

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18408

研究課題名(和文)がん幹細胞は免疫細胞老化関連免疫抑制を誘導し造腫瘍性を発揮するという新仮説の検証

研究課題名(英文)Verification of a new hypothesis that cancer stem cells induce immune cell senescence-related immunosuppression and exert tumorigenicity

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん幹細胞(造腫瘍細胞)はそれ自身が炎症性サイトカイン(TICIF-1)を産生し、その作用により周囲のマクロファージを老化様および免疫抑制性表現型に誘導することが明らかになった。通常、“細胞老化”によって生じる表現型(SASP)といえば炎症遷延性の現象を想起させるが、今回の結果から、細胞老化によりもたらされる表現型は細胞種により異なる可能性が示唆された。TICIF-1はSASP因子の一つとして知られるが、SASP因子は直接的に腫瘍形成に貢献しているのではなくM<sub>2</sub>を抑制性表現型へと導くことで免疫健全動物における腫瘍発生母地の形成に貢献している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that cancer stem cells itself produce inflammatory cytokines, TICIF-1. TICIF-1 induced cellular senescence-like phenotypes and immunosuppressive phenotype into the surrounding macrophages. Commonly, SASP is known as inflammatory phenomena, however, our results suggested that senescence-associated phenotypes are different depending on cell types. TICIF-1 is known as one of the SASP factors and it is suggested the correlation with tumorigenesis. On this point, Our results suggested that TICIF-1 induce macrophages into immunosuppressive phenotype, eventually, it contributes to tumorigenesis in immunocompetent animals.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：がん幹細胞 細胞老化 免疫抑制

## 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(本稿では、生体内で腫瘍形成能を有するがん細胞を便宜的に「がん幹細胞」と呼ぶ)。

生体内で腫瘍を形成し、個体を死に至らしめるがん幹細胞とは何か。この問いに答えるために多くの腫瘍学研究が行われてきた。それらの研究の中で、がん細胞のもつ「造腫瘍性」の解析は多くの場合、免疫不全マウスを用いて行われてきた。しかし、実際に問題となるヒトのがんのほとんどは、正常な免疫系を有する個体から発生する。私は、個体を死に至らしめる「がん」という事象の発生過程において、がん細胞と免疫系との相互作用は決して無視できないという考えのもと研究を進めてきた。

実際に下記のような事例がある。免疫不全動物である SCID マウスを用いた解析にて、ヒト悪性黒色腫細胞中に含まれるがん幹細胞の割合はおよそ 109 万個中に 1 個と見積もられた。しかしその後、より重度の免疫不全マウスである NOD-SCID/IL2R $\gamma$ 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 個ががん幹細胞として見積もられることが示された (Quintana E, Nature, 2008)。これらの研究の主題は、単純に「がん幹細胞の存在頻度」を明らかにすることであったが、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る。つまり、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もたらされた事象であると考えることができる。これまでに、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造腫瘍能を発揮する「がん幹細胞」について再考する必要があると考えた。

これまでに申請者は、マウスグリオブラストーマ幹細胞株および非幹細胞株を用い、野生型マウス個体内に存在する免疫細胞との相互作用に着目して解析を進めてきた。その過程で、グリオブラストーマ幹細胞株(以下、がん幹細胞株と呼ぶ)のもつ特異な免疫反応性を複数見出してきた (Wada H. Unpublished data)。中でも、がん幹細胞株は免疫細胞に「細胞老化」を誘導している可能性を示唆する興味深いデータを得た。例えば、がん幹細胞株による刺激でマクロファージ (M $\phi$ ) は細胞分裂の停止、細胞サイズの増大、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色陽性といった細胞老化様のフェノタイプを示すことを見出している。実際に遺伝子発現解析を行うと p19Arf、p21 の

発現が上昇し、細胞老化様の状態にあると考えられた。また、そのような状態にある M $\phi$  が IL-10 をはじめとする免疫抑制分子を発現することも見出している。よって、M $\phi$  においては細胞老化関連シグナル系が免疫抑制性表現型となるような機能変化を誘導し、ひいては造腫瘍性に貢献している可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究は、がん幹細胞による免疫細胞の老化誘導現象および免疫細胞老化によりもたらされる機能変化を細胞生物学的、分子生物学的に同定し、その意義を明らかにすることを目的とする。

本研究の達成により、「免疫学的に正常な個体内には免疫細胞老化を誘導しうるがん細胞こそが真のがん幹細胞である」という定義づけが可能となれば、免疫細胞老化の分子メカニズムを標的とする新しい概念に基づくこれまでにないがん治療法の開発が可能になると期待している。

