

プロテオーム解析を用いた口腔癌の分子標的の  
探索とそのオーダーメイド医療への応用

(課題番号:17390539)

平成17年度—平成18年度科学研究費補助金(基盤研究(B)(2))研究成果報告書

平成19年6月

研究代表者

岡本哲治(広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・教授)

広島大学図書

0100453493



## -はじめに-

本研究では、口腔癌の適確な診断法、有効な治療法を確立すべく、その基礎となる生物学的知見（増殖能、浸潤能、転移能、血管新生能、制ガン剤感受性さらに宿主免疫能等）を集積し、口腔癌の早期発見法の確立、微少癌や前癌病変の検出、治療に直結したがん個性の質的診断法、治療後の再発の早期予知法や治療効果の先行指標の確立、宿主細胞性免疫能など生物学的診断法の確立を行うことを目的とした。

従来、口腔癌に対して手術療法を中心に、化学療法、放射線療法の2者あるいは3者を併用したマスの治療法が行われてきた。しかし、癌の発癌過程では、複数の染色体・遺伝子異常が多段階的に起こり、その蓄積により生物学的にも臨床的にもより悪性の形質獲得へと導くことが明らかにされており、口腔癌の各個体ごとにその段階は異なる。本研究は、この様な多段階発癌過程のどのステップにあるかの質的診断を分子・細胞生物学的に行うものであり、口腔癌の個性に応じた最適な治療法つまりテーラー（オーダー）メイド医療の選択を可能とする。口腔癌の試験切除材料を用いて、増殖能、浸潤能、転移能、血管新生能、制ガン剤感受性さらに宿主免疫能等を細胞生物学的および分子生物学的に検討する。さらに、手術切除材料を用いて各種治療効果を分子生物学的および組織学的に判定するとともに、予後との関連性を明らかにすることにより、口腔癌の個性に応じた最適な治療法つまりオーダーメイド医療を目指すものである。

口腔癌の、制ガン剤に対する感受性と最も関連のある分子・遺伝子群、放射線に対する感受性と最も関連のある分子・遺伝子群、免疫療法に対する感受性と最も関連のある分子・遺伝子群を同定する。さらに、予後因子として有用な遺伝子・分子を明らかにする。これらを通じて、治療に直結したがん個性の質的診断法を確立する。さらに、口腔癌の早期発見法の確立、微少癌や前癌病変の検出、治療後の再発の早期予知法や治療効果の先行指標の確立、宿主細胞性免疫能など生物学的診断・治療法の確立も目指す。

### 1) 過去の成果

化学療法（C）あるいは放射線療法（R）あるいは免疫療法（LAK 養子免疫療法）（I）それぞれ単独、あるいはC+R、C+I、R+I、C+R+I、の術前治療を行った後、手術（S）を行い、なおかつ術前に共通の化学療法（シスプラチン+5-FU）を行い得た症例数は、74症例であった。これら症例について、以下の項目について検討を行った。



### (1) 蛋白・分子マーカーの検討

免疫組織学的に、p 5 3, p 2 7 (発現低下), PCNA, MMP-2, MMP-9, Angiopoietin (Ang) -1, Ang-2, Ang-4, Ang 受容体 Tie-2, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, Flt-4, の発現について検討を行った。

各蛋白の発現率は; p 5 3 陽性率; 4 6 % (2 5 / 5 4)、p 2 7 発現低下; 3 0 %、VEGF-A; 6 4 %、VEGF-B; 8 5 %、VEGF-C; 3 6 %、MMP-2; 5 7 %、MMP-9; 3 1 %、Ang-1; 3 7 %、Ang-2; 4 5 %、Ang-4; 3 3 %、Tie-2; 7 5 %、Flt-4; 7 6 %、であった。

これら蛋白・分子の発現状況と、TNM、病期、組織分化度、臨床的治療効果および病理組織学的治療効果、についてMann-WhitneyのU検定を用いて統計学的に検定を行ったが、現症例数では明らかな関係を見いだすことは出来なかった。

### 動注・化学・免疫・放射線療法

口腔癌34症例に対しては、ビタミンA (ショコラ A6万単位/日) の経口投与の併用を行った。その結果、臨床的治療効果および病理組織学的治療効果 (大星・下里分類) とビタミンA 投与に相関関係を認めた ( $p < 0.05$ )。特に化学療法+ビタミンA+免疫療法を併用した群ではほとんどの症例で臨床的治療効果がCR (完全消失) を示し、高い治療効果があることが明らかになった。

その結果を科学的に解明するために、ETAN-DIGE システムを用いた2次元電気泳動およびそれに続くMALDI-TOFMS 解析法を用いたプロテオーム解析にてビタミンA 処理により癌細胞表面で発現亢進する細胞膜タンパクを分離・同定した。その結果、ナチュラルキラー細胞活性化受容体として最近明らかにされた、NKG2D のリガンドである Major histocompatibility complex class I chain-related molecule A (MICA) の発現が亢進することが明らかとなった。そこで、ビタミンA (100nM) 処理後のMICA mRNA の発現を定量PCR法で検討した結果、口腔癌細胞をビタミンA (100nM) 処理すると処理後3時間をピークにMICA mRNA の発現が上昇した。また、FACS 解析にて、ビタミンA 処理癌細胞表面ではMICA 蛋白の発現が上昇することが明らかとなった。したがって、ビタミンA の経口摂取により口腔癌細胞表面でのMICA 蛋白の発現が上昇し、NK細胞の活性化を誘導していると考えられた。

MICA の遺伝子多型と口腔癌感受性について: NK細胞の活性化との関連性およびベーチェット病やI型糖尿病の疾患感受性に関与していると考えられているMICA 遺伝子の遺伝子多型 (膜貫通領域をコードする exon5 における GCT の繰り返し配列: 4回; 4型, 5回; 5型, Gのインサクションを含む5回; 5.1型, 6回; 6型, 9回; 9型) について, 100名の口腔癌患者および103名の健常人について

Chi-square method および fisher's *P* value test を用いて統計学的に検討した結果、5.1 型の MICA 遺伝子型を持つ個体の口腔癌感受性は有意に高い ( $\chi^2=16.203$ ,  $P$  value=0.00006) ことが明らかとなった。

### 薬剤耐性関連遺伝子およびその産物 (YB-1およびP-gp) と口腔癌の治療効果との関連性についての検討

現在まで癌細胞の薬剤耐性機構への様々な分子の関与が報告されている。その中でもABC トランスポーターである P 糖蛋白 (P-gp) や、P-gp をコードしている MDR-1 遺伝子、あるいはその発現に関与する転写因子群 (Sp1, HIF-1, YB-1) の重要性に関する報告が多い。そこで今回、口腔扁平上皮癌における化学療法の治療効果と YB-1, P-gp の発現を比較検討した。2002年に術前化学療法を施行し十分な組織学的検査が可能であった15例 (BLM+放射線外照射群: 10例, 多剤併用療法群 (PP・MMC・VCR): 5例) の腫瘍組織における P-gp, YB-1 の発現を免疫組織化学的染色にて検討した。培養癌細胞における抗癌剤の殺細胞効果はMTT assayにて、P-gp の発現はWestern blottingにて検討した。その結果、YB-1およびP-gpの陽性細胞率が高値の症例は、腫瘍縮小率が低値を示した。また、OSCC細胞および唾液腺癌細胞において、P-gpの高産生細胞株は、抗癌剤のIC値が高い傾向を示した。

したがって、ヒト口腔扁平上皮癌組織において YB-1, P-gp の陽性率は化学療法の効果を予測する指標となりうる事が示唆されるとともに、口腔扁平上皮癌組織および培養癌細胞において、抗癌剤の殺細胞効果と P-gp, YB-1 の発現が関連している事が示唆された。

### 平成 17-18 年度の研究成果

【緒言】MHC class 1 chain-related molecule A (MICA) は、ナチュラルキラー (NK) 細胞や T 細胞などの免疫細胞の活性化受容体である NKG2D のリガンドであり、ストレスや感染を受けた細胞および種々の腫瘍細胞に発現が誘導されると考えられている。一方、癌細胞表面に MICA 蛋白が発現しているにも関わらず NK 細胞などによって癌細胞が排除されないのは、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、その一つとして可溶性 MICA (sMICA) が考えられている。

Transforming Growth Factor (TGF) - $\beta$  は細胞性免疫抑制性に作用し、NKG2D の発現を抑制することが報告されている。TGF- $\beta$  シグナルの異常は癌の発生・進展に関与することが明らかになっている。

【目的】本研究では、sMICA 産生機構の解明および MICA 分子と OSCC 患者の臨床病態との関連性を明らかにすることを目指した。

【方法】OSCC 組織における MICA 蛋白の発現を免疫組織化学的に検討するとともに、

OSCC 患者血清中 sMICA を ELISA 法を用いて定量し、臨床病態との関連性について検討した。次に、OSCC 細胞株 KO 細胞の培養上清より sMICA を精製し、脱糖鎖処理および TOF-MS を用いた質量解析により切断部位の同定を行った。さらに、OSCC 細胞株 KO 細胞を用いて MICA 蛋白および sMICA の発現における TGF- $\beta$ <sub>1/2</sub> の機能を、TGF- $\beta$ <sub>1/2</sub> siRNA を用いて検討した。

**【結果】** 1. 免疫組織化学的検討の結果、発現様式や強度に差はあるものの全例において MICA 蛋白の発現を認め、MMPs を高発現している浸潤部では、MICA の細胞表面での発現は低下あるいは消失していた。また、進展例では、癌細胞表面での MICA 発現は低下し、間質組織での発現が上昇していた。さらに MICA の癌細胞表面での発現と化学療法や光線力学療法などの治療効果は相関傾向を示した。血清 sMICA 濃度は、癌の進展、再発や転移に伴い上昇した。さらに腫瘍血管内皮および平滑筋細胞で MICA 発現を示す症例では血清 sMICA 濃度は有意に低値を示した。

2. OSCC 細胞株 KO 細胞の培養上清より sMICA を精製し、脱糖鎖処理および質量解析により、sMICA の分子量は約 24,000 であることが判明し、sMICA は MICA 分子の  $\alpha$ 3 ドメインの前半部分（前半部分とは？どちらからか？細胞膜側からか N-末端側からか？）で切断されている可能性が考えられた。

3. 無血清培養系にて、TGF- $\beta$ <sub>1/2</sub> により KO 細胞の細胞表面における MICA 蛋白の発現は低下し、培養上清中への sMICA の産生は促進された。一方、TGF- $\beta$ <sub>1/2</sub> siRNA 導入 KO 細胞では、細胞表面 MICA 蛋白の発現は亢進し、培養上清中への sMICA の産生は著しく抑制された。また、TGF- $\beta$ <sub>1/2</sub> により MMP-2, -3, -8, -9 mRNA 発現および zymography による MMP-2, -3, -8, -9 活性の上昇を認め、MMPs 特異的阻害剤により細胞表面 MICA 蛋白の発現は上昇し、培養上清中への sMICA の産生は抑制されることが明らかとなった。

**【考察】** 癌細胞における MICA および sMICA の産生は、TGF- $\beta$  シグナルにより制御されていることが明らかとなった。また、sMICA は MMPs により MICA の  $\alpha$ 3 ドメイン領域で切断・産生され、担癌生体の全身免疫回避に重要な働きをしているのみならず、腫瘍局所、特に浸潤部位において NK 細胞などの機能を抑制することで、浸潤・転移の獲得にも重要な役割を果たしていると考えられた。さらに、癌細胞における MICA 発現や血清 sMICA 濃度は臨床病態と相関していたことから、MICA は口腔癌の新たな分子標的として有用であると考えられた。

研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
00169153	フリガナ オカモトテツジ 岡本哲治	大学院医歯薬学総合研究科	教授

研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名
90172220	フリガナ トラタンゲアキ 虎谷茂昭	病院	講師
70243251	フリガナ ハヤシドウヤスタカ 林堂安貴	病院	講師

交付決定額（配分額）

	直接経費	間接経費	合計（千円）
平成17年度	8,800	0	8,800
平成18年度	6,800	0	6,800
総計	15,600	0	15,600

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Novel relationship between the antifungal activity and cytotoxicity of marine-derived metabolite xestoquinone and its family. Nakamura M, Kakuda T, Qi J, Hirata M, Shintani T, Yoshioka Y, Okamoto T, Oba Y, Nakamura H, Ojika M. *Biosci Biotechnol Biochem*. Sep;69(9):1749-52, 2005.
2. Plasminogen activator/plasmin system suppresses cell-cell adhesion of oral squamous cell carcinoma cells via proteolysis of E-cadherin. Hayashido Y, Hamana T, Yoshioka Y, Kitano H, Koizumi K, Okamoto T. *Int J Oncol*. Sep;27(3):693-8, 2005.
3. Constitutive activating mutation of the FGFR3b in oral squamous cell carcinomas. Zhang Y, Hiraishi Y, Wang H, Sumi KS, Hayashido Y, Toratani S, Kan M, Sato JD, Okamoto T., *Int J Cancer*. Oct 20;117(1):166-8, 2005.
4. Leukemia inhibitory factor as an anti-apoptotic mitogen for pluripotent mouse embryonic stem cells in a serum-free medium without feeder cells. Furue, M., Okamoto, T., Hayashi, Y., Okochi, H., Fujimoto, M., Myoishi, Y., Abe, T., Ohnuma, K., Sato, G. H., Asashima, M., Sato, J. D..*In Vitro Cell Dev Biol Anim*. Jan-Feb;41(1-2):19-28, 2005.
5. Modulation of activin A-induced differentiation in vitro by vascular endothelial growth factor in *Xenopus* presumptive ectodermal cells. Yoshida, S., Furue, M., Nagamine, K., Abe, T, Fukui, Y, Myoishi, Y., Fujii, T., Okamoto, T., Taketani, Y., Asashima, M. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. Mar-Apr;41(3-4):104-10, 2005.
6. Dedifferentiation in adenoid cystic carcinoma of submaxillary gland: A case of report Hayashido, Y.; Yoshioka, H.; Tanaka, N.; Yoshioka, Y.; Kitano, H.; Hamana, T.; Koizumi, K.i.; Okamoto, T. • Short communication *Oral Oncology, Volume 41, Issue 5, 1 May, Pages 84-88, 2005.*
7. Primary Leiomyosarcoma of the Mandible. Yoshioka, Y., Hayashido, Y., Koizumi, K., Myoishi, Y., Hamana, T., Kitano, H., Okamoto, T.: *Asian J. Oral Maxillofac. Surg.* 17(2), 106-109, 2005.
8. Primary intraosseous carcinoma of mandible associated with elevation of serum carcinoembryonic antigen level: A case of report, Hayashido, Y., Yoshioka, Y., Shitani, T., Hamana, T., Koizumi, K., Okamoto, T.: *Oral Oncology*, 41(10), 267-271, 2005.
9. Developmental Signaling Disorders in Craniofacial Anomalies and Cancers, Zhang, Y., Okamoto, T., et al., *Oral Science International*, 3(2) Nov:56-63, 2006.

10. Induction of alpha2-antiplasmin inhibits E-cadherin processing mediated by the plasminogen activator/plasmin system, leading to suppression of progression of oral squamous cell carcinoma via upregulation of cell-cell adhesion. Hayashido Y, Hamana T, Ishida Y, Shintani T, Koizumi K, Okamoto T., *Oncol Rep.* Feb;17(2):417-23, 2007.
11. Immunohistochemical expression of heparin-binding protein 17/fibroblast growth factor-binding protein-1 (HBp17/FGFBP-1) as an angiogenic factor in head and neck tumorigenesis. Begum S, Zhang Y, Shintani T, Toratani S, Sato JD, Okamoto T. *Oncol Rep.* Mar;17(3):591-6. 2007.
12. Zootaxanthellamide D, a Polyhydroxy Polyene Amide from a Marine Dinoflagellate, and Chemotaxonomic Perspective of the Symbiodinium Polyols. Fukatsu T, Onodera KI, Ohta Y, Oba Y, Nakamura H, Shintani T, Yoshioka Y, Okamoto T, Lohuis MT, Miller DJ, Kawachi M, Ojika M. *J Nat Prod.* Mar 23;70(3):407-411. Epub 2007 Feb 22. 2007.
13. Constitutive Activating Mutation of the *FGFR3b* in Oral Squamous Cell Carcinomas-Reply to the letter to the editor. Zhang Y, Hiraishi Y, Wang H, Sumi KS, Hayashido Y, Toratani S, Kan M, Sato JD, Okamoto T. *Int J Cancer.* 2007 May 1;120(9):2060. 2007.

#### 学会発表

##### a) 国際シンポジウム, 国内学会, 招待講演

- 1 : 頭蓋・顎・顔面・口腔疾患の遺伝子・分子診断 : 張 雁, 汪華, 田中良治, 谷 亮治, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治 : 第 58 回 日本口腔科学会総会 シンポジウム 横浜 2005, 5/7~5/8
- 2 : KGFR 受容体遺伝子導入による細胞分化とアポトーシスの誘導を介した唾液腺癌細胞の増殖制御 : 張 雁, 岡本哲治 : 第 63 回 日本癌学会総会 シンポジウム 福岡 2005, 9/29~10/1
- 3 : Mutation of the *patched* in OSCC cells and suppression of its oncogenic potential by wild-type *patched* gene therapy : 岡本哲治 : 第 6 回アジア口腔顎顔面外科学会総会 第 49 回口腔外科学会総会 シンポジウム 千葉 2005, 10/20~10/23
4. Growth Factor Receptors as Molecular Targets for Genetic/Molecular Diagnosis of Oral & Maxillofacial Diseases, Zhang, Yan., Tetsuji Okamoto. 日中合同口腔科学会 (ハルビン) 2005 年 9 月 7-9 日



5. Proteolytic release of soluble MHC class I chain-related molecule A (sMICA) from oral squamous cell carcinoma cells

張 雁、峯岡摩耶、虎谷茂昭、岡本哲治

第7回アジア口腔外科学会、2006年11月 香港

6. Novel Mutations in Human Homologue of *Drosophila Patched* and its Ligand *Sonic Hedgehog* in a Japanese Nevroid Basal Cell Carcinoma Syndrome (NBCCS) Family and Median Cleft/Lip. 張 雁、亀谷明秀、北村直也、畑毅、細田超、虎谷茂昭、岡本哲治、第7回アジア口腔外科学会、2006年11月香港

b) 一般演題

1. ヒトメラノーマ細胞の浸潤・増殖における VEGF 受容体系の機能解析、  
小泉浩一、林堂安貴、吉岡幸男、浜名智昭、北野尚孝、岡本哲治、  
第59回 日本口腔科学会総会、徳島、2005年4月22日
2. 口腔扁平上皮癌の免疫逃避機構における可溶性 MICA の機能解析とその臨床的意義 (ミニシンポジウム) 池田淳子、福原泰明、張 雁、谷 亮治、  
岡本哲治、日本口腔科学会総会 (徳島) 2005年4月22日
3. ヒトメラノーマ細胞の運動能における VEGF 受容体系の機能解析：  
小泉浩一、林堂安貴、吉岡幸男、新谷智章、浜名智昭、岡本哲治、  
第78回 日本組織培養学会、広島
4. プラスミノゲン/プラスミン系による口腔扁平上皮癌細胞の細胞間接着の制御：浜名智昭、林堂安貴、吉岡幸男、小泉浩一、岡本哲治、  
日本組織培養学会 第78回大会 (広島) 2005年5月26日
5. インテグリンβ8 発現抑制が口腔扁平上皮癌細胞の増殖と浸潤能に与える影響：北野尚孝、林堂安貴、吉岡幸男、小泉浩一、浜名智昭、岡本哲治、  
第42回 日本口腔組織培養学会 (広島) 2005年11月26日
6. Mouse melanoma 細胞を用いた Tumor Dormancy モデルの作成、  
新谷智章、岡本哲治、O' Reilly, Michael S.,  
日本口腔組織培養学会 H17/11/26
7. FGF シグナルおよび androgen シグナルを介した前立腺癌発生機構の解明：  
小林雅史、McKeehan, WL, 岡本哲治、  
第42回口腔組織培養学会 2005年11月26日
8. 下顎前歯部に生じた歯原性扁平上皮腫の1例：  
福井康人、谷亮治、虎谷茂昭、小川郁子、林大祐、芳村喜道、高田隆、  
岡本哲治：  
第53回日本口腔科学会中国・四国地方部会 (高松) 平成17年11月4日

