

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670415

研究課題名(和文)小細胞肺癌の循環腫瘍細胞を根絶する新規抗腫瘍免疫療法の開発

研究課題名(英文)A novel anti tumor immunotherapy to eliminate circulating tumor cells of SCLC

研究代表者

各務 博 (Kagamu, Hiroshi)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：30418686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：DDX3Xという蛋白質を高発現する癌細胞は浮遊で生存することが可能となり、高い浸潤、増殖能を有する癌幹細胞の性質を獲得することを報告してきた。

本研究において、小細胞肺癌を解析した結果、遠隔転移を持つ進展型患者ではDDX3Xを発現している循環腫瘍細胞が存在しており、限局型という遠隔転移のない患者ではDDX3X陽性の循環腫瘍細胞が存在しないことを明らかとした。

また、限局型ではDDX3Xに反応するTリンパ球が存在するのに対して、進展型では認められなかった。以上の結果は、DDX3Xに対する抗腫瘍T細胞免疫が高い転移能を持つDDX3X陽性循環腫瘍細胞を駆逐し、遠隔転移を防いでいることを示した。

研究成果の概要(英文)：We have reported that cancer cells expressing DDX3X possessed ability to proliferate in an anchorage independent manner, and acquired cancer stem cell (CSC)-like characteristics, such as high migration and proliferation activity.

In this study, it was elucidated that cancer cells circulating in peripheral blood of extended stage disease (ED) small cell lung cancer (SCLC) patients expressed DDX3X, but that those of limited stage disease (LD) SCLC did not. On the other hand, T-lymphocytes in peripheral blood of LD-SCLC patients recognized DDX3X and secreted IFN γ , but that T-lymphocytes of ED-SCLC patients could not. In conclusion, it is likely that antitumor T-lymphocytes recognizing DDX3X eliminated DDX3X-positive CSC-like circulating cancer cells and prevented distant metastases.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：小細胞肺癌 循環腫瘍細胞 癌幹細胞 DDX3X

1. 研究開始当初の背景

私達は、抗腫瘍免疫において CD4⁺ effector T 細胞が極めて高い活性を示すことを報告し (Kagamu, H., et al., *J.Immunol*, 1998)、長期間の抗腫瘍効果を保つためには制御性 T 細胞(Treg)との間に effector 優位の CD4⁺T 細胞バランスが必要であることを示した (Hiura, T., Kagamu, H., et al., *J.Immunol*, 2005)。

Small cell lung cancer (SCLC)は進行が早く、極めて転移しやすい肺がんである。検出可能な遠隔転移を持たない限局型と顕性遠隔転移を有する進展型に分けられる。細胞生物学的特性や遺伝子変異などは限局型、進展型で差がないことが示されている。興味深いことに、ランバート・イートン症候群など onco-neural antigen と呼ばれる癌と神経系の共通抗原に対する自己免疫疾患が生じると長期間限局型に止まることが知られており、T 細胞免疫現象が遠隔転移の有無を分けている可能性が示唆されてきた。私達は、SCLC 患者末梢血を検討し CD4⁺ effector T 細胞と Treg 間にシーソー型のバランスを見出した。即ち、遠隔転移を持つ進展型(ED)では Treg が増加しているが、遠隔転移のない限局型(LD)では、逆に CD4⁺ effector T 細胞が増加しており Treg は健常者と同等であった (Koyama, K., Kagamu, H., et al., *Clin Cancer Res*, 2008)。一方、循環腫瘍細胞の多くは CSC としての性質を有していることが報告されている。申請者らは、のプロテオーム解析により DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked (DDX3X)が CD133 を発現するマウスメラノーマ CSC 特異的であることを見出した(Koshio, J., Kagamu, H., et al., *CII*, 2013)。一方、DDX3X は高免疫原性蛋白質であり、DDX3X によるワクチネーションによりメラノーマを退縮させる抗腫瘍 T 細胞免疫を誘導可能であることを明らかにし

