

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 藤田 裕美

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

【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、ウエスタンプロット、セルプ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見る、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ず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り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が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、組織特異的なり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。