9. インテグリン $\alpha V$ 発現抑制による口腔扁平上皮癌細胞の接着能、浸潤能および増殖能に及ぼす影響, 吉岡幸男、林堂安貴、北野尚孝、浜名智昭、石田康隆、小泉浩一、岡本哲治, 第59回 日本口腔科学会総会(徳島)平成17年4月21日(木) 22日(金)
10. 口腔扁平上皮癌におけるMICA蛋白の発現とその臨床的意義  
峯岡摩耶, 福井康人, 末松美玲, 張雁, 岡本哲治  
第60回日本口腔科学会、名古屋国際会議場、  
平成18年5月11日, 12日
11. 口腔扁平上皮癌の浸潤・増殖におけるインテグリン $\beta 8$ の関与  
石田康隆、林堂安貴、吉岡幸男、小泉浩一、浜名智昭、岡本哲治  
第60回日本口腔科学会、名古屋国際会議場、平成18年5月11日,  
12日
12. 表在性口腔癌に対するPDT療法  
虎谷茂昭、谷亮治、岡本哲治  
第16回日本光線力学学会学術講演会2006年5月13日 東京
13. 口腔粘膜上皮細胞および口腔扁平上皮癌細胞株におけるPatched-1 Splicing Variantの同定とその機能解析  
張雁, 北村直也, 虎谷茂昭, 岡本哲治  
第79回 日本組織培養学会(東京大学)平成18年5月25日
14. 口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・増殖におけるインテグリン $\beta 8$ の役割  
石田康隆、林堂安貴、吉岡幸男、小泉浩一、浜名智昭、岡本哲治  
第79回 日本組織培養学会(東京大学)平成18年5月25日
15. 超選択的動注化学・細胞治療が奏効したStageIV舌癌の3例  
谷亮治, 小泉浩一, 福井康人, 峯岡摩耶, 吉岡幸男, 小林雅史, 新谷智章, 岡本康正, 福原泰明, 明石靖史, 鍋島巧, 松本真司, 竹末奈々子, 木村直大, 新川修司, 藤井良典, 星正浩, 石田康隆, 張雁, 角健作, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治,  
2006年 7月(広島)中四国口腔癌研究会
16. 表在性口腔癌に対する光線力学療法、虎谷茂昭、谷亮治、松本真司、鍋島巧、新川修司、福原泰明、福井泰人、岡本康生、新谷智章、小泉浩一、小林雅史、吉岡幸男、岡本哲治  
第51回(社)日本口腔外科学会総会2006年10月13日 北九州
17. 口腔扁平上皮癌の浸潤・増殖を制御するインテグリン $\alpha V\beta 8$ を介するシグナル伝達系  
石田康隆、林堂安貴、吉岡幸男、小泉浩一、浜名智昭、岡本哲治  
第43回日本口腔組織培養学会 11月11日 千里ライフサイエンスセンタ

ーサイエンスホール

- 1 8. 下顎臼歯部に発生した腺性歯原性嚢胞の1例  
新川修司、小泉浩一、虎谷茂昭、小川郁子、高田隆、岡本哲治  
第 54 回日本口腔科学会 中国・四国地方部会 11 月 18 日（広島）
- 1 9. エナメル上皮癌における新規可溶化性 FGFR3 受容体の同定  
張 雁、峯岡摩耶、石田康隆、虎谷茂昭、岡本哲治  
新第 54 回日本口腔科学会 中国・四国地方部会 11 月 18 日（広島）

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

1. United State Patent: Method of testing Squamous epithelial cells, Tetsuji Okamoto,  
Application NO. 09/953,562, Approved date: 06/20/2005
2. アシルスペルミジン誘導体及び抗腫瘍用剤、岡本哲治、小鹿一、広島大学、  
名古屋大学、特願 2006-168926, 2006.

## 第1章 緒言

Major histocompatibility complex (MHC) class I chain-related molecule A (MICA) は、ヒト細胞の細胞膜上に発現する糖蛋白で、一部の上皮細胞を除いてほとんどの正常細胞では発現されておらず、紫外線・発がん物質・微生物感染などのストレスを受けた粘膜上皮細胞や種々の腫瘍細胞において、発現が誘導されると考えられている (Bahram, et al., 1994; Groh, et al., 1996; Groh, et al., 1998; Li, et al., 2001)。また、MICA は、Natural Killer (NK) 細胞や一部の細胞障害性 T 細胞などの免疫細胞の活性化受容体である NKG2D のリガンドであり、同受容体を介した NK 細胞などへの活性化シグナルは、多彩な免疫応答の成立に寄与していると考えられている (Groh, et al., 1999; Bauer, et al., 1999; Wu, et al., 1999)。

癌免疫において、癌原発巣で癌特異抗原による前感作を必要とせず最先端で作動するのは、NKG2D を介した NK 細胞などを中心とした自然免疫のカテゴリーに属する免疫細胞であり、MICA を発現する標的癌細胞を即時に攻撃したり、IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) などのサイトカインの産生を介して免疫機構全体を包括的に活性化する (Nakachi, et al., 2004; Joseph, et al., 2004)。また、Lymphokine-activated killer (LAK) 細胞は、T 細胞などが産生する IL-2 (interleukin-2) の刺激を受けて活性化するリンパ球系の細胞群であり、NK 細胞や細胞障害性 T 細胞が含まれ、癌細胞に対してのみ細胞障害活性を示し、正常細胞を障害しないという高い選択性を有するため、近年、がん治療の臨床において、従来 of 化学療法、放射線療法および手術療法に加えて、LAK 細胞や

NKT細胞を用いた養子免疫細胞療法が注目されている (Joseph, et al., 2004)。

MICA遺伝子 (Bahram, et al., 1996 ; Perez-Rodriguez, et al., 2000; Rueda, et al., 2002; Gambelunghe, et al., 2006) には、膜貫通領域をコードするエキソン 5 内の GCT 繰り返し配列数の違いにより、4 回繰り返しが A4 型、5 回が A5 型、6 回が A6 型、8 回が A8 型、9 回が A9 型、さらに 2 回目と 3 回目の間に G 塩基が変則的に入る A5.1 型の 6 型が存在することが知られており、1 型糖尿病や Behçet 病などの疾患感受性との関連性が示唆されている (Mizuki, et al., 1997; Gambelunghe, et al., 1999; Kawabata, et al., 2000; Sugimura, et al., 2001; Hughes, et al., 2005)。池田は、口腔扁平上皮癌 (Oral Squamous Cell Carcinoma, 以下 OSCC と略す) の疾患感受性と MICA 遺伝子多型の関連性を検討し、OSCC では A5.1 型を有する個体の疾患感受性が対照と比較して有意に高いことを明らかにした (Table 1A)。また、Allele 解析においても OSCC 患者では A5.1 型が有意に高く、5.1 ホモ接合型は OSCC 患者のみに認められることを明らかにしている (Table 1B)。この結果より、A5.1 型では膜貫通領域のアミノ酸配列の変化により MICA 蛋白の本来の高次構造が変化し、結果的に NKG2D 受容体を介した NK 細胞の活性化シグナル伝達に影響を与えていることが考えられた。

一方、重症化した担癌個体においては、NK 細胞活性をはじめとした細胞性免疫能の低下がしばしばみられ、担癌個体のステージの進行に伴いさらに低下するとの報告もある (Herberman, et al., 1982)。癌細胞が細胞表面に MICA を発現し、NK 細胞を中心とした自然免疫系の活性化を誘導する環境を自ら作っているにもかかわらず、NKG2D を発現する NK 細胞や一部の細胞障害性 T

細胞などの免疫細胞によって癌細胞が排除されがたいという事実は、不明な点が多い。その原因として、担癌生体には何らかの免疫回避システムが存在する可能性が考えられており、そのひとつとして腫瘍細胞由来の可溶性 MICA (soluble form of MICA, 以下 sMICA と略す) の存在が明らかにされた (Groh, et al., 2002; Salih, et al., 2003; Holdenrieder, et al., 2006a, b)。この sMICA が NKG2D を被覆することにより NKG2D<sup>+</sup> NK 細胞などによる癌細胞の認識を阻害する、あるいは NK 細胞表面の NKG2D の発現を負に制御することにより、NK 活性の低下を引き起こしている可能性が考えられる。しかしながら、sMICA の詳細な産生機構はいまだ明らかとされていない。

そこで本研究では、sMICA 産生機構の解明および MICA 分子と OSCC 患者の臨床病態との関連性を明らかにすることを目指した。

## 第 2 章 材料および方法

### 第 1 節 細胞培養

#### 1) 基礎培地

Dulbecco's Modified Eagle's 培地 (Dulbecco, et al., 1959) と Nutrient Mixture Ham F-12 (Ham, et al., 1963) を 1:1 に混合した DF 培地 (Barnes, et al., 1963; Darmon, et al., 1981)、および Dulbecco's Modified Eagle's 培地と RPMI1640 培地 (Moore, et al., 1967) を 1:1 に混合した RD 培地 (Sato, et al., 1987; Myoken, et al., 1989) (以上、Sigma Chemical Co., St. Louis, MI) を、精製した純水 (ELIX 水純化装置; Millipore, Billerica, MA, USA) に溶解し、90 mg/L ペニシリン G ナトリウム (明治製菓, 京都)、90 mg/L カナマイシン (明治製菓)、110 mg/L ピルビン酸ナトリウム (和光純薬, 大阪)、15mM N-2 ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンスルホン酸 (HEPES; 同仁化学, 熊本) および重炭酸ナトリウム (和光純薬) を、DF 培地には 1.2 g/L、RD 培地には 2.0 g/L 添加後、pH7.4 に調整し、メンブレンフィルター (孔径 0.2  $\mu$ m, Acrocap; Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI, USA) でろ過滅菌し、基礎培地として用いた。

## 2) 無血清培地

無血清培地として、DF および RD 培地に以下の 5 種類の添加因子 (5F) を添加した DF5F および RD5F 培地を用いた。10  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール、10  $\mu$ M 2-アミノエタノール、10nM 亜セレン酸ナトリウム (以上、和光純薬)、5  $\mu$ g/ml ヒトトランスフェリン、10  $\mu$ g/ml 結晶化ウシインシュリン (以上、Sigma)。

## 3) 培養癌細胞株

細胞株として当科で樹立した口腔扁平上皮癌由来細胞株 KO, NA (HO-1-N-1) (Miyachi, et al., 1988), KA (Wu, et al., 1991), SI, UE (HO-1-U-1) (Miyachi, et al., 1985), NI を用いた。それぞれ DF あるいは RD 培地に 5% 仔ウシ血清 (CS; HyClone, Logan, UT, USA) を添加した培地を用いて、100 mm 径培養皿 (CORNING Inc. USA) 上で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 気相下で CO<sub>2</sub> インキュベータ (NAPCO CO<sub>2</sub> 5400, 和研薬株式会社, 京都) を用いて培養した。継代培養は細胞が増殖飽和状態になった時点で行った。すなわち、0.05% トリプシン (Sigma) と 0.04% エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA; 同仁化学) を含む Dulbecco's Ca<sup>2+</sup>・Mg<sup>2+</sup> 不含リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffer saline; PBS) (以下、トリプシン/EDTA と略す) で細胞分散後、5% CS を含む DF、RD 培地を用いて継代培養を行った。



## 第 2 節 OSCC 組織における MICA 蛋白の発現および OCSS 患者の血清 sMICA 濃度と臨床病態との関連性についての検討

### 1) 口腔扁平上皮癌 (OSCC) 患者の初診時組織採取

広島大学病院, 顎・口腔外科を受診した OSCC 患者 30 名より、同意のもと、初診時に診断のために採取した腫瘍組織を用いた。なお本研究は広島大学歯学部倫理委員会の承認済みである。

### 2) 免疫組織化学的検討

OSCC 組織における MICA 蛋白および、Matrix metalloproteinase (MMP)-2,-3,-8,-9 の発現を免疫組織化学的に検討した。通法に従い、第 2 節 1) で得た組織をホルマリン固定後、パラフィンブロックを作製し、5 $\mu$ m 厚の切片をアミノシランコートスライドガラス (MATSUNAMI GLASS IND., LTD, Osaka) 上に作製した。続いて 40 $^{\circ}$ C で 2 日間静置した後、キシレンおよびエタノール系列にて水和させ、0.01M クエン酸 (pH6.0)、95 $^{\circ}$ C にて 5 分間、2 回処理した。続いて、MeOH/3% $H_2O_2$  で 15 分間、室温で処理し、内因性ペルオキシダーゼの除去を行った。さらに、非特異的反応を防ぐため、1.5%血清/PBS で 37 $^{\circ}$ C、1 時間のブロッキングを行った後に、1 次抗体 (Table 2A) を 4 $^{\circ}$ C で一晩作用させた。次いで、ヒストファンシンプルステイン MAX PO (株式会社ニチレイバイオサイエンス) (Table 2B) を 37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させ、最後に DAB 溶液 (1mg/ml 3,3-diaminobenzidine,0.03%  $H_2O_2$ , 0.01M Tris-HCl buffer ; pH 7.4) にて発色させた。また、核の染色はヘマトキシリンにて行っ

た。エタノールおよびキシレン系列にて脱水後、MOUNT-QUICK (DAIDO SANGYO CO., LTD. Japan) にて封入した。なお、各段階で反応終了後に PBS にて 3 回洗浄した。対照はブロッキングバッファー処理群とした。各蛋白の発現は蛍光顕微鏡 (ECLIPSE E800; Nikon, Tokyo, Japan) を用いて行った。

MICA 発現の評価は、negative=0, mild staining=1, moderate staining=2, strong staining=3 とし、0 を陰性症例、1~3 を陽性症例とした。

### 3) Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 染色によるアポトーシスの判定

腫瘍組織のアポトーシスの判定には、Apoptosis *in situ* detection kit (和光純薬) を用いて、TUNEL 法により行った。切片を 0.1% Triton X-100 を含む 0.1% trisodium citrate 溶液で 4℃で 2 分間処理後、0.05% proteinase K で室温にて 5 分間処理した。その後、TdT reaction solution (TdT enzyme : TdT substrate solution = 1 : 1) を用いて 37℃で 60 分間処理した。続いて 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で室温下にて 5 分間処理後、peroxidase-conjugated antibody で 37℃下 60 分間 incubate した。DAB 溶液にて発色後、ヘマトキシリンにて核染色を行い、脱水、封入し顕微鏡観察を行った。

#### 4) OSCC 患者からの血清採取

平成 15 年 8 月から平成 18 年 11 月の間に広島大学病院、顎・口腔外科を受診した OSCC 患者 184 名に対して研究協力についてインフォームドコンセントを行い、同意を得た後一般血液検査のために採血し検査後の残りの検体を用いた。採血は EDTA 入り真空採血管（ベノジェクト®; TERUMO, 東京）を用いて行い、遠心分離後の血清を使用した。184 名のうち、初診時の血清を採取できたのは 71 名であった。

#### 5) サンドイッチ-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) による

##### 血清 sMICA 濃度の測定

DuoSet®ELISA Development System (DY1300, R&D System Inc. USA) を用いて、OSCC 患者の血清 sMICA 濃度を測定した。ELISA プレート (Nunc-ImmunoPlate / MaxiSorp, Nalge Nunc International K.K., Denmark) に、Capture 抗体 (マウス IgG1 抗ヒト MICA 抗体, 2.0  $\mu$ g/ml) を加えて、室温にて一晩処理し、抗体をコーティングした後に PBS に 0.05% Tween®20 (和光純薬) を加え作製したウォッシュバッファーにて洗浄した。1% BSA-PBS を加え、室温で 1 時間ブロッキングした後、洗浄し、血清サンプルを 1% BSA-PBS で 4 倍に希釈したものを加え、室温で 2 時間反応させた。スタンダードとして recombinant human MICA (DY1300-841614) を各濃度 (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5ng/ml) 加えた。洗浄後、Detection 抗体 (ヤギ IgG 抗ヒト MICA 抗体, 0.4  $\mu$ g/ml) を加えて、室温にて 2 時間反応させた。洗浄後、1% BSA-PBS にて 200 倍希釈した Streptavidin HRP を 100  $\mu$ l/well 加え、室温で 20 分間反応

させた後に洗浄し、TMB ペルオキシダーゼ基質および溶液 B (KPL, Gaithersburg, Maryland, USA)を 100  $\mu$ l/well 加えて発色させた。最後に、2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で反応を停止後、Bio-RAD Model 550 Microplate Reader (Bio-RAD Laboratories, Japan) を用いて、450nm の波長で、各サンプルの吸光度を測定した。sMICA の内部標準曲線をもとに、各サンプルの sMICA 濃度を算出した。なお、対照として健常人 (n=6) の血清 sMICA 濃度を測定した。また、内部標準曲線は測定ごとに作成した。

#### 6) 血清 sMICA 濃度の解析法

OSCC 患者の初診時を含めた治療経過中の血清 sMICA 濃度と OSCC 組織 MICA 蛋白発現との関連性、および患者ごとの治療経過や臨床病態との関連性を統計学的に解析 (*p* value test) した。解析ソフトは、Prism 4, Ver. 4 (GraphPad Software, Inc) を用い、*t* 検定を行った。

### 第3節 MICA 分子の切断部位の同定

#### 1) 培養細胞株における MICA 発現の検討

##### (1) 蛍光免疫組織染色による MICA 蛋白の局在の検討

OSCC 細胞株 KO, NA, KA, SI, UE, NI における MICA 蛋白の局在を明らかにするため、無血清培養系にて検討を行った。無血清培地として DF5F および RD5F を用いた。

Type I コラーゲン (新田ゼラチン, 大阪)/PBS にてコラーゲンコートした 8well チャンバーdish (Lab-Tek® II Chamber Slide™ System, Nalgen Nunc International, USA) を用い、3 日間培養した後に、4%パラホルムアルデヒド (和光純薬) にて細胞を固定した。PBS にて 3 回洗浄後に、非特異的反応を防ぐため、Blocking One (ナカライテスク株式会社, Kyoto, Japan) にて、室温下 1 時間ブロッキング処理を行った。1 次抗体として、抗ヒト MICA ヤギポリクローナル抗体 (anti-human MICA antibody, 4.0ng/μl, R&D System Inc.) を用い、4°Cで一晩反応させた。PBS にて 3 回洗浄後、2 次抗体として HiLyte Fluor™ 標識抗ヤギ抗体 (Rabbit anti-goat IgG, HyLite Fluor™ 647 conjugated, AnaSpec Inc., USA) を室温で 1 時間反応させ、さらに PBS にて 3 回洗浄した。ただちに、Zeiss LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, GERMANY) にて検鏡、画像を Zeiss LSM Image Browser (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) にて解析し、MICA の局在を検討した。

## (2) Northern Blot 法による MICA mRNA 発現検討

OSCC 細胞株 KO, NA, KA, SI, UE, NI より RNeasy kit<sup>®</sup>(QIAGEN K.K., Japan) を用いて RNA の抽出を行い、それぞれ 10  $\mu$ g の total RNA を用いて MICA mRNA の発現を Northern Blot 法にて検討した。