ている。

DDX3X は多くのヒト非小細胞肺癌、乳癌、大腸癌由来細胞株で高発現していることを確認しているが、特にヒト小細胞肺癌株に特に高発現していた。

2. 研究の目的

本研究は、小細胞肺癌の循環腫瘍細胞を駆逐する癌幹細胞(CSC)特異的抗腫瘍免疫療法の開発を目的とする。小細胞肺癌について、①循環腫瘍細胞における DDX3X 発現の有無、機能、バイオマーカーとしての意義を明らかにする、②オンコリスバイオファーマ社と共同して第二世代テロメスキャン™を用い、高い精度で循環腫瘍細胞検出を行うとともに、末梢血に DDX3X 反応性エフェクターT細胞が存在するか否か検討する。

3. 研究の方法

- 1) SCLC 患者末梢血 15ml を採取し、オンコリスバイオファーマ研究室において第二世代テロメスキャン™を用い (Fig.1)、GFP 蛍光陽性細胞として末梢血中循環腫瘍細胞を半定量する。小細胞肺癌患者の末梢血循環腫瘍細胞について TelomeScan F35 を用いて検出を試みた。TelomeScan F35 はテロメラーゼ陽性細胞において GFP を発現するよう遺伝子改変されたアデノウイルスであり、不死化細胞である癌細胞はこのウイルス感染によりテロメラーゼを有するため蛍光を発する。

Fig. 1

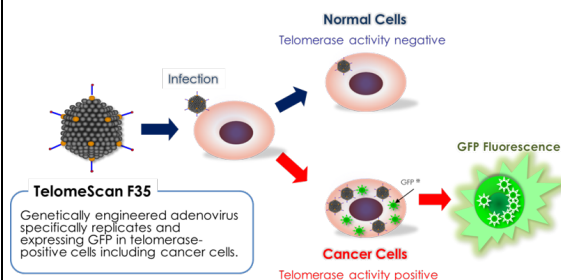
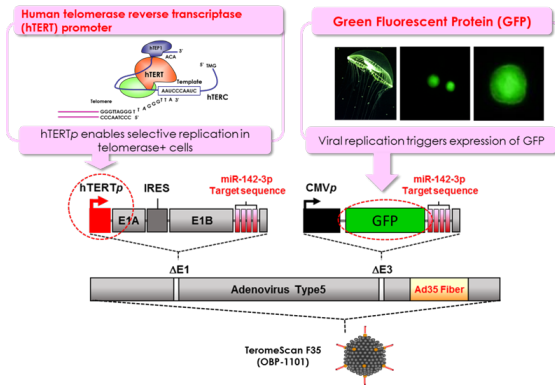


Fig. 2



また、miR-142-3p を組み込むことにより血球系細胞への感染を最小限に抑制している (Fig. 2)。①で得られた循環腫瘍細胞の免疫組織化学的解析を行う。細胞数が少数であることが予想されるため、DDX3X、 β -catenin、CD44、E-cadherin、vimentin を優先的に解析する。

2) SCLC 患者末梢血 T 細胞を用いた解析

- ① Clin Cancer Res に報告した方法を用いて effector CD4⁺ T 細胞と Treg との細胞比率を解析する。CD62L^{low} CD4⁺ T 細胞を effector 型、CD62L^{high} CD25⁺ CD4⁺ T 細胞を Treg とし、フローサイトメトリーにより定量化を行う。
- ② DDX3X 反応 T 細胞の検出: 磁気ビーズを用いて分離した CD62L^{low} CD4⁺ T 細胞、CD62L^{low} CD8⁺ T 細胞を responder 細胞として用いる。stimulator 細胞としては樹状細胞に合成 DDX3X 蛋白質をパルスして用いる。コントロールとして OVA をパルスした樹状細胞を用い、測定した IFN γ 量がコントロールの 1.5 倍以上で $p < 0.05$ の有意差を持っている場合に、反応ありと判定する。

4. 研究成果

1). この系を用いて検討した結果、CD45-GFP+ 循環腫瘍細胞を 14 症例中 6 例で検出した。CellSearch と同様な手法である EpCAM 発現による検出率は、3/14 であり TelomeScan F35 の約半数の症例のみで認められた。EpCAM 陽性循環腫瘍細胞検出例は全て TelomeScan 陽性症例に含まれていた。7.5ml の全血検体から最大 235 個を検出した。臨床病期との関連では、N0-1 症例では検出されなかったのに対して、N2 症例で 40%、N3 症例で 57.1% の検出率であった。遠隔転移を持たない M0 症例では 37.5% に陽性であり、M1 症例では 50% の陽性率であった。DDX3X は、遠隔転移陽性症例の循環腫瘍細胞全てにおいて発現されていた。一方、遠隔転移を持たない限局

