

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09334

研究課題名（和文）頭頸部癌PDXを用いた癌幹細胞の同定および癌幹細胞維持機構の解明

研究課題名（英文）Identifcaiton of cancer stem cells in HNSCC

研究代表者

森田 真吉（Morita, Shinkichi）

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）・がん幹細胞研究部・特任研究員

研究者番号：10773955

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：申請者らは下咽頭癌における癌幹細胞マーカーCD271を同定し、さらに治療標的となるかどうかを検討した。抗CD271抗体を作成し、ヒト化を行った。In vitroでは、がん細胞株に対してADCC活性を認めた。担癌マウスに対してヒト化抗CD271抗体を投与したところ、腫瘍組織の増大抑制が見られた。詳細に検討すると、腫瘍組織中のCD271陽性細胞が減少していた。以上のことから、下咽頭癌においてCD271陽性細胞を標的とした治療が可能であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では抗CD271抗体が癌の治療に使えることをマウスモデルを用いて示した。今後更に検討を重ね、臨床応用の検討を進める。

研究成果の概要（英文）：This study aims to test whether CD271, which is a stem cell marker in hypopharyngeal cancer, is a good target in therapy. A humanized anti-CD271 antibody was developed. The antibody possessed antibody-dependent cellular cytotoxicity capacity against cancer cells in vitro. Antibody administration in mice bearing human cancer cells led to tumor volume suppression. CD271-positive cancer cells in the antibody-treated mice decreased. Collectively, the CD271 antibody treatment for hypopharyngeal cancer is a promising therapy.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：下咽頭癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者のグループは、免疫系リンパ球の分化・増殖に関わる複数のサイトカインに共通な受容体サブユニット c 鎖の発見を起点に、c 鎖欠損マウスが免疫不全症モデルになることを示し、NOD-SCID マウスとの交配により、免疫不全 NOG マウスを共同で作出した (Blood, 2002)。NOG マウスは、現在、最も免疫不全が強いマウスとして知られている。これまでに申請者らは NOG マウスを用いて、ヒト造血幹細胞移植による免疫系ヒト化マウスの作出や、ヒト白血病発症モデルを確立してきた。

申請者らはさらに、NOG マウスに癌手術検体を移植することによって PDX (Patient Derived Xenograft) 株を樹立し、生体内の癌組織の複雑性を反映した腫瘍の継代を可能とした。申請者らは、現在までにこれら NOG マウスの系を用い、以下を報告している。

下咽頭癌における、下咽頭癌幹細胞マーカー CD271 の発見 (PLoS One, 2013, Sci. Rep., 2016)

胆管癌における、癌幹細胞分画 (CD274low) の発見 (Cancer Sci, 2014)

成人 T 細胞性白血病 (ATL) 細胞における、癌幹細胞分画の濃縮 (Cancer Sci., 2016, Cancer Sci., 2017)

このように、免疫不全マウスおよび PDX をもちいることで癌幹細胞に特異的に発現する表面分子の同定に成功している。そこで私たちは、表面分子のみならず癌幹細胞維持に必須の細胞内分子機構をみいだすことを、部位によって大きく性格の変わる頭頸部癌 (咽頭癌・喉頭癌・口腔癌) を対象として計画した。

NOG マウスを癌研究に用いる利点の一つは、「生体内の腫瘍組織を再現しながらも、癌幹細胞分画の濃縮が可能である」点にある。大腸癌においても、NOG マウスへの継代移植によって同定され、LGR5 が大腸癌幹細胞マーカーであることが報告されている (Stem Cell, 2012)。PDX を用いたアプローチにより、これまで CD44 など既存癌幹細胞マーカーの利用のみでは不明であった幹細胞分画を明らかとすることが可能となった。

2. 研究の目的

本課題では、NOG マウスにおける造腫瘍能を指標として、頭頸部癌、特に下咽頭癌における癌幹細胞マーカーを同定し、このマーカーを指標とした抗体治療が可能かどうかを検討する。

3. 研究の方法

癌幹細胞マーカーの同定：他癌種で知られている癌幹細胞マーカーによって下咽頭癌細胞株を分画し、NOG マウスに移植して造腫瘍能を比較し、高造腫瘍能をもつマーカーを同定した。

