

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640066

研究課題名(和文)免疫学的に正常な個体内で造腫瘍能を発揮する真のがん幹細胞とは何か

研究課題名(英文)What is the authentic tumor initiating cells in healthy mice?

研究代表者

和田 はるか(Wada, Haruka)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師

研究者番号：70392181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍組織中に存在するがん細胞は多様であり、いわゆるがん幹細胞(TIC)のみが腫瘍形成能を有すると考えられている。TICは、主に免疫不全マウスを用いて評価されてきたが、免疫学的に正常な個体で同定する必要がある。我々は、どのようながん細胞が正常個体で造腫瘍能を有するのかを解析した。解析の結果、TICはTIC関連免疫制御因子(TICIF)を産生していることが判明した。TICIFを欠損させたTICは、免疫不全マウスでは腫瘍を形成したが、正常個体では腫瘍を形成しなかった。よって、TICIFを産生するようながん細胞こそが免疫学的に正常な個体内で造腫瘍能を発揮する真のがん幹細胞であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Many kinds of tumor cells include in tumor tissue. Recent research using immune-deficient mice revealed that tumor initiating cells (TIC) only have a potential to form tumor tissue. However, we proposed that we need to identify TIC in immune-healthy body. Such TIC is authentic TIC which we should realistically focused on. We found that TIC secretes TIC-associated immune cell factors (TICIF). TICIF deficient TIC no longer initiated tumor in immune-healthy body but they nevertheless formed tumor in immune-deficient mice. These results indicated that TIC secreting tumor cells are authentic tumor cells in immune-healthy body.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：造腫瘍細胞 がん幹細胞 免疫 がん細胞の特性

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織中に存在するがん細胞は、均一な細胞集団であると長らく考えられていた。しかし近年、腫瘍組織中に存在するがん細胞は多様性に富んでおり、生体に移植した際に腫瘍組織を形成する、いわゆる「がん幹細胞」と、腫瘍組織形成能をもたない細胞の両者が存在することが示されてきた。

がん細胞の造腫瘍能については、主として免疫不全マウスを用いた解析で評価されてきた。例えば、SCID マウスを用いた解析では、ヒト悪性黒色腫細胞中に含まれる造腫瘍能をもつ細胞の割合は、およそ 109 万個中に 1 個と見積もられていた。しかし近年、より重度の免疫不全マウスである NOD-SCID/IL2R γ c ノックアウトマウスを用いた解析が行われ、およそ 9 個中に 1 個が造腫瘍能をもつ細胞として見積もられることが示された (Quintana E, Nature. 2008)。この研究の主題は、単純に「がん幹細胞の存在頻度」についてであったが、がん細胞を移植した個体の免疫学的背景によってがん幹細胞の検出頻度が大きく異なるということが読み取れ、生体内における腫瘍の形成という現象は、がん細胞と免疫細胞の相互作用の結果、免疫細胞による攻撃を免れたがん細胞によりもたらされた事象であると考えられることができる。これまでがん幹細胞の実体については、多くの研究がなされ、CD133をはじめとする様々なマーカーにてがん幹細胞が同定可能とされてきたが、免疫学的に正常な個体内においての「がん幹細胞」について再考する必要がある。

2. 研究の目的

生体内において腫瘍形成能を有するとされるがん幹細胞は、主に免疫不全マウスを用いた解析で同定されてきた。しかし、生体内にてがん幹細胞を接種するとその個体の免疫学的背景次第でその検出頻度は大きく異なることから明らかのように、がん幹細胞と呼ばれるような集団であっても免疫学的に正常な個体内に接種すると腫瘍形成がほとんど見られないケースもある。本研究では、生体内における腫瘍形成という現象をがん細胞と免疫細胞の相互作用の結果と位置づけ、「免疫学的に正常な個体内で造腫瘍能を発揮する真のがん幹細胞とは何であるか」という問題を細胞生物学・分子生物学レベルで解決することを目指す。究極的には、明らかにされた真のがん幹細胞のもつ、免疫学的に正常な個体内での生存メカニズムをもとに、そのメカニズムを標的とする効果的ながん治療法の開発につなげたい。

