

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24593023

研究課題名(和文) 口腔癌、前癌病変の効果的診断・治療法の開発基盤

研究課題名(英文) Development of effective diagnostic methods and treatment of oral cancer and pre-cancerous lesions

研究代表者

橋元 亘 (Hashimoto, Wataru)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30323033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：新規癌マーカーによる口腔癌の診断法の開発を目指し、多くの腫瘍細胞上に発現を認める NKG2Dに着目した。ヒト由来口腔癌細胞株における発現をフローサイトメーターで解析したところ、2種類の細胞で弱い発現を認めた。更に過去の病理標本にて扁平上皮癌・上皮異型性・正常細胞上のNKG2Dリガンド発現を調べたところ、すべてにおいて発現を認めなかった。一方、免疫制御受容体であるPD-1リガンドについては扁平上皮癌細胞株(2種類)上に高発現を認めた。今後病理標本にてPD-1リガンド発現を見ていく。以上の結果より、NKG2DリガンドよりもPD-1リガンドが口腔癌の新規癌マーカー候補分子となりうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To develop effective diagnostic methods and treatment of oral cancer, NKG2D-ligand expression on human oral cancer cell lines was analysed by a flowcytometer. As a result, the only weak expression of NKG2D-ligand was determined on two tumor cell lines. In addition, the expression of NKG2D-ligand was analysed by immunohistochemical methods on normal cells, the epithelial dysplasia cells and squamous carcinoma cells, no expression was observed on all type cells. On the other hand, the high expression of PD-1 ligands, which are immune control receptors, was determined on two tumor cell lines by a flowcytometric analysis. In the future, we will check the PD-1 ligand expression in the past of pathological tissue specimens. These results suggested that PD-1 ligands, but not NKG2D ligands, will be new marker for diagnosis of oral cancer.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：口腔癌 新規癌マーカー 免疫制御受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 前癌病変としての口腔白板症

癌は早期発見、早期治療が最も効果的である。口腔外科外来において、前癌病変として、白板症・紅板症の患者が多数来院する。口腔白板症の癌化率は日本では、3.1~16.3%と報告されており、その中でも上皮異形成を有する病変が癌化をきたしやすいといわれている。しかし、上皮異形成から癌化するプロセスの詳細については依然として不明であり、癌の早期発見の観点からは、新規癌マーカーを同定し、これを用いた新たな診断法を開発することが求められている。口腔白板症から癌化すると、多くの場合癌細胞は粘膜層を超えずに表在性に広がる傾向にあり、これを口腔表在癌と定義している。これまで、白板症と考えられていた症例の中には、このような口腔表在癌も含まれていることが知られるようになり、近年は口腔表在癌の症例が増加してきている。実際に当科において過去3年間で加療を行った口腔癌の詳細を見てみると、118症例のうちほぼ半分の58症例が、癌浸潤が粘膜層を超えない口腔表在癌であった。したがって、このような白板症からの癌化が強く示唆される口腔表在癌を早期に見つけることが重要となってくる。

	男性	女性	合計
表在癌	23	35	58
浸潤癌	28	32	60
合計	51	67	118

表1. 当科3年間の口腔癌症例数

(2) 新規癌マーカー分子候補としての NKG2D リガンド分子

ナチュラルキラー細胞(NK細胞)は、ウイルス感染細胞やある種のがん細胞などを直接傷害することによる感染防御、IFN- γ をはじめとする各種サイトカイン産生を通じてのT細胞やマクロファージの活性化調節、骨髄移植における拒絶反応などの生体防御機能を有した細胞である。その中でも重要な機能が抗腫瘍効果であり、NK細胞はNKT細胞やCD8+T細胞とともに、腫瘍免疫のキープレイヤーである。

NK細胞表面には、その機能を活性化または抑制するレセプターが存在しているが、活性化レセプターの一つが、NKG2Dである。NKG2Dは、natural killer receptor complex内に存在する遺伝子でありホモダイマーで存在しDAP10、DAP12を介してシグナル伝達され

細胞傷害活性などを発現する(図1)。

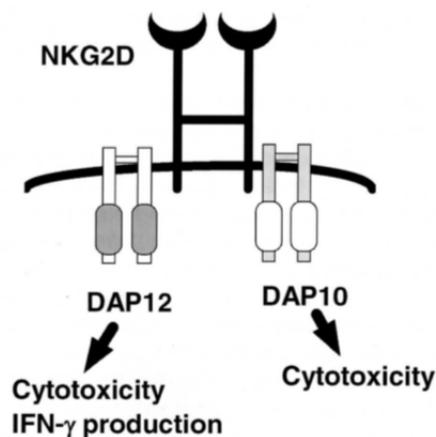


図1. NKG2Dの構造

このNKG2Dレセプターは、NKG2Dリガンドを認識することが知られている。このNKG2Dリガンドの遺伝子発現は厳密に制御されており、通常 adult tissue ではほとんどその発現が認められない。以前、研究分担者の小笠原らがNKG2Dリガンドの発現を検討したところ、腫瘍細胞で広範に発現することがわかり(Hameran, J. A., Ogasawara, K. and Lanier, L. L.: NK cells in innate immunity. Curr. Opin. Immunol. 17:29-35, 2005.)、NKG2Dこそが真のNKレセプターではないかと注目されている。そこで、このNKG2Dリガンドが口腔癌とその前癌病変における新規癌マーカー候補と考えられた。