### ① RNA 抽出法

RNeasy kit<sup>®</sup>(QIAGEN K.K., Japan) を用いた total RNA の抽出法は以下の通りである。対数増殖期の OSCC 細胞株 KO, NA, KA, SI, UE, NI より、Lysis Buffer および 100% エタノールを用いて total RNA を分離した。その溶解液を RNeasy<sup>®</sup> ミニ スピン カラムに添加し遠心後、カラム付属メンブレンに吸着した total RNA を elution buffer で溶出し、純粋な total RNA を得た。RNA 量は分光光度計 (NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer; 株式会社エル・エム・エス, 東京) を用いて定量した。

### ② Digoxigenin (DIG) 標識 cRNA プロープの作製

OSCC 細胞株 NA より total RNA を抽出し、RNA 1  $\mu$ g に対し、サーマルサイクラー (PTC-0220 DNA Engine Dyad; MJ Japan, K.K., Tokyo) を用いて Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) を行い、MICA 遺伝子の exon 4 を含む領域を増幅した。PCR 産物を pGEM-T Easy Vector System (Promega, WI) で 4°C overnight で ligation 反応を行った。これを E.Coli JM109 株に形質転換し、100  $\mu$ g/ml アンピシ

リン (和光純薬) 添加 LB 寒天培地 (GIBCO) 上の形質転換株を選択した。得られた形質転換株からプラスミド DNA を精製し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer, USA) を用いて *MICA* 遺伝子の塩基配列を確認した。その後、*MICA* 遺伝子を含むプラスミド DNA を制限酵素 Spe I (New England Biolabs, MA) を用いて 37°C で 16 時間処理し、精製した DNA 1  $\mu$ g を T7 polymerase 1  $\mu$ l (Roche, Mannheim, Germany)、10  $\times$  Labeling Mix 2  $\mu$ l (Roche)、RNase Inhibitor 1  $\mu$ l (Perkin-Elmer) を加えて全量を 20  $\mu$ l とし、37°C で 2 時間 incubate し、エタノール沈殿後、75%エタノールで洗浄したものを使用した。

### ③ Northern hybridization

*MICA* 遺伝子発現を Northern hybridization にて解析した。各々の細胞より抽出した total RNA 10  $\mu$ g をホルムアルデヒド変性 1%アガロースゲルで電気泳動後、Biodyne-nylon メンブレン (Pall BioSupport, East Hills, NY) に転写した。UV-LINKER (フナコシ) で UV 照射後、メンブレンを熱変性した DIG 標識 *MICA* cRNA プロブあるいは GAPDH cDNA プロブをそれぞれ含む hybridization buffer (5 $\times$ SSC、0.75M NaCl、0.075M Sodium citrate; pH7.0、2%DIG blocking buffer (Roche)、50% formamide、0.05%SDS) で 60°C 下、18 時間 hybridization を行った。反応後 2 $\times$ SSC/0.1%SDS 中にて室温で 5 分間 2 回洗浄し、さらに、0.2 $\times$ SSC/0.1%SDS 中にて 68°C で 15 分間 2 回洗浄し、DIG detection system (Roche) にて解析した。

### (3)Western Blot 法による MICA 蛋白発現の検討

無血清培養下、80% confluent まで増殖した各 OSCC 細胞株を、PBS にて 3 回洗浄後、Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) を添加した Cell Lysis Buffer (10mM Tris-Hcl (pH7.4), 150mM NaCl, 5mM EDTA-1%Triton X-100) で可溶化し細胞抽出液を得た。細胞抽出液中の蛋白量を、Bradford の方法 (Bradford, M. M., 1976) に準じて分光光度計 (BioSpec-mini; 島津製作所, 京都) にて定量した後に、以下の方法で Western Blot を行い、細胞抽出液中の MICA 蛋白の発現を検討した。還元下で 10%SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。続いて、蛋白をゲルから Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, CA) を用いて 20V、1.5 時間、PVDF メンブレン (Immobilon™-PTransferMembrane, Millipore Corporation, USA) へ転写した。転写後のメンブレンを Blocking One にて室温下、1 時間ブロッキング後、抗ヒト MICA ヤギポリクローナル抗体(anti-human MICA antibody, 0.2ng/ $\mu$ l, R&D System Inc.)で 4°C 下一晩反応させた。メンブレンを 0.1%Tween-20 (和光純薬) を含む TBS (Tris 0.02M, NaCl 0.137M, pH7.5) で 15 分間、3 回洗浄後、HRP 標識抗ヤギ抗体 (anti-goat IgG, HRP-linked antibody, Sigma) を室温で 1 時間反応させた。発光は、Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Corporation) を用いて行った。続いて、ChemiDoc XRS (Bio-Rad) にて画像を取り込み、The Discovery Series™ Quantity One® (Bio-Rad) にて解析した。



#### (4) サンドイッチ-ELISA 法による細胞培養上清中 sMICA の定量

各 OSCC 細胞株の培養上清中の sMICA 濃度を測定した。無血清培地 DF5F および RD5F で 3 日間培養した後、DF および RD のみの基礎培地に交換し、24 時間後に培養上清を採取した。続いて、Centricon® Plus20 (Millipore) にて培養上清を 50 倍に濃縮後、第 2 節 5)の方法に準じてサンドイッチ-ELISA 法にて、各培養上清中の sMICA 濃度を測定した。

#### 2) sMICA 蛋白の精製

無血清培養系にて KO 細胞を培養し、その培養上清 3 L を回収し、以下の方法で sMICA を精製した。Affigel 15 Beads (Bio-Rad) 400  $\mu$ l を 3 倍量の Milli-Q 水で洗浄後、HEPES Buffer 中で 4°C 下、4 時間、mouse IgG1 anti-human MICA Antibody (AM01, Immatix Biotechnologies, Tubingen, Germany) 100  $\mu$ g と反応させ Affigel Beads に抗体をカップリングした。続いて、1M エタノールアミンにてブロッキング処理を行い、抗 MICA 抗体結合アフィニティーカラムを作製した。回収した培養上清をカラムに通した後、カラムを HEPES Buffer で洗浄し、0.1M Glycine-HCl Buffer (pH2.5) で蛋白を溶出後、ただちに 1/2 倍量の HEPES-NaOH、pH10.2 で中和した。

### 3) sMICA の分子量の検討

第3節 2) で得たsMICA蛋白に、1/10倍量の10×Glycoprotein Denature Buffer (5%SDS, 0.4M DTT)を加え、100℃、10分間熱変性を行い、さらに1/10倍量の10×G7 Reaction Buffer (0.5M Sodium Phosphate Buffer, pH7.5) および10% NP-40を加え、続いて1,500 units PNGase F (New England Bio Labs) を添加し、37℃で5時間反応させ、脱糖鎖蛋白を得た。続いて、第3節 1)-c)の方法に準じてWestern Blot法にてsMICAの分子量を決定した。

### 4) 質量解析による MICA 分子の切断部位の検討

第3節 2) で精製した sMICA を Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time of Flight – Mass Spectrometer (MALDI/TOF-MS) による質量解析を行い切断部位を検討した。MALDI/TOF-MSの方法を以下に示す。

精製した sMICA を Sequencing Grade Modified Trypsin (Promega, USA) で処理し、断片化した。断片化した sMICA を Biflex IV (Bluker Daltonics Inc., USA) を用いて測定し、BRUKER Xtof (Bluker Daltonics) にて質量分析を行った。得たペプチドフラグメントを Matrix Science のデータベース (<http://www.matrixscience.com>)と照合し、MICA 分子と一致するアミノ酸配列を検索した。

#### 第4節 MICA 蛋白および sMICA の発現に及ぼす Transforming growth factor- $\beta_1$ 、 $\beta_2$ (TGF- $\beta_{1/2}$ ) の影響についての検討

##### 1) MICA 蛋白および sMICA の発現に及ぼす TGF- $\beta_{1/2}$ の影響

培養癌細胞株、KO 細胞を用いて、MICA 蛋白および sMICA の発現に及ぼす TGF- $\beta_{1/2}$  の影響を検討した。無血清培地 DF5F にて KO 細胞、 $1 \times 10^6$  個を 100 mm 径培養皿 (CORNING) を用いて 24 時間、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養し、培地交換と同時に TGF- $\beta_1$  (Human TGF- $\beta_1$ , R&D Systems)、および TGF- $\beta_2$  (Human TGF- $\beta_2$ , R&D Systems) を各 0.4、2.0、10.0 ng/ml 添加した。添加 48 時間後に培養上清を採取し、Amicon Ultra<sup>®</sup>15k (Millipore) にて 4000g、35~60 分間遠心し、50~100 倍濃縮した。濃縮したサンプルを用いて、第 2 節 5) の方法に準じてサンドイッチ-ELISA にて、各培養上清中の sMICA 濃度の測定を行った。また、第 3 節 1)-(3) の方法に準じて Western Blot 法にて sMICA および MMP-2,-3,-8,-9 の発現を検討した。さらに、培養細胞から細胞抽出液を採取し、細胞抽出液中の MICA および MMP-2,-3,-8,-9 の発現を第 3 節 1)-(3) の方法に準じて Western Blot 法にて検討した。また培養細胞より第 3 節 1)-(2) ①の方法に準じて RNA を抽出し、MICA mRNA および MMP-2,-3,-8,-9 mRNA の発現を半定量 RT-PCR 法にて検討した。RT-PCR 法は以下に示す。

Total RNA 1  $\mu$ g に MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l、10 $\times$ PCR Buffer 2  $\mu$ l、dNTP 8  $\mu$ l、Random Hexamers 1  $\mu$ l、RNase Inhibitor 1  $\mu$ l、Reverse Transcriptase 1  $\mu$ l (以上 Applied Biosystems Japan Ltd.)、nuclease-free water (Sigma) を加えて、20  $\mu$ l とし、42°C で 20 分間反応後、99°C で 5 分間、5°C で 5 分間反応させて

cDNA を合成した。続いて合成した cDNA に、各プライマー対 (Table 3) と Ampli Taq Gold DNA Polymerase (Roche) を加え、サーマルサイクラーを用いて 95°C 10 分反応後、変性反応 94°C 1 分、各アニーリング温度 (Table 3) で 1 分、伸展反応 72°C, 1 分を 1 サイクルとするプログラム (Table 3) を繰り返すことにより PCR 産物を得た。この PCR 産物を 1.5% アガロースゲル電気泳動後、SYBR Safe™ DNA gel stain (Invitrogen, Japan, k.k.) で染色、可視化し、ChemiDoc XRS (Bio-Rad) にて画像を取り込み、The Discovery Series™ Quantity One® (Bio-Rad) にて解析した。

## 2) MICA 蛋白および sMICA の発現に及ぼす内在性 TGF- $\beta_{1/2}$ の発現抑制の影響 についての検討

KO 細胞を用いて、MICA 蛋白および sMICA の発現に及ぼす内在性 TGF- $\beta_{1/2}$  発現の抑制の影響を検討した。内在性 TGF- $\beta_{1/2}$  発現の抑制には TGF- $\beta_{1/2}$  small interfering RNA (以下 siRNA と略す) (Table 4) を用いた。無血清培地 DF5F を用い、KO 細胞、 $1 \times 10^6$  個を 100 mm 径培養皿 (CORNING) 上で 24 時間、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した後に、培地交換と同時に以下の方法で TGF- $\beta_{1/2}$  siRNA を導入した。Negative Control (以下 NC と略す) siRNA 0.6  $\mu$ g、TGF- $\beta_1$  siRNA 3.0  $\mu$ g、TGF- $\beta_2$  siRNA 1.2  $\mu$ g、を 1.0ml の DF5F で希釈し、それぞれ siRNA の最終濃度を 5nM、25nM、10nM とした。希釈した siRNA に、HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN) (40  $\mu$ l) を添加し、室温で 10 分間インキュベートし、siRNA 混合液を作製した。続いて、各混合液を 1 滴ずつ均一になるよう細胞に直接添加した後に、DF5F を加えて全培養液量を 8.0ml

とし、さらに培養を行った。siRNA 導入 48 時間後に第 4 節 1)の方法に準じて培養上清、培養細胞抽出液および Total RNA を採取し、サンドイッチ-ELISA による培養上清中 sMICA 濃度、Western Blot 法による培養上清中 sMICA の発現、細胞抽出液中 MICA 発現、および半定量 RT-PCR 法による *MICA*、*MMP-2*、*-3*、*-8*、*-9* mRNA 発現の検討を行った。

### 3) MICA 蛋白および sMICA の発現に及ぼす MMP 阻害剤の影響の検討

KO 細胞を用いて、MICA 蛋白および sMICA の発現に及ぼす MMP 阻害剤の影響を検討した。無血清培地 DF5F にて KO 細胞、 $1 \times 10^6$  個を 100 mm 径培養皿 (CORNING) 上で 24 時間、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養し、培地交換と同時に MMP-3 Inhibitor II (Calbiochem<sup>®</sup>, EMD Biosciences, Inc. Germany) 2.0-32.0 μM、MMP-8 Inhibitor I (Calbiochem<sup>®</sup>) 0.1-1.6 μM、MMP-2/9 Inhibitor I (Calbiochem<sup>®</sup>) 2.17-13.0 μM、を添加した。添加 24 時間後に再度 MMP Inhibitor を各濃度で追加添加した。初回添加 48 時間後に第 4 節 1)の方法に準じて培養上清および培養細胞抽出液を採取し、サンドイッチ-ELISA を用いて培養上清中 sMICA 濃度の測定、Western Blot 法による培養上清中 sMICA の発現、および細胞抽出液中 MICA 発現の検討を行った。

## 第 3 章 結果

### 1. OSCC 組織における MICA 蛋白の発現

検討した OSCC 組織全例において、その発現強度には違いはあるものの、細胞膜、細胞核および細胞質に MICA 蛋白の局在を認めた (Fig. 1A, B, C)。特徴的な所見として、浸潤部の癌細胞では、MICA 蛋白の細胞表面での発現は低下あるいは消失しており (Fig. 2A)、同部では、MMP2 (Fig. 2B) および MMP9 (Fig. 2C) を高発現していた。また進展例では、癌細胞表面での MICA 蛋白発現は低下し間質組織での局在を認めた (Fig. 3)。さらに、30 症例中 6 例において腫瘍血管内皮および平滑筋細胞に MICA 発現を認め、その全例で血管内皮は TUNEL 陽性を示した (Fig. 5A, B)。

### 2. OSCC 患者の血清 sMICA 濃度と臨床病態との関連性

臨床経過と血清 sMICA 濃度の関係を解析した結果、再発や転移に伴い血清 sMICA 濃度は高値を示すことが明らかとなった (Fig. 4)。初診時のステージ分類との比較では、ステージの進行に伴い血清 sMICA 濃度の上昇がみられ、特にステージ I と他のステージ間で有意差を認めた (Fig. 4)。また、再発やリンパ節転移、肺転移症例では高値を示した。一方、治療後 1 年以上、再発・転移を認めない症例では 1~1.5 ng/ml と低値を示した。また、血管内皮および平滑筋細胞での MICA 発現陽性症例の血清 sMICA 濃度は  $0.45 \pm 0.15$  ng/ml であり、陰性症例の  $3.32 \pm 0.36$  ng/ml と比較して有意に低値を示していた ( $p < 0.01$ ) (Fig. 6)。なお、対照として 6 人の健常人の血清 sMICA 濃度を測定した結果、測定検出限界値以下であったため、対照値は 0 とした。

### 3. 各 OSCC 培養細胞株における MICA の発現

蛍光免疫染色法にて MICA 蛋白の局在を検討したところ、全ての OSCC 細胞株で MICA 蛋白の発現を認めた (Fig. 7)。また、Western Blot 法および Northern Blot 法を用いて細胞抽出液中の MICA 蛋白および MICA mRNA の発現を検討したところ、いずれの OSCC 細胞株も MICA mRNA を同程度発現していたが (Fig. 8A)、Western Blot 法の結果より、他の細胞株と比べて KO 細胞では MICA 蛋白の発現は非常に低いことが明らかとなった (Fig. 8B)。一方、ELISA 法を用いて培養上清中の sMICA 濃度を検討した結果、sMICA の産生量は KO 細胞において最も高いことが分かった (Fig. 8C)。

### 4. sMICA の分子量の決定

培地中に分泌された sMICA の分子量を明らかにするため、精製 sMICA を脱糖鎖処理し、Western Blot 法にて検討したところ、脱糖鎖未処理の sMICA は 48kDa であったが、脱糖鎖処理後の sMICA は 24kDa のシングルバンドとして検出され、sMICA の分子量は約 24,000 であることが明らかとなった (Fig. 9)。

### 5. sMICA 切断部位の同定

MALDI/TOF-MS の結果、MICA 分子の  $\alpha 3$  ドメイン以降のペプチド断片は検出されなかったこと、および分子量は約 24,000 であったことから、sMICA は MICA 分子の  $\alpha 3$  ドメインの中央付近で切断されている可能性が考えられた (Table 5, Fig. 10)。

## 6. MICAを切断する蛋白分解酵素について

$\alpha$ 3ドメインの中央領域で切断能を有する蛋白分解酵素について検討すると、210番目のアスパラギン(N) と211番目のバリン(V) を切断するMMP-3、215番目のグルタミン酸(E) と216番目のアラニン(A) を切断するMMP-8、あるいは243番目のグリシン(G) と244番目のバリン(V) を切断するMMP-2/9の3種類のMMPが候補として考えられた。また、それぞれ産生されるsMICAは20.6kDa、21.1kDa、24.2kDaであることが予測された (Table 6, Fig. 11 )。

## 7. MICA 蛋白および sMICA の発現に及ぼす TGF- $\beta_{1/2}$ の影響

MICA蛋白およびsMICAの発現に及ぼすTGF- $\beta_{1/2}$ の影響を、Western Blot法およびELISA法により検討した結果、TGF- $\beta_1$ 、TGF- $\beta_2$ のいずれも、sMICAの産生を濃度依存的に促進することが明らかとなった (Fig. 12A, B)。一方、細胞抽出液中のMICA蛋白の発現は、TGF- $\beta_1$ 処理ではほとんど影響を受けなかったが、TGF- $\beta_2$ 処理により濃度依存的に低下することが分かった (Fig. 12C)。

さらに、TGF- $\beta_{1/2}$ 処理により、MICA mRNA発現には変化を認めなかったが、MMP-2,-3,-8,-9 mRNA発現は亢進した (Fig. 13)。またWestern Blot法にてMMPの発現を検討したところ、培養上清中ではMMP-3,-8,-9の発現は亢進し (Fig. 14)、細胞抽出液中では、MMP-2,-3,-8の発現上昇を認めた (Fig. 15)。



## 8. MICAおよびsMICAの発現に及ぼす内在性TGF- $\beta_{1/2}$ の発現抑制の影響

KO細胞にTGF- $\beta_{1/2}$ siRNAを導入することによりMICA mRNA発現は影響を受けなかったが、MMP-2,-3,-8,-9 mRNA発現は低下した (Fig. 16)。さらに、MICA mRNAの発現は変化していないにも関わらず、細胞表面MICA蛋白の発現は対照群を1とすると、TGF- $\beta_1$ siRNA導入KO細胞、およびTGF- $\beta_2$ siRNA導入KO細胞はいずれも約4倍まで亢進し (Fig. 17A)、培養上清中へのsMICAの産生はTGF- $\beta_1$ siRNA導入KO細胞では57%抑制され、TGF- $\beta_2$ siRNA導入KO細胞では93%抑制された (Fig. 17B)。