## 3. 研究の方法

本研究では人工がん細胞 (p53 KO マウスの神経幹細胞に H-RasL61 を遺伝子導入して作出) を用いた (北大・遺伝子病制御研究所、近藤亨教授から供与)。サブクロニングにより複数株が樹立され、各株は *in vitro* では共に類似の増殖性を示したが、免疫系を有するマウス脳内に接種したところ、ある亜株は致死性であり (造腫瘍株 (TIC))、別の亜株は非致死性であった (非増腫瘍株 (nTIC)) (Hide T, Cancer Res, 2009 及び未発表データ)。これらの亜株の差異に着目し、造腫瘍細胞が誘導する免疫細胞老化について検討した。

具体的には、下記の項目について検討した。

- (1) TIC と免疫細胞との相互作用により生じる免疫細胞の変化
- (2) 造腫瘍細胞との相互作用により生じた老化免疫細胞の免疫抑制能の評価
- (3) 造腫瘍株との相互作用により生じる免疫細胞老化誘導の分子メカニズム

## 4. 研究成果

### (1) TIC と免疫細胞との相互作用により生じる免疫細胞の変化

TIC または nTIC を重度免疫不全マウスである NOD/SCID に移植したところ、どちらのケースでもマウスは死亡した。一方、免疫を有するマウスへの移植では TIC を移植されたマウスは死亡したが、nTIC では殆どが腫瘍死することなく生存し続けた。また、TIC/nTIC の腫瘍局所に免疫細胞が顕著に浸潤していた。この結果から、*in vivo* にて TIC/nTIC は免疫

細胞と何らかの相互作用をすると考えられた。そこで TIC/nTIC と脾臓細胞を共培養し解析したところ、nTIC との共培養でマクロファージ (M) が顕著に増殖したのに対し、TIC との共培養では M は増殖抵抗性であった。TIC 上清で M を培養すると、nTIC 上清で培養したものに比べ扁平でサイズの大きい細胞が誘導されていることが観察され、それらはβ-ガラクトシダーゼ (β-Gal) 陽性であり、サイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質 (CDKi) の遺伝子発現が高まっていた。これらの結果から、TIC は M に細胞老化様の表現型を誘導することが示唆された。また TIC-M では免疫抑制遺伝子の発現が増強していた。

## **(2) 造腫瘍細胞との相互作用により生じた老化免疫細胞の免疫抑制能の評価**

免疫抑制遺伝子を高発現する TIC-M の免疫抑制能について解析した。TIC/nTIC と脾臓細胞の共培養 (この中に M が含まれる) において、T 細胞の活性化レセプター発現が減弱していることを見出した。TIC 腫瘍組織でも、同様の現象が認められた。また活性化レセプター発現の減弱した T 細胞は抗原刺激によるサイトカイン産生が著明に低下していた。

## **(3) 造腫瘍株との相互作用により生じる免疫細胞老化誘導の分子メカニズム**

解析の結果、TIC は nTIC に比べ少なくとも 4 種類のサイトカイン (TIC-related immune cell factor (TICIF)-1 ~ -4) を選択的に高発現していることが明らかになった。TICIF-1 ~ 4 のうち TICIF-1 の除去により老化 M が有意に減少したことから、TICIF-1 に着目し、TICIF-1 の KO 株 (TIC-TICIF1-KO) を作製した。尚、TICIF-1 は炎症性サイトカインの一つである。

M を TIC-TICIF1-KO 細胞またはその対照細胞 (TIC-Mock) と共培養したところ、TIC-Mock に比べ TIC-TICIF1-KO との共培養でβ-Gal 陽性細胞が有意に減少した。また TIC-Mock-M は扁平で細胞サイズが大きく、細胞老化様の形態を呈したが、TIC-TICIF1-KO-M は突起状の仮足を有し、TIC-Mock-M とは著しく異なる形態であった。また、TIC-TICIF1-KO-M では CDKi の発現、免疫抑制遺伝子の発現が著明に減少した。従って、TICIF-1 は M に細胞老化様及び免疫抑制性の表現型を誘導することが示唆された。

## **(4) 免疫学的に健常な動物において M 老化を誘導する TICIF は TIC の造腫瘍能を規定するか**

最後に、免疫健常動物において TICIF は TIC の造腫瘍能を規定するかを検討した。TIC-Mock または TIC-TICIF1-KO を免疫不全動物 (NOD/SCID) に移植したところ、どちらの条件においても全マウスが死亡し、その生存期間に差はなかった。よって、免疫不全動物においては、TIC-TICIF1-KO は TIC-Mock と同様に in vivo 腫瘍形成能を有することが示さ