2. 研究の目的

先に述べたように、NKG2Dリガンドはヒトの胎生期の細胞とがん細胞には発現しているものの、成人の組織ではほとんど発現していない。従って、このNKG2Dリガンドを口腔癌およびその前癌病変である白板症における新規癌マーカー分子の候補として、これを指標に口腔癌の悪性度や前癌病変から癌化への進行度の予測として用い、口腔癌の早期診断法を開発とすることをこの研究の目的とする。また、NKG2Dリガンドのみならず、抗アポトーシス分子のIAP familyの一つであるSurvivinや腫瘍特異分子として癌細胞の分化・アポトーシスの抑制・浸潤や血管新生の増強が報告されているEGFR、さらに免疫制御受容体であるPD-1リガンドについても、NKG2Dリガンドと同様に新規癌マーカー分子になりうるか否かを検討する。

3. 研究の方法

- (1) 口腔癌細胞株における、新規癌マーカー候補分子の発現解析

まず、口腔癌細胞株における NKG2D リガンドや PD-1 リガンドなどの発現解析を行う。ヒト扁平上皮癌細胞から樹立した口腔癌細胞株である HSC-2, HSC-3 における NKG2D リガンド、PD-1 リガンドなどの発現をフローサイトメトリーによって解析する。さらに、口腔癌細胞株において NKG2D リガンドなどの発現がみられた場合は、それらの発現を同様にリアルタイム PCR にて解析する。

- (2) 口腔癌標本、上皮異形性標本における、新規癌マーカー候補分子の発現解析

口腔扁平上皮癌および口腔白板症の中で上皮異形性の診断がついているものについて、病理組織学的に病理標本上での NKG2D リガンド、PD-1 リガンドなどの発現について検討する。

- (3) 新規癌マーカー候補分子同定のための細胞傷害活性・抗腫瘍効果の検討

口腔癌細胞株における NKG2D リガンドや PD-1 リガンドの発現状態を検索した後、それぞれの分子の発現を化学療法で用いられている薬剤で処理することにより調節可能か否かを検討する。NKG2D リガンド、PD-1 リガンドなどの発現の強度に応じて、NK 細胞、NKT 細胞からの細胞傷害性の感度に違いがあるかを ^{51}Cr release assay により解析する。さらに、NIH3T3 などの immortal cell line (癌化していない細胞株) や HUVEC などの primary culture 細胞を用いて、化学療法で用いられている薬剤で処理することによりそれぞれの分子の発現に変化があるか、および副作用の有無についてフローサイトメーターおよび ^{51}Cr release assay により解析する。

- (4) ヒト型モデルを用いた効果的な化学療法、免疫療法の開発基盤

重度複合免疫不全マウスである NOG マウスに患者腫瘍細胞を移植し、更に患者から採取した末梢血も移入することで新しい口腔癌治療モデルを確立する。まず、当科にて治療を行う口腔癌患者から腫瘍を採取

し約 1 cm^3 の腫瘍をメスで 1mm 四方程度に細切、細胞培養液で洗浄後、NOG マウスの背部皮下に移植する。次に患者より採取した末梢血よりリンパ球を分離し、 5×10^6 個の細胞をマウス尾静脈より投与する。移植 7 日後のマウス尾静脈より、末梢血を採取し、ヒトリンパ球が検出できることをフローサイトメトリーにて解析、確認する。確認後、患者に投与予定の化学療法剤を移植マウスに接種し、治療効果を調べる。並行して、癌患者から採取した腫瘍細胞を in vitro にて primary culture を行う。この primary culture の腫瘍細胞に対して患者に投与予定の化学療法剤を加え、化学療法剤の効果を測定する。ヒト型モデルマウスを用いた in vivo の結果と primary culture による in vitro の結果を併せて、化学療法剤の効果を評価する。

ヒト型モデルマウスを用いた効果的の化学療法、免疫療法の開発
化学療法、免疫療法

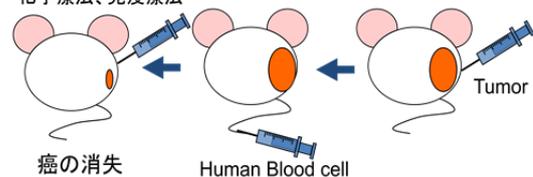


図 2. ヒト型モデルマウスを用いた研究

4. 研究成果

- (1) 口腔癌細胞株における、新規癌マーカー候補分子 NKG2D リガンドの発現解析

口腔癌細胞株における NKG2D リガンド発現をフローサイトメトリーで解析した。NKG2D リガンドの一つである hULBP-4 抗体で HSC-2 細胞株を染色したところ、下図 3 のように軽度陽性であった (図 3)。