## 9. MICA蛋白およびsMICAの発現に及ぼすMMP阻害剤の影響

MMP-3,-8,-2/9阻害剤処理により、細胞培養上清中へのsMICAの産生は対照群を1として、いずれも最高濃度添加処理群において約80~90%抑制された。また、MMP阻害剤処理により、sMICAの産生は濃度依存的に抑制された (Fig. 18A, C, E)。一方、細胞表面MICA蛋白の発現は、各MMP阻害剤の濃度依存的に促進され、最大濃度で約2倍の促進を認めた (Fig. 18B, D, F)。

## 第4章 考察

MICA は、ヒト細胞の細胞膜上に発現する糖蛋白であり、これまでに口腔扁平上皮癌 (OSCC)、大腸癌、肺癌、腎臓癌、前立腺癌 (Wu, et al., 2004) や乳癌など幅広い上皮系腫瘍細胞や、悪性黒色腫および神経膠芽腫 (Eisele, et al., 2006) などの間葉系腫瘍細胞での発現が報告されている。

MICA は、一部の正常細胞を除いて、ほとんどの正常細胞では発現しておらず、細胞がウイルス感染や悪性形質転換などストレスを受けた結果、発現すると考えられている (Bahram, et al., 1994; Groh, et al., 1996; Groh, et al., 1998; Li, et al., 2001)。MICA の発現機序はいまだ不明の点が多いが、MICA 遺伝子は第 6 染色体短腕 21.3 領域に位置し (Bahram, et al., 1996a, b)、Heat Shock Protein 70 (以下 HSP70 と略す) 遺伝子の近傍に存在していることや、MICA のプロモーター領域の遺伝子配列は HSP70 のプロモーター領域の遺伝子配列との相同性が高く、HSP70 遺伝子と同様に MICA 遺伝子にも heat shock elements が存在すると考えられている (Wu, et al., 2004)。

MICA は NK 細胞や  $\gamma\delta$  T 細胞、CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T 細胞の活性化受容体 NKG2D のリガンドである (Bauer, et al., 1999; Groh, et al., 1999; Wu, et al., 1999; Lanier, et al., 2003)。MICA は、細胞内領域、膜貫通領域、細胞外領域から構成されており、細胞外領域は  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  および  $\alpha 3$  ドメイン構造を有している。MICA の  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  領域がそれぞれ NKG2D-A および NKG2D-B に結合し、NKG2D を介した活性化機構が成立していると推察されている (Borrego, et al., 2001; Li, et al., 2001; Li, et al., 2002)。MICA 分子を NKG2D-A、NKG2D-B ホモダ

イマーの NKG2D が認識すると、NKG2D は C 型レクチン様受容体ファミリーであるアダプター分子、DAP10 と複合体を形成し phosphatidylinositol 3 (PI3) キナーゼの p85、p110 サブユニットを活性化し、標的細胞障害が行われる (Wu, et al., 1999; Cerwenka, et al., 2003; Raulet, et al., 2003)。つまり NK 細胞は、標的細胞に結合し活性化されると、NK 細胞の顆粒膜は細胞質膜と結合し、エンドサイトーシスによってパーフォリンやグランザイムなどの細胞内顆粒を細胞外に放出する。放出されたパーフォリンは、標的細胞の細胞膜結合面に直径約 160Å の裂孔を形成し、その穴からグランザイム (セリンプロテアーゼ) が標的細胞に進入、アポトーシスを誘導し、核を断片化して標的細胞を傷害する (Joseph, et al., 2004)。こういった NK 細胞、 $\gamma \delta$  T 細胞や CD8<sup>+</sup>  $\alpha \beta$  T 細胞による自然免疫は、腫瘍細胞に対する生体の免疫監視機構の一つとして大変重要である。したがって、MICA を腫瘍細胞が細胞表面に発現することは、NK 細胞や  $\gamma \delta$  T 細胞、CD8<sup>+</sup>  $\alpha \beta$  T 細胞の活性化受容体である NKG2D を介した免疫監視機構の成立に、非常に重要な役割を果たし、免疫細胞による癌細胞の排除に有利に働くことが考えられる。

一方、癌細胞が細胞表面に MICA を発現しているにも関わらず、NK 細胞などの MICA-NKG2D を介した免疫監視機構から逃れ、排除されないのは、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、その一つとして sMICA が報告されている (Groh, et al., 2002; Salih, et al., 2003; Holdenrieder, et al., 2006a, b)。sMICA は、担癌患者の血清中から同定されており、sMICA が NKG2D に結合することによって、NKG2D を被覆 (マスク) し、MICA-NKG2D 活性化シグナルの伝達を阻害することや、sMICA 自身が NKG2D の発現を負に

制御していると推察されている。

MICA 蛋白の発現は、種々の上皮系腫瘍細胞で認められている。Wu ら (Wu, et al., 2004) は、正常な前立腺組織では MICA 蛋白の発現を認めないものの、前立腺癌では Gleason scores (以下 GS と略す) が 6~10 の 165 症例のうち、95%の症例において MICA 蛋白の発現を認め、GS 6~7 では細胞膜上の MICA 蛋白発現は 93.9%であったが GS 8~10 では 22.7%と、担癌個体の重症化に伴い細胞膜上の MICA 蛋白発現は有意に低下することを報告している。また、彼らは上皮内異形成症例では、MICA の発現は上皮細胞表面に限局されているが、GS 6~7 では MICA の免疫反応性は細胞表面のみに制限されず、浸潤様を示す腺組織に広く認められ、さらに、GS 8~10 では大半の腫瘍細胞表面は MICA の免疫反応性を喪失し、間質に瀰漫性に MICA の局在を認めたことを報告している。また、担癌個体が重症化すると、細胞表面での MICA 蛋白の発現が消失するだけでなく、それに伴って血清 sMICA 濃度が有意に上昇することも明らかにしている。また、Eisele ら (Eisele, et al., 2006) は、正常な大脳白質においては MICA 蛋白の発現は認めないものの、WHO grade II-IVの星細胞腫では MICA 蛋白の発現を認め、gradeIVにおける MICA 発現は grade II のそれと比較し有意に低値を示し、grade の上昇とともに MICA 蛋白の発現は減弱していくことを報告している。本研究においても、初診時の OSCC 組織における MICA 蛋白の発現は、細胞膜、細胞核、細胞質と発現局在が様々であったり、その発現強度に差はあったが、30 症例全例において MICA 蛋白の発現を認めたものの、ステージの進行に伴い癌細胞の細胞膜上での MICA 蛋白の発現は減少していた。また、ステージ進行症例では間質組織に瀰漫性に MICA 蛋白の免疫反応

性を認めた。この間質組織に局在する MICA 蛋白の由来について考えてみると、腫瘍組織に近接する間質組織の細胞がストレス状態に陥り、間質組織の細胞が産生した MICA、あるいは腫瘍細胞が産生した sMICA、の2つの可能性が考えられた。MICA 蛋白はストレス状態にある細胞において発現が誘導される糖蛋白であるが、これまでに間質組織の細胞における MICA 蛋白のに関する報告はない。Wu ら (Wu, et al., 2004) は、癌細胞表面上での MICA 蛋白の発現は初期癌のみに認めるのに対して、血清 sMICA は癌の進行に伴って上昇し負の相関性を示すことを報告していることから、細胞表面上の MICA 蛋白発現の喪失は MICA が切断され sMICA が産生された可能性を示唆している。本研究においても、細胞表面上の MICA 蛋白発現は癌の進展に伴い減少したが、間質組織での MICA 蛋白の免疫反応性は進行した癌のみに認め、血清 sMICA 濃度も癌の進展に伴い有意に上昇した。したがって、間質組織で認めた MICA の発現局在は腫瘍細胞が産生した MICA が、細胞表面で切断され sMICA となって周囲の間質組織に到達した結果、瀰漫性に免疫反応性を示した可能性が強く考えられた。

また、同一切片中においても MICA 蛋白の発現様式は腫瘍表面と腫瘍深部では異なっており、基底膜を破壊し、浸潤をしている癌細胞では、細胞表面での MICA 蛋白の発現は低下あるいは消失していた。間質組織には NK 細胞などの免疫細胞が存在し、外界からの異物やウィルス、形質転換した異常細胞を排除する (Owen, et al., 1980; Cerwenka, et al., 2001; Raulet, et al., 2003)。癌細胞は基底膜を破壊して間質に移動・浸潤して初めて免疫細胞にさらされ、免疫細胞からの攻撃を受けることになる。したがって、癌細胞が浸潤していく際には、このような免疫監視機構から逃れる必要がある。MICA 蛋白を細胞表

面に提示している癌細胞は、免疫細胞に認識され攻撃を受けやすいと考えられる。したがって、癌浸潤部位で癌細胞が細胞表面の MICA 蛋白を欠失しているのは、免疫監視機構から逃れ、浸潤をしていくために非常に有利に働く。このように今回の結果から、癌細胞は自ら MICA 蛋白を切断し、浸潤に有利な性質を獲得しているのではないかと考えられた。またさらに、同部では、MMP2 および MMP9 を高発現していた。MMP2、MMP9 はIV型コラーゲン分解能を持つゼラチナーゼであり、基底膜の破壊には MMP2、MMP9 が関与していることがすでに報告されている (Liotta, et al., 1980; Brown, et al., 1993; Gokaslan, et al., 1998; Yoshizaki, et al., 2001; Sugita, et al., 2002; Kato, et al., 2005; Kosunen, et al., 2006)。本研究においても、MMP2、MMP9 は浸潤部位に高発現していたことからそれが強く裏付けられた。さらに、同部での細胞表面 MICA 発現は著しく低下していたことより、癌細胞は MMPs により細胞間橋や基底膜を破壊し浸潤・転移能を獲得するのみならず、免疫監視機構への旗印となる MICA 蛋白を切断し、免疫回避能までも獲得していると推察できた。

さらに、30 症例中 6 例では腫瘍血管内皮および平滑筋細胞に MICA 発現を認め、全例において TUNEL 染色にて、血管内皮は陽性を示した。6 例の内訳はステージ I 1 例、ステージ II 2 例、ステージ IV 3 例とばらついており、腫瘍血管内皮および平滑筋細胞における MICA 発現と病態の進行との関連性はあまり認めなかったが、血管内皮および平滑筋細胞での MICA 発現陽性症例の血清 sMICA 濃度は  $0.45 \pm 0.15$  ng/ml であり、陰性症例の  $3.32 \pm 0.36$  ng/ml と比較して有意に低値を示していた ( $p < 0.01$ )。MICA 発現陽性症例の血清 sMICA 濃度が有意に低かった理由として、MICA 蛋白を発現している血管内皮細胞は NK 細胞などの免疫細胞によって認識され、アポトーシスを起こした結果、腫

瘍組織における血管新生が阻害され、tumor dormancy に近い状態となり、結果的に血清 sMICA 濃度が上昇しなかったと推察される。

本研究において、OSCC の初診時のステージ分類と血清 sMICA を検討した結果、癌の進展に伴い血清 sMICA 濃度の上昇が認められ、特に再発、転移例では高値を示した。さらに、各治療過程で血清 sMICA 濃度を測定したところ、腫瘍切除、あるいは化学療法や放射線療法などにより腫瘍を制御すると、血清 sMICA 濃度は著しく低下したが、再発、転移などに伴い高値を示した。つまり、腫瘍組織の量や、腫瘍の悪性度と血清 sMICA 濃度は正の相関性を示した。以上のことから、血清 sMICA 濃度は臨床病態と深く関連している可能性が考えられ、sMICA 分子は OSCC の新たな分子標的抗原として有用であることが強く示唆された。

sMICA の産生機構の詳細はいまだ明らかとされていないが、Salih ら (Salih, et al., 2002; Salih, et al., 2006) および Wu ら (Wu, et al., 2004) によると、細胞表面の MICA が特定の MMP などによって切断され、sMICA が産生されると推察されている。そこで sMICA の産生機構を解明するために、OSCC 細胞株を用いて MICA 蛋白の発現および sMICA の培養上清中への産生能について解析した。蛍光免疫染色法にて MICA 蛋白の局在を検討したところ、全ての OSCC 細胞株に MICA 蛋白の発現を認めた。また、Northern Blot 法および Western Blot 法を用いて MICA mRNA および MICA 蛋白の発現を検討したところ、いずれの OSCC 細胞株も MICA mRNA を同程度発現していたが、Western Blot 法の結果より、他の細胞株と比べて KO 細胞では MICA 蛋白の発現は非常に低いことが明らかとなった。一方、ELISA 法を用いて培養上清中の sMICA 濃度を検討した結果、sMICA の産生能は KO 細胞において最も高いことが明らかとなっ

た。この結果より、KO 細胞では MICA 蛋白は発現されているものの、蛋白分解酵素などによって切断された結果、細胞膜上の MICA 蛋白の発現は低下し、培地中への sMICA の遊離が亢進していることが考えられた。

A5.1ホモ接合型であるHeLa細胞におけるMICA分子は62kDaであることが報告されている (Zou, et al., 2002)。また、上皮細胞A431におけるMICAも62kDaであると報告されている (Zwirner, et al., 1998)が、これら細胞株はいずれもMICA\*008のA5.1ホモ接合型であった。その後、62-67kDaと異なるMICAが報告された (Groh, et al., 1996; Zou, et al., 2005)が、この差はMICA遺伝子多型の違いを反映していると考えられる。しかしながら、sMICAの詳細な構造は分かっておらず、これまでに細胞由来のsMICAの分子量を同定した報告はない。そこで、sMICAの分子量およびMICAの切断部位を同定することを目指して、sMICA産生能の最も高いKO細胞の培養上清からsMICAの精製を行った。Western Blot法にてsMICAは、約48 k Daのbroadなシグナルを示した (未発表データ)。その理由として、MICA蛋白には $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ の細胞外領域にN-グリコシドーションサイトが8カ所存在しており (Bahram, et al., 1994; Bahram, et al., 1996)、培地中のsMICAは糖鎖が結合している可能性が考えられた。そこで、sMICAを脱糖鎖処理しWestern Blot法にて検討すると、未処理のsMICAは48kDaであったが、脱糖鎖処理後のsMICAは24kDa付近にシングルバンドとして検出された。したがって、MICA\*008のA5.1ホモ接合型細胞株KO細胞が産生するsMICAの分子量は約24,000であると考えられた。また、KO細胞由来sMICAが、MICA分子が複数の場所で切断された結果、このsMICAが産生されるとすると、複数のバンドとして検出されるはずであるが、本検討結果では24kDaのシングルバンドのみが検出されたことから、MICA分子の切断部位



は1カ所であると考えられた。これまでに33kDaのrecombinant sMICAを用いた研究報告 (Salih, et al., 2002; Salih, et al., 2006) があるが、細胞由来のsMICAの分子量についての報告はない。KO細胞由来sMICAをMALDI/TOF-MS解析した結果、検出された5個のペプチドフラグメントがMICAのアミノ酸配列と一致した。また、一致したペプチドフラグメントは細胞外領域の $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ を含んでいたが、 $\alpha 3$ 領域のペプチドフラグメントは検出されなかった。脱糖鎖処理および質量解析の結果、sMICAはMICA分子の $\alpha 3$ ドメインの中央付近で切断されている可能性が考えられた。そこで、同領域でMICA切断能を有する蛋白分解酵素について検討すると、210番目のアスパラギン (N) と211番目のバリン (V) 間を切断するMMP-3と、215番目のグルタミン酸 (E) と216番目のアラニン (A) 間を切断するMMP-8、および、243番目のグリシン (G) と244番目のバリン (V) 間を切断するMMP-2/9の3つのMMPsが候補として考えられた。また、それぞれ産生されるsMICAの分子量は20,600、21,100、24,200と予測され、MMP-2/9が最も関与している可能性が考えられた。

細胞性免疫抑制性に作用し、NKG2Dの発現を抑制する、腫瘍細胞由来の細胞増殖因子として、TGF- $\beta$ が報告されている (Friese, et al., 2004; Lee, et al., 2004; Saunier, et al., 2006; Eisele, et al., 2006)。TGF- $\beta$ は細胞外マトリックス蛋白の産生と分解や、接着分子の調節などを介して、生理的な細胞の再生や創傷治癒、炎症・免疫反応などを調節することが明らかになっている (Caestecker, et al., 2000; Massague, et al., 2000; Caestecker, et al., 2000; Shi, et al., 2003; Siegel, et al., 2003; Bieri, et al., 2006)。また、TGF- $\beta$ シグナルの異常は癌の発生・進展に関与することや、種々の癌細胞はTGF- $\beta$ をautocrine growth factorとし過剰発現していることも明らかにされており

(Rahden, et al., 2006)、TGF- $\beta$ シグナルの発現やその制御は、癌研究および癌治療に非常に重要である。そこで、MICA蛋白およびsMICAの発現にTGF- $\beta_{1/2}$ はどのような影響を及ぼしているのか、KO細胞を用いて検討した。

Western Blot法による細胞培養上清中のsMICAの発現および、ELISA法によるsMICAの定量結果より、TGF- $\beta_1$ およびTGF- $\beta_2$ のいずれも、sMICAの産生を濃度依存的に促進することが明らかとなった。一方、細胞抽出液中のMICA蛋白の発現は、TGF- $\beta_1$ 処理ではほとんど影響を受けなかったが、TGF- $\beta_2$ 処理により濃度依存的に低下した。したがって、TGF- $\beta_{1/2}$ はMICA蛋白およびsMICAの発現に影響を与えていることが判明した。Friezeら (Frieze, et al., 2004)および Eiseleら (Eisele, et al., 2006) は、TGF- $\beta_{1/2}$ はmRNAレベルでMICA発現を抑制していることから、NK細胞など免疫細胞の活性化受容体であるNKG2Dの発現を抑制するのみならず、そのリガンドであるMICAの発現までも抑制することにより、MICA-NKG2Dを介した免疫機構を制御すると報告している。しかしながら本研究においては、TGF- $\beta_{1/2}$ はMICA mRNA発現に影響は示さず、MMP-2,-3,-8,-9 mRNA発現および培養上清や細胞抽出液中でのMMP-2,-3,-8,-9の発現を亢進させていた。このことから、TGF- $\beta_{1/2}$ シグナルによりMMPの発現が亢進され、MICA分子を切断した結果、sMICAの産生が亢進した可能性が考えられた。

一方、内在性TGF- $\beta_{1/2}$ 発現抑制の、MICAおよびsMICA発現に及ぼす影響をTGF- $\beta_{1/2}$  siRNA導入KO細胞を作製して検討したところ、TGF- $\beta_{1/2}$  siRNA導入によりMICA mRNA発現は影響を受けなかったが、MMP-2,-3,-8,-9 mRNAの発現は低下した。また、MICA mRNAの発現は変化していないにも関わらず、細胞表面MICA蛋白の発現は亢進し、培養上清中へのsMICAの産生は著しく抑制さ

れた。したがって、sMICAは、内在性のTGF- $\beta_{1/2}$ シグナルを介したMMPの活性化によりMICA蛋白から切断され、産生されている可能性が考えられた。

Salih ら (Salih, et al., 2002; Salih, et al., 2006) および Eisele ら (Eisele, et al., 2006) は、MMPs 阻害剤、GM6001 によって sMICA の産生は濃度依存的に抑制されることを報告している。しかし、各 MMP の特異的阻害剤の及ぼす影響に関する報告はない。そこで、MICA 蛋白および sMICA の発現に及ぼす各特異的 MMP 阻害剤の影響を明らかにするために、KO 細胞由来 MICA 分子を切断する MMPs の候補として考えられた MMP-3,-8,-2/9 に対する特異的阻害剤を用いて検討した結果、MMP 阻害剤は、細胞培養上清中への sMICA の産生を濃度依存的に抑制した。また、細胞表面 MICA 蛋白の発現は濃度依存的に亢進していた。これらの結果は、MICA 蛋白は MMPs により切断されている可能性をさらに強く裏付けている。