No	Stage	GFP+	CD45-(CTC)	EpCAM+ DDX3X+	
				EpCAM+	DDX3X+
1	II a	0	0	0	0
2	III b	0	0	0	0
3	III a	2	0	0	0
4	III a	11	2	0	0
5	IV	3	3	2	2
		3	2	0	1
6	IV	235	235	92	0
		2	2	1	2
7	IV	0	0	0	0
8	III b	1	1	1	0
9	I b	5	0	0	0
10	III a	0	0	0	0
11	IV	1	1	0	1
12	IV	1	0	0	0
13	III b	2	1	0	0
14	IV	4	0	0	0

Clinical Characteristics	GFP+ Total CTC		
	Negative	Positive	Positive rate
N0	1	0	0%
N1	1	0	0%
N2	3	2	40%
N3	3	4	57.1%
M0	5	3	37.5%
M1	3	3	50%
Liver Metastasis+	0	2	100%
Liver Metastasis-	8	4	33.3%

型の小細胞肺癌症例では DDX3X 陽性循環腫瘍細胞は認められなかった。

2). 末梢血中 CD4+ T 細胞が DDX3X に反応して IFN γ を産生するか検討したところ、限局型小細胞肺癌患者 12 症例中 6 例で反応を認めたが、進展型小細胞肺癌患者 7 症例、健康ボランティア 6 例では全く反応を認めなかった。

	No	stage	Age	Gender	DDX3X-responsive T cells
SCLC-LD	1	cT4N3M0	68	F	CD4
	2	pT3N1M0	77	M	CD4
	3	cT \times N1M0	66	M	N.S.
	4	cT3N2M0	33	M	N.S.
	5	cT2bN1M0	78	M	CD4
	6	cT2bN3M0	50	M	N.S.
	7	pT4N2M0	74	M	N.S.
	8	cT4N2M0	64	M	N.S.
	9	pT2aN0M0	66	M	N.S.
	10	cT1bN2M0	59	F	N.S.
	11	cT1N0M0	77	M	CD4 CD8
	12	cT1N1M0	65	M	CD4
	13	pT2aN2M0	64	M	N.S.
	14	cT1bN2M0	79	M	N.S.
	15	cT1aN2M0	66	F	N.S.
	16	pT1aN1M0	64	M	N.S.
	17	cT4N3M0	71	M	N.S.
	18	cT2N2M0	63	M	N.S.

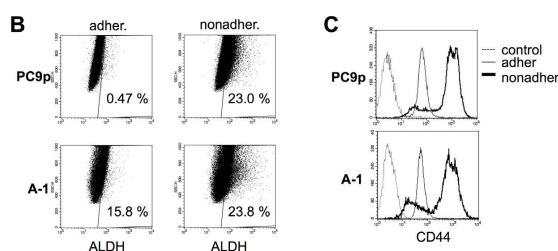
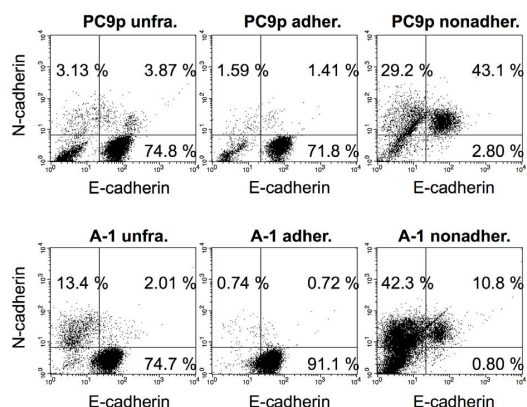
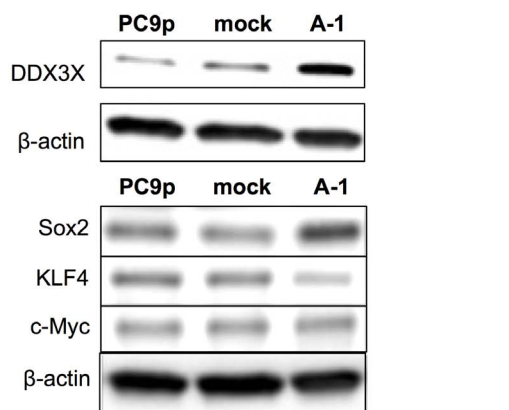
	No	stage	Age	Gender	DDX3X-responsive T cells
SCLC-ED	1	cT4N2M1a	70	M	N.S.
	2	cT2aN3M1b	81	M	N.S.
	3	cT \times N2M1b	53	M	N.S.
	4	cT2aN3M1b	54	M	N.S.
	5	pT2aN0M1b	59	M	N.S.
	6	cT \times N2M1b	69	M	N.S.