3. 研究の方法

現在、マウス等の生体に生着させることが可能ながん細胞が世の中に多数出回っているが、一般的には、たとえがん細胞との間で免疫学的背景の一致したマウスであっても、がん細胞を生体に生着させるには通常 $1 \times 10^5 \sim 10^6$ 個といった大量のがん細胞を接種する必要がある。その背景としては、正常個体が備える免疫系によるがん細胞の排除が無縁ではない。造腫瘍能をもつ「がん幹細胞」の研究にあたって、これまで免疫不全マウスが多用されてきたが、本研究では免疫能を有する正常個体において造腫瘍性をもつ真のがん幹細胞を明らかにすることに挑戦する。

がん幹細胞研究を困難にしているのはがん幹細胞集団の僅少性である。私は、その僅少性を打破する材料として人工がん細胞株を用いる (北大・遺伝子病制御研究所、近藤亨教授からの供与)。この人工がん細胞株は、p53 ノックアウトマウスの神経幹細胞に、H-RasL61 を遺伝子導入することで作出した。サブクローニングにより複数株が樹立されたが、各細胞株は *in vitro* では共に類似の増殖性を示すにもかかわらず、Nude マウスや免疫学的に正常な C57BL/6 マウス脳内に接種したところ、ある亜株を接種されたマウスでは脳内に腫瘍が形成され死亡したものの (以下、その亜株を造腫瘍株と呼ぶ)、また別の亜株を接種されたマウスでは腫瘍が形成されず生存し続けた (以下、非造腫瘍株と呼ぶ) (Hide T, Cancer Res. 2009 および未発表データ)。このユニークな細胞材料をさらに免疫学的観点からの研究と組み合わせ、効率よく研究を進める。

(1) 造腫瘍株・非造腫瘍株と免疫細胞の相互作用の詳細な解析 (*in vitro* 解析)

これまでの予備検討で、造腫瘍株・非造腫瘍株と免疫細胞の相互作用性に大きな違いがあることを見出している。どのような細胞種の免疫細胞が造腫瘍株・非造腫瘍株と相互作用するのか、相互作用によりどのような変化が生じるかをそれぞれの細胞を分画するなどして共培養し、その後再回収して、細胞の生死や発現分子の変化をフローサイトメトリーや qPCR により詳細に解析した。

(2) 造腫瘍 - 非造腫瘍株間で発現に差異のみられる細胞表面分子、細胞外分泌分子の遺伝子クローニング/強制発現株の作製および shRNA 発現ベクターの作製/ノックダウン株の作製

がん細胞と免疫細胞の相互作用は主として細胞表面分子、細胞外分泌分子によっておこる。造腫瘍・非造腫瘍細胞で発現する分子を比較したマイクロアレイ解析の結果から、細胞表面分子、細胞外分泌分子に絞って解析し、造腫瘍株で高発現する複数の分子をピッ

クアップした。これらの分子が免疫細胞との作用に係るかを調べるため、造腫瘍株/非造腫瘍株で高発現する遺伝子の強制発現ベクターや、shRNA 発現ベクターを作製し、造腫瘍株・非造腫瘍株に導入して強制発現/発現ノックダウンした細胞株を作製した。

(3)真のがん幹細胞は、免疫学的に正常な個体内で造腫瘍能を発揮するのか？

(2)で作製した強制発現/ノックダウン細胞株を免疫学的に正常なマウス個体および免疫不全マウス個体に接種し、腫瘍の生着や生存期間を観察することで、がん細胞の生着/非生着においての各強制発現/ノックダウンさせた分子の効果を解析し、免疫学的背景の異なる個体内においてがん細胞の生着/非生着にかかわる責任分子を同定した。

4. 研究成果

がん幹細胞 (Tumor initiating cell; TIC) / 非がん幹細胞 (non-TIC; nTIC) と免疫細胞を共培養して解析したところ、TIC/nTIC は自然免疫細胞と異なる相互作用性を有することを見出した。そこで TIC/nTIC の産生する分泌因子のスクリーニングを行い、TIC で高発現する免疫関連因子 (TIC immune factor; TICIF) を同定した。

