスが RCAS1 依存性であるかを検

証するため、最もアポトーシスを誘導していた SQUU-B に RCAS1 siRNA の遺伝子導入を行った。RCAS1 をノックダウンさせた細胞株と K562 を共培養した結果、K562 に対するアポトーシス誘導の著明な減弱が認められた。さらに細胞非接触環境下で SQUU-B と K562 の共培養を行い、RCAS1 の発現動態がアポトーシス誘導能へ及ぼす影響について検討した。その結果、分泌型 RCAS1 単独による K562 のアポトーシスが誘導された (図 4)。

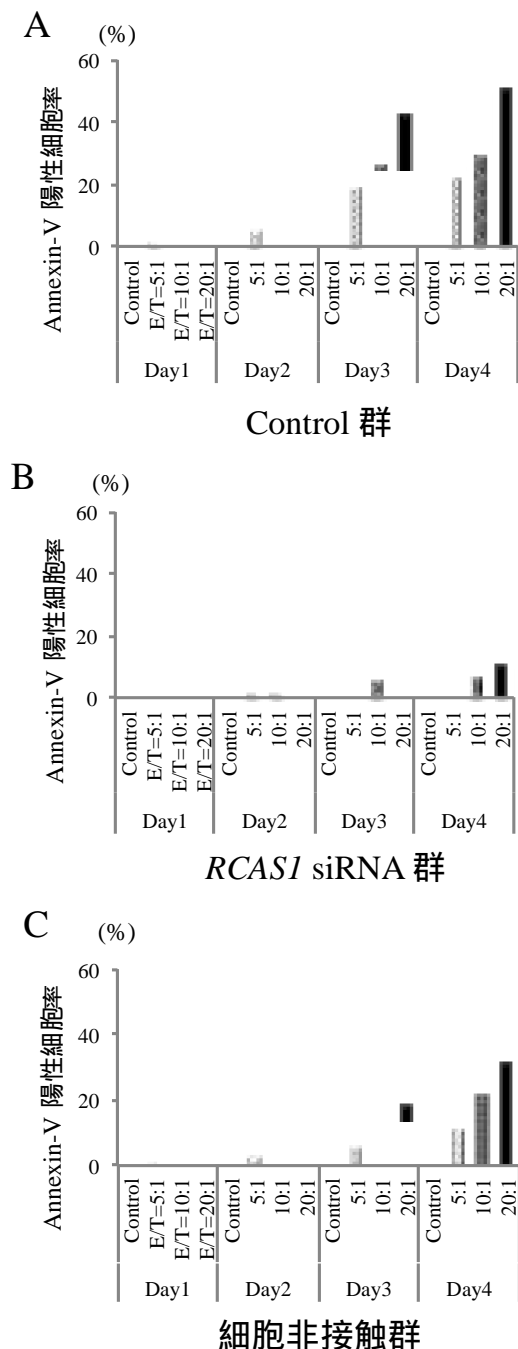


図 4. RCAS1 発現動態がアポトーシス誘導能に及ぼす影響についての解析

OSCC 患者血清中の分泌型 RCAS1 の解析

OSCC 患者 7 例と健常者 7 例の血清中 RCAS1 濃度を、ELISA を用いて解析した。健常者と比較して、分泌型 RCAS1 は OSCC 患者におい

て高濃度に検出されたが、有意差は認められなかった。次に、OSCC 患者 2 例における治療前後の血清中 RCAS1 濃度の推移を解析したが、明らかな相関関係は認められなかった (図 5)。

