

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09363

研究課題名(和文) 下咽頭がんにおける新規Tumor initiating cellの治療応用

研究課題名(英文) The tumor initiating cell as a new therapeutic target for hypopharyngeal cancer.

研究代表者

望月 麻衣 (Mochizuki, Mai)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん幹細胞研究部・研究員

研究者番号：40726303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、独自にバキュロウイルス発現系を用いてCD271タンパク抗原を作成し、マウスへ複数回免疫することで、独自のCD271抗体を産生するハイブリドーマを得た。抗体をヒト化し、免疫不全マウスに移植した腫瘍にヒト免疫細胞とともに投与したところ、腫瘍抑制効果が確認できた。また、申請者らは下咽頭がんだけでなく、肺扁平上皮がんにおいてもCD271ががんの悪性化・増殖に寄与する分子であり、これを抑制することで腫瘍抑制効果が得られることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、従来有望な治療標的に乏しかった下咽頭がんにおいて、CD271を標的とした治療が有望であることを、独自に作成した抗体でin vitroおよびin vivoの両面で示したものである。さらに、申請者らは下咽頭がんと異なる臓器である肺から発生する扁平上皮がんにおいても、CD271が同様にがんの悪性化に寄与することを示し、CD271が下咽頭がんのみならず他の扁平上皮がんでも広く治療標的となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：An anti-CD271 antibody by immunized recombinant protein to mice was newly established to develop a CD271 therapeutic antibody. The antibody was humanized, and the anti-tumor effort of humanized-CD271 monoclonal antibody in the cancer graft model in mice was investigated, resulting in tumor decrease.

We also reported that CD271 is a tumor formation marker and correlates with poor prognosis in human lung squamous cell carcinoma (LSCC). We established LSCC cell lines and CD271-knockdown cells using siRNA to elucidate the role of CD271 in LSCC. We determined that CD271-knockdown suppressed tumor formation and cell proliferation in LSCC.

研究分野：腫瘍学

キーワード：頭頸部がん 下咽頭がん がん幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

今日、がん患者の割合は増加しており、有効な治療法の確立されていない難治性がんにおける新規治療標的となる分子の同定・および治療法の開発は重要な課題である。申請者らはこれら難治性がんの中でも、予後・QOLの不良である下咽頭がんに焦点を当てて研究を進めてきた。申請者らは、有効な治療標的を同定するため、下咽頭がんの臨床検体を用いて、免疫不全マウスにおける造腫瘍能を指標に細胞表面マーカーのスクリーニングを行い、神経成長因子の受容体である CD271 を見出した。がん組織における CD271 の発現強度は患者予後と相関し、また大部分の下咽頭がん症例は CD271 陽性細胞と陰性細胞がヘテロに存在しているが、マウス皮下において腫瘍を再構築できたのは CD271 陽性細胞のみであった。このことから、CD271 陽性細胞は下咽頭がんの Tumor initiating cell であると考えられた (*PLoS ONE*, 2013)。さらに、CD271 をノックダウンするとがん細胞の増殖はほぼ停止した。その際、増殖シグナルである pErk の低下および静止期維持に必要な CDKN1C の発現の増加が認められた (*Sci.Rep.*, 2016)。これらの結果から、CD271 は増殖能の亢進/静止期の抑制を行うことによって、Tumor initiating cell としての機能を発揮していることがわかった。

以上のことから、申請者らは CD271 陽性細胞を治療標的とすれば、がん組織全体の縮小が期待できるという仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

下咽頭がん(頭頸部がん)は、近年罹患率の上昇が認められているきわめて悪性度の高いがんである。診断時既に進行がん(ステージ、)である症例が 60%を占め、シスプラチン・5-FU を用いた化学放射線療法でも治療効果の改善に乏しい。近年、セツキシマブが頭頸部がん治療に認可されたが、満足のいく奏効率は得られておらず、下咽頭がん特異的な標的分子の探索は必須である。このため、申請者は予後・QOLの改善を目的として特異的な分子を標的とした治療法の開発を目指すため、本研究を着想した。本研究では、申請者らが独自に発見した下咽頭がん増殖制御分子 CD271 を標的とした新規治療法の確立を目指している。従来不明であった CD271 陽性細胞による腫瘍維持機構を解明し、実際に治療応用を目指す抗 CD271 抗体を作成・評価し、さらなる治療標的を明らかとするための下流機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