抗体作成：CD271 細胞外ドメインタンパクを生成し、BALB/c マウスに免疫した。その後、脾細胞をとりだし、SP2/0 細胞と融合させ、ハイブリドーマを作成した。ELISA を用いてハイブリドーマのセレクションを行い、親和性の高いものをクローニングした。クローニングされた抗 CD271 抗体 (マウス IgG) をもとに、ヒト化抗 CD271 抗体を作成した。

抗体治療モデル：NOG マウスの皮下にヒトがん細胞株を移植し、その後ヒト NK 細胞と抗体を尾静注あるいは腫瘍に直接注入した。腫瘍体積を毎週計測した。

4. 研究成果

複数の表面マーカーによって下咽頭癌細胞株を分画し、造腫瘍能を比較したところ、CD271 (NGFR) が高発現している癌細胞は高い造腫瘍能を持つことが明らかになった。

そこで、抗 CD271 抗体を作成し、ヒト化した。まず、in vitro における殺細胞性を検討した。CD271 を強制発現した SP2/0 細胞と NK 細胞・抗 CD271 抗体を混ぜ、SP2/0 細胞の生存を測定したところ、抗体濃度依存性に SP2/0 の生存率は低下することが判明した。このことは、メラノーマ細胞株や下咽頭癌細胞株でも確認された。そこで、CD271 強制発現 SP2/0 細胞・メラノーマ細胞株・下咽頭癌細胞株をそれぞれ NOG マウスに移植し、NK 細胞とヒト化抗 CD271 抗体をマウスに投与して、腫瘍の体積を測定した。その結果、いずれの細胞株においても NK 細胞・抗体投与群では腫瘍の増殖率が低下した。治療後の腫瘍を病理学的に検索すると、CD271 陽性細胞は未治療群で 10% 程度であったが、治療群では約 5% まで減少していた。

本課題では、同定した癌幹細胞マーカー CD271 に対するヒト化抗体を作成し、マウスモデルを

用いて抗体治療が可能かどうかを検討した。CD271 細胞は腫瘍組織全体の 10%程度しか発現していないにもかかわらず、抗体治療群では腫瘍全体の体積が抑制された。このことは、癌組織の中の一部の治療抵抗性細胞(癌幹細胞)を狙うだけで腫瘍全体の治療が可能であることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morita Shinkichi, Mochizuki Mai, Shibuya-Takahashi Rie, Nakamura-Shima Mao, Yamazaki Tomoko, Imai Takayuki, Asada Yukinori, Matsuura Kazuto, Kawamura Sadafumi, Yamaguchi Kazunori, Yasuda Jun, Sugamura Kazuo, Katori Yukio, Satoh Kennichi, Tamai Keiichi	4. 巻 39
2. 論文標題 Establishment of a Monoclonal Antibody That Recognizes Cysteine-Rich Domain 1 of Human CD271	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 6~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2019.0040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morita Shinkichi, Mochizuki Mai, Wada Kouichi, Shibuya Rie, Nakamura Mao, Yamaguchi Kazunori, Yamazaki Tomoko, Imai Takayuki, Asada Yukinori, Matsuura Kazuto, Sugamura Kazuo, Katori Yukio, Satoh Kennichi, Tamai Keiichi	4. 巻 461
2. 論文標題 Humanized anti-CD271 monoclonal antibody exerts an anti-tumor effect by depleting cancer stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 144~152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2019.07.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Keitaro, Morita Shinkichi, Mochizuki Mai, Shibuya Takahashi Rie, Fujimori Haruna, Yamaguchi Kazunori, Abe Jiro, Yamazaki Tomoko, Imai Takayuki, Sugamura Kazuo, Yasuda Jun, Satoh Kennichi, Sato Ikuro, Saito Koyama Ryoko, Fujishima Fumiyoshi, Sasano Hironobu, Kato Yukinari, Matsuura Kazuto, Asada Y, Tamai K	4. 巻 -
2. 論文標題 Establishment of a monoclonal antibody against glycosylated CD271 specific for cancer cells in immunohistochemistry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15340	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	玉井 恵一 (Tamai Keiichi) (40509262)	地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん幹細胞研究部・部長 (81303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------