

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15236

研究課題名(和文) 多能性維持因子Nanogは癌幹細胞の免疫回避能を制御できるか？

研究課題名(英文) Does NANOG have the potential to regulate immune escape of cancer stem cells?

研究代表者

金田 安史 (Kaneda, Yasufumi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10177537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞集団ではNanogの高発現とICAM-1の発現低下が認められた。癌細胞ではNanogによってICAM-1の発現が低下し、NK細胞感受性が低下した。Nanog強発現の癌細胞やNanog shRNA導入癌細胞をSCIDマウスに移植して腫瘍形成させた実験では、Nanogの発現がICAM-1の発現低下を誘導しNK細胞の感受性低下により腫瘍形成が促進された。NanogのChIP-seqにより、ICAM-1 promoterのNanog結合部位へのヒストンアセチル化酵素のp300の結合がNanogによって阻害された。前立腺癌の臨床サンプルではNanogとICAM-1の発現の逆相関が見出された。

研究成果の概要(英文)：In cancer stem-like cells, high expression of Nanog and low expression of ICAM-1 were discovered. Nanog expression inhibited ICAM-1 expression in cancer cells, which suppressed the sensitivity of cancer cells to NK cells. Xenograft experiments were performed in SCID mice using cancer cells with Nanog-overexpression or Nanog suppression by Nanog shRNA. It was concluded that Nanog expression accelerated tumor growth in mice by lowering NK cell sensitivity through the suppression of ICAM-1. ChIP-seq analysis revealed that Nanog bound to the ICAM-1 promoter sited and inhibited the association of histone acetylase p300 with ICAM-1 promoter. Clinical sample analysis demonstrated the inverse correlation of Nanog and ICAM-1 expression.

研究分野：遺伝子治療学

キーワード：癌幹細胞 Nanog NK細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌細胞が免疫系を逃れて生存、増殖、転移ができるメカニズムについては、古くから研究が進められてきた。特に最近は無免疫チェックポイントの研究やその抗体療法での検証によって、癌細胞や腫瘍組織の免疫細胞が T 細胞上の抑制系受容体のリガンド(PD-L1 など)を高発現し、CTL 機能の抑制シグナルを刺激して、いわゆる疲弊した T 細胞の割合を高めることが注目されている。また制御性 T 細胞が T 細胞や NK 細胞や樹状細胞の機能を抑制することも報告されてきた。さらに NK 細胞の受容体を刺激するリガンドの可溶型を癌組織が高発現して NK 細胞を抑制することも明らかになっている。このように癌組織は、多くの面から宿主の免疫監視機構から逃れて増殖し続け、いったん大きくなってしまうと免疫監視機構を寄せ付けぬ防御機構を幾重にも張り巡らせて生き延びることが可能となっている。しかし原発巣において腫瘍が形成されるごく初期、或いは、癌細胞が原発巣から全身に流出し他の組織に生着して腫瘍巣を作る最初の段階では、少数の(場合によっては単一の)癌細胞は容易に免疫系で排除されてしまうはずである。にもかかわらず腫瘍形成がおこっている。それは何故、という primitive な疑問が腫瘍分野の研究者には絶えず去来してきた。

(2) 癌の研究領域においては、昨今固形癌にも癌幹細胞(Cancer stem cell あるいは Cancer-initiating cell)と考えられる細胞集団の存在が指摘され、それが腫瘍形成や治療抵抗性に大きく関与していることが明らかになり、癌治療の究極的な標的として高い注目を集めている。癌幹細胞が治療抵抗性をもたらすことが指摘され、特に抗癌剤に対する抵抗性が主として研究対象とされてきた。しかし癌幹細胞の特性として、非常に少ない細胞数であっても腫瘍形成ができ

る(癌幹細胞を含む集団は、含まない集団の 100 分の 1 以下で腫瘍形成可能)事から考えれば、もともと癌幹細胞には免疫回避能が備わっているのではないかと推測される。そのような研究はまだ十分行われているとは言い難い状況である。

(3) 癌幹細胞の研究においては表面抗原の解析が進んでいるが、申請者は以前より癌幹細胞を規定する遺伝子発現の特異性に焦点を当ててきた。その中で、癌幹細胞と多能性維持因子の関連性の研究から、特に Nanog の発現がスフェア形成能、腫瘍形成能、抗癌剤耐性能に深くかかわることを発見した(文献 1)。

(4) 以上を総合的に考えると、多能性維持因子、特に Nanog の発現が癌幹細胞の特性を決定する因子の可能性が高く、したがって Nanog の発現が癌細胞の免疫回避能にも影響しているのではないかという仮説を立てるにいたった。