本課題では、下咽頭がんにおける CD271 について、

1. がん組織から CD271 陽性細胞を除去することで、腫瘍縮小効果が得られるかの検証
2. CD271 抗体を作成し、腫瘍縮小効果が得られるかの検証
3. これまで不明である下咽頭がんにおける CD271 の下流機構の解明を行い、治療標的としての妥当性を検証する。

### 4. 研究成果

1)バキュロウイルス発現系にて作成したリコンビナント CD271 タンパクを免疫元とし、これをマウスに複数回免疫することで、独自に CD271 抗体発現ハイブリドーマを作成した。ハイブリドーマ上清をスクリーニングし、十分な抗原認識能を有する抗 CD271 抗体を産生する株を得た。続いて、この抗体のヒト化を行った。ヒト化した抗体は、まず *in vitro* で下咽頭がんなどの CD271 発現細胞株を用いて ADCC 活性を評価した。続いて、免疫不全マウス皮下に移植した下咽頭がん、メラノーマなどの CD271 発現腫瘍について、ヒト化 CD271 抗体およびヒト PBMC の投与を行い、腫瘍の抑制効果を検証した。これらの実験の結果、ヒト化 CD271 抗体および PBMC を投与した腫瘍部において、CD271 陽性分画の減少が確認され、また、腫瘍抑制効果も認められた。また、私たちが作成した CD271 抗体産生ハイブリドーマのうち、別クローンについて種々のアッセイを検証したところ、非常に高い親和性を有し、免疫染色・ウェスタンブロッティングにおいて腫瘍細胞の CD271 発現確認に有用であるクローンを得た。

これらの結果は、*Cancer Letters*, 2019 および *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy* 2020 に報告した。

2) 私たちは、ヒト肺がん患者検体について、CD271 とがんの悪性度について検証を行った。その結果、同じ肺由来でも、肺腺がんではほとんどの検体で CD271 の発現は認められず、肺扁平上皮がんにおいて CD271 の発現が予後と相関していることを見出した。また、肺扁平上皮癌において CD271 は機能的に細胞増殖を制御する分子であり、これをノックダウンすることで顕著に腫瘍形成能が低下することがわかった。さらに、CD271 の発現はがんの転移・浸潤の指標となる胸膜浸潤とも相関しており、肺扁平上皮がん細胞株において CD271 をノックダウンすると、細胞遊走能が明らかな低下を示した。これは、CD271 が下咽頭がん同様に Tumor initiating cells のマーカー分子であり、また細胞増殖・浸潤を担う重要な分子であることを示している。

また、私たちは手術検体の免疫染色の結果から、下咽頭がん、肺扁平上皮がんのみならず、他の扁平上皮がんである陰茎がん、外陰がん、食道がんにおいても同様に CD271 陽性細胞は増殖性の細胞を示す Ki67 が陽性であることを確認した。これらの結果から、CD271 は原発の臓器では