れた。次に、免疫学的に健常な動物 (C57BL/6) にて同様の検討を行ったところ、TIC-Mock 移植マウスではほぼ全匹のマウスが死亡したのに対し、TIC-TICIF1-KO を移植したマウスは約 6 割のマウスが 400 日を超えて生存し続けた。これらの結果から、TICIF1 は免疫健常マウスにおける TIC の造腫瘍能において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

がん微小環境にて、がん細胞の放出するサイトカインによって周囲の線維芽細胞が細胞老化を起こし、炎症性サイトカインを分泌する“細胞老化関連分泌表現型 (SASP)”を介して炎症環境を形成し腫瘍発生に貢献していることが示唆されている。我々は、造腫瘍細胞はそれ自身が炎症性サイトカインを分泌する細胞であり、M に細胞老化様のフェノタイプを誘導することを見出した。更にこの細胞老化様フェノタイプを呈する M は、老化線維芽細胞で見られるような炎症遷延性ではなく、免疫抑制性の分子を高発現していた (Wada H. Unpublished data)。通常、“細胞老化”によって生じる SASP といえば炎症遷延性の現象を想起させるが、我々の研究結果から、細胞老化によりもたらされる表現型は細胞種により異なる可能性が示唆された。また、SASP 因子は直接的に腫瘍形成に貢献しているのではなく M を抑制性表現型へと導くことで免疫健常動物における腫瘍発生母地の形成に貢献している可能性が考えられた。今後、TICIF-1 による M の老化と免疫抑制能の獲得が相互に直接リンクしているのかあるいは独立した事象であるのかを明らかにし、新たながん治療法の開発へとつなげたい。

## 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 6 件)

Enhanced IL-34 expression in Nivolumab-resistant metastatic melanoma.

Han N, Baghdadi M, Ishikawa K, Endo H, Kobayashi T, Wada H, Imafuku K, Hata H, Seino KI.

Inflammation and Regeneration 38:3, 2018.

doi.org/10.1186/s41232-018-0060-2

査読あり

High co-expression of IL-34 and M-CSF correlates with tumor progression and poor survival in lung cancers.

Baghdadi M, Endo H, Takano A, Ishikawa K, Kameda Y, Wada H, Miyagi Y, Yokose T, Ito H, Nakayama H, Daigo Y, Suzuki

N, Seino K.  
Sci Rep. 2018 Jan 11;8(1):418. doi:  
10.1038/s41598-017-18796-8.  
査読あり

**Interleukin 34, from pathogenesis to clinical applications.**

Baghdadi M, Endo H, Tanaka Y, Wada H,  
Seino K.  
Cytokine 99: 139-147, 2017  
査読あり

**Chemotherapy-induced IL-34 enhances immunosuppression by tumor-associated macrophages and mediates survival of chemoresistant lung cancer cells.**

Baghdad M\*, Wada H\* (\*Equal contribution), Nakanishi S, Abe H, Han N, Putra WE, Endo D, Watari H, Sakuragi N, Hida Y, Kaga K, Miyagi Y, Yokose T, Takano A, Daigo Y, Seino K.  
**Cancer Research.** 76(20):6030-6042. 2016  
査読あり

**Transcriptional regulator Bhlhe40 works as a cofactor of T-bet in the regulation of IFN- production in iNKT cell.**

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,  
**Proc Natl Acad Sci.** 113(24):E3394-402. 2016  
査読あり

**Identification of a Highly Immunogenic Mouse Breast Cancer Sub Cell Line, 4T1-S.**

Abe H, Wada H, Baghdadi M, Nakanishi S, Usui Y, Tsuchikawa T, Shichinohe T, Hirano S and Seino K.  
**Human Cell.** 29: 58-66, 2016  
査読あり

[学会発表](計 17 件)

**Immunological features of tumor cells defines tumor-initiating capacity in immunocompetent animal**  
Haruka Wada, Muhammad Baghdadi and Ken-ichiro Seino  
第15回 日本免疫治療学研究会学術

集会  
2018年2月17日、東京大学伊藤国際学術研究センター、文京区

**Tumor initiating cell in immunocompetent animal defined by immunological features**

Haruka Wada, Muhammad Baghdadi and Ken-ichiro Seino  
第46回日本免疫学会学術集会  
2017年12月12-14日、仙台国際センター、仙台

他15件

[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  
<https://seinolab.wixsite.com/seinolab/home-1>

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