

44662491

悪性腫瘍の免疫寛容獲得機序における
抗原提示能の関与の解析

(課題番号：10670152)

平成10年度～平成11年度科学研究費補助金
〔基盤研究(C)(2)〕研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 三代川 齐之
(旭川医科大学医学部 助教授)

は し が き

腫瘍細胞が生体内で増殖して行くには、腫瘍発生の初期に免疫監視機構から逃れ免疫寛容の状態になることが必要と考えられる。腫瘍発生のごく初期（アネルギー状態になる前）に腫瘍細胞特異的 CTL 等の免疫監視機構から逃れるには、腫瘍細胞が免疫抑制液性因子を産生放出するばかりでなく、腫瘍細胞における抗原提示機能の破綻が関与している可能性も推察される。最近散見される大腸癌や肝癌の一部での MHC 分子の発現量低下、大腸癌や肺癌の一部での TAP 分子の発現量低下の報告例は、腫瘍発生初期の腫瘍細胞における抗原提示能の異常を示唆するものとして注目される。

本研究では、腫瘍発生の各段階における腫瘍細胞の抗原提示能に関し異常の有無を検討することを目的として種々の解析を行った。その結果、興味ある知見が得られたので報告する。これらの研究成果について、御批判を頂ければ幸甚である。

研究組織

研究代表者： 三代川 齊之 （旭川医科大学医学部 助教授）

研究経費

平成 10 年度 2,400 千円

平成 11 年度 800 千円

研 究 発 表

(1) 学会誌等

1. Kobayashi H., Kokubo T., Sato K., Kimura S., Asano K., Takahashi H., Iizuka H., Miyokawa N., Katagiri M. : CD4+ T cells from peripheral blood of a melanoma patient recognize peptides derived from nonmutated Tyrosinase. *Cancer Research*, 58:296-301, 1998
2. Takahashi M., Adachi T., Matsui R., Miyokawa N. : Assessment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining in parotid tumors. *Eur.Arch.Otorhinolaryngol.*, 255:311-314, 1998
3. Kono T., Tokusashi Y., Yamamoto Y., Kakisaka A., Miyokawa N. Kasai S. : Adenosquamous carcinoma of the rectum showing endocrine cell differentiation – Report of a case. *Dis.Colon Rectum*, 42(8): 1089-1092,1999
4. Inagaki M., Ishizaki A., Kino S., Onodera K., Matsumoto K., Yokoyama K., Makino I., Ojima H., Tokusashi Y., Miyokawa N., Kasai S. : Papillary adenoma of the distal common bile duct. *J.Gastroenterol.* 34:535-539,1999
5. Inagaki M., Maguchi M., Kino S., Obara M., Ishizaki A., Onodera K., Yokoyama K., Makino I., Ojima H., Tokusashi Y., Miyokawa N., Kasai S. : Mucin-producing tumors of the pancreas : clinicopathological features, surgical treatment, and outcome. *J.Hepatobil. Pancreat Surg.* 6:281-285,1999
6. 山田由美子、田中 光、浅野一弘、山本明美、三代川齊之、川岸尚子、飯塚 一 : 脂肪肉腫の1例、皮膚科の臨床、41(12):1947-1950 ,1999
7. Miyamoto T., Hayashi H., Sengoku K., Ojima H., Tokusashi Y.,

Yamaguchi Y., Takuma N., Hasuike S., Miyokawa N., Ishikawa M. : Diffuse malignant mesothelioma of the uterus. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*. 79(2):154-155, 2000

8. 平田 哲、八柳英治、山崎弘資、杉本泰一、越湖 進、小久保 拓、熱田義頭、笹嶋唯博、三代川齊之 : Nedaplatin 単独投与による食道癌術前化学療法、*癌と化学療法*、27(2):221-226, 2000
9. Ohsaki Y., Tanno S., Fujita Y., Toyoshima E., Fujiuchi S., Nishigaki Y., Ishida S., Nagase A., Miyokawa N., Hirata S., Kikuchi K.: Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients with p53 overexpression. *Oncology Reports*. 7(3):603-607, 2000
10. Ogino T., Sato K., Miyokawa N., Kimura S., Katagiri M. : Importance of GAD65 peptides and I-Ag7 in the development of insulinitis in nonobese diabetic mice. *Immunogenetics*. 51:538-545,2000
11. Fujii H., Zhu X.G., Matsumoto T., Inagaki M., Tokusashi Y., Miyokawa N., Fukusato T., Uekusa T., Takagaki T., Kadowaki N., Shirai T. : Genetic classification of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. *Human Pathol.*, 31(9):1011-1017, 2000

(2) 口頭発表

1. 藤井博昭、三代川齊之、徳差良彦、白井俊一 : Genetic progression and heterogeneity in intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas. 第87回日本病理学会、1998、4 (広島)
2. 荻野 武、佐藤啓介、三代川齊之、木村昭治、片桐 一 : NOD マウスにおける GAD65T 細胞エピトープの解析、第87回日本病理学会、1998、4 (広島)

