

学位論文題名

ヒト腫瘍におけるNKG2Dリガンドの
免疫組織化学的発現プロファイルの解析

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

NK細胞活性化レセプターの一つであるNKG2Dは、対応するリガンドが複数存在することが知られており、ヒトのNKG2Dリガンドとしては、MHC領域でコードされているMICA、MICB (MHC class I-related chains A, B)、ULBP (UL16-binding protein) 1, 2, 3, 4, 5, 6の8つが現在までに同定されている。NKG2Dという一つのレセプターが、なぜ構造の異なる多数のリガンドを持つのかについては未だはっきりと解明されていない。多様性の検討の多くは *in vivo* の研究で、蛋白レベルの発現についてはまだ少ない。本研究では、ヒト上皮性組織における、悪性転化とNKG2Dリガンド発現の分子病理学的関係を明らかにするために、特異性を確認した抗体を使用し、免疫組織化学的発現プロファイリングを行った。

【対象と方法】

北海道大学病院において切除、病理検査された組織検体を使用し、第一章では、全身の主な上皮性腫瘍22種を選び、同一個体の対照counter partとなりうる非腫瘍組織も併せてのTissue micro array (TMA) を、第二章では上皮性腫瘍の一つである浸潤性乳癌に注目し、169症例についてのTMAを作製し、免疫組織化学的検討を行った。NKG2Dリガンドに対する各抗体は、市販されていないULBP5については新たに作製した。作製した抗体、ポリクローナル抗体については、各ULBPの遺伝子導入細胞を作製し、ウエスタンブロット、セルブロックの免疫染色両者にて特異性、適用性の確認を行った。第二章では、NKG2Dリガンドの抗体の他に、乳癌診断で使用されているホルモンレセプター(ER, PgR, Her-2)や増殖能を示すKi-67、酸化ストレスのマーカーであるHIF-1 α 等も併せて検討した。

【結果】

第一章の上皮性腫瘍とその対照である非腫瘍組織に関する検討では、悪性転化に伴い発現の上昇をみる、組織特異的発現を示すリガンドの存在を見いだした(例:子宮頸部癌はULBP3 ($p < 0.008$)とULBP4 ($p < 0.048$), 子宮内膜癌はULBP2/6 ($p < 0.018$), 喉頭癌はULBP4 ($p < 0.048$)とULBP5 ($p < 0.008$)). また、非腫瘍組織、腫瘍組織にそれぞれにおけるクラスター解析では、リガンドの発現に一定のパターンがある傾向をつかんだ。非

腫瘍組織では、ULBP5- ULBP3- MICA/ B および ULBP2/6-ULBP1-ULBP4 からなる、2つの大きなクラスターが得られ、腫瘍組織では、ULBP4 は一番相関性が低く、次いで MICA/B、そして残りの群 (ULBP2/6, 3, 5) といった大きな3群のクラスターとなり、両者は違った発現パターンとなった。

第二章では、浸潤性乳癌に関し、NKG2Dリガンドの発現プロファイリングをまず行い、さらに得られた組織発現プロファイルと、臨床病理学的パラメータおよび分子病理学的パラメータとの関係性について検討した。リガンドのクラスター解析では、遺伝子発現制御上の類似性が低いと考えられているULBP3とULBP4発現に高い相関性が認められた。パラメータの解析では、特定のリガンドの発現との間に相関がみられた。Ki-67 indexとULBP2/6発現に有意な逆相関 ($p < 0.003$) がみられた。酸化ストレスマーカーであるHIF-1 α はULBP3およびULBP4と正の相関が認められた (それぞれ $p < 0.014$ および $p < 0.001$)。また治療標的分子でありいづれも細胞増殖シグナルの活性化に関係するER, PgR, HER2については、Ki-67同様、ULBP2/6とERのみに有意な相関が認められた。

【考察】

第一章の上皮性腫瘍組織におけるリガンドの発現のクラスター解析では、リガンドのプロモーター領域の DNA 配列の比較検討により報告されている樹状図に類似したデンドログラムが得られ、腫瘍における蛋白発現制御は遺伝子発現制御と密接に関係している可能性が示唆された。

第二章では、特定の因子と相関のある特異的なリガンドの存在が示唆された。一部のリガンドの発現は、腫瘍の代表的なイベントである細胞増殖や酸化ストレスと何らかの関係あることが考えられた。またリンパ節転移や浸潤性乳管癌の組織亜型と相関のあった ULBP5 は予後予測マーカーとなり得る可能性を示唆した。

