

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14384

研究課題名(和文)がん幹細胞の免疫回避微小環境を誘導する機構解明と克服

研究課題名(英文)Analysis of escaping mechanism from immune system by microenvironment of cancer stem cells

研究代表者

佐谷 秀行 (Saya, Hideyuki)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：80264282

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)：本研究ではがん幹細胞が腫瘍免疫回避を誘導する実行細胞であると仮説を立て、我々が開発してきたマウス人工がん幹細胞(iCSC)モデルを用いて免疫制御に関わる分子について検討を行った。その結果、卵巣がんiCSCがマクロファージによる貪食作用の回避の役割があるCD47分子が高発現していることを見出した。しかし、CD47発現強弱による移植実験及び発現抑制の検討からCD47は卵巣がん形成には必須ではないことが分かり、分泌因子など他の免疫制御分子の関連が示唆された。一方、白血病iCSCの検討においてはドライバ遺伝子が異なることによって異なる腫瘍免疫回避機構が存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we hypothesized that cancer stem cells is responsible for escaping from immune system against tumor formation. Our developed mice models with induced cancer stem cells (iCSCs) revealed that CD47, a cell surface molecule to block macrophage's phagocytosis, is not required for escaping of ovarian iCSC from immune surveillance, suggesting that other molecules can be involved. Furthermore, analysis of leukemic iCSCs revealed that different driver oncogenes induce different mechanisms to escape from immune system during leukemogenesis. These results suggest that CSCs have the potential to regulate immune system.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん幹細胞 腫瘍免疫 卵巣がん 急性リンパ芽球性白血病

1. 研究開始当初の背景

(1) 多くのがん腫において報告されてきたがん幹細胞は自己複製能や薬剤耐性能を持ち、腫瘍組織の全体の構築を担うため、極めて重要な治療標的である。近年、各組織のがん腫においてがん幹細胞が同定され、その機能や性質を解析した報告が蓄積されてきた。がん幹細胞自体の機能の理解は進んできた一方で、がん幹細胞の微小環境の制御が周辺細胞、特に腫瘍免疫系へ与える影響はほとんど分かっていない。

(2) 一般にがんは、その発生・進展過程において、自然免疫及び獲得免疫系によって常に監視され、異常細胞は排除される腫瘍免疫システムによって抑制されているが、近年悪性度の高いがん細胞は、分泌因子や PD-L1 のような細胞膜分子、免疫抑制細胞を介して免疫細胞からの攻撃を抑制・回避することが報告された。しかし、これまで報告された腫瘍免疫回避イベントにがん幹細胞自身がどのように関わるのか、またそれが存在した場合、がん幹細胞から発するどのような分子シグナルが腫瘍免疫を制御するのかは未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、がん組織の中核を成すがん幹細胞が腫瘍免疫回避を誘導する実行細胞であると仮説を立てた。そこでこれまで開発してきた正常免疫能を持つ同種マウスへの移植が可能で人工がん幹細胞 (iCSC) を用いて、がん幹細胞が細胞表面分子、分泌因子などを介していかに免疫微小環境へ制御を行うのかを解明することを目的とし、研究を実施した。

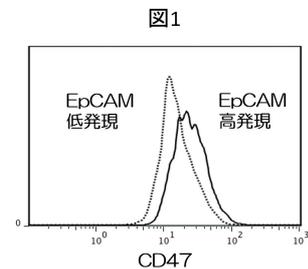
3. 研究の方法

固形腫瘍の iCSC としてマウス卵巣がん iCSC (*Carcinogenesis* 32:1597-606, 2011) 及び白血病の iCSC である前駆 B 細胞性急性リンパ芽球性白血病 (Pre-B ALL) の iCSC (*Oncogene* 31:2849-2861, 2012) を用いて検討を行った。

細胞表面分子はフローサイトメーターを使用し、サイトカインやケモカインなどの分泌因子は定量的 RT-PCR 法及びサイトカインアレイを使用し、発現を解析した。また細胞表面分子の陽性、陰性細胞をセルソーターによって分離した。発現抑制実験としては標的分子の shRNA をレンチウイルスベクターを用いて細胞へ導入した。移植方法は卵巣がん iCSC では腹腔内移植、白血病 iCSC は尾静脈への注入による移植を行った。

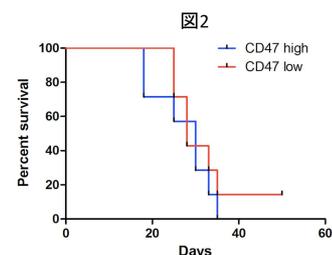
4. 研究成果

(1) 卵巣がん iCSC を移植し、その後形成した腫瘍細胞を採取し、細胞表面分子の発現を解析した。その結果、幹細胞マーカーの一つである EpCAM 陽性細胞でマクロファージ等による貪食を防ぐ機能がある CD47 の発現が高いことを見出した (図 1)。



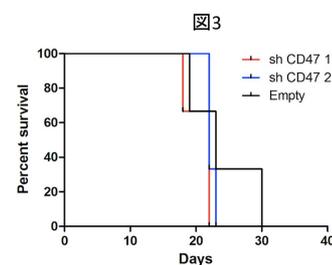
そこで CD47 の高発現、低発現細胞をソートした後、移植を実施し生体内における免疫回避機構に CD47 が重要な役割を果たしているのかを検討を行った。