2. 研究の目的

(1) 癌幹細胞と考えられる細胞集団が、原発巣や転移巣における腫瘍形成の初期、非常に細胞数の少ない時期でも腫瘍を形成するためには、癌幹細胞に免疫回避能力が備わっていると考えるのが自然であろう。我々の研究室では、CRISPR/Cas9 による Nanog 遺伝子のノックアウト細胞や Nanog 強発現癌細胞を用いた実験から、癌幹細胞における多能性維持因子、特に Nanog 遺伝子の発現が少数の癌細胞集団による腫瘍形成や抗癌剤耐性といった癌幹細胞の特性を制御する結果を得ている(文献 1)。

(2) そこで本研究においては、Nanog 遺伝子発現が特に NK 細胞による癌細胞の認識能を抑制し、抗腫瘍免疫回避能を癌幹細胞に賦与しているという仮説を立証し、その分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 様々なヒト癌細胞株（前立腺癌細胞 PC3, DU-145, 乳癌細胞 MDA-MB231）、マウス癌細胞株（大腸癌細胞 MC38, メラノーマ細胞 B16F10）より、従来の報告に従って癌幹細胞を豊富に含む集団を分離して Nanog の発現を確認する。癌幹細胞集団の NK 細胞に対する感受性を評価し、その機構を明らかにする。

(2) 癌幹細胞分画が免疫細胞の腫瘍組織への浸潤や機能に与える影響について解析する。次に、Nanog 強発現癌細胞や Nanog ノックダウン癌細胞を作成し、それぞれから癌幹細胞集団を分離する。

(3) それらの癌幹細胞集団の免疫細胞に対する感受性や免疫機能に与える影響について *in vitro*, *in vivo* (腫瘍モデルマウス) の両面から解析し、癌幹細胞集団における Nanog 遺伝子発現と癌幹細胞の免疫回避能力との間の相関について明らかにし、ChIP seq を用いてその機構を解明する。

4. 研究成果

(1) 癌幹細胞を豊富に含む細胞集団を分離するため、ヒト乳癌細胞 MDA-MB231 細胞において CD44⁺CD24⁻の細胞集団を抗 CD44 抗体、抗 CD24 抗体を用いた磁気ビーズによる MACS によって幹細胞集団を分画した。また multi-well plate を用いた限界希釈法で癌細胞 1 個からスフェア形成をさせる方法により cancer initiating cell (CIC) を得ることができる。そこでヒト去勢抵抗性前立腺癌細胞の PC3, DU145 細胞の CIC を分離した。ヒト前立腺癌細胞株 DU-145 細胞を通常の培地で培養した場合の接着細胞 (Adherent:AD) とスフェア形成を起こさせる条件で培養した場合のスフェア (Sphere: SP) の比較では、SP に癌幹細胞様集団が豊富に含まれ、また Nanog の発現が高い。これら癌幹細胞集団における Nanog の発現を RT-PCR, Western blot で定量したところ、非癌幹細胞集団に比較して、Nanog

の高発現が認められた。癌細胞が免疫細胞によって認識される分子や免疫細胞の機能に影響を与える分子について、分離した癌幹細胞集団と、コントロール集団との間で発現レベルを比較したところ、ICAM-1 の発現が有意に低下していることが明らかになった。ICAM-1 の発現を AD と SP で比較すると、AD では高く、SP では低いことがわかった。

(2) ICAM-1 は NK 細胞によって認識され NK 細胞感受性にかかわっているため、マウス脾臓より分離した NK 細胞を、カルセインを取り込ませた癌幹細胞集団にかけて、カルセインの放出により細胞死を判定したところ、癌幹細胞集団は非幹細胞集団に比較して細胞死が抑制されていた。

(3) Nanog shRNA を導入すると NK 細胞感受性が回復した。一方 DU-145 細胞に GFP-Nanog を強発現させたところ、NK 細胞感受性が低下した。Nanog shRNA を導入した DU-145 細胞を SCID マウスに移植するとコントロール shRNA 導入群と比較して、腫瘍形成能が低下した。

(4) そこで AD と SP 細胞を SCID マウスの皮下に移植した。それぞれ左、右背部に 50 万個ずつ注入した。一方のマウスには、NK 細胞を抑制する anti-asialo GM1 antibody を、もう一方には Control IgG を腹腔内投与した。その結果、移植後 30 日で腫瘍形成が起こり始める。Control IgG 投与群では、SP は腫瘍増殖が促進され大きな腫瘍を形成したが、AD は腫瘍形成が起こらなかった。Anti-asialo GM1 antibody 投与群では、AD, SP とも腫瘍形成が起こり腫瘍容積には有意差がなかった。このように、Nanog の発現が高く ICAM-1 の発現が低い癌細胞は腫瘍形成が促進されるが、NK 細胞を抑制すると Nanog 発現に関わらず腫瘍形成が起こる。以上のことから、Nanog が NK 細胞に