腫瘍細胞が自ら産生する TGF- $\beta$  は、癌細胞表面上の TGF- $\beta$  I 受容体および TGF- $\beta$  II 受容体のヘテロダイマーと結合する。TGF- $\beta$  受容体シグナルは Smad や MAP キナーゼを介したシグナル伝達系によって核に移行し、MMPs の発現や活性を上昇させた結果、sMICA の産生を促進すると考えられた。

また、TGF- $\beta$  同様に腫瘍細胞からは MMPs が過剰に産生されており、基底膜や細胞間橋が MMPs によって破壊されることによって腫瘍細胞は運動能を獲得し、浸潤・転移をする (Brown, et al., 1993; Gokaslan, et al., 1998; Yoshizaki, et al., 2001; Sugita, et al., 2002; Kato, et al., 2005; Kosunen, et al., 2006)。現在、癌の浸潤・転移を制御することを目指した、MMP 阻害剤の臨床応用が注目され、臨床治験段階に入っている (Nemunaitis, et al., 1998; Rosemurgy, et al., 1999; Bramhall, et al., 2001; Maekawa, et al., 2002)。

本研究の結果より、腫瘍細胞から産生された MMPs は、癌細胞が基底膜を破壊して浸潤するのを促進するのみならず、腫瘍細胞表面に発現している MICA 蛋白を切断することにより、sMICA の産生にも関与していると考えられた。産生された sMICA は、NK 細胞や T 細胞などの NKG2D 活性化受容体をマスクし、その結果、癌細胞は NK 細胞などの免疫監視機構から逃れ、さらに浸潤・転移を進めることが出来ると考えられた。したがって、腫瘍組織局所での TGF- $\beta$  シグナルの遮断は、MMPs による癌の浸潤・転移を抑制するのみならず、MMPs による sMICA の産生を抑制することにより、NKG2D を介した免疫監視機構の働きを亢進すると考えられた。

sMICA は担癌生体の全身免疫回避に重要な働きをしているのみならず、腫瘍局所、特に浸潤部位において NK 細胞などの機能を抑制することで、浸潤・転移の獲得にも重要な役割を果たしていると考えられた。また、癌細胞における MICA 発現や担癌生体における血清 sMICA 濃度は臨床病態と非常によく相関していたことから、MICA は口腔癌の新たな分子標的として有用であると考えられた。今後、これらを新たなターゲットとして OSCC の治療や予後の判定に利用できることが期待される。

## 第 5 章 総括

本研究では、sMICA 産生機構の解明および MICA 分子と口腔扁平上皮癌 (OSCC) 患者の臨床病態との関連性を明らかにすることを旨とし、OSCC 患者および OSCC 細胞株における MICA 蛋白、sMICA の発現検討と、MICA 発現および sMICA 産生に及ぼす TGF- $\beta$  および MMP の影響についての検討を行った。

その結果以下のことが明らかとなった。

1. 免疫組織化学的検討の結果、OSCC 組織全例において MICA 蛋白の発現を認めた。
2. 浸潤部位では、MICA 蛋白の細胞表面での発現低下・消失と MMP-2,-9 の発現亢進を認めた。
3. 進展例では、癌細胞表面での MICA 蛋白発現は低下し、間質組織での局在を認めた。さらに、血清 sMICA 濃度は、癌の進展、再発や転移に伴い上昇した。
4. 腫瘍血管内皮および平滑筋細胞で MICA 発現を示す症例では血管内皮は TUNEL 陽性を示し、血清 sMICA 濃度は有意に低値を示した。

5. OSCC 細胞株 KO 細胞の培養上清より sMICA を精製し、脱糖鎖処理により、sMICA の分子量は約 24,000 であることが判明した。
6. sMICA は MICA 分子の  $\alpha 3$  ドメインの中央付近で切断されている可能性が考えられた。
7. 無血清培養系にて、TGF- $\beta_{1/2}$  により KO 細胞の細胞表面における MICA 蛋白の発現は低下し、培養上清中への sMICA の産生は促進された。
8. TGF- $\beta_{1/2}$  siRNA 導入 KO 細胞では、細胞表面 MICA 蛋白の発現は亢進し、培養上清中への sMICA の産生は著しく抑制された。
9. TGF- $\beta_{1/2}$  により MMP-2,-3,-8,-9 の発現上昇を認め、MMPs 特異的阻害剤により細胞表面 MICA 蛋白の発現は上昇し、培養上清中への sMICA の産生は抑制された。

以上の結果から、sMICA は担癌生体の全身免疫回避に重要な働きをしているのみならず、腫瘍局所、特に浸潤部位において NK 細胞などの機能を抑制することで、浸潤・転移の獲得にも重要な役割を果たしていると考えられた。また、癌細胞における MICA 発現や担癌生体における血清 sMICA 濃度は臨床病態と非常によく相関していたことから、MICA は口腔癌の新たな分子標的として有用であると考えられた。

## 参考文献

Bahram, S., Bresnahan, M., Geraghty, D. E., and Spies, T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 6259-6263, 1994.

Bahram, S., Mizuki, N., Inoko, H., and Spies, T. Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene, *Immunogenetics.* 44: 80-81, 1996.

Barnes, D. and Sato, G. Serum-free cell culture: a unifying approach, *Cell.* 22: 649- 655, 1980.

Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Spies, T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA, *Science.* 285: 727-729, 1999.

Bierie, B., and Moses, H. L. TGF  $\beta$ : the molecular Jekyll and Hyde of cancer, *Nature.* 6: 506-520, 2006.

Borrego, F., Kabat, J., Kim, D. K., Lieto, L., Maasho, K., Pena, J., Solana, R., and Coligan, J. E. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human nature killer (NK) cells, *Molecular Immunology.* 38: 637-660, 2001.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.* 72: 248-254, 1976.

Bramhall, S. R., Rosemurgy, A., and Brown, P. D. Marimastat as first-line therapy for patients with unresectable pancreatic cancer: Randomized trial, *J Clin Oncol.* 19: 3447-3455, 2001.

Brown, P. D., Bloxidge, R. E., Anderson, E., and Howell, A., Expression of activated gelatinase in human invasive breast carcinoma, *Clin Exp Metastasis*. 11: 183-189, 1993.

Caestecker, M. P., Piek, E., and Roberts, A. B. Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer, *Natl Cancer Inst*. 92: 1388-13402, 2000.

Cerwenka, A. and Lanier, L. L. NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer, *Tissue Antigens*. 61: 335-343, 2003.

Darmon, M., Serrero, G., Rizzino, A., and Sato, G. Isolation of myoblastic, fibro-adipogenic, and fibroblastic clonal cell lines from a common precursor and study of their requirements for growth and differentiation, *Exp Cell Res*. 132: 313-327, 1981.

Dulbecco, R. and Freeman, G. Plaque production by the polyoma virus, *Virology*. 8: 396-397, 1959.

Eisele, G., Wischhusen, J., Mittelbronn, M., Meyermann, R., Waldhauer, I., Steinle, A., Weller, M., and Friese, M. A. TGF- $\beta$  and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells, *Brain*. 129: 2416-2425, 2006.

Friese, M. A., Platten, M., Lutz, S. Z., Naumann, U., Aulwurm, S., Bischof, F., Buhring, H. J., Dichgans, J., Rammensee, H. G., Steinle, A., and Weller, M. MICA/NKG2D- mediated immunogene therapy of experimental gliomas, *Cancer Res*. 63: 8996-9006, 2003.

Friese, M. A., Wischhusen, J., Wick, W., Weiler, M., Eisele, G., Steinle, A., and Weller, M. RNA Interference Targeting Transforming Growth Factor- $\beta$  Enhances NKG2D-Mediated Antiglioma Immune Response, Inhibits Glioma Cell Migration and Invasiveness, and Abrogates Tumorigenicity In vivo, *Cancer Res*. 64: 7596-7603, 2004.

Gambelunghe, G., Falorni, A., Ghaderi, M., Laureti, S., Tortoioli, C., Santeusano, F., Brunetti, P., and Sanjeevi, C. B. Microsatellite polymorphism of the MHC class I chain-related (MIC-A and MIC-B) genes marks the risk for autoimmune Addison's disease, *J Clin Endocrinol Metab*. 84: 3701-3707, 1999.



Gambelunghe, G., Lisa, A. B., Ghaderi, M., Tortoioli, C., and Falorni, A. MICA A8: a New Allele Within MHC Class I Chain-Related A Transmembrane Region With Eight GCT Repeats, *Human Immunology*. 67: 1005-1007, 2006.

Gokaslan, Z. L., Chintala, S. K., and York, J. E. Expression and role of matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 in human spinal column tumors, *Clin Exp Metastasis*. 16: 721-728, 1998.

Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., and Spies, T. Cell stress - regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 12445-12450, 1996.

Groh, V., Steinle, A., Bauer, S., and Spies, T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gamma delta T cells, *Science*. 279: 1737-1740, 1998.

Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K. H., and Spies, T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 6879-6884, 1999.

Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation, *Nature*. 419: 734-738, 2002.

Ham, R. G. An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines, *Exp Cell Res*. 29: 515-526, 1963.

Herberman, R. B., Natural killer cells, *Hosp Pract (Hosp Ed.)* . 4 : 93-103, 1982.

Holdenrieder, S., Stieber, P., Peterfi, A., Nagel, D., Steinle, A. L., and Salih, H. R. Soluble MICA in malignant diseases, *Int J Cancer*. 118: 684-687, 2006a.

Holdenrieder, S., Stieber, P., Peterfi, A., Nagel, D., Steinle, A. L., and Salih, H. R. Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA, *Cancer Immunol Immunother*. 55: 1584-1589, 2006b.

Hughes, E. H., Collins, R. W. M., Kondeatis, E., Wallace, G. R., Graham, E. M., Vaughan, R. W., and Stanford, M. R. Associations of major histocompatibility complex class I chain-related molecule polymorphisms with Behcet's disease in Caucasian patients, *Tissue Antigens*. 65:195-199,2005.

Joseph, N. Blattman, and Philip, D. Greenberg, *Cancer Immunotherapy: A Treatment for the Masses*, Science. 305:200-205, 2004.

Kato, K., Hara, A., Kuno, T., Kitaori, N., Huilan, Z., Mori, H., Toida, M., and Shibata, T. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in oral squamous cell carcinomas: manifestation and localization of their activity, *J Cancer Res Clin Oncol*. 131: 340-346, 2005.

Kawabata, Y., Ikegami, H., Kawaguchi, Y., Fujisawa, T., Hotta, M., Ueda, H., Shintani, M., Nojima, K., Ono, M., Nishino, M., Taniguchi, H., Noso, S., Yamada, K., Babaya, N., and Ogihara, T. Age-related association of MHC class I chain-related gene A (MICA) with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus, *Hum Immunol*. 61: 624-629, 2000.

Kosunen, A., Pirinen, R., Ropponen, K., Pukkila, M., Kellokoski, J., Virtaniemi, J., Sironen, R., Juhola, M., Kumpulainen, E., Johansson, R., Nuutinen, J., and Kosma, V. M. CD44 expression and its relationship with MMP-9, clinicopathological factors and survival in oral squamous cell carcinoma, *Oral Oncology*, PMID: 16798062, 2006.

Lanier, L. L., *NKG2D*, *J Biol Regul Homaost Agents*. 17, 338-340, 2003.

Lee, J. C., Lee, K. M., Kim, D. W., and Heo, D. S. Elevated TGF- $\beta$  1 Secretion and Down-Modulation of NKG2D Underlies Impaired NK Cytotoxicity in Cancer Patients, *The Journal of Immunology*. 15: 7335-7341, 2004.

Li, P., Morris, D. L., Willcox, B. E., Steinle, A., Spies, T., and Strong, R. K. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA, *Nat Immunol*. 2: 443-451, 2001.

Li, P., McDermott, G., and Strong, R. K. Crystal Structures of RAE-1  $\beta$  and Its Complex with Activating Immunoreceptor NKG2D, *Immunity*. 16: 77-86, 2002.

Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C. M., and Shafie, S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, 284: 67-68, 1980.

Maekawa, K., Sato, H., Furukawa, M., and Yoshizaki, T. Inhibition of cervical lymph node metastasis by marimastat (BB-2516) in an orthotopic oral squamous cell carcinoma implantation model, *Clinical & Experimental Metastasis*. 19: 513-518, 2002.

Massague, J., Blain, S. W., and Lo, R. S. TGF-beta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders, *Cell*. 103: 295-309, 2000.

Miyauchi, S., Moroyama, T., Sakamoto, T., Okamoto, T., and Takada, K. Establishment of human tumor cell line (Ueda-1) derived from squamous cell carcinoma of the floor of the mouth, *Jpn. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 31: 1347-1351, 1985.

Miyauchi, S., Moroyama, T., Kyoizumi, S., Asakawa, J., Okamoto, T., and Takada, K. Malignant tumor cell lines produce interleukin-1-like factor, *In Vitro Cell Dev Biol.* 24: 753-758, 1988.

Mizuki, N., Ota, M., Kimura, M., Ohno, S., Ando, H., Katsuyama, Y., Yamazaki, M., Watanabe, K., Goto, K., Nakamura, S., Bahram, S., and Inoko, H. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet disease, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 1298-1303, 1997.

Moore, G. E., Gerner, R. E., and Franklin, H. A. Culture of normal human leukocytes, *Jama*. 199: 519-524, 1967.

Myoken, Y., Okamoto, T., Osaki, T., Yabumoto, M., Sato, G. H., Takada, K., and Sato, J. D. An alternative method for the isolation of NS-1 hybridomas using cholesterol auxotrophy of NS-1 mouse myeloma cells, *In Vitro Cell Dev Biol.* 25: 477-480, 1989.

Nakachi, K., Hayashi, T., Imai, K., and Kusunoki, Y. Perspectives on cancer immunology, *Cancer Sci.* 95: 921-929, 2004.

Nemunaitis, J., Poole, C., and Primrose, J. Combined analysis of studies of the effects of the matrix metalloproteinase inhibitor marimastat on serum tumor markers in advanced cancer: Selection of a biologically active and tolerable dose for longer-term studies, *Clin Cancer Res.* 4: 1101-1109, 1998.

Owen, M. J., Crumpton, M. J., *Biochemistry of major human histocompatibility antigens*, *Immunol. Today* 1 : 117, 1980

Perez-Rodriguez, M., Corello, A., Arguello, J. R., Cox, S. T., McWhinnie, A., Marsh, S. G. E., and Madrigal, J. A. A new MICA allele with ten alanine residues in the exon5 microsatellite, *Tissue Antigens.* 55:162-165,2000.

Rahden, B. H. A., Stein, H. J., Feith, M., Puhlinger, F., Theisen, J., Siewert, J. R., and Sarbia, M. Overexpression of TGF- $\beta$  1 in Esophageal (Barrett' s) Adenocarcinoma is Associated With Advanced Stage of Disease and Poor Prognosis, *Molecular Carcinogenesis.* 45: 786-794, 2006.

Raulet, D. H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands, *Nat Rev Immunol.* 3: 781-790, 2003.

Rosemurgy, A., Harris, J., and Langleben, A. Marimastat in patients with advanced pancreatic cancer: A dose-finding study, *Am J Clin Oncol.* 22: 247-252, 1999.

Rueda, B., Pascual, M., Lopez-Nevot, M. A., Gonzalez, E., and Martin, J. A new allele within the transmembrane with seven GCT repeats, *Tissue Antigens.* 60: 526-528, 2002.

Salih, H. R., Rammensee, H. G., and Steinle, A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding, *J Immunol.* 169: 4098-4102, 2002.

Salih, H. R., Antropius, H., Gieseke, F., Lutz, S. Z., Kanz, L., Rammensee, H. G., and Steinle, A. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia, *Blood.* 102: 1389-1396, 2003.

Salih, H. R., Goehlsdorf, D., and Steinle, A. Release of MICB Molecules by Tumor Cells: Mechanism and Soluble MICB in Sera of Cancer Patients, *Human Immunology*. 67: 188-195, 2006.

Sato, J. D., Kawamoto, T., and Okamoto, T. Cholesterol requirement of P3-X63-Ag8 and X63-Ag8.653 mouse myeloma cells for growth in vitro, *J Exp Med*. 165: 1761-1766, 1987.

Saunier, E. F., and Akhurst, R. J. TGF Beta Inhibition for Cancer Therapy, *Current Cancer Drug Targets*. 6: 565-578, 2006.

Shi, Y., and Massague, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus, *Cell*. 113: 685-700, 2003.

Siegel, P. M., and Massague, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer, *Nat Rev Cancer*. 3: 807-821, 2003.

Sugimura, K. Ota, M., Matsuzawa, J., Katsuyama, Y., Ishizuka, K., Mochizuki, T., Mizuki, N., Seki, S. S., Honma, T., Inoko, H., and Asakura, H. A close relationship of triplet repeat polymorphism in MHC class I chain-related gene A (MICA) to the disease susceptibility and behavior in ulcerative colitis, *Tissue Antigens*. 57: 9-14, 2001.

Sugita, K., Matrix Metalloproteases and Tumor Angiogenesis, *Angiogenesis: molecular mechanisms and clinical application*, The Japanese Association of Medical Sciences. 128: 43-49, 2002.

Wu, D., Kan, M., Sato, G., Okamoto, T., and Sato, J. D. Characterization and molecular cloning of binding protein for heparin-binding growth factors. *J Biol Chem*. 266 : 16778-16785, 1991.

Wu, J., Song, Y., Bakker, A. B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L. L., and Phillips, J. H. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10, *Science*. 285: 730-732, 1999.

Wu, J. D., Higgins, L. M., Steinle, A., Cosman, D., Haugk, K., and Plymate, S. R. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer, *J Clin Invest.* 114: 560-568, 2004.

Yoshizaki, T., Maruyama, Y., and Sato, H. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma, *Int J Cancer (Pred Oncol).* 95: 44-50, 2001.

Zou, Y., Mirbaha, F., Lazaro, Y., Lavingia, B., and Stastny, P. MICA is a target for complement-dependent cytotoxicity with mouse monoclonal antibodies and human alloantibodies, *Hum. Immunol.* 63: 30-39, 2002.

Zou, Y., Bresnahan, W., Taylor, R. T., and Stastny, P. Effect of Human Cytomegalovirus on Expression of MHC Class I -Related Chains A, *J of Immunol.* 174: 3098-3104, 2005.

Zwirner, N. W., and Fernandez-Vina, M. A. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes, *Immunogenetics.* 47: 139-148, 1998.