なく、扁平上皮がんという病理学上分類される組織において共通した治療標的となる可能性が示された。

これらの結果は、*Laboratory Investigation*, 2019 に報告した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Morita Shinkichi, Mochizuki Mai, Shibuya-Takahashi Rie, Nakamura-Shima Mao, Yamazaki Tomoko, Imai Takayuki, Asada Yukinori, Matsuura Kazuto, Kawamura Sadafumi, Yamaguchi Kazunori, Yasuda Jun, Sugamura Kazuo, Katori Yukio, Satoh Kennichi, Tamai Keiichi	4. 巻 39
2. 論文標題 Establishment of a Monoclonal Antibody That Recognizes Cysteine-Rich Domain 1 of Human CD271	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 6~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2019.0040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mochizuki Mai, Nakamura Mao, Sibuya Rie, Okazaki Toshimasa, Abe Jiro, Nakagawa Takayuki, Takahashi Satomi, Yamazaki Tomoko, Imai Takayuki, Takano Atsushi, Ito Hiroyuki, Yokose Tomoyuki, Miyagi Yohei, Daigo Yataro, Sato Ikuro, Satoh Kennichi, Sugamura Kazuo, Yamaguchi Kazunori, Tamai Keiichi	4. 巻 99
2. 論文標題 CD271 is a negative prognostic factor and essential for cell proliferation in lung squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1349~1362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0246-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morita Shinkichi, Mochizuki Mai, Wada Kouichi, Shibuya Rie, Nakamura Mao, Yamaguchi Kazunori, Yamazaki Tomoko, Imai Takayuki, Asada Yukinori, Matsuura Kazuto, Sugamura Kazuo, Katori Yukio, Satoh Kennichi, Tamai Keiichi	4. 巻 461
2. 論文標題 Humanized anti-CD271 monoclonal antibody exerts an anti-tumor effect by depleting cancer stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 144~152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2019.07.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujisaka Yasuyuki, Iwata Tomoaki, Tamai Keiichi, Nakamura Mao, Mochizuki Mai, Shibuya Rie, Yamaguchi Kazunori, Shimosegawa Tooru, Satoh Kennichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Long non-coding RNA HOTAIR up-regulates chemokine (C2C motif) ligand 2 and promotes proliferation of macrophages and myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma cell lines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 509-514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2017.7322	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimoyama Yusuke, Tamai Keiichi, Shibuya Rie, Nakamura Mao, Mochizuki Mai, Yamaguchi Kazunori, Kakuta Yoichi, Kinouchi Yoshitaka, Sato Ikuro, Kudo Akira, Shimosegawa Tooru, Satoh Kennichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Periostin attenuates tumor growth by inducing apoptosis in colitis-related colorectal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 20008-20017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okazaki Toshimasa, Tamai Keiichi, Shibuya Rie, Nakamura Mao, Mochizuki Mai, Yamaguchi Kazunori, Abe Jiro, Takahashi Satomi, Sato Ikuro, Kudo Akira, Okada Yoshinori, Satoh Kennichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Periostin is a negative prognostic factor and promotes cancer cell proliferation in non-small cell lung cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 31187-31199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25435	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Abe Jiro, Tanuma Nobuhiro, Nomura Miyuki, Ito Shin, Kasugai Isao, Sato Ikuro, Tamai Keiichi, Mochizuki Mai, Yamaguchi Kazunori, Shima Hiroshi, Okada Yoshinori, Yasuda Jun	4. 巻 522
2. 論文標題 Novel activating KRAS mutation candidates in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 690 - 696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tamai Keiichi, Nakamura-Shima Mao, Shibuya-Takahashi Rie, Kanno Shin-Ichiro, Yasui Akira, Mochizuki Mai, Iwai Wataru, Wakui Yuta, Abue Makoto, Yamamoto Kuniharu, Miura Koh, Mizuma Masamichi, Unno Michiaki, Kawamura Sadafumi, Sato Ikuro, Yasuda Jun, Yamaguchi Kazunori, Sugamura Kazuo, Satoh Kennichi	4. 巻 10
2. 論文標題 BEX2 suppresses mitochondrial activity and is required for dormant cancer stem cell maintenance in intrahepatic cholangiocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78539-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Mai Mochizuki, Shinkichi Morita, Kazunori Yamaguchi, Kazuo Sugamura, Keiichi Tamai
2. 発表標題 CD271 is an essential regulator for cell proliferation in squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月麻衣、森田真吉、今井隆之、山口壹範、菅村和夫、玉井恵一
2. 発表標題 神経成長因子受容体CD271は扁平上皮がんの増殖制御因子である
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月麻衣、森田真吉、今井隆之、山口壹範、菅村和夫、玉井恵一
2. 発表標題 神経成長因子受容体CD271は扁平上皮癌の増殖を制御する
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 3. 望月麻衣、中村真央、渋谷莉恵、山口壹範、佐藤賢一、菅村和夫、玉井恵一
2. 発表標題 肺扁平上皮癌の増殖はCD271依存性である
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 4. Mai Mochizuki, Mao Nakamura, Rie Shibuya, Kazunori Yamaguchi, Kazuo Sugamura, Kennichi Satoh, Keiichi Tamai
2. 発表標題 Lung squamous cell carcinoma exclusively depends on CD271 for cell proliferation.
3. 学会等名 Mechanisms & Models of cancer (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今井 隆之 (Takayuki Imai)  (80408583)	地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん幹細胞研究部・特任研究員  (81303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------