

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590915

研究課題名(和文) 小細胞肺癌に対する Th17 細胞誘導を介した新規抗腫瘍免疫療法の開発

研究課題名(英文) Antitumor immunotherapy for small cell lung cancer with Th17 induction

研究代表者

各務 博 (KAGAMU HIROSHI)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：30418686

研究成果の概要(和文)：

限局型小細胞肺癌(SCLC)患者に存在する Th17 細胞が認識する抗原を明らかにする目的で SCLC 表面抗原の解析を行った。浮遊で増殖する分画において癌幹細胞マーカーである CD133 が表出されており、癌幹細胞に特異的な抗原が Th17 誘導に関わっていると考えられた。プロテオーム解析の結果、癌幹細胞に優位な発現パターンを持つ蛋白質4つを同定した。その中の一つである DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked (DDX3X)を用いたワクチン療法は抗腫瘍効果をもつことを明らかにしている。現在、DDX3Xを用いた Th17 誘導抗癌幹細胞免疫療法の開発が進行中である。

研究成果の概要(英文)：

To elucidate the SCLC antigens that are recognized by Th17 cells, we examine surface molecules of SCLC cells and found that the floating SCLC cells express CD133, which is one of putative cancer stem cell (CSC) markers. Proteome analyses revealed DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked (DDX3X) as a novel CSC-specific protein. An anti-DDX3X vaccination induced anti-CSC effector T cells that mediated antitumor therapeutic efficacy. DDX3X was highly expressed in human CD133⁺ SCLC cells but not in normal epithelial cells. These results indicate that anti-DDX3X, immunotherapy to induce Th17 is a promising treatment option in the clinical setting.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：呼吸器内科学

キーワード：非閉塞性肺疾患、肺線維症、呼吸器感染症、その他、
Th17, 制御性 T 細胞, 小細胞肺癌

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、化学発癌マウス線維肉腫細胞を用いて腫瘍所属リンパ節を解析し、抗腫瘍活性を持つ T 細胞は CD62L^{low} の分画に存在することを示した (Kagamu, H., et al., *Cancer Res*, 1996)。また、MHC classII 抗原陰性腫瘍に対し、CD4⁺T エフェクター細胞単独で極めて高い抗腫瘍活性を示すことを証明した (Kagamu, H., et al., *J.Immunol*, 1998)。更に、この CD4 ヘルプの代替として CD40 シグナルを樹状細胞に与えることで抗腫瘍エフェクター T 細胞プライミングが促進され、effector phase での CD8⁺T 細胞機能が増強されることを示した (Fujita, N., Kagamu, H., et al., *J.Immunol*, 2001, Watanabe, S., Kagamu, H., et al., *J.Immunol*, 2003)。これらは、エフェクター T 細胞優位の CD4T 細胞バランスが抗腫瘍免疫現象の鍵であることを示唆している。しかし、担癌マウスの腫瘍所属リンパ節解析により、この抗腫瘍 CD4T 細胞のサイトカイン産生能、増殖能を完全に阻害可能な制御性 T 細胞が誘導されており、腫瘍量の増大と時間経過により Treg 優位なバランスに変化していることが明らかとなった (Hiura, T., Kagamu, H., et al., *J.Immunol*, 2005)。

申請者らは、“小細胞肺癌患者に誘導された免疫寛容打破を目的とした画期的免疫療法の開発”研究 (基盤研究 C 課題番号 18590841) において小細胞肺癌患者末梢血を検討した。この結果、CD62L^{low}CD4⁺ T 細胞と CD62L^{high}CD25⁺CD4⁺ Treg 間にシーソー型のバランスが見られることが明らかとなった。即ち、遠隔転移を持つ進展型(ED)では Treg のみが増加しておりエフェクターCD4⁺ T 細胞の増加は見られなかった。遠隔転移のない限局型(LD)では、これとは全く逆にエフェクターCD4⁺ T 細胞のみが増加しており Treg は健常者と比較して変化が見られなかった。驚くべきことに治療により治癒したと考えられる 3 年以上の長期生存者ではこのエフェクター優位の CD4 バランスが保持されていた。一方 LD 症例でも遠隔転移をもって再発した患者では Treg 優位のバランスに変化していた。以上より、エフェクター優位の CD4 バランスは血中を循環する癌細胞に対する障壁として機能し遠隔転移を防ぐとともに治癒に至る過程にも寄与しているものと考

えられた。さらに、LD 症例から CD62L^{low} として分離したエフェクターCD4⁺ T 細胞は健常者(HV)、ED 症例からのそれに比べて有意に大量の IL-17 を産生することが明らかとなった。一方、同じ培養上清中の IFN γ には有意差が見られなかった。

IL-17 を主に産生する Th17 は最近、存在が明らかとなったヘルパー T 細胞分画である。これまでに多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患などの自己免疫性疾患やそのモデルにおいて疾患発症に不可欠な細胞であることが明らかとなっている。興味深いことに、Th17 の誘導は Treg の誘導と相反することが報告されている。培養環境に TGF β が単独で存在すると Treg が誘導されるが、そこに IL-6 を加えると Treg プライミングは阻害され Th17 が誘導されるように劇的な変化を起こす (Bettelli E, et al., *Nature*. 2006)。これは、自己抗原に対する免疫寛容がブレイクされエフェクター優位な免疫現象に変化する可能性を示唆しており、LD-SCLC 患者体内ではこのような環境が存在し Treg に対してエフェクターCD4⁺ T 細胞が優位性を獲得している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、癌細胞の存在により制御性 T 細胞 (Treg) 優位に傾いた CD4 T 細胞バランスをエフェクター T 細胞 (Teff) 優位に変える新たな Th17 細胞誘導抗腫瘍免疫療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 小細胞肺癌株を用いた癌幹細胞マーカー解析：