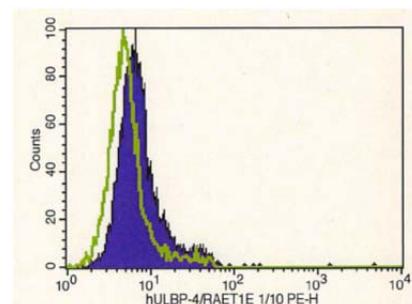


図 3. HSC-2 における NKG2D リガンド発現

同様に口腔癌細胞株 HSC-3 における NKG2D リガンドである hULBP-4 発現も軽度陽性であった (図 4)。

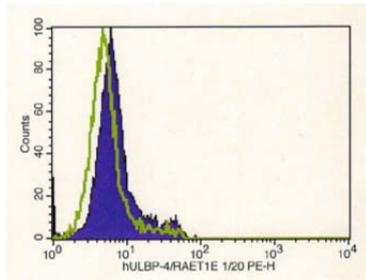


図 4. HSC-3 における NKG2D リガンド発現

(2) 口腔癌細胞株における、免疫制御受容体 PD-1 リガンドの発現解析

次に、口腔癌細胞株における免疫制御受容体 PD-1 リガンドの発現をフローサイトメトリーで解析した。その結果、下図 5, 6 のように HSC-2 および HSC-3 どちらの細胞株でも強陽性であった。

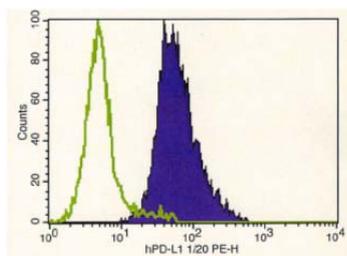


図 5. HSC-2 における PD-1 リガンド発現

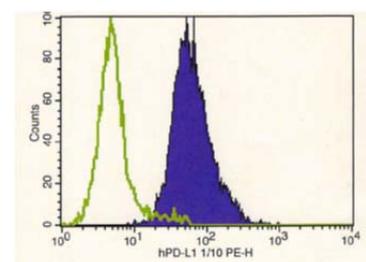


図 6. HSC-3 における PD-1 リガンド発現

(3) 口腔癌標本、上皮異形性標本における、新規癌マーカー候補分子の発現解析

過去の病理標本にて、扁平上皮癌・上皮異形性・正常細胞上の NKG2D リガンド発現を調べた。抗体は、anti- ULBP4 を用いた。その結果、扁平上皮癌のみならず上皮異形性・正常細胞上のすべてにおいて NKG2D リガンド発現を認めなかった。今後、同様に扁平上皮癌・上皮異形性・正常細胞上の PD-1 リガンド発現についても検討予定である。

以上の結果より、NKG2D リガンドよりも PD-1 リガンドのほうが口腔癌の新規癌マーカー候補分子となりうることを示され、さらに PD-1 リガンドを用いることで口腔癌の早期診断につながるのみならず、PD-1 リガンドをターゲットとした口腔癌の免疫療法への応用の可能性も示唆された。ヒト型モデルを用いた効果的な化学療法、免疫療法の開発基盤については、今回の研究では着手できなかったため、今後の検討課題とする。

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)

[論文発表] (計 5 件)

- ① Nakamura K, Nakayama M, Kawano M, Ishii T, Harigae H, Ogasawara K 2013 NK-cell fratricide-Dynamic crosstalk between NK and cancer cells *OncoImmunology* 2:11, e26529(査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3891629/>
- ② Nakamura K, Nakayama M, Kawano M, Amagai R, Ishii T, Harigae H, Ogasawara K. Fratricide natural killer cells dressed with tumor-derived NKG2D ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* (2013) 110 (23) : 9421-9426. doi/10.1073/pnas.1300140110(査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 橋元 亘, 阿部慧子, 森 士朗, 栗原淳, 野上晋之介, 宮下 仁, 山内健介, 熊本裕行, 高橋 哲. 当科における口腔表在癌の臨床的検討. 第 69 回日本口腔科学会学術集会. 2015 年 5 月 15 日, 大阪国際会議場 (大阪) .

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋元 亘 (HASHIMOTO, WATARU)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：30323033

(2) 研究分担者

小笠原康悦 (OGASAWARA, KOUETSU)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号：30323603

谷口貴洋 (TANIGUCHI, TAKAHIRO)
東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師
研究者番号：40444012