

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月7日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791087

研究課題名（和文） 悪性黒色腫幹細胞を標的とした免疫治療法の開発

研究課題名（英文） Development of immunotherapy targeting melanoma stem cells.

研究代表者

松下 麻衣子（MATSUSHITA MAIKO）

慶應義塾大学・薬学部・講師

研究者番号：10327520

研究成果の概要（和文）：我々は、悪性黒色腫の Side Population(SP)分画に癌幹細胞様の性質を持つ集団が濃縮されていることを示してきた。本研究では、この癌幹細胞様集団が低酸素環境下において示す遺伝子変化を解析するとともに、癌幹細胞様集団に特異的に発現する癌精巣抗原に対する抗体が患者血清中に存在することを示した。さらに、この癌精巣抗原に由来する HLA-A*2402 拘束性ペプチドの同定に成功した。以上の結果は、悪性黒色腫患者に対する癌幹細胞を標的とした新規免疫治療法の開発の重要な基礎データになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have previously isolated melanoma-stem cell like population in Side Population (SP). In this study, we analyzed genes expressed by hypoxia in those SP cells. We also found antibodies against novel cancer testis antigen specifically expressed by melanoma SP cells in melanoma patients. In addition, we have identified HLA-A*2402-restricted peptide in this cancer testis antigen. These results will be useful for development novel immunotherapy targeting cancer stem cells in melanoma patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成23年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚腫瘍学、癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

各種癌において、高い腫瘍形成能、自己複製能、化学療法抵抗性などを持つ癌幹細胞 (cancer stem cell) が報告され、この癌幹細胞を標的とした治療法を開発することが癌の根治に不可欠であると考えられている。さらに、癌幹細胞と免疫細胞との相互作用や免疫療法への反応性については検討されていない。我々は、悪性黒色腫の癌幹細胞様集団と免疫細胞との相互作用を明らかにするため、これまでに悪性黒色腫細胞株を用いて、Side Population (SP) に癌幹細胞様性質を持つ集団が濃縮される可能性について検討した。SP は Hoechst 色素排出能の高い集団であり、造血幹細胞や各種癌幹細胞様集団を濃縮する方法として広く用いられている。悪性黒色腫細胞株から分離した SP と non-SP (NSP) 分画の性質を比較したところ、SP からは SP、NSP の両方が増殖するが、NSP からは NSP のみが増殖する非対称性増殖を示し、また、SP は NSP に比べ様々な抗がん剤に対して高い体制を示した。さらに、NOD/Shi-*scid*、IL-2R^{null}(NOG)マウスでの *in vivo* 腫瘍形成能も、NSP に比べて SP で高かった。さらに、間葉系細胞への多分化能も SP に高く、これらのことから SP に癌幹細胞様分画が濃縮されていると考えられた。

GeneChip による SP、NSP の遺伝子発現比較から、NSP に比べて SP で発現が高い遺伝子の中に、精巣以外の正常組織に発現しないものを探した結果、3 種類の新規癌精巣抗原を同定した。いずれの遺伝子も悪性黒色腫細胞株に高頻度に発現しているが、機能は不明である。これらの抗原には、日本人に多い HLA-A*2402 に提示されるペプチド候補配列が複数存在する。

一方、我々が分離した SP には癌幹細胞のマーカーとされてきた CD133 の発現は認められない。これまでに、膀胱癌細胞株を低酸素環境におくと CD133 が発現誘導されるという報告があり、生体内の癌微小環境での性質が *in vitro* と異なることが示唆されている。従って、SP を低酸素環境やマウス生体内で生着させた状態で発現する遺伝子から、生体内での癌幹細胞様集団を単離するために有効なマーカーや治療標的分子が新たに明らかになる可能性がある。

また、癌組織には間葉系幹細胞や筋線維芽細胞などが集積して間質を形成し、癌の悪性化に関わっている。SP は NSP に比べて生着後に間質を多く含む傾向を持ち、間質細胞は免疫抑制分子の放出などにより免疫抑制に

働く。SP が間質細胞の集積を助ける分子や免疫抑制責任分子を解明すれば、その発現抑制により抗腫瘍免疫を増強できる可能性がある。

以上のように、癌幹細胞、免疫細胞、間質細胞の三者の相互作用を解明することは、より効果的な癌免疫治療法を開発する上で重要であると考えられる。

2. 研究の目的

我々は、悪性黒色腫 SP に癌幹細胞様集団が濃縮されること、この集団は免疫抵抗性をもつことを示し、SP に高発現する新規癌精巣抗原を同定してきた。本研究では、生体内での真の癌幹細胞様集団を単離するマーカーおよび抗体や T 細胞によって攻撃する効果的な治療標的を探索するとともに、癌幹細胞、免疫細胞、間質細胞の 3 者の相互作用の解析から癌微小環境を抗腫瘍免疫に適した環境に改善する手段を開発することによって、より効果的な癌免疫治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 生体内での癌幹細胞様集団のマーカーと治療標的分子の探索

SP と NSP を低酸素濃度で培養した場合、または HIF-1 α の活性型を過剰発現させた場合の遺伝子発現を DNA chip 解析で明らかにする。さらに、PKH26 または PKH67 で標識した SP、NSP をマウス生体内で生着させた後、遺伝子発現を解析することにより、生体内での癌幹細胞様集団を単離するマーカーや治療標的となる発現分子を明らかにする。

