

# 抗腫瘍免疫応答増強へ向けた DNA 損傷応答の解析

群馬大学 先端科学研究指導者育成ユニット

柴田 淳史

## 1. はじめに

### 研究目的

先端がん治療の一つである免疫細胞治療は新たなオーダーメイドがん治療法として世界的に大きな注目を集めている。近年の研究成果により、免疫細胞治療は化学・放射線療法と組み合わせることでより大きな効果を発揮する事が示唆されつつある。本研究では、重粒子線を含めた放射線照射によって生じた DNA 損傷に反応する免疫反応誘導因子 NKG2D リガンドに着目し研究を行う。DNA 損傷後、癌細胞膜上に提示された NKG2D リガンドは免疫細胞が有する NKG2D 受容体を介し認識及び除去される。我々の予備実験の結果から、癌細胞において NKG2D リガンドは X 線照射により誘導されるが、いくつかの癌細胞ではその誘導レベルが非常に低かった。本研究では NKG2D リガンドの誘導レベルの違いを DNA 損傷応答の視点から解明し、DNA 損傷応答を操作することで NKG2D リガンド発現耐性癌細胞を感受性へ転換することを目指す。

MICA MICB(MHC class I polypeptide-related sequence A, B, 以下 MICAB)は NK 細胞の活性型受容体 NKG2D のリガンドとして単離された膜表面蛋白である。NKG2D 受容体は NK 細胞、細胞障害性 T 細胞(CD8+細胞)、 $\gamma$   $\delta$  型 T 細胞の細胞膜上に発現しており、リガンドが結合すると、その細胞障害活性を高める。2006 年に、MICAB は DNA 損傷シグナルにより p53 非依存性 ATM/ATR 依存性に細胞膜表面に発現する事が報告された(Gasser et al, Nature)。放射線照射による MICAB 発現の増強は、放射線療法により体内の免疫細胞による腫瘍排除能を高めると期待される。放射線治療においては、照射野外の転移巣が縮小する現象 (アブスコパル効果)が知られているが、MICAB 発現の増強はこの効果の原因となる因子の一つと考えられている。しかし放射線照射後の免疫応答の増加は必ずしも起こらない。腫瘍は体内の免疫監視機構から逃れて増殖した細胞群であるため、がん細胞が免疫細胞の排除能から逃れている理由の一つとして MICAB 発現の低下が挙げられる。そこで我々は MICAB 発現が低く放射線応答も認められない発現抵抗性がん細胞株の MICAB 発現回復を目標とし、研究を行った。

## 2. 方法

がん細胞株として、肺胞基底上皮腺癌細胞株(A549, H1734, SQ5, H2228)・骨肉腫細胞株(U2OS, SaOS2)・グリア芽細胞腫株(T98G)・大腸がん細胞株(HCT116 p53 野生型, HCT116 p53 欠損株)を使用し、正常細胞株 HFLIII と比較検討を行った。細胞株は理化学研究所および ATCC より入手し、10%牛胎児血清含有 DMEM 培地、または 10%牛胎児血清含有 RPMI 培地, McCoy's 5A 培地中にて培養した。対数増殖期の培養細胞に 10Gy の X 線を照射し、24 時間後に MICA MICB 抗体(6D4, Biolegend)染色し MICA MICB の発現強度をフローサイトメーター(BD FACs Calibur)で測定した。PI および Annexin V 陽性細胞は死細胞として解析から除外している。またヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 SAHA を X 線照射 2 時間前に培地に添加し、同様の実験を行った。

## 3. 結果 研究成果

臓器由来・がん種・がん抑制遺伝子 status における放射線誘導 NKG2DL 発現レベルを検討するため、細胞株(A549, H1734, SQ5, H2228, U2OS, SaOS2, HCT116 p53+/+, HCT116 p53-/-細胞)の MICAB 発現強度と放射線応答性を比較検討した(図 1)。その結果、我々は A59, H1734, T98G が発現抵抗性がん細胞であることを見出した。しかし一方で発現強度・放射線応答性に由来臓器・がん種・がん抑制遺伝子 status の相関は認められなかった。次に、我々は MICAB 発現が極めて低い T98G に着目し、その発現

回復を試みた。放射線誘導 MICAB 発現を回復させるため、我々は各種抗がん剤を放射線照射と併用して行った結果、HDAC 阻害剤である SAHA が最も効果的に放射線誘発 MICAB 発現を回復する薬剤であることを見出した。さらに我々は、低濃度 1~3 $\mu$ M SAHA の処理によっても、X 線照射で MICAB 発現が回復することを見出した (図 2)。SAHA の細胞増殖に対する毒性試験では、低濃度 1~3 $\mu$ M の SAHA はヒト正常細胞 HFLIII に対して約 30%程度の増殖抑制のみを示した(data not shown)。