3. 齊藤裕樹、北野陽平、松本学也、丹 聡子、松井朋子、横山和典、牧野 勲、稲垣光裕、小野寺一彦、葛西眞一、尾島英知、徳差良彦、三代川齊之：腓実質浸潤をきたした進行型十二指腸癌の1例、第76回日本消化器内視鏡学会北海道支部例会、1998、6（札幌）
4. 山本泰司、中西京子、井手 宏、西垣 豊、長内 忍、中野 均、大崎能伸、菊池健次郎、徳差良彦、三代川齊之：多発性の反応性リンパ節腫脹を認め、血清 IL-6 高値を示した肺癌の一例、第24回日本肺癌学会北海道支部例会、1998、9（札幌）
5. Miyokawa N., Ojima H., Tokusashi Y., Ogawa K. & Katagiri M. : A case of macronodular transformation in nodular regenerative hyperplasia of liver. 22nd International congress of the International Academy of Pathology, 1998,10(Nice, France)
6. 中西京子、西垣 豊、中尾祥子、井手 宏、長内 忍、中野 均、大崎能伸、菊池健次郎、徳差良彦、三代川齊之：未治療で縮小した肺小細胞癌の一例、第39回日本肺癌学会総会、1998.10（金沢）
7. Takiyama Y., Tokusashi Y., Kimura S., Ito K., Miyokawa N. & Katagiri M. : Expression of interleukin-18 messenger RNA in rat thyroid FRTL-5 cell line and human thyroid gland. 第28回日本免疫学会、1998、12（神戸）
8. 柴田敏也、神田 誠、佐々木雅彦、中湊誠幸、北 進一、三代川齊之：抜歯後治癒不全と歯肉癌について、日本口腔腫瘍学会誌、10(3):155, 1998
9. 荻野 武、佐藤啓介、三代川齊之、木村昭治、片桐 一：NOD マウスにおける GAD65 特異的 T 細胞クローンの活性化に対する I-A^{g7} β 鎖 56 番、57 番の重要性についての検討、第28回日本免疫学会、1998、12（神戸）
10. 徳差良彦、岸辺 幹、山田能久、中村 哲、和田 隆、飯塚 一、三代川齊之、小川勝洋：Multiple Bowen's Disease の一例、第88回日本病理学会、1999、4（東京）

11. 藤井博昭、朱 学功、松本俊治、植草利公、徳差良彦、三代川斉之、福里利夫、白井俊一：混合型肝癌の Loss of heterozygosity (LOH) 解析による腫瘍クローナリテイの検索、第 88 回日本病理学会、1999、4 (東京)
12. 平田 哲、笹嶋唯博、越湖 進、杉本泰一、山崎弘資、八柳英治、三代川斉之：頭頸部腫瘍に重複する食道癌と併存する dysplasia の問題、日本外科学会雑誌、100(臨増):330, 1999
13. 大崎能伸、中西京子、山本泰司、西垣 豊、井手 宏、藤内 智、長内 忍、豊嶋恵理、藤田結花、三代川斉之、菊池健次郎：肺非小細胞癌での carcinoembryonic antigen(CEA)の発現の免疫組織学的検討、肺癌、39 (5) :621 , 1999
14. 佐藤真紀、山本泰司、中西京子、井手 宏、西垣 豊、長内 忍、大崎能伸、菊池健次郎、徳差良彦、三代川斉之：乳癌手術 7 年後と 12 年後に孤立性肺転移を生じた 1 例、 肺癌、39(7):1044, 1999
15. 徳差良彦、尾島英知、三代川斉之、小川勝洋、原渕保明：Melanin pigmented oncocytic metaplasia of the nasopharynx の 1 例、日本病理学会会誌、89(1):253, 2000.03

本研究の基礎となった論文

1. Klein B., Levin I., Klein T. : HLA class I antigen expression in human solid tumors. *Israel Journal of Medical Sciences*. 32(12):1238-43, 1996
2. Papavassiliou E.D., Arvind P., Tsioulis G.J., Qiao L., Goldin E., Staiano-Coico L., Rigas B. : The effect of ethanol on the expression of HLA class I genes in human colon adenocarcinoma cell lines. *Cancer Letters*. 81(1):33-8, 1994
3. Tsioulis G.J., Triadafilopoulos G., Goldin E., Papavassiliou E.D., Rizos S., Bassioulas P., Rigas B. : Expression of HLA class I antigens in sporadic adenomas and histologically normal mucosa of the colon. *Cancer Research*. 53(10 Suppl):2374-8, 1993
4. Zborovskaya I., Gasparian A., Kitaeva M., Polotzky B., Tupitzin N., Machaladze Z., Gerasimov S., Shtutman M., Jakubovskaya M., Davidov M., Tatosyan A. : Simultaneous detection of genetic and immunological markers in non-small cell lung cancer: prediction of metastatic potential of tumor. *Clinical & Experimental Metastasis*. 14(6):490-500, 1996