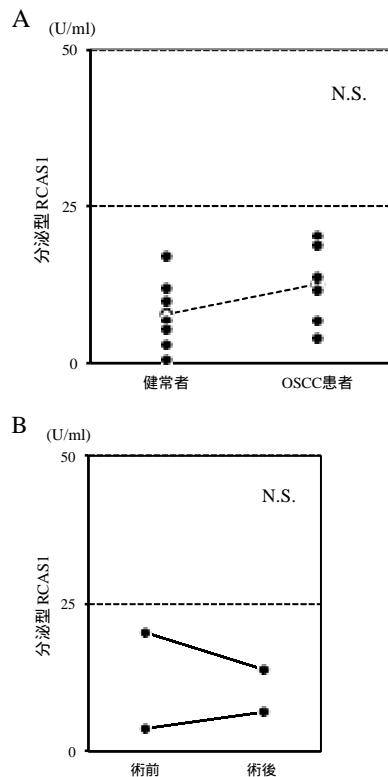


図 5. OSCC 患者血清中における分泌型 RCAS1 の解析

以上の結果より、RCAS1 は OSCC において膜型および分泌型として発現する腫瘍関連抗原であり、K562 にアポトーシスを誘導することにより、生体内で免疫監視機構から回避する可能性が示唆された。また、分泌型 RCAS1 は OSCC における腫瘍特性を表現するバイオマーカーである可能性が示唆された。

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 6 件)

Kubota K, Moriyama M, Furukawa S, Haque R ASM, Maruse Y, Jinno T, Tanaka A, Ohta M, Ishiguro N, Yamauchi M, Sakamoto M, Maehara T, Hayashida JN, Kawano S, Kiyoshima T, Nakamura S.

CD163⁺CD204⁺ tumor-associated macrophages contribute to T cell regulation via interleukin-10 and PD-L1 production in oral squamous cell carcinoma. Sci Rep 査読有、7:1755, 2017.

DOI: 10.1038/s41598-017-01661-z

Ohta M, Moriyama M, Goto Y, Kawano S,

Tanaka A, Maehara T, Furukawa S, J Hayashida JN, Kiyoshima T, Shimizu M, Arinobu Y, Nakamura S. A case of marginal zone B cell lymphoma mimicking IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis. World J Surg Oncol 査読有、13:67, 2015.
DOI: 10.1186/s12957-015-0459-z.

Hayashi Y, Moriyama M, M Takashi, Goto Y, Kawano S, Ohta M, Tanaka A, Furukawa S, Hayashida JN, Kiyoshima T, Shimizu M, Chikui T, Nakamura S. A case of mantle cell lymphoma presenting as IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis, so-called Mikulicz's disease. World J Surg Oncol 査読有、13:225, 2015.
DOI: 10.1186/s12957-015-0644-0.

Jinno T, Kawano S, Maruse Y, Matsubara R, Goto Y, Sakamoto T, Hashiguchi Y, Kaneko N, Tanaka H, Kitamura R, Toyoshima T, Jinno A, Moriyama M, Oobu K, Kiyoshima T, Nakamura S. Increased expression of interleukin-6 predicts poor response to chemoradiotherapy and unfavorable prognosis in oral squamous cell carcinoma. Oncol Rep 査読有、33(5):2161-8, 2015.
DOI: 10.3892/or.2015.3838.

Goto Y, Kawano S, Matsubara R, Kiyosue T, Hirano M, Jinno T, Maruse Y, Toyoshima T, Kitamura R, Tanaka H, Oobu K, Nakamura S. Possible involvement of Np63 downregulation in the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma via induction of a mesenchymal phenotype. Clin Exp Metastasis 査読有、31(3):293-306, 2014. DOI: 10.1007/s10585-013-9628-z.

Tanaka H, Toyoshima T, Sonoda K, Kitamura R, Sasaguri M, Kawano S, Matsubara R, Goto Y, Nakamura S. Apoptotic function of tumor-associated antigen RCAS1 in oral squamous cell carcinoma. J Transl Med 査読有、12:112,2014.
DOI: 10.1186/1479-5876-12-112.

〔学会発表〕(計 1 件)

田中秀明、豊嶋健史、園田顕三、北村亮二、川野真太郎、平野充広、神野哲平、丸瀬靖之、笹栗正明、大部一成、中村誠司. 口腔扁平上皮癌由来細胞株における腫瘍関連抗原 RCAS1 の発現、分泌と機能についての検討. 第 67 回日本口腔科学会学術集会
2013 年 5 月 22 日. 栃木県総合文化センター (栃木県・宇都宮市)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 誠司 (NAKAMURA, Seiji)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号: 60189040

(2) 研究分担者

豊嶋 健史 (TOYOSHIMA, Takeshi)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号: 20546569

吉田 裕樹 (YOSHIDA, Hiroki)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号: 40260715

山田 晃 (YAMADA, Akira)
久留米大学・付置研究所・教授
研究者番号: 50158177

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし