

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18416

研究課題名(和文)スフィア形成がん細胞の抗腫瘍免疫回避機構の解明

研究課題名(英文)Escaping system from anti-tumor immunity of sphere-forming cancer cell

研究代表者

佐賀 公太郎 (Saga, Kotaro)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00563389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではスフィア形成DU145のNK細胞攻撃回避に関わる遺伝子を同定し、その遺伝子がどのように制御されているかを検討した。スフィア形成DU145はNANOGを高発現していたことから、NANOG過剰発現DU145を樹立した。NANOG過剰発現DU145はICAM1の発現を低下させることでNK細胞からの攻撃を回避していることが明らかとなった。更に、スフィア形成DU145に見られるNK細胞攻撃回避機構はICAM1過剰発現によって消失した。したがって、スフィア形成DU145はNANOG高発現によってICAM1発現低下を誘導し、NK細胞からの攻撃を回避していることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In this research, it was investigated a mechanism of escaping system from NK cell attack in sphere-forming prostate cancer cells. Sphere-forming prostate cancer cells (DU145 and PC3) highly expressed NANOG, therefore NANOG-overexpressing DU145 was generated. It was revealed that NANOG-overexpressing DU145 escaped from NK cell attack by ICAM1 downregulation. Moreover, the escaping ability from NK cell attack of sphere-forming DU145 was inhibited by ICAM1 overexpression. Therefore, it was revealed that sphere-forming DU145 had escaping system from NK cell attack by NANOG overexpressing-mediated ICAM1 downregulation.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：sphere-forming cancer

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織は性質の異なる雑多ながん細胞の集団で構成されているが、もとは一つのがん化した細胞から形成されている。近年、腫瘍形成能を示すがん細胞を「がん幹細胞」と呼び、がんの初期発生、転移、治療後の再増殖などに関連していると考えられている。腫瘍組織は免疫抑制性の宿主由来細胞（制御性 T 細胞、腫瘍関連マクロファージ、骨髄由来免疫抑制細胞、がん関連繊維芽細胞など）の取り込み、種々のサイトカイン分泌、エクソソーム放出など、抗腫瘍免疫を抑制する環境を構築することで腫瘍内がん細胞を保護している。しかし、一つのがん幹細胞が腫瘍組織を形成し、抗腫瘍免疫抑制環境を構築するまでの間も宿主免疫システムから逃れる必要がある。したがって、がん幹細胞には特殊な抗腫瘍免疫回避機構が備わっていることが考えられるが、これまでにその機構に関してはあまり報告がない。がん幹細胞の抗腫瘍免疫回避機構が明らかとなれば、今後の効果的ながん免疫療法の開発につながると思われる。

2. 研究の目的

接着性がん細胞を無血清培地中・非接着条件下で培養するとスフィアを形成する。スフィア形成がん細胞は SCID マウスや NOD/SCID マウスなどの免疫不全マウスへの移植において高い腫瘍形成能を示すことから、がん幹細胞様の性質を示す細胞を多く含むと考えられている。これらの免疫不全マウスには NK 細胞活性が残存していることから、スフィア形成がん細胞は腫瘍を形成するために NK 細胞からの攻撃回避機構を獲得していることが考えられる。実際、スフィア形成前立腺癌細胞株 (DU145) と接着培養 DU145 を SCID マウス背部皮内に移植すると、スフィア形成 DU145 のみが効率的に腫瘍を形成するが、NK 細胞を抑制するとスフィア形成 DU145、接着培養 DU145 のどちらも腫瘍を形成した。この結果は、DU145 がスフィア形成によって NK 細胞からの攻撃を回避する能力を獲得したことを示唆するが、その分子メカニズムは不明である。本研究ではスフィア形成 DU145 における NK 細胞攻撃回避に関わる遺伝子を同定し、その遺伝子がどのように制御されているかを検討する。

3. 研究の方法

これまでに、前立腺癌を含む様々ながん幹細胞において多能性関連転写因子 (NANOG、OCT3/4、SOX2 など) の発現が確認されており、これらの因子ががん幹細胞様特性の付与に関連していると報告されている。実際に、スフィア形成 DU145 において NANOG の発現量が接着培養細胞群よりも著しく増加

していることを確認した。これらの知見より、スフィア形成がん細胞は NANOG などの遺伝子発現が亢進することによってがん幹細胞様の性質を示し、それによって NK 細胞からの攻撃を回避する特殊な機構を獲得していると考えた。本研究では NANOG を過剰発現させた前立腺癌細胞株を樹立し、その NK 細胞攻撃回避機構を解明する。

4. 研究成果

NANOG 過剰発現前立腺癌細胞株の作製とその NK 細胞抵抗性の検討

前立腺癌細胞株 (DU145、PC3) に GFP、または GFP-NANOG (GN) を恒常的に過剰発現させた組換え細胞株 (GFP-DU145、GN-DU145、GFP-PC3、GN-PC3) を樹立した (図 1)。

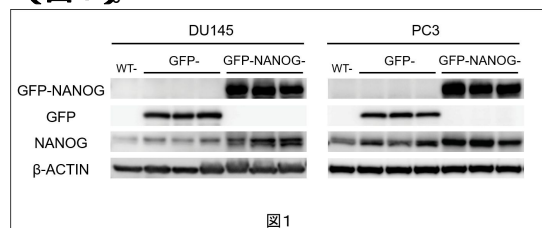


図 1

各過剰発現細胞株、及びそれぞれの親株を NK 様細胞 (MTA) と共培養し、48 時間後の各細胞の生存率を検討した。その結果、DU145、PC3 共に、親株及び GFP 過剰発現細胞株と比較して GN 過剰発現細胞株は高い生存率を示した (図 2)。さらに、NK 細胞中和抗

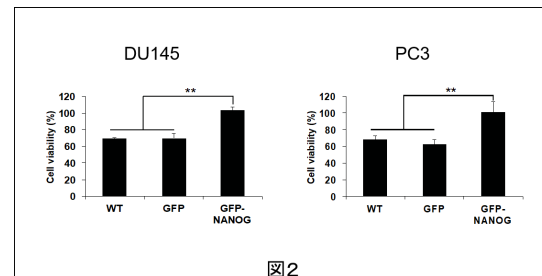


図 2

体 (抗シアロ GM1 抗体) または非特異的抗体を投与した SCID マウスの背部皮下に接着培養 GFP-、及び GN-DU145 を移植すると、非特異的抗体投与群において GFP-DU145 は腫瘍を形成できなかったのに対し、GN-DU145 は腫瘍形成能を示した (図 3)。一方、NK 細胞中和抗体投与群においては GFP-、GN-DU145 共に腫瘍を形成した (図 3)。

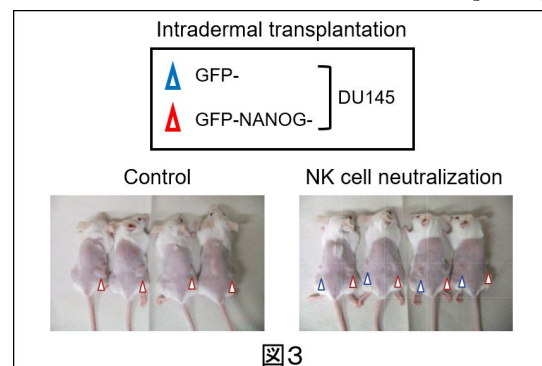


図 3

これらの結果より、NANOG 過剰発現 DU145 はスフィア形成と同様に NK 細胞攻撃回避能を示すことが示唆された。

NANOG 過剰発現前立腺癌細胞株の NK 細胞攻撃回避機構に関わる遺伝子の検討

WT、GFP-、GN-DU145 における NK 細胞抑制因子と NK 細胞活性化因子の遺伝子発現を定量 PCR 法で検討した結果、GN-DU145 で特異的に ICAM1 の発現が低下していることを明らかとした (図4左)。更に、タンパク質レベルでも GN-DU145 における ICAM1 の発現低下が確認された (図4右) これらの結果から、GN-DU145 の NK 細胞攻撃回避機構に ICAM1 の関与が示唆された。

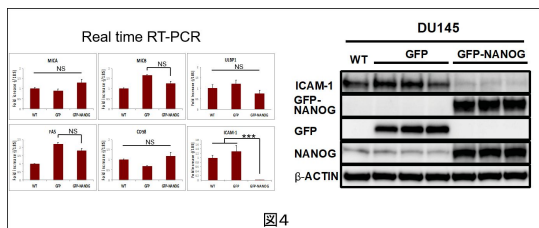


図4

WT、GFP、GN-DU145 及び -PC3を MTA と共培養し、同時に抗 ICAM1 抗体、または非特異的抗体を培地に投与した。その結果、DU145、PC3 のどちらの細胞株においても、WT、GFP 群において抗 ICAM1 抗体投与によって生存率が増加した (図5)。しかし、GN 群においては生存率の変化はなかった (図5)。次に、ICAM1 過剰発現 GN-DU145