(2) 癌幹細胞様集団の治療標的分子の抗原性評価、特異的 CTL 誘導および機能解析

癌幹細胞様性質をもつ SP に高発現する新規癌精巣抗原についてリコンビナント蛋白質を作成し、悪性黒色腫患者血清中にそれらを認識する抗体が存在するか western blot により検討する。また、HLA A*0201 および HLA A*24 拘束性に提示されるエピトープ候補ペプチドを合成し、ヒト末梢血単核球から SP を効率よく障害できる細胞障害性 T 細胞 (CTL) の誘導を試みる。さらに、NOG マウスに移植した SP が生着後、*ex vivo* で誘導した特異的 CTL を移入し、SP から派生した癌細胞を CTL がどのように攻撃するかを明らかにする。

(3) 癌幹細胞、間質細胞、免疫細胞の相互作用の解明

マウス悪性黒色腫細胞株とマウス NK 細胞を用いて SP、NSP の NK 感受性を *in vivo*, *in vitro* で比較する。また、ヒト癌細胞の SP、NSP

細胞を SCID マウスに移植した後、脾臓のマウスNK細胞を DX5 抗体で単離して YAC -1 に対する細胞障害活性を測定し、液性因子などによるマウス NK 活性への影響を評価する。さらに、ヒト悪性黒色腫細胞株において NK 感受性規定分子の発現を調節している転写因子の発現量を shRNA で減少させ、NOG マウス内において、ヒト癌細胞 SP に対する移入ヒトNK細胞による細胞障害を増強できるか検討する。

4. 研究成果

(1) 癌微小環境と癌幹細胞の相互作用に関する解析においては、低酸素で働く転写因子 HIF -1 α 及びHIF -2 α の活性化型を作成し、2種類の悪性黒色腫細胞株に遺伝子導入した恒常発現株を作成した。これらはいずれもside population(SP)の顕著な増加、CD133のわずかな増加を示した。また、oct4 promoter領域を悪性黒色腫細胞株からクローニングし、oct4 promoter駆動性にGFP発光するレンチウイルスベクターを作成し、悪性黒色腫細胞株8株に導入した。これらのうち2株は低酸素下での培養によりGFPの発光が認められた。これらの、invitroでの低酸素培養によりGFPの発光が認められた悪性黒色腫細胞株について、side population (SP)を免疫不全マウスに移植し、形成された腫瘍からGFP陽性細胞をソーティングによる回収を試みたが、GFP陽性細胞を検出できなかった。そこで、oct4 promoterとGFP遺伝子の接続部分に変更を加えるとともにレンチウイルスのMOIを増加させたところ低酸素培養時のGFP発光効率を顕著に向上させることができた。また、悪性黒色腫のがん幹細胞集団をモニターできる可能性のある他のレポーターとしてJARID1BとLgr5のpromoter駆動性にそれぞれGFPと異なる波長で発光するレンチウイルスベクターを作成し、oct4レポーターとともに感染させた悪性黒色腫細胞株を作成することに成功した。今後、これを免疫不全マウスに移植し、invivoでの挙動を解析する予定である。

(2) 癌幹細胞様集団の治療標的分子の抗原性評価、特異的CTL誘導および機能解析

SPに発現が高い新規の癌精巢抗原3種類のうち1種類のリコンビナント蛋白質を大腸菌で作成し、悪性黒色腫患者と健常人の血清中に抗体が存在するかどうかを検討した。この遺伝子には長さの異なる2種類の産物が存在したが、短い産物は患者と健常人両方に弱い抗体反応が見られ、長い産物は健常人で抗体反応が認められなかったのに対し、患者の1割程度に抗体が存在し、同抗原が癌患者体内で免疫系に認識されていることが示唆された。

また、悪性黒色腫細胞株のSP分画に高発現する癌精巢抗原3種類のうちKU-MEL9抗原について、日本人に多く見られるHLA A*2402拘束性に提示されるエピトープ候補ペプチドを合成し、健常人ヒト末梢血単核球より、ペプチドをパルスした樹状細胞を用いてSPを効率よく障害できる細胞障害性T細胞(CTL)の誘導を試みた。T細胞を1週ごとに計3回刺激後に、抗原特異性についてELISpot法および細胞傷害試験により検討したところ、1種類の9merのペプチドを用いた系において、抗原特異的CTLを誘導することに成功した。このCTLは、癌抗原を内因性に発現するHLA A*2402陽性メラノーマ患者由来癌細胞を特異的に認識することが細胞傷害試験において証明された。以上の結果は、同ペプチドを用いた癌幹細胞特異的免疫療法を開発する際の重要な基礎的データとなると考えられる。

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2件)

鈴木拓真、松下麻衣子、堤田直也、飯島史朗、塚本信夫、河上裕、松木絵里、岡本真一郎、服部豊；慢性骨髄性白血病(CML)における新規治療標的としてのKU-MEL-9抗原の検討。日本薬学会第132年会、2012年3月29日、札幌市
Maiko Matsushita, Takuma Suzuki, Naoya Tsutsumida, Shiro Iijima, Nobuo Tsukamoto, Yutaka Kawakami, Eri Matsuski, Shinichiro Okamoto, and Yutaka Hattori ; New diagnostic and therapeutic target KU-MEL9 for chronic myeloid leukemia (CML) 米国癌研究学会2012年次総会、2012年4月2日、シカゴ

〔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

松下 麻衣子 (MATSUSHITA MAIKO)
慶應義塾大学・薬学部・講師
研究者番号：10327520

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：