DDX3X反応T細胞

6	cure	無
9	cure	無
14	cure	無
15	cure	無
16	cure	無

2	健常人	無
3	健常人	無
10	健常人	無
19	健常人	無
20	健常人	無
24	健常人	無

3). マウスメラノーマ幹細胞に特異的に発現している蛋白質として。肺癌細胞株に DDX3X を遺伝子導入し強制発現させると、非接着性分画が増加しカドヘリンスイッチするなど上皮間葉転換が進む。また、DDX3X により Sox2 が高発現し、ALDH、CD44 など癌幹細胞マーカーのアップレギュレーションが生じることを示してきた。



【結論】

進展型小細胞肺癌患者は末梢血を循環する腫瘍細胞が存在すること、その細胞は癌幹細胞化、EMTを進めると考えられるDDX3Xを発現しているが、これに対するT細胞免疫反応を欠如していることが明らかとなった。一方、限局型小細胞肺癌では逆にDDX3Xに対するT細胞免疫応答が認められ、末梢血を循環する腫瘍細胞はDDX3Xを発現していないことから、DDX3Xに対するT細胞免疫が末梢血における血行性転移の障壁として働いていると考えられた。

DDX3Xを標的抗原としたT細胞免疫療法は、癌幹細胞化、EMT化することで抗がん剤、分子標的治療薬に耐性である癌細胞を駆逐できる可能性を示唆している。

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 3件)

1. Saida, Y., Watanabe, S., Tanaka, T., Baba, J., Sato, K., Shoji, S., Igarashi, N., Kondo, R., Okajima, M., Koshio, J., Ichikawa, K., Nozaki, K., Ishikawa, D., Koya, T., Miura, S., Tanaka, J., Kagamu, H., Yoshizawa, H., Nakata, K., and Narita, I. (2015) Critical Roles of Chemoresistant Effector and Regulatory T Cells in Antitumor Immunity after Lymphodepleting Chemotherapy. *J Immunol* **195**, 726-735, 査読あり
2. Miura, S., Kagamu, H., Sakai, T., Nozaki, K., Asakawa, K., Moro, H., Okajima, M., Watanabe, S., Yamamoto, S., Iino, N., Goto, S., Kazama, J. J., Yoshizawa, H., and Narita, I. (2015) Advanced thymic

cancer treated with carboplatin and paclitaxel in a patient undergoing hemodialysis. *Intern Med* **54**, 55-58, 査読あり

3. Nozaki, K., Kagamu, H., Shoji, S., Igarashi, N., Ohtsubo, A., Okajima, M., Miura, S., Watanabe, S., Yoshizawa, H., and Narita, I. (2014) DDX3X induces primary EGFR-TKI resistance based on intratumor heterogeneity in lung cancer cells harboring EGFR-activating mutations. *PLoS One* **9**, e111019, 査読あり

〔学会発表〕(計 1件)

1. Circulating small cell lung cancer cells and DDX3X-specific effector T cells in peripheral blood of SCLC patients

Aya Ohtsubo, Hiroshi Kagamu, Masaaki Okajima, Satoru Miura, Satoshi Watanabe and Toshiaki Kikuchi

2015年10月8日、日本癌学会総会、名古屋

〔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

各務 博 (Kagamu Hiroshi)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：30418686

(2) 研究分担者

土田 正則 (Tsuchida Masanori)
新潟大学・医学部・教授
研究者番号：60293221

梅津 哉 (Umezu Hajime)
新潟大学・医歯学総合病院・准教授
研究者番号：50251799

(3) 連携研究者

()

研究者番号：