<i>MICA</i> Phenotype	OSCC (n=165)	Control (n=103)	<i>p</i> -Value
A4	51(31%)	40(39%)	0.23
A5	87(53%)	48(47%)	0.30
A5.1	45(27%)	15(15%)	0.017
A6	63(38%)	54(52%)	0.031
A9	30(18%)	22(21%)	0.72

**Table 1A OSCC患者における*MICA*遺伝子多型**

A5.1型を有するOSCC患者の割合は全患者の27%を示し、Control (103名) の15%に比べて有意に高かった。一方、A6型を有するOSCC患者の割合は38%であり、Controlの52%に比べて有意に低かった。

<i>MICA</i> Genotype	OSCC (n=45)	Control (n=15)
5.1/5.1	8(4.8%)	0
5.1/4	4(2.4%)	4(4%)
5.1/5	14(8.5%)	3(3%)
5.1/6	16(9.7%)	7(7%)
5.1/9	3(1.8%)	1(1%)

**Table 1B A5.1型OSCC患者のgenotype**

A5.1型アレルを有するOSCC患者のgenotype解析では、5.1ホモ接合型個体はOSCC患者のみに認められた。



Name	IgG	Maker	IHC	WB	ELISA
Anti-human MICA Antibody	Goat	R&D	4ng/ $\mu$ l	0.2ng/ $\mu$ l	-
Anti-human MICA Antibody (Capture-antibody)	Mouse	R&D	-	1ng/ $\mu$ l	2ng/ $\mu$ l
Anti-human MICA Antibody (Detection-antibody)	Goat	R&D	-	-	0.4ng/ $\mu$ l
Anti-TGF- $\beta_1$ Antibody	Mouse	R&D	10ng/ $\mu$ l	1ng/ $\mu$ l	-
Anti-TGF- $\beta_2$ Antibody	Mouse	R&D	10ng/ $\mu$ l	1ng/ $\mu$ l	-
Anti-MMP2 Antibody(H-76)	Rabbit	Santa Cruz	4ng/ $\mu$ l	0.2ng/ $\mu$ l	-
Anti-MMP3 Antibody(C-19)	Goat	Santa Cruz	4ng/ $\mu$ l	0.2ng/ $\mu$ l	-
Anti-human MMP8 Antibody	Goat	R&D	4ng/ $\mu$ l	0.1ng/ $\mu$ l	-
Anti-human MMP9 Antibody	Goat	R&D	4ng/ $\mu$ l	0.1ng/ $\mu$ l	-

**Table 2A 一次抗体**

使用用途の略記号は以下の通りである。IHC: Immunohistochemistry , WB: Western Blotting , ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Name	IgG	Maker	IHC	WB
ヒストファンシンプルステインMAX PO(G)	Rabbit	ニチレイ	*	-
ヒストファンシンプルステインMAX PO(M)	Goat	ニチレイ	*	-
ヒストファンシンプルステインMAX PO(R)	Goat	ニチレイ	*	-
HiLyte Fluor™ Labeled anti-goat IgG Antibody	Rabbit	AnaSpec	5ng/ $\mu$ l	-
Anti-goat IgG, HRP-linked antibody	Rabbit	SIGMA	-	1ng/ $\mu$ l
Anti-Rabbit IgG(H&L), HRP-linked antibody	Goat	Cell Signaling	-	1ng/ $\mu$ l
Anti-Mouse IgG(H&L), HRP conjugate antibody	Goat	Bio-Rad	-	1ng/ $\mu$ l

**Table 2B 二次抗体**

ヒストファンシンプルステインMAX POは免疫組織化学染色の2次抗体として、使用説明書に準じて使用した (\*)。また、蛍光免疫組織染色の2次抗体として、HiLyte Fluor™ Labeled anti-goat IgG Antibodyを上記濃度で使用した。HRP標識抗体はWestern Blot法の2次抗体に用いた。

Name	Base Sequenc	Annealing(°C)	Cycle数
MICA(4) : S	5'-TGCCCCCATGGTGAAT-3'	57	24
MICA(4) : AS	5'-AGAGGGCACAGGGTGAGTGC-3'		
MICA(5) : S	5'-CCTTTTTTTTCAGGGAAAGTGC-3'	57	24
MICA(5) : AS	5'-CCTTACCATCTCCAGAAACTGC-3'		
MMP2 : S	5'-CGCAGTGACGGAAAGATGTG-3'	65	29
MMP2 : AS	5'-TGGGACAGACGGAAGTTCTTG-3'		
MMP3 : S	5'-AGCAAGGACCTCGTTTTTCATT-3'	61	37
MMP3 : AS	5'-GTCAATCCCTGGAAAGTCTTCA-3'		
MMP8 : S	5'-CTTACTCCATGTGCAGATTTTC-3'	54	37
MMP8 : AS	5'-CCCGTCACATTCAACCCAAA-3'		
MMP9 : S	5'-TGCCCGGACCAAGGATACAG-3'	59	29
MMP9 : AS	5'-GGCACTGAGGAATGATCTAAG-3'		
GAPDH : S	5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3'	60	29
GAPDH : AS	5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT-3'		

**Table 3 RT-PCRに用いた primer**

RT-PCRに用いたprimerの設計および、それぞれのannealing温度と処理したサイクル数を示す。MICADIG標識cRNA作製にはMICA遺伝子exon4領域に設計したプライマーMICA(4)を用い、半定量RT-PCRにはMICA遺伝子exon5領域に設計したプライマーMICA(5)を用いた。

Name	Base Sequence
TGF- $\beta_1$ S	Batch No.208546
TGF- $\beta_1$ AS	Batch No.208547
TGF- $\beta_2$ S	5'-GCGCUACAUCGACAGCAAAA-3'
TGF- $\beta_2$ AS	5'-UUUGCUGUCGAUGUAGCGC-3'

**Table 4 TGF- $\beta_{1/2}$  small interfering RNA**

内在性TGF- $\beta_{1/2}$ を抑制するためにTGF- $\beta_{1/2}$  siRNAをKO細胞に導入した。

Observed	Start-End Residues	Sequence
1694.216	66~80	AKPQGQWAEDVLGNK
825.318	88~94	DLTGNGK
2270.787	98~117	MTLAHIKDQKEGLHSLQEIR
1046.692	158~166	AQTLAMNVR
2074.646	178~196	THYHAMHADCLQELRRYLK

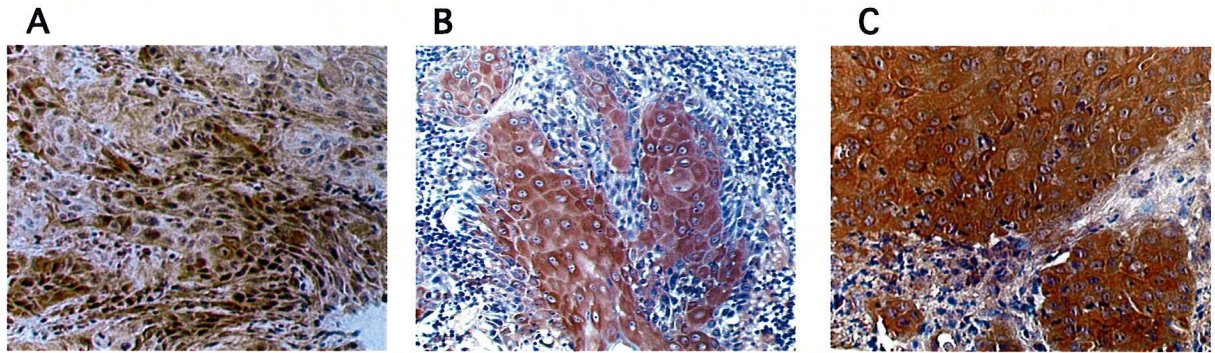
**Table 5 MALDI/TOF-MSにより検出されたペプチド断片のアミノ酸配列**

MALDI/TOF-MSにより検出された5つのペプチド断片がMICA分子と一致した。Fig.10に示した赤矢印のペプチド断片のアミノ酸配列は、MICA分子の $\alpha$ 1および $\alpha$ 2領域と一致した。また、 $\alpha$ 3ドメイン以降のペプチド断片は検出されなかった。

MMPs	Cleavage Site	Predicted Size of sMICA(kDa)
MMP3	N210-V211	20.6
MMP8	E215-A216	21.1
MMP2/9	G243-V244	24.2

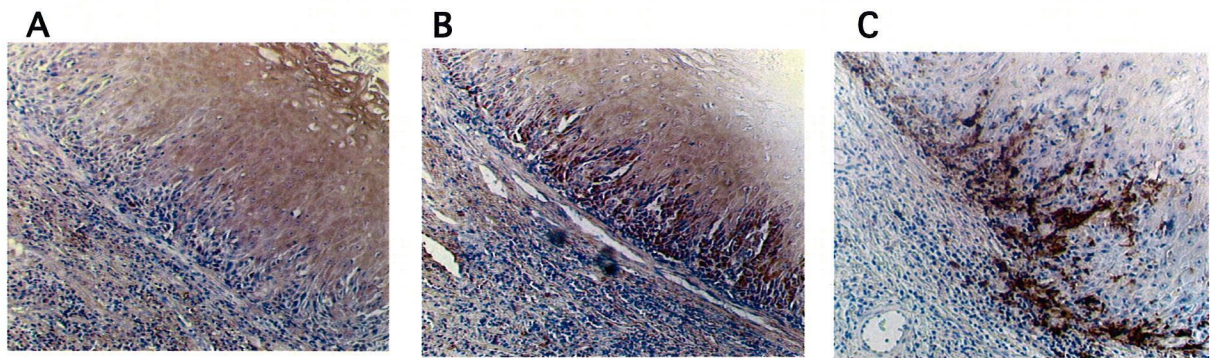
**Table 6  $\alpha$ 3ドメイン中央付近でMICA切断能を有する蛋白分解酵素**

MICAの $\alpha$ 3ドメインの中央付近で切断能を有する蛋白分解酵素として、210番目のアスパラギン(N)と211番目のバリン(V)を切断するMMP3、215番目のグルタミン酸(E)と216番目のアラニン(A)を切断するMMP8、243番目のグリシン(G)と244番目のバリン(V)を切断するMMP2/9が考えられた。



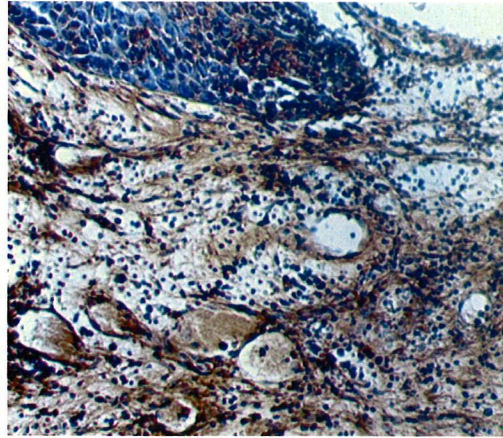
**Fig.1 OSCC組織におけるMICA蛋白の発現**

MICA蛋白は細胞核(A)、細胞質(B)、細胞膜(C)に局在を認め、その発現様式や強度には違いが見られたものの、OSCC全例においてMICA蛋白の発現を認めた。



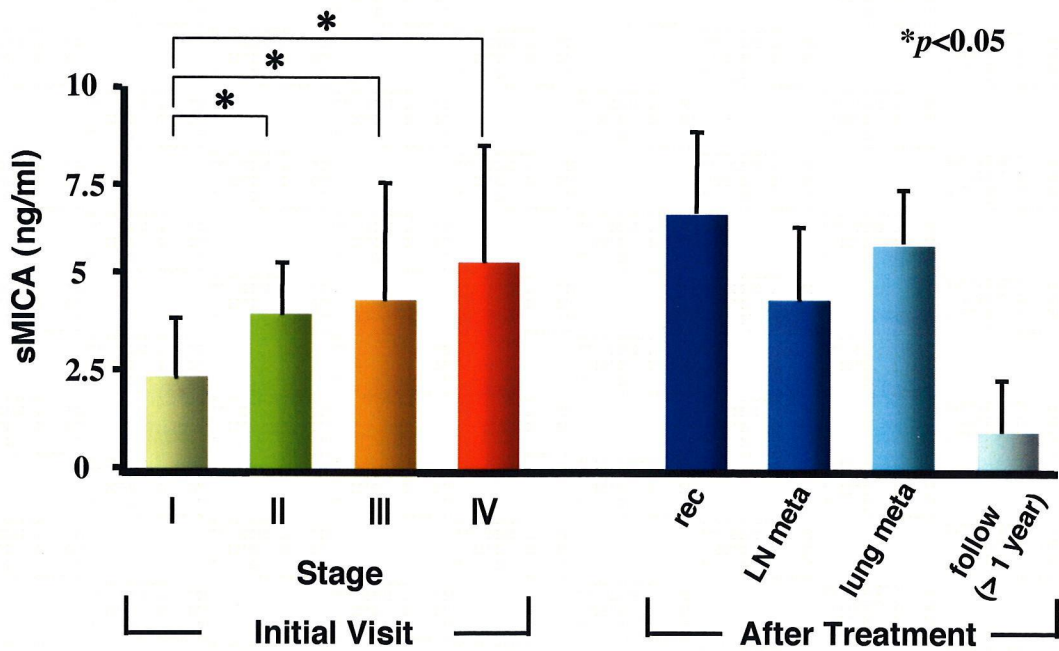
**Fig.2 腫瘍浸潤部におけるMICA蛋白およびMMPsの発現**

浸潤部の癌細胞では、癌細胞表面でのMICA蛋白の発現が低下、消失していた(A)。また同部ではMMP2(B)、およびMMP9(C)を高発現していた。



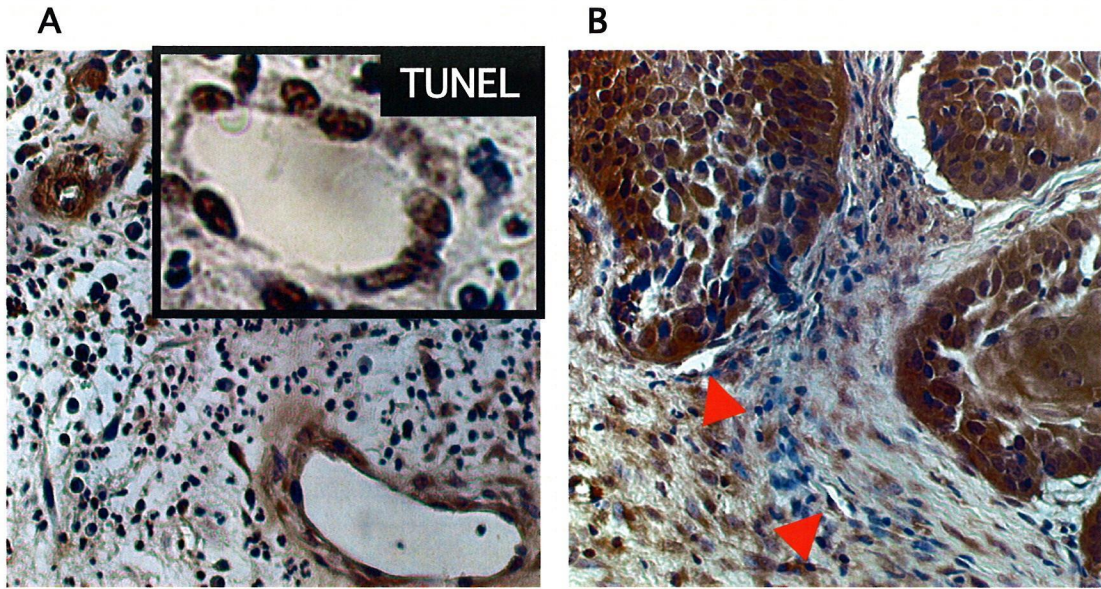
**Fig.3 Stage IV症例におけるMICA蛋白の発現**

Stage IVなどの進展例では、癌細胞表面でのMICA蛋白の発現は低下し、間質組織にMICA蛋白の免疫反応陽性所見を認めた。



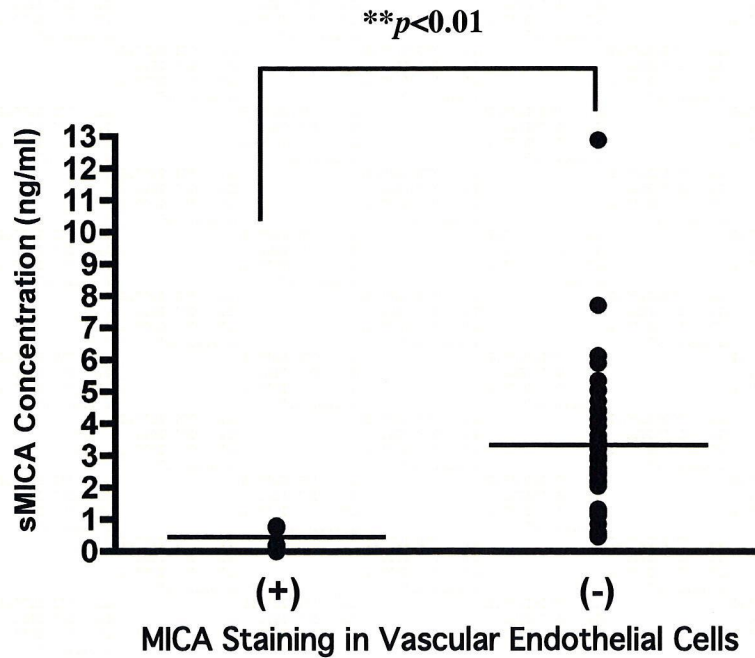
**Fig.4 OSCC患者の臨床病態と血清sMICA濃度**

OSCC患者において、初診時の血清sMICA濃度は、初診時のステージの進行に伴い上昇がみられた。特にステージIと比較し、他のステージでは有意に高値を示した。また、初期治療後の患者においては、再発・リンパ節転移・肺転移症例では血清sMICAは高値を示した。一方、治療後1年以上再発・転移のない症例では血清sMICA濃度は1-1.5ng/mlと低値を示した。



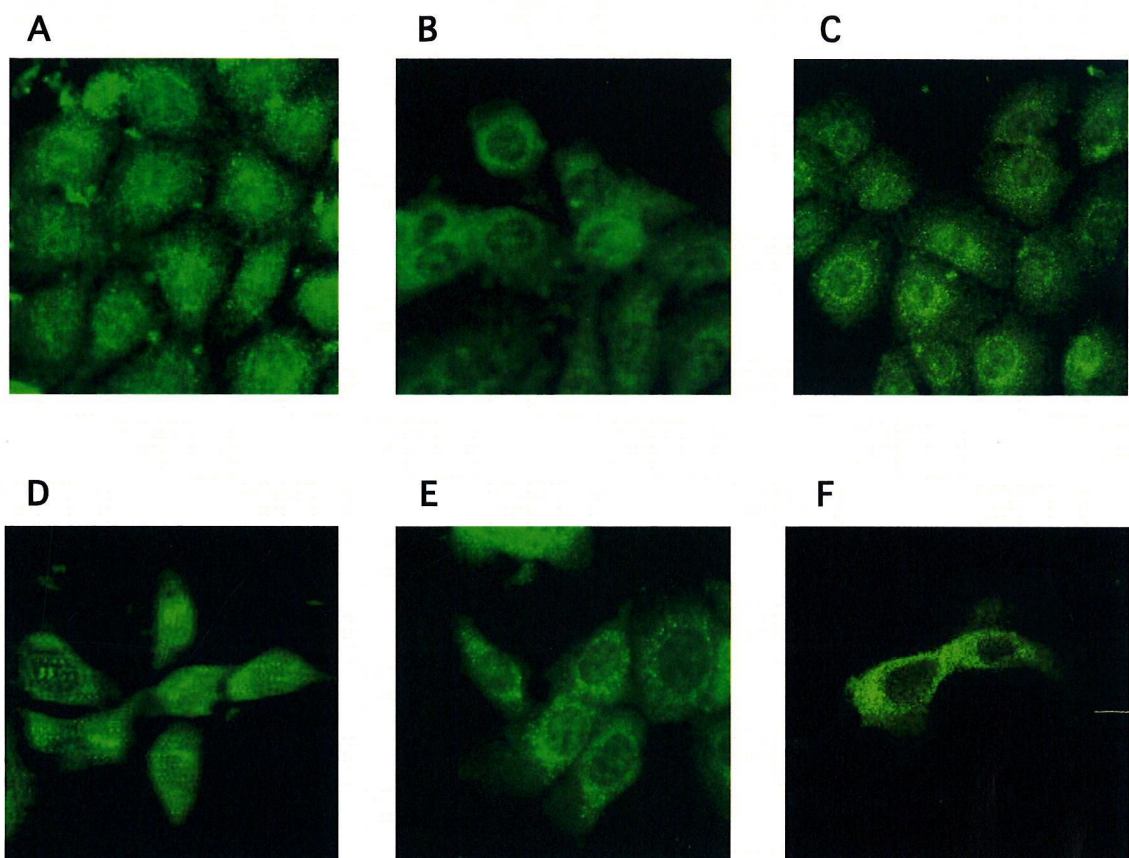
**Fig.5 腫瘍血管内皮および平滑筋細胞におけるMICA蛋白の発現**

30症例中5例において腫瘍血管内皮および平滑筋細胞にMICA蛋白の発現を認め(A)、その全例において血管内皮はTUNEL陽性を示した(A右上)。また30症例中25例は腫瘍血管内皮(B▲)および平滑筋細胞にMICA発現を認めなかった。