TICIF をノックアウトした細胞株 (TIC-IFKO) を樹立し、免疫細胞との相互作用性を再度解析したところ、部分的ではあったが、TIC-IFKO の免疫細胞相互作用性は nTIC と類似したものとなった。よって、TIC の有する特徴的な免疫細胞相互作用性は TICIF により担われていることが明らかとなった。

続いて、TIC の産生する TICIF が免疫学的に正常な個体内で造腫瘍性に及ぼす影響を明らかにする目的で、TIC/TIC-IFKO を野生型個体に移植したところ、TIC 移植群では全例死亡したものの、TIC-IFKO 移植群は 100 日を経過しても概ね 90% 以上の個体が生存し続けた。一方で、重度免疫不全マウスにて同実験を施行したところ、両群にて全例が死亡した。これらの結果から、TIC は TICIF を産生することにより、免疫学的に正常な個体内で造腫瘍能を発揮できることが判明した。つまり、TICIF を産生するがん細胞こそが免疫学的に正常な個体内で造腫瘍性を発揮する真のがん幹細胞であることが明らかとなった。

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5件)

Kanda M, Yamanaka H, Kojo S, Usui Y, Honda H, Sotomaru Y, Harada M, Taniguchi M, Suzuki N, Atsumi T, Wada H, Baghdadi M, Seino K, Transcriptional regulator Bhlhe40 works as a cofactor of T-bet in the regulation of IFN- γ production in iNKT cell, PNAS, 査読有, In press

Hayashi E, Hachiya K, Kojo S, Baghdadi M, Takeuchi S, Yamanaka H, Abe H, Wada H, Seino K. α -MSH stimulation contributes to TGF- β 1 production via MC1R-MITF signaling pathway in melanoma cell. Inflammation and Regeneration, 査読有, in press

Muto M, Baghdadi M, Maekawa R, Wada H, and Seino K, Myeloid molecular characteristics of human T cells support their acquisition of tumor antigen-presenting capacity, Cancer Immunology, Immunotherapy, 査読有, in press

Takeuchi S, Baghdadi M, Tsuchikawa T, Wada H, Nakamura T, Abe H, Nakanishi S, Usui Y, Higuchi K, Takahashi M, Inoko K, Sato S, Shichinohe T, Takano H, Hirano S, Seino K. Chemotherapy-derived inflammatory responses accelerate the formation of immunosuppressive myeloid cells in the tissue microenvironment of human pancreatic cancer, Cancer Res, 査読有, 75(13), 2629-40, 2015
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2921.

Baghdadi M, Takeuchi S, Wada H, Seino K. Blocking monoclonal antibodies of TIM proteins as orchestrators of anti-tumor immune response, mAbs (monoclonal antibodies) 査読有, 6(5), 1124-1132, 2014
doi: 10.4161/mabs.32107.

[学会発表](計4件)

Muhammad Baghdadi, Sayaka Nakanishi, Haruka Wada, Ken-ichiro Seino, IL-34 accelerates the formation of immunosuppressive macrophages in chemoresistant tumors, 第44回日本免疫学会、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市) 2015年11月18-20日

武内慎太郎、ムハンマド・バグダーディー、土川貴裕、和田はるか、中村透、七戸俊明、清野研一郎、平野聡、ヒト膵癌微小環境における Myeloid-derived suppressor cells の形成は化学療法により促進される、第 95 回北海道医学大会 第 112 回北海道癌談話会北海道大学（北海道・札幌市）2015 年 9 月 12 日

Muhammad Baghdadi, Sayaka Nakanishi, Haruka Wada, Ken-ichiro Seino, Chemotherapy-induced IL-34 accelerates the formation of tumor associated macrophages (TAMs) in human tumor microenvironment, 第 19 回日本がん免疫学会, 伊藤国際学術研究センター、(東京都・文京区) 2015 年 7 月 9-11 日

和田はるか、第 20 回 脳腫瘍治療研究会、2014 年 11 月 22 日、第一三共株式会社 札幌支店会議室（北海道・札幌市）招待講演

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/Immunobiology-Web/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 はるか (Wada, Haruka)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師

研究者番号：70392181