しかし、結果的にどちらも腫瘍形成に大きな差は生じなかった (図 2)。



さらに shRNA によって CD47 を発現抑制した細胞を作成し、移植を行っても同様に腫瘍形成能に大きな変化がなかった (図 3)。

これらの結果から CD47 の発現は卵巣がん幹細胞の腫瘍免疫からの回避に必須で



はないことが示唆された。一方、サイトカインアレイの結果、EpCAM 陽性細胞は CXCL1 や M-CSF などの液性因子を特異的に放出していることを見出した。これら因子によって誘引された免疫細胞や免疫抑制細胞などの周辺細胞にがん幹細胞がさらに働きかけることで生存に有利な免疫抑制環境が作られる可能性が十分に想定される。

今後、これらの因子の抑制及び免疫微小環境に関わる周辺細胞を欠損したマウスを用いることにより、卵巣がんのがん幹細胞がいかに腫瘍免疫を回避するのか検討する予定である。

(2) Pre-B ALL を発症する $p190^{BCR-ABL}$ 発現 iCSC 及び *c-Myc* 発現 iCSC を用いて移植後の免疫回避機構の検討を行った。その結果、 $p190^{BCR-ABL}$ 発現によって発症した Pre-B ALL は *c-Myc* 発現によって発症した Pre-B ALL と比較して発症期間が短く、T リンパ球による攻撃を抑制する免疫チェックポイント因子 PD-L1 の発現が高いことを見出した。また、 $p190^{BCR-ABL}$ あるいは *c-Myc* を発現した iCSC にて特異的に発現する液性因子を調べたところ、 $p190$ は IL-18, $TNF\alpha$, CCL3 の発現が高く、*c-Myc* は IL-6 や $IFN\gamma$ の発現が高いことが分かった。これらの結果より、ALL を発症するドライバー遺伝子はその種類によって異なる腫瘍免疫回避機構が存在する可能性を明らかにした。

一般的にフィラデルフィア染色体によって生じた $p190^{BCR-ABL}$ をはじめとした BCR-ABL を発現する Pre-B ALL は非常に予後が悪いことで知られているが、近年 BCR-ABL 阻害剤の開発によって治療成績の改善が見込まれている。しかし、完全に治癒できる可能性は低いと考えられているため、今後腫瘍免疫回避機構の分子レベルでの解明により、腫瘍免疫を再活性化させる新たな治療法の開発に繋がるべく検討を行っていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Ueda T, Nakata Y, Yamasaki N, Oda H, Sentani K, Kanai A, Onishi N, Ikeda K, Sera Y, Honda ZI, Tanaka K, Sata M, Ogawa S, Yasui W, Saya H, Takita J and Honda H: ALKR1275Q perturbs extracellular matrix, enhances cell invasion and leads to the development of neuroblastoma in cooperation with MYCN. *Oncogene* 2016 (in press) (doi: 10.1038/onc.2015.519) 査読有

2. Adachi T, Kobayashi T, Sugihara E, Yamada T, Ikuta K, Pittaluga S, Saya H, Amagai M, and Nagao K: Hair follicle-derived IL-7 and IL-15 mediate skin-resident memory T cell homeostasis and lymphoma. *Nat Med* 21: 1272-1279, 2015 (doi: 10.1038/nm.3962) 査読有

3. Fukuda K, Sugihara E, Ohta S, Izuhara K, Funakoshi T, Amagai M and Saya H: Periostin is a key niche component for wound metastasis of melanoma. *PLoS One*. 10: e0129704, 2015 (doi: 10.1371/journal.pone.0129704) 査読有

〔学会発表〕(計7件)

1. 佐谷秀行: がん幹細胞を標的とした治療戦略。特別講演3。第25回日本サイトメトリ学会学術集会、07/11/2015、ソラシティカンファレンスセンター(東京都千代田区)

2. 佐谷秀行: がん幹細胞の特性解析と標的治療。シンポジウム6「がん幹細胞の分子標的・免疫制御の新展開」第13回日本臨床腫瘍学会学術集会、07/16/2015、ホテルロイトン札幌(北海道札幌市)

3. 佐谷秀行: がん幹細胞の代謝不均一性。招待講演。第13回日本プロテオーム学会、07/23/2015、くまもと森都心プラザ(熊本県熊本市)

4. 佐谷秀行: がん幹細胞を標的とする新たながん治療開発の展望。教育講演2。第53回日本癌治療学会学術集会。10/29/2015、国立京都国際会館(京都府左京区)

5. 杉原英志、橋本典愉、植野さやか、清水孝恒、佐谷秀行: New mouse lymphoma model reveals the requirement for Fas downregulation in initiation and maintenance of lymphoma cells 第74回日本癌学会総会、10/08/2015、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

6. Sugihara E, Hashimoto N, Ueno S, Saya

H : New mouse model for mature B cell lymphoma revealing requirement for Fas downregulation in lymphomagenesis. 20th Congress of European Hematology Association (EHA), 6/11-6/12/2015, ウィーン (オーストリア)

7. Sugihara E, Hashimoto N, Ueno S, Saya H : Novel mouse model for mature B cell lymphoma reveals the requirement for Fas downregulation in lymphomagenesis. American Association for Cancer Research Annual meeting (AACR), 4/18/2015, フィラデルフィア (アメリカ合衆国)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.genereg.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐谷 秀行 (SAYA Hideyuki)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号 : 80264282

(2) 研究分担者

杉原 英志 (SUGIHARA Eiji)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号 : 50464996