研究 成 果

2年間にわたり大腸癌症例20例（手術症例及び内視鏡的粘膜切除術（EMR）症例各10例）、EMR腺腫内癌症例10例、前癌病変である大腸腺腫症例30例（高度異型・中等度異型・軽度異型症例各10例）の合計60症例の組織検体を用いて抗原提示関連分子（MHC、TAP、HSP72、Calnexin、Grp94）の発現変化を検討した。また、MHC遺伝子の発現量とp53遺伝子の変異を検討した。用いた症例の一部は、症例報告等で論文として発表した（別添1、2）。さらに、大腸癌以外の癌症例で同様の検討を行った。

1. 腫瘍抗原提示に関与する分子の免疫組織化学的解析

市販の抗MHCクラスI抗体2種類及び抗TAP抗体1種類を用い免疫組織化学染色したが、ホルマリン固定標本ではいずれの抗体もすべての症例で反応しなかった。ホルマリン固定標本で各種抗原賦活法（5種類）も試みたが、これらの抗体ではごく微弱な陽性像をみるのみで、定量化に適した抗体では無かった。しかし、抗MHCクラスI抗体の1種類は、凍結標本とAMeX固定標本では良好な反応性を認めたものの症例数が5例と少なく、抗原の発現低下を統計的に確認できなかった。

一方、HSP72、Calnexin、Grp94抗体は、ホルマリン固定標本に対しても反応性良好であり、正常細胞・腺腫細胞・癌細胞となるにしたがい発現増強を認めた。MHCクラスI分子の発現に関与していると考えられているHSP72、Calnexin、Grp94各分子の発現が正常細胞から癌細胞へと変化するにしたがい発現増強される事より、MHCクラスI分子の発現に差異が無いとは考えられず、以前から報告されているように癌細胞でMHCクラスI分子の発現が低下しているために代償性にこれらの関連分子が発現増強している可能性が推察される（投稿準備中）。MHCクラスI分子の発現低下を我々の症例で証明できれば、発癌過程における抗原提示分子の関与が裏付けられるものと考えられる。

さらに、平成11年11月より米国Roswell Park Cancer InstituteのFerrone教授との共同研究が実現し、ホルマリン固定組織標本においても良好に反応するMHCクラスI抗体を入手でき、全症例に関してMHCクラスI抗原の発現を再検討した結果、正常細胞・腺腫細胞・癌細胞となるにしたがい発現低下を認めた（投稿準備中）。

2. 組織上でのMHCクラスI分子のmRNA定量化

大腸癌と大腸腺腫各5症例を用いてin situ RT-PCRを行い、MHCクラス

I 抗原の各遺伝子 (HLA-A, B, C) を mRNA より合成増幅した。発色法では症例間での差異や同一標本上の正常粘膜上皮と病変部での差異も確認出来なかった。凍結標本・AMeX固定標本を用いた検討によっても同様に、明らかな差異を見出せなかった。MHCクラスI抗原の発現量が従来の報告のように癌細胞で低下しているとする、蛋白合成段階での調節機構が関与している可能性を示唆している。

3. p53遺伝子の検討

大腸癌症例を用いp53の第6・7・8エクソンに関するPCR-SSCPを行い、一部の症例において異常を確認できたが、いずれも正常細胞との差異が無いことより germ lineでの異常が示唆された。

4. 大腸癌以外の癌症例での検討

MHCクラスI抗原の発現に関し、免疫染色による解析を上顎癌および食道扁平上皮癌を用いて行った。上顎癌では発現減少を確認出来、この結果はFerrone教授との共同研究として投稿中である。一方、食道がんでは、発現減少を明らかにしえなかった。

p53遺伝子に関しては、食道癌多発症例で正常細胞と癌細胞での遺伝子

変異が確認された（投稿準備中）。

さらに、肝癌での解析では、解析したすべての症例でLOHが検出されたが、MHCクラスI遺伝子および関連遺伝子が存在する第6染色体短腕にはLOHは検出出来なかった（別添3）。

- 別添 1 : Kono,T., Tokusashi,Y., Yamamoto,Y., Kakisaka,A., Miyokawa,N.
Kasai,S. : Adenosquamous carcinoma of the rectum showing
endocrine cell differentiation – Report of a case. Dis.Colon
Rectum, 42(8): 1089-1092,1999
- 別添 2 : 平田 哲、八柳英治、山崎弘資、杉本泰一、越湖 進、小久保 拓、
熱田義顕、笹嶋唯博、三代川齊之 : Nedaplatin单独投与による食道
癌術前化学療法、 癌と化学療法、27(2):221-6, 2000
- 別添 3 : Fujii,H., Zhu,X.G., Matsumoto,T., Inagaki,M., Tokusashi,Y.,
Miyokawa,N., Fukusato,T., Uekusa.T., Takagaki,T., Kadowaki,N.,
Shirai,T.: Genetic classification of combined hepatocellular-
cholangiocarcinoma. Human Pathol., 31(9):1011-1017, 2000