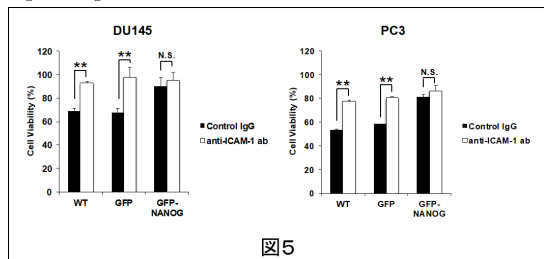


図5

(ICAM1/GN-DU145) を作製し、MTA と共培養すると、GN-DU145 と比較して生存率は著しく減少した (図6)。さらに、NK 細胞

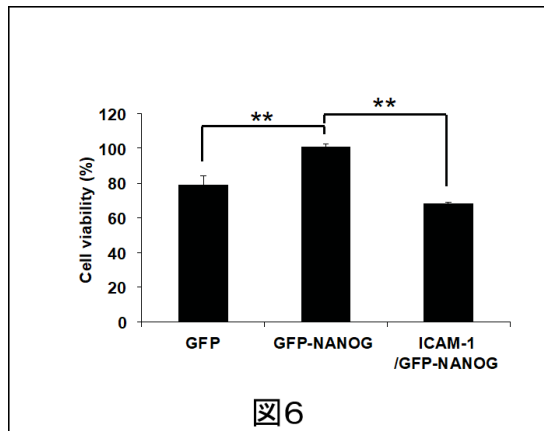


図6

中和 SCID マウス、及びその対照群の背部皮内に GN-DU145 及び ICAM1/GN-DU145 を移植すると、NK 細胞中和群ではどちらの細

胞も腫瘍を形成するが、対照群では ICAM1/GN-DU145 は腫瘍を形成できなかった (図7)。これらの結果から、GN-DU145

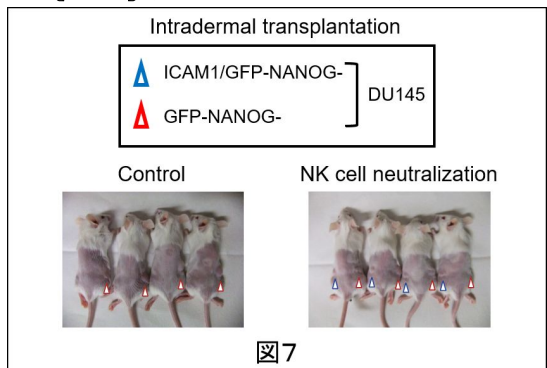


図7

の NK 細胞攻撃回避には ICAM1 発現低下が重要であることが示された。

スフィア形成 DU145 の NK 細胞攻撃回避機構における ICAM1 関与の検討

スフィア形成 DU145 が GN-DU145 と同様の機構によって NK 細胞攻撃を回避するのかを検討した。スフィア形成 DU145 を FACS によって ICAM1 低発現細胞集団と高発現細胞集団に分離・回収し、それぞれの細胞集団における NANOG 発現を検討した。その結果、スフィア形成 DU145 の ICAM1 低発現細胞集団は高発現細胞集団と比較して NANOG 発現量は増加していた (図8)。次

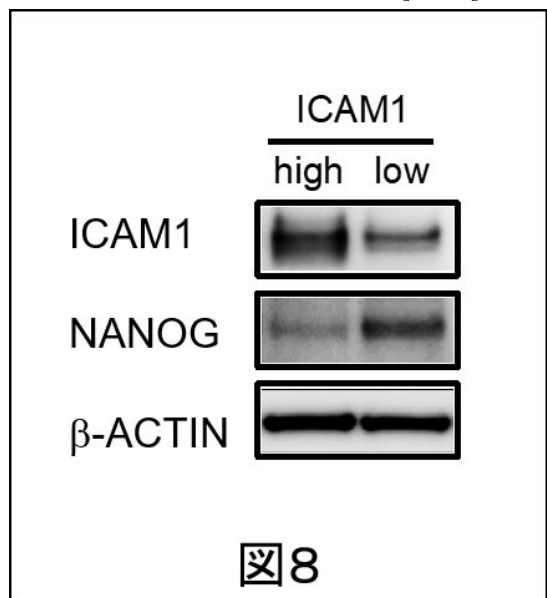


図8

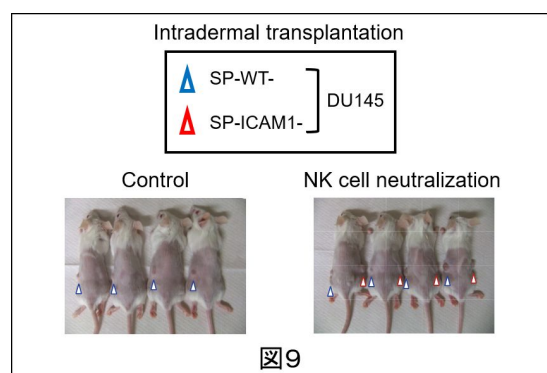


図9

に、ICAM1 過剰発現 DU145(ICAM1- DU145) を作製し、WT- 及び ICAM1-DU145 のスフィア形成細胞 (SP-WT-, SP-ICAM1- DU145) を作製した。各スフィア形成 DU145 を NK 細胞中和 SCID マウス、及びその対照群の背部皮内に移植すると、NK 細胞中和群においてはどちらの細胞も腫瘍を形成した(図9)。しかし、対照群においては SP-ICAM1-DU145 は腫瘍形成能を示さなかった(図9)。以上より、スフィア形成 DU145 は NANOG 高発現によって ICAM1 発現低下を誘導し、NK 細胞からの攻撃を回避していると考えられる。

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

発表者：佐賀公太郎

発表標題：NANOG expression induces NK cell resistance in human prostate cancer

学会名：第76回日本癌学会学術総会

発表年月日：2017年9月28日

発表場所：パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 0件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐賀 公太郎 (Saga Kotaro)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00563389

(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

()