【結論】

本研究では、抗体の特異性の確認を行った上で、ヒト全身臓器の非腫瘍組織と腫瘍組織におけるNKG2Dリガンド発現の免疫組織学的検討を行い、多数あるリガンドに一定の使い分けがある可能性を示唆した。引き続き行った、浸潤性乳癌の多数例での検討では、組織特異的なリガンドの発現を見せ、特定のリガンドとリンパ節転移、ホルモンレセプターの発現などにも相関がみられた。また、増殖能や酸化ストレスマーカーと特定のリガンドの発現の相関も示唆された。NKG2Dリガンドの多様化について詳細な解析をおこない理解を深めることは、NKG2Dシステムの理解につながるとともに、ヒト腫瘍の生物学的特性解明や治療開発にも有用な知見を与えるものである。今後、種々のヒト腫瘍についての詳細な解析を進めるべき重要な研究分野と考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 伸 哉
副 査 教 授 松 野 吉 宏
副 査 教 授 岩 永 敏 彦
副 査 教 授 高 田 賢 藏

学位論文題名

ヒト腫瘍におけるNKG2Dリガンドの 免疫組織化学的発現プロファイルの解析

本研究は、Natural killer (NK) 細胞の活性化分子である NKG2D (natural killer group 2, member D) リガンドの多様性と腫瘍における組織発現の関係を明らかにすることを目的し、先行的研究の進んでいる MICA, B (MHC class I-related chains A, B) のみならず、ULBP (UL16-binding protein) 1-6 を含む NKG2D リガンド全体について、免疫組織化学的手法にて、組織横断的、網羅的解析を行った。

第一章では、主要なヒト上皮性腫瘍における NKG2D リガンドの組織発現プロファイリングを行い、リガンドの腫瘍組織特異性の有無について検討を行うとともに、形態学的に正常の構築を有する非腫瘍組織との発現比較を行い、腫瘍化に伴う発現変動について包括的なリガンド間比較を行った。また第二章では、第一章でのプロファイリングの結果よりすべてのリガンドにおいて比較的高い割合で陽性症例が認められるタイプにクラスター分類され、かつ細胞傷害活性を作用機序とする抗体治療や、分子診断の臨床導入が最も進んでいる癌種であるにもかかわらず、NKG2D リガンドの組織発現の知見は極めて乏しい乳癌に着目し、167 症例を用いた網羅的解析を行った。

その結果、第一章では腫瘍組織と非腫瘍組織の発現の差異では、特定の癌種で、腫瘍化によってリガンド選択的に発現が有意に変化することが示された。また、上皮性腫瘍におけるクラスター解析より得られた樹状図は、Eagle らが発表した、NKG2D が符号化する各遺伝子のプロモーター領域の配列に基づく樹状図に酷似しており (Eagle R. et al, *Human Immunol*, 2006)、腫瘍化に伴う細胞ストレスにより誘導されるリガンド発現が、転写因子による制御に依存していることが示唆された。第二章では、各リガンドと様々な臨床病理学的、分子病理学的因子との関連が示され、特定のリガンドについては p53 が制御に関与している可能性を示した。

発表後、副査の岩永教授より、腫瘍周囲にある NK 細胞についての検討の有無、陽性とした染色の局在 (細胞質か細胞膜か) について、また、抑制性のシグナル (HLA-class I) についての検討を行ったのかとの質問が出された。

引き続き副査の高田教授より NKG2D リガンド自体の生理作用の有無について、p53 と NKG2D リガンドとの関連について、染色判定の基準判定は妥当であったか、臨床応用への発展をどのように考えているのか、ADCC (Antibody-dependent cellular cytotoxicity) 活性と NKG2D リガンド

の知見の有無などの質問があった。主査の田中教授より、レセプターである NKG2D について判っていることはあるか、NK 細胞と腫瘍の関係の腫瘍病理学的知見の有無、NKG2D リガンド発現と腫瘍回避との関連の捉え方、血液腫瘍と NKG2D リガンドとの知見の有無について、乳癌では Molecular subtype との関連の有無について質問があった。副査の松野教授より、子宮頸癌のみ別のグループに分類された結果に対する考察、ウイルス感染の関与した癌との関連 (Epstein Barr ウイルス関連胃癌など)、外的刺激に対する表層防御機能を示す扁平上皮と NKG2D リガンドとの関連について質問がなされた。

いずれの質問に対しても、申請者は実際のデータや文献的考察に基づいて妥当な回答をした。

本研究は、NKG2D リガンドのヒト組織における組織横断的な網羅解析を行った初めての検討であり、ヒト腫瘍における NKG2D リガンドの発現や多様性の理解を深めるために大きく貢献したと認められる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。