図 1

### NKG2Dリガンドの放射線応答はがん細胞株によって異なる

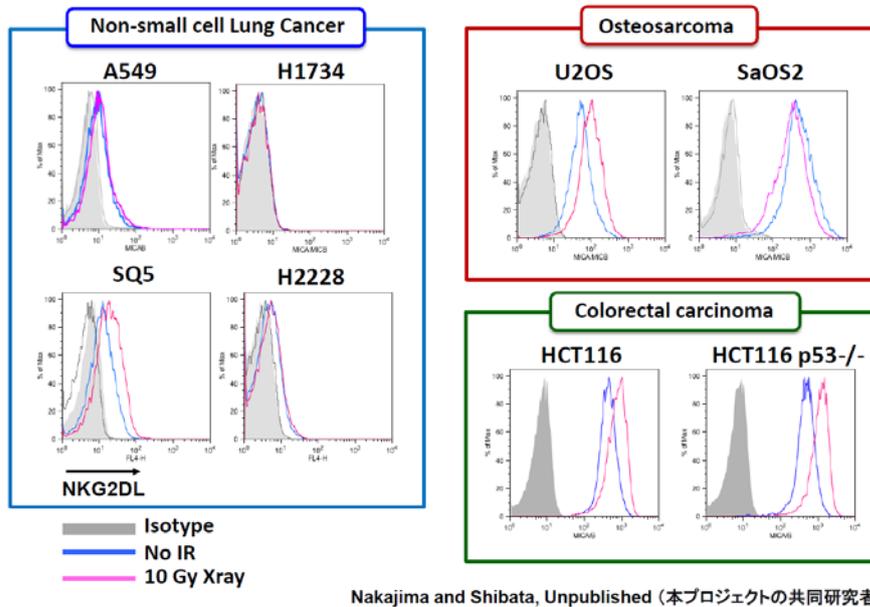


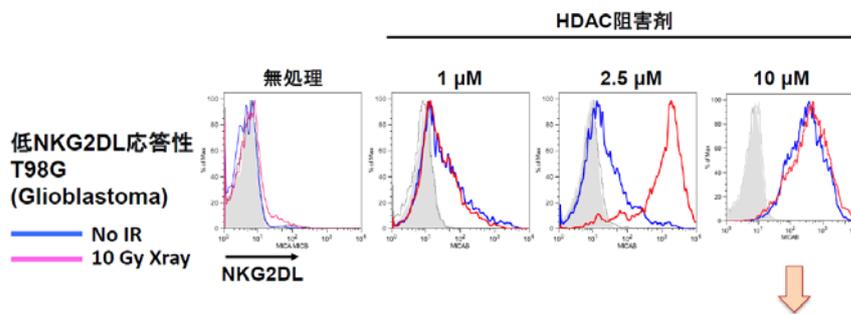
図 2

### 低用量HDAC阻害剤処理による効果的な NKDG2リガンドの再活性化



HDAC阻害剤 (SAHA):

- 1) サイレンスされたNKG2DLの放射線に対する反応性を再活性化する。
- 2) クロマチン弛緩によりDNA損傷シグナルを増大させる。



高濃度HDAC阻害剤の処理は正常細胞を殺してしまう。

#### 4. 考察 まとめ

本研究により、放射線照射による NKG2D リガンドの膜発現レベルは、がん細胞株によって大きく異なることが明らかになった。しかしながら我々の実験では、これら発現レベルの違いと、臓器由来・がん種・がん抑制遺伝子 p53/RB の間に相関性は認められなかった。我々は HDAC 阻害剤 (SAHA) を NKG2D リガンド非応答性がん細胞株 T98G に前処理することで、放射線誘導 NKG2D リガンドの発現を回復することに成功した。高濃度の SAHA を処理することにより T98G 細胞は NKG2D リガンドの膜発現を回復することが出来るが、同濃度では正常細胞が死滅してしまう (data now shown)。しかしながら我々は SAHA が比較的低い濃度でも効果が表れることを見出したため、実際の臨床現場において正常細胞への副作用を大きく軽減したプロトコルを提案出来ると考えています。現在は SAHA による NKG2D リガンドの発現回復機構を分子生物学に解明するため研究を進めている。

#### 5. 発表論文

特になし