**Fig.6 腫瘍血管内皮におけるMICA蛋白の発現と血清sMICA濃度**

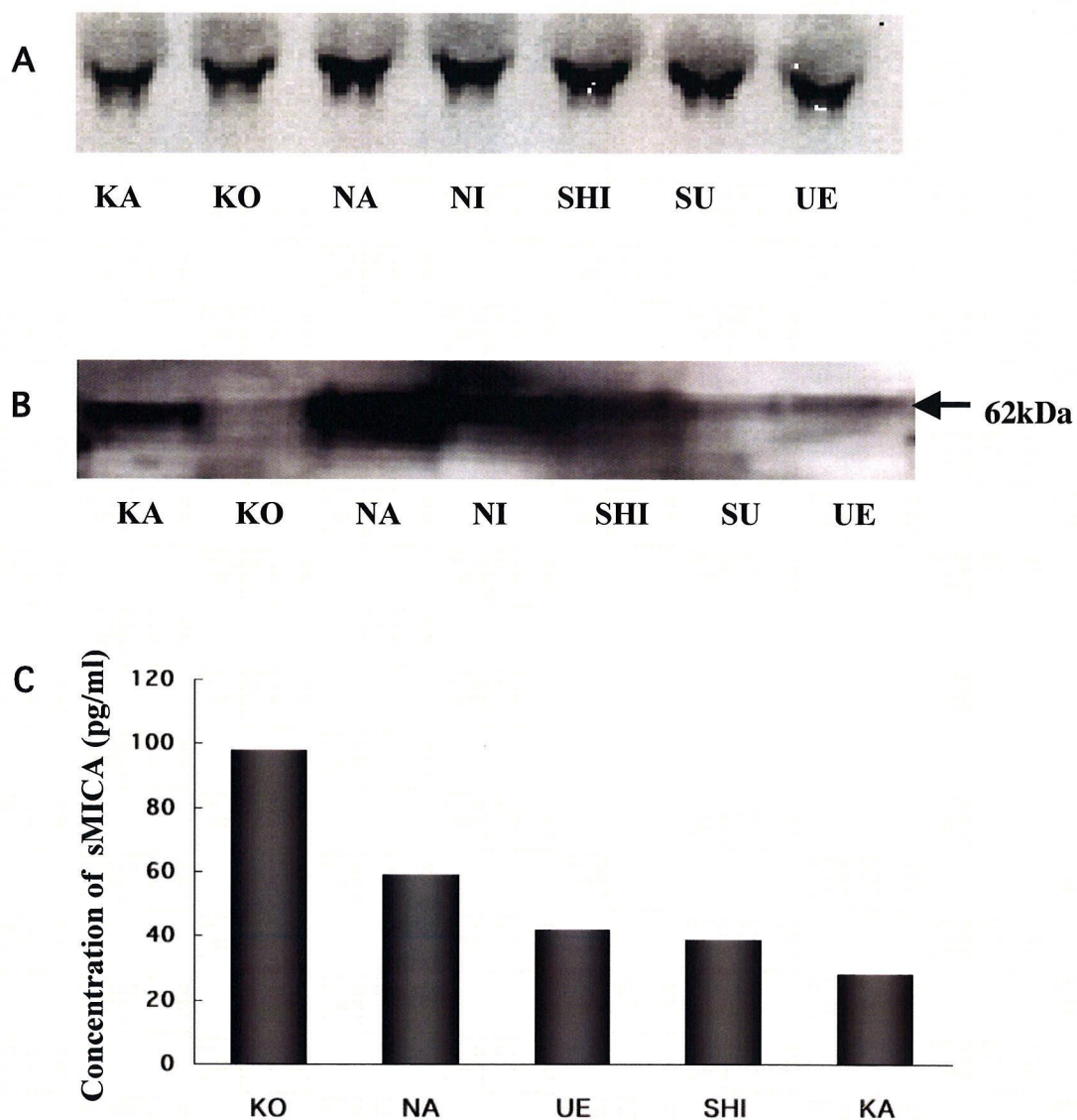
血管内皮および平滑筋細胞でのMICA発現陽性症例における血清sMICA濃度は  $0.45 \pm 0.15$  であり、陰性症例の  $3.32 \pm 0.36$  と比較して有意に低値を示していた ( $p < 0.01$ )。



**Fig.7 OSCC培養細胞株におけるMICA蛋白の発現**

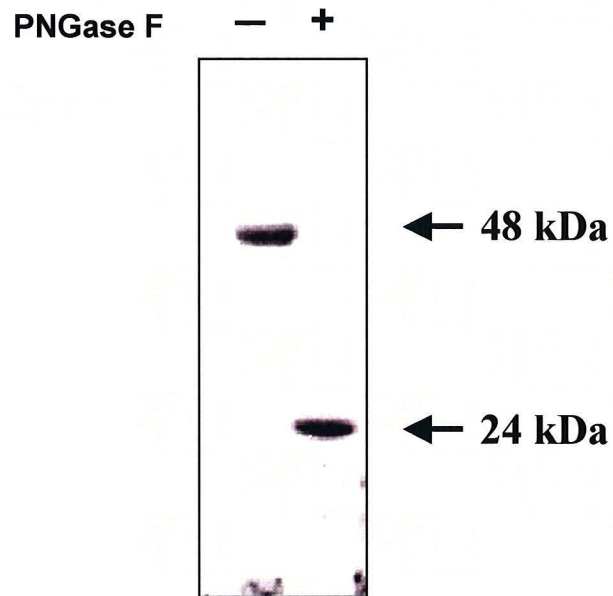
蛍光免疫染色法にてMICA蛋白の局在を検討した。OSCC培養細胞株、KA(A)、KO(B)、NA(C)、NI(D)、SHI(E)、UE(F)全てにおいてMICA蛋白の発現を認めた。





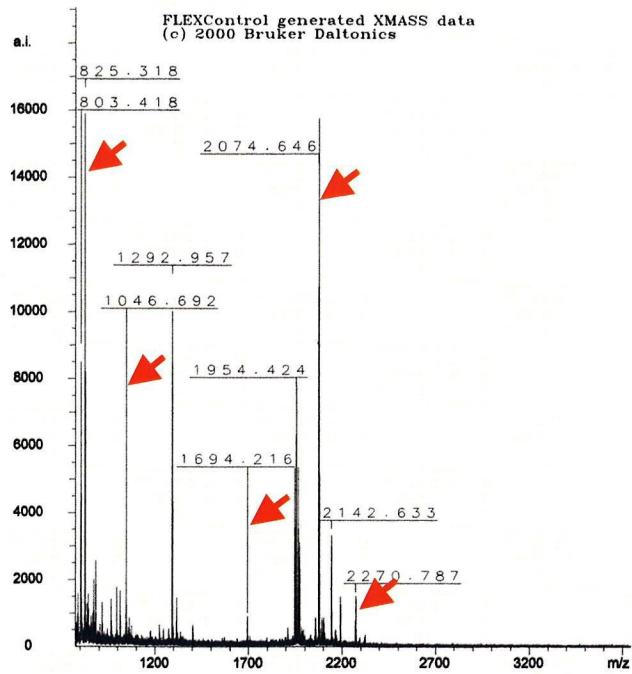
**Fig.8 OSCC培養細胞株におけるMICA mRNAおよびMICA蛋白の発現と、細胞培養上清中のsMICA濃度の検討**

Northern Blot法にてMICA mRNAの発現を検討した結果、いずれのOSCC細胞株もMICA mRNAを同程度発現していた(A)。また、Western Blot法にて細胞抽出液中のMICA蛋白の発現を検討したところ、他の細胞株と比べてKO細胞ではMICA蛋白の発現が非常に低かった(B)。一方、ELISA法にて細胞培養上清中のsMICA濃度を検討した結果、sMICAの産生はKO細胞において最も高かった(C)。



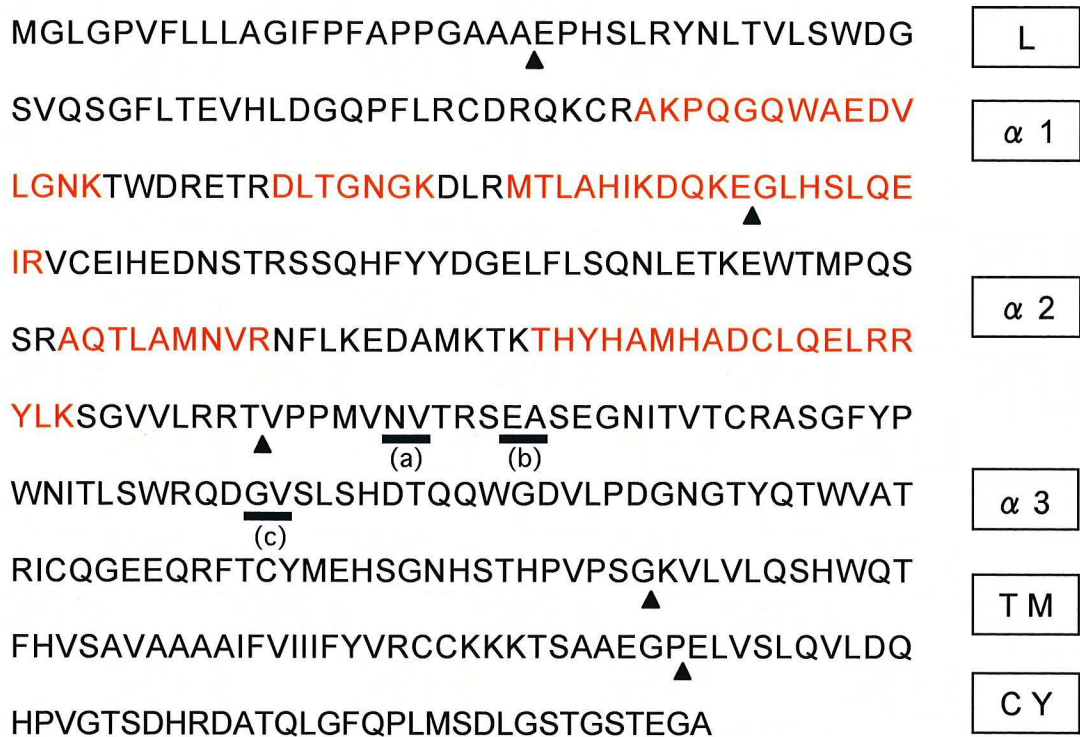
**Fig.9 sMICAの分子量**

Western Blot法にてsMICAの分子量を検討した。未処理のsMICAは48kDaであったが、脱糖鎖処理後のsMICAは約24kDaのシングルバンドとして検出され、sMICAの分子量は約24,000であることが明らかとなった。



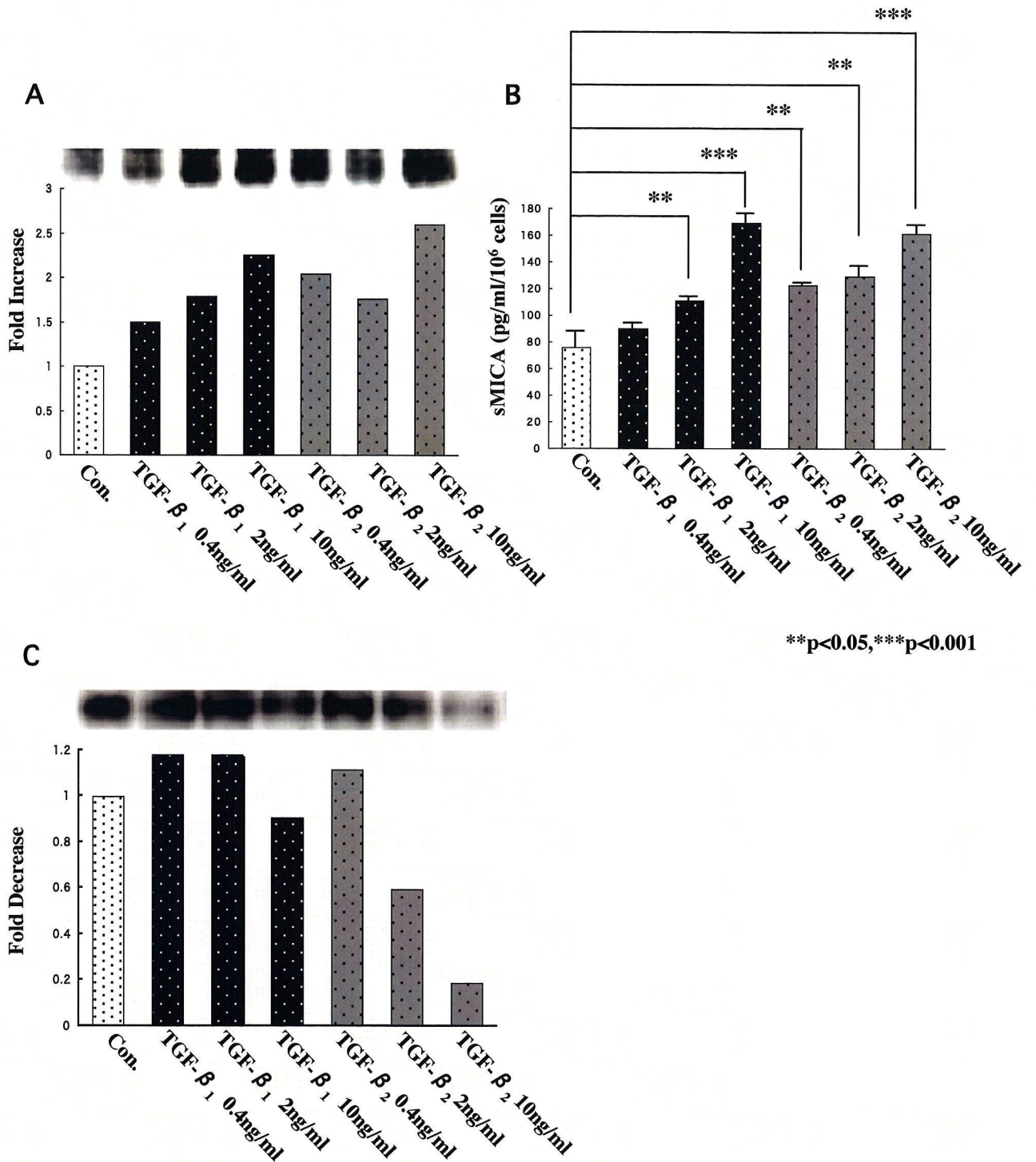
**Fig.10 MALDI/TOF-MSの結果**

MALDI/TOF-MSにてsMICA切断部位を検討した結果、赤矢印で示す5つのペプチド断片がMICA分子と一致した。



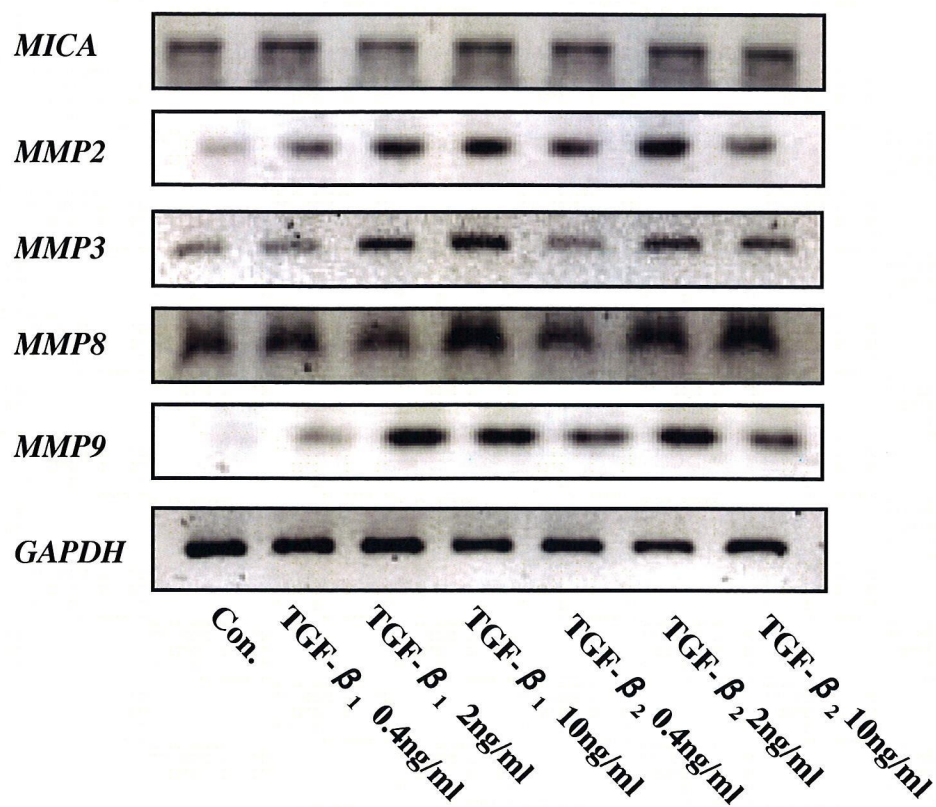
**Fig.11 MICAのアミノ酸配列**

MICAのアミノ酸配列を示す。細胞外領域( $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2、 $\alpha$ 3)、膜貫通領域、および細胞内領域の境界を▲で示している。またMALDI/TOF-MSで検出された5つのペプチド断片のアミノ酸配列を赤字で示した。MICA分子量24,000、つまり $\alpha$ 3中央付近でMICA切断能を有する蛋白分解酵素として、210番目のNと211番目のVを切断するMMP3(a)、215番目のEと216番目のAを切断するMMP8(b)、243番目のGと244番目のVを切断するMMP2/9(c)が考えられた。