対する癌細胞の感受性を低下させることにより腫瘍形成を促進していると考えられる。

(5) 次に GFP-Nanog 強発現 DU-145 細胞を移植した場合は、腫瘍形成が促進した。Nanog shRNA 導入の DU-145 細胞を SCID マウスの皮内に移植して腫瘍形成を起こさせる実験において、ICAM-1 の抗体を投与すると腫瘍形成が促進された。以上のことから、癌幹細胞分画では Nanog の発現より ICAM-1 の発現が低下し、これにより NK 細胞による癌細胞死誘導が抑制されていることが明らかになり、癌幹細胞の抗腫瘍免疫抵抗性の機構の一端が解明された。

このように Nanog により ICAM-1 の発現が抑制され、NK 細胞感受性が低下することが明らかになったが、その分子機構を解明する必要がある。

(6) そこで Nanog の ICAM-1 promoter 部位への結合サイトを明らかにするために ChIP-seq を行った。4 つの予想される Nanog 結合サイトのうち、2 つに Nanog が結合した。さらになぜ Nanog 結合が ICAM-1 発現抑制にかかわるのかを明らかにするため、ヒストンアセチル化酵素やヒストン脱アセチル化酵素の Nanog 結合サイトへのリクルートの状況を ChIP seq. を施行して解析した。ヒストン脱アセチル化酵素は何れの Nanog 結合サイトにもリクルートされなかった。一方、ヒストンアセチル化酵素の p300 は Nanog が結合することによって、1 つのサイトへの結合が阻害された。もう 1 つのサイトには Nanog の有無にかかわらず結合しなかった。

(7) 前立腺癌の臨床サンプルを用いて、Nanog と ICAM-1 の発現の逆相関があるかどうかを調べた。Nanog の陽性の腫瘍部位では、ICAM-1 の発現が低く、ICAM-1 陽性の腫瘍部位では逆に Nanog の発現が抑制されていた。ICAM-1 の発現が高いと 5 年生存率も延長し、Nanog の発現が高いがん患

者は生存率も低いことが明らかになった。

(8) 腫瘍が転移するときには、少数の癌細胞が血液中を流れて遠隔部位に届き、生着する。しかしそのときには免疫系、特に NK 細胞によって排除されることが考えられる。キラー T 細胞による認識は腫瘍抗原の提示を抑制して対応していると考えられるが、NK 細胞への対応は不明であった。今回の実験結果から、癌幹細胞様の集団が Nanog を強く発現して ICAM-1 の発現を低下させ、NK 細胞からの攻撃を抑制していることが推測され、癌幹細胞がなぜ再発や転移を起こすと考えられているのかという疑問への 1 つの回答を与えることができたと考えられる。

< 引用文献 >

1. Kawamura, N., Nimura, K., Nagano, H., Yamaguchi, S., Nonomura, N. and **Kaneda, Y.** CRISPR/Cas9-mediated gene knockout of NANOG1 and NANOGP8 leads to low malignant potential in prostate cancer. *Oncotarget*, Sep 8;6(26):22361-74, 2015.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Sumin, L., Nishikawa, T., **Kaneda, Y.** Inactivated Sendai Virus Particles upregulate cancer cell ICAM-1 expression with enhancing NK cell sensitivity on cancer cell. *Cancer Science* 108(12):2333-2341, 2017. doi: 10.1111/cas.13408.

Lee C-H, Nishikawa, T., **Kaneda, Y.** *Salmonella* mediated the hemagglutinating virus of Japan-envelope transfer suppresses tumor growth. *Oncotarget* 8(21):35048-35060, 2017. doi:

10.18632/oncotarget.17037.

Fujita, K., Nakai, Y., Kawashima, A.,
Ujike, T., Nagahara, A., Uemura, M.,
Miyagawa Y., Lee, C-M., Inoue, T.,
Kaneda, Y., Nonomura, I. Phase I/II
clinical trial to assess safety and efficacy
of intratumoral and subcutaneous
injection of HVJ-E to castration resistant
prostate cancer patients. Cancer Gene
Ther., 24(7):277-281, 2017. doi:
10.1038/cgt.2017.15.

〔学会発表〕(計 4件)

Clinical trials for the treatment of
intractable cancers using HVJ
envelope (HVJ-E). 口頭発表(シンポ
ジウム) **Kaneda, Y.**, 第76回日本癌
学会学術総会, 横浜, 2017年9月30
日、国内

Current status and future prospect of gene
therapy in Japan. 口頭発表(理事長講
演) **Kaneda, Y.** 第23回日本遺伝子細
胞治療学会学術集会、岡山、2017年7
月21日、国内

Current status and future prospect of
human gene therapy. 口頭発表(Dawes
lecture)、**Kaneda, Y.** 国際胎児新生児治
療学会2017、大阪、2017年9月3日、
国内

世界の遺伝子治療の現状と展望. 口頭
発表(シンポジウム) **金田安史.**, 日本
人類遺伝学会第62回大会、神戸、2017
年11月18日、国内

〔図書〕(計 1件)

金田 安史 (編集) メディカルドゥ、遺
伝子医学 “今、着実に実り始めた遺伝子
治”、2016、299.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gts/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 安史 (KANEDA Yasufumi)

大阪大学 大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10177537

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()