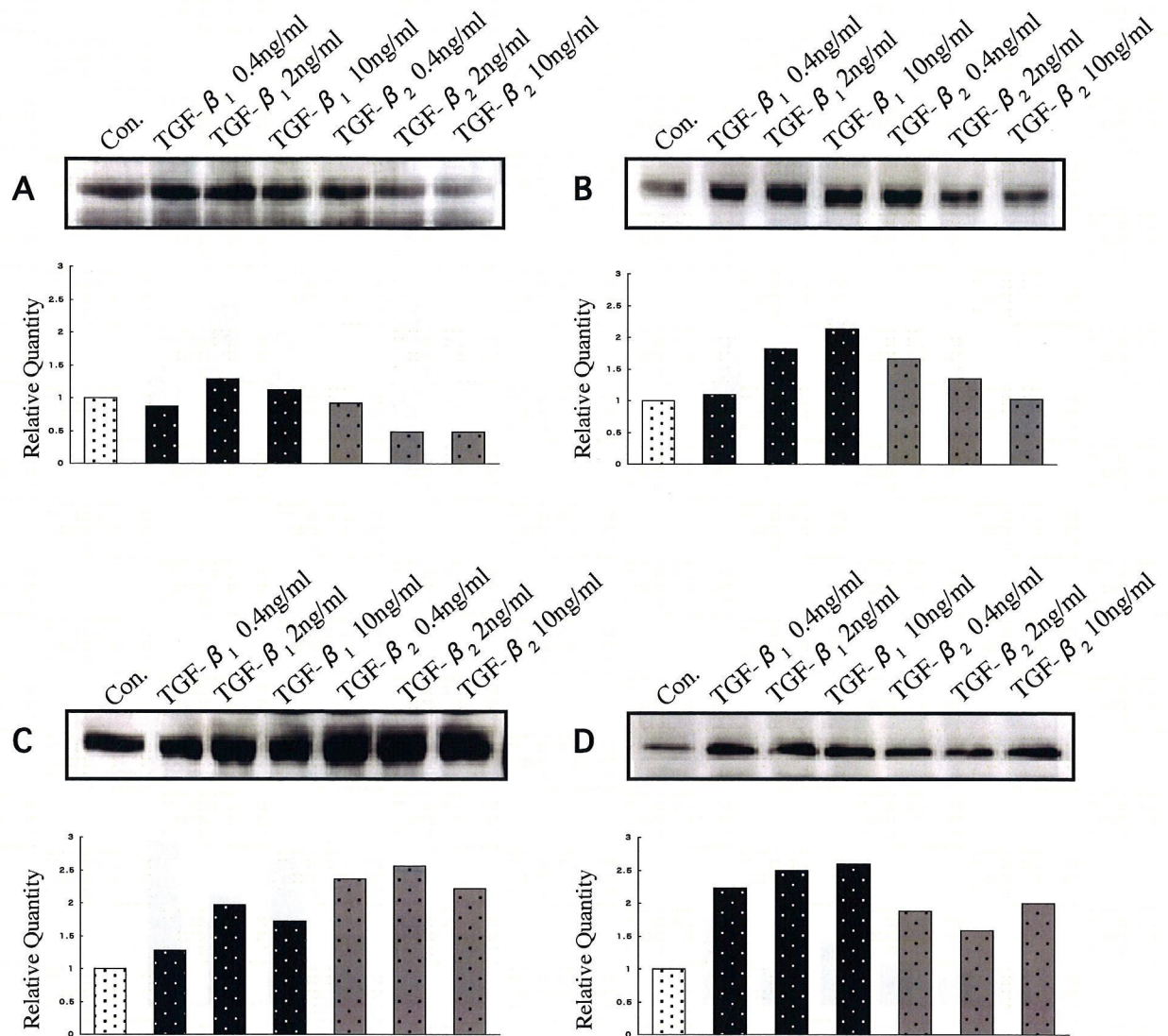
**Fig.12 MICA蛋白およびsMICAの発現に及ぼすTGF- $\beta_{1/2}$ の影響**

TGF- $\beta_{1/2}$ のMICA蛋白およびsMICAの発現に及ぼす影響をWestern Blot法(A)、ELISA法(B)により検討した。TGF- $\beta_1$ 、TGF- $\beta_2$ いずれも、sMICAの産生を濃度依存的に促進した。一方、細胞抽出液中のMICA蛋白の発現をWestern Blot法(C)にて検討した結果、細胞抽出液中のMICA蛋白はTGF- $\beta_2$ 処理により濃度依存的に低下した。バンドの強度はThe Discovery Series™ Quantity One® (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)にて解析し、コントロールを1としてその相対値をグラフに示した。



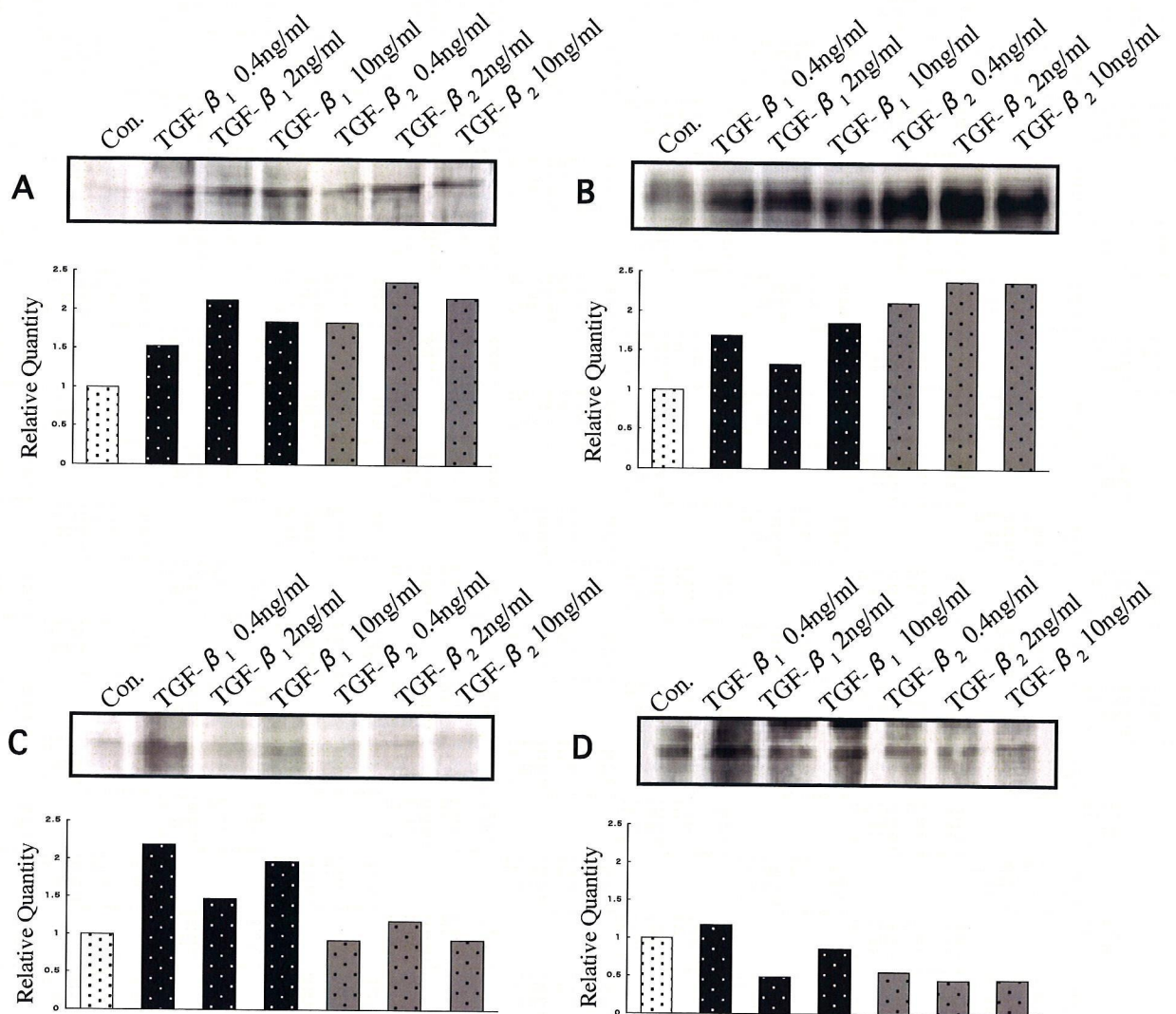
**Fig.13 MICA mRNAおよびMMPs mRNAの発現に及ぼすTGF- $\beta_{1/2}$ の影響**

TGF- $\beta_{1/2}$ 処理によりMICA mRNAおよびMMP-2,-3,-8,-9 mRNAの発現に及ぼす影響を半定量RT-PCR法にて検討した。primerおよびannealing温度、cycle数はTable 2に示す。TGF- $\beta_{1/2}$ 処理によりMICA mRNA発現は変化を認めなかったが、MMP-2,-3,-8,-9 mRNA発現はいずれも亢進した。



**Fig.14 培養上清中のMMPs 発現に及ぼすTGF- $\beta_{1/2}$ の影響**

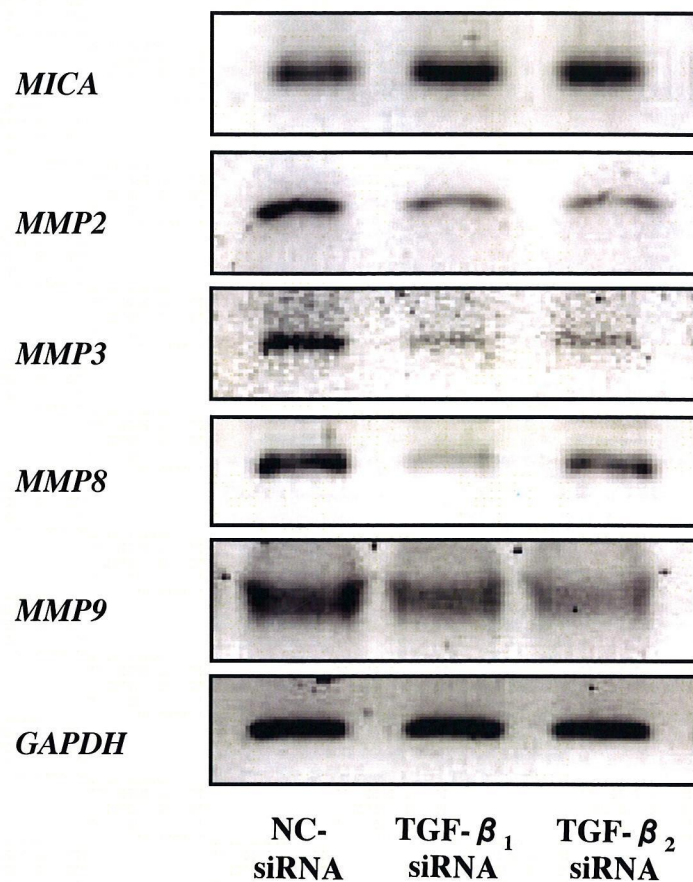
培養上清中のMMP-2(A)、MMP-3(B)、MMP-8(C)、MMP-9(D)の発現をWestern Blot法にて検討した。TGF- $\beta_{1/2}$ 処理により培養上清中のMMP-2の発現に変化は認めなかったが、MMP-3の発現はTGF- $\beta_1$ 処理にて約2.1倍、TGF- $\beta_2$ 処理にて約1.7倍に亢進した。MMP-8の発現はTGF- $\beta_1$ 処理にて約2倍、TGF- $\beta_2$ 処理にて約2.6倍に亢進し、MMP-9の発現はTGF- $\beta_1$ 処理にて約2.6倍、TGF- $\beta_2$ 処理にて約1.9倍に亢進した。



**Fig.15 細胞抽出液中のMMPs 発現に及ぼすTGF-β<sub>1/2</sub>の影響**

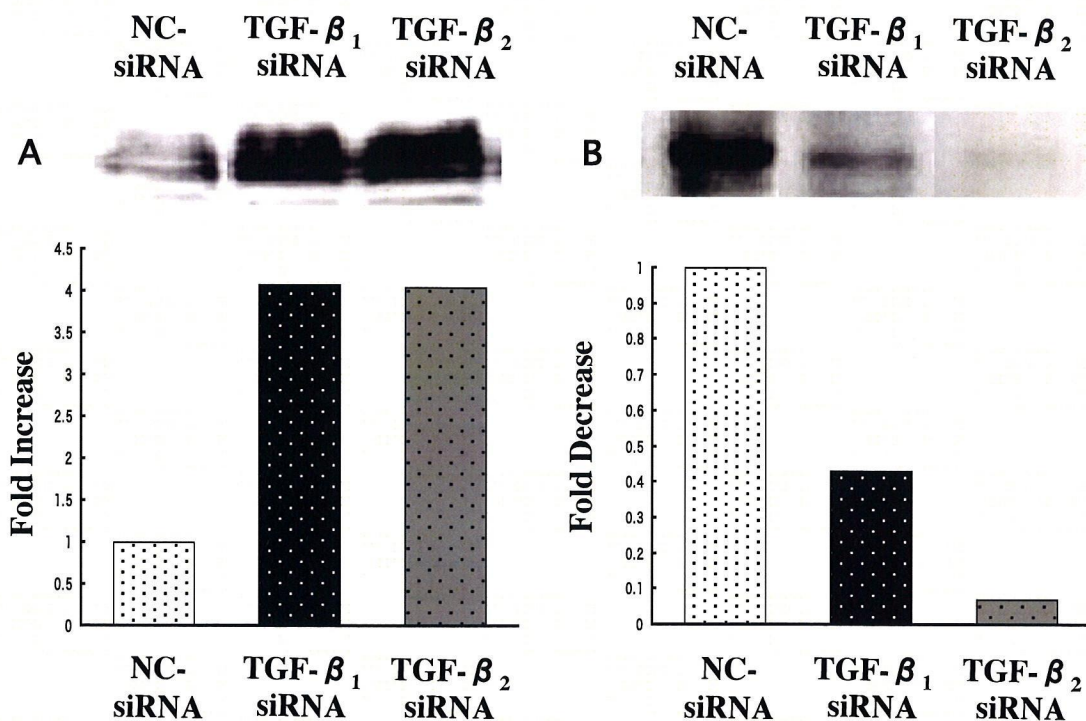
細胞抽出液中のMMP-2(A)、MMP-3(B)、MMP-8(C)、MMP-9(D)の発現をWestern Blot法にて検討した。MMP-2の発現はTGF-β<sub>1</sub>処理にて約2.1倍、TGF-β<sub>2</sub>処理にて約2.4倍に亢進した。また、MMP-3の発現はTGF-β<sub>1</sub>処理にて約1.8倍、TGF-β<sub>2</sub>処理にて約2.4倍に亢進し、MMP-8の発現はTGF-β<sub>2</sub>処理では変化しなかったが、TGF-β<sub>1</sub>処理にて約2.2倍に亢進した。TGF-β<sub>1/2</sub>処理により細胞抽出液中のMMP-9の発現は約1/2に減少した。





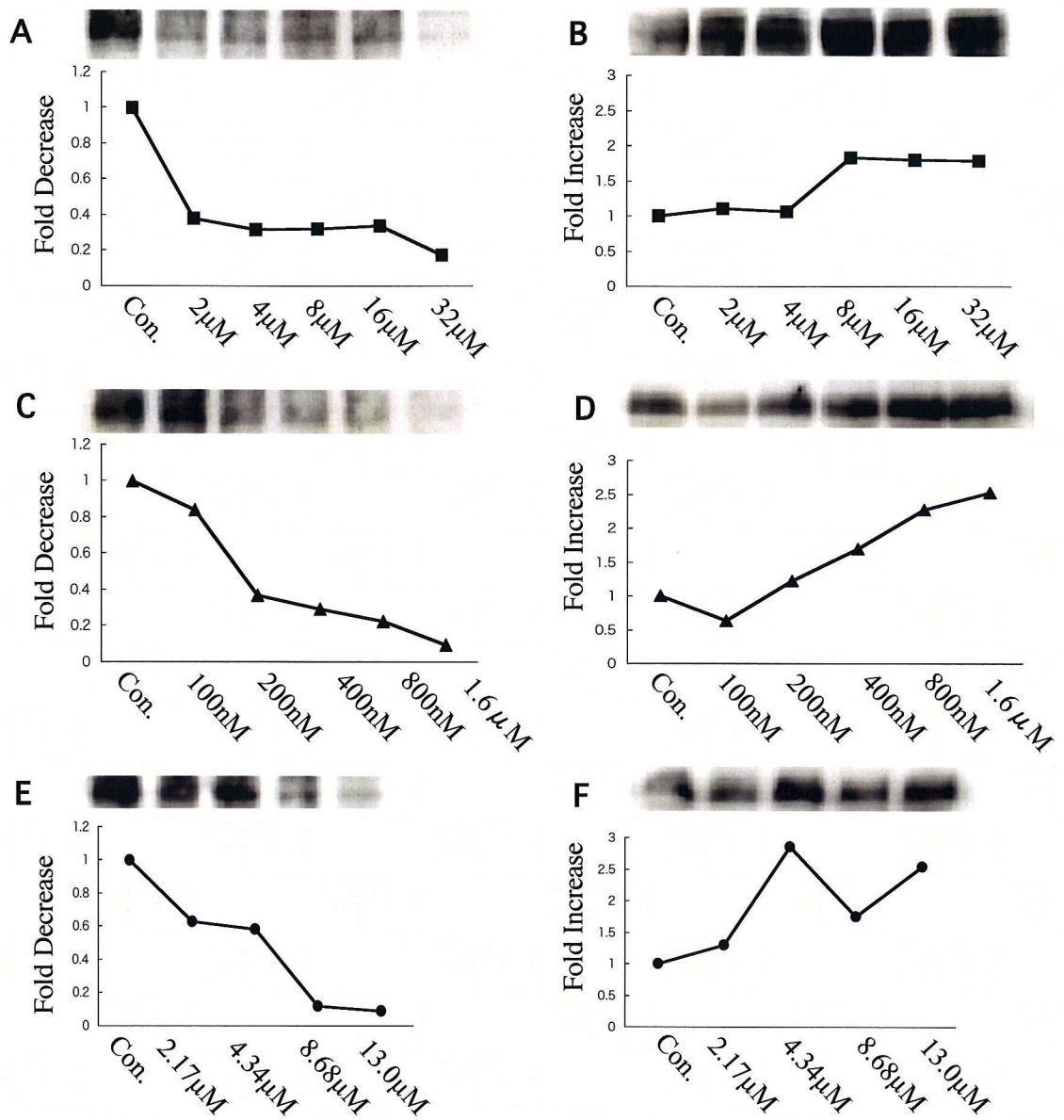
**Fig.16 MICA mRNAおよびMMPs mRNAの発現に及ぼす TGF-β<sub>1/2</sub>siRNA導入の影響**

TGF-β<sub>1/2</sub>siRNAのMICA mRNAおよびMMP-2,-3,-8,-9 mRNAの発現に及ぼす影響を半定量RT-PCR法にて検討した。TGF-β<sub>1/2</sub>siRNA導入によりMICA mRNA発現は変化を認めなかったが、MMP-2,-3,-8,-9 mRNA発現はいずれも低下した。



**Fig.17 MICA蛋白およびsMICAの発現に及ぼす内在性TGF- $\beta_{1/2}$  発現抑制の影響**

TGF- $\beta_{1/2}$  siRNA導入KO細胞株を用いて、Western Blot法にて、MICA蛋白およびsMICAの発現を検討した。TGF- $\beta_1$  siRNAおよびTGF- $\beta_2$  siRNAの導入により細胞抽出液中のMICA蛋白の発現は著しく亢進した(A)。一方、TGF- $\beta_{1/2}$  siRNAの導入により、培養上清中へのsMICAの産生は著しく抑制された(B)。



**Fig.18 MICA蛋白およびsMICAの発現に及ぼす特異的MMP阻害剤の影響**

MICA分子を切断する蛋白分解酵素の候補として考えられた、MMP-3,-8,-2/9について、それぞれの特異的MMP阻害剤のMICA蛋白およびsMICAの発現に及ぼす影響をWestern Blot法にて検討した。MMP-3阻害剤処理による培養上清中sMICA (A) および細胞抽出液中MICA蛋白(B)の発現を、MMP-8阻害剤処理による培養上清中のsMICA (C) および細胞抽出液中のMICA (D)、MMP-2/9阻害剤処理による培養上清中のsMICA (E) および細胞抽出液中MICA (F) をそれぞれ示す。各MMP阻害剤添加処理により、細胞培養上清中へのsMICAの産生は濃度依存的に抑制され、細胞抽出液中のMICAの発現は濃度依存的に促進された。