小細胞肺癌株 87.5, S2, Lu65、肺腺癌細胞株 A549, PC9, 乳癌 MCF7, 大腸癌 HCT116, 正常ヒト臍帯内皮細胞、正常気管支上皮細胞、正常ヒト皮膚上皮細胞を ATCC から入手した。PE-conjugated anti-CD133, anti-CD44, anti-CD24, anti-ABCG2 mAbs により染色し、フローサイトメトリーにより表面抗原解析を行った。

(2) マウスメラノーマを用いた癌幹細胞に対する免疫応答：

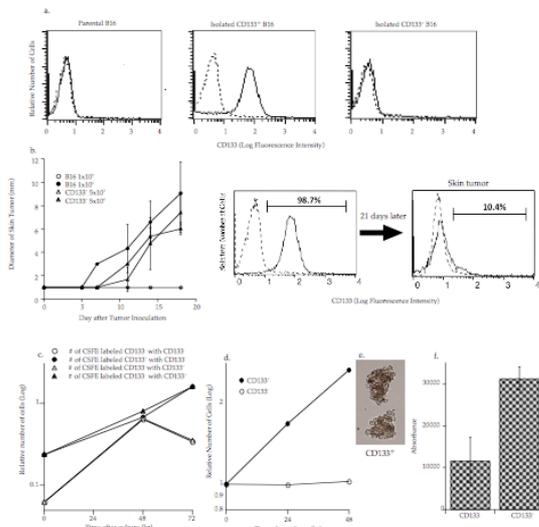


Fig. 1

1) C57B16 マウス由来 B16 メラノーマ細胞はその 0.4-0.8%程度が CD133 陽性である。PE-conjugated anti-CD133 mAb と anti-PE マイクロビーズを用いて数回分離を繰り返すことにより 95%以上純化した CD133+腫瘍細胞を得た。この純化した CD133+腫瘍細胞は、 5×10^3 程度の少数細胞を皮下接種することにより腫瘍形成を得ることが可能であった (Fig.1)。また、soft agar assay や浮遊細胞培養アッセイにより足場非依存的に増殖する能力を示した。また、浮遊細胞培養により容易に tumor sphere 形成が可能であった。一方、高い純度の CD133+腫瘍細胞を接種しても、形成された腫瘍の 90%以上が CD133-の形質に変化していることから非対称性分裂能を持つものと考えられた。以下の実験は、この CD133+メラノーマを用いて行った。

2) 樹状細胞はマウス骨髄細胞を IL-4, GM-CSF 存在下に 5 日間培養することで得た。腫瘍細胞に 5000cGy の放射線処理をした後、同数の樹状細胞と一晚共培養し回収した樹状細胞を 1×10^7 側腹部に皮下接種することでワクチネーションを行った。所属リンパ節を用いる実験では、皮下接種 1 週間後単径リンパ節から抗原によりプライミングを受けた細胞として CD62L^{low} T 細胞を回収して用いた。

(3) 二次元電気泳動によるプロテオーム解析；CD133+, CD133-メラノーマの蛋白発現解析はプロフェニックス inc に委託の上施行した。

(4) CSC 特異的蛋白質の発現解析：immunoblotting 法により各種ヒト癌細胞における DDX3X 発現を検討した。

4. 研究成果

(1) LD-SCLC 患者末梢血中に誘導されていた Th17 エフェクター T 細胞が遠隔転移を防

いでいるとした場合、末梢血を循環する腫瘍細胞を認識している可能性が高いと考え、浮遊で増殖する小細胞肺癌株 87.5 と固着して増殖する S2 において表面抗原を解析した。この結果、浮遊増殖する 87.5 のほとんどは CD133 を発現していることが明らかとなった。CD133 は転移・再発の主役と考えられている癌幹細胞マーカーとして知られており、Th17 エフェクターの標的抗原が小細胞肺癌幹細胞上に存在することが示唆された (Fig. 2)。

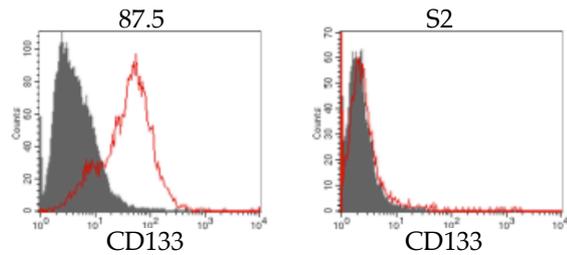


Fig. 2

(2) 次に、CD133+腫瘍細胞が実際に抗腫瘍免疫を惹起する能力があるかマウス腫瘍系において検討した。マウスメラノーマ B16 細胞から CD133+細胞を分離し樹状細胞アジュバントとして接種したところ、親株腫瘍、CD133-腫瘍細胞に比して高い抗腫瘍免疫効果が得られた (Fig. 3A)。CD133+腫瘍細胞を接種して所属リンパ節から得た anti-CSC T細胞は養子移入することにより高い治療効果を発揮した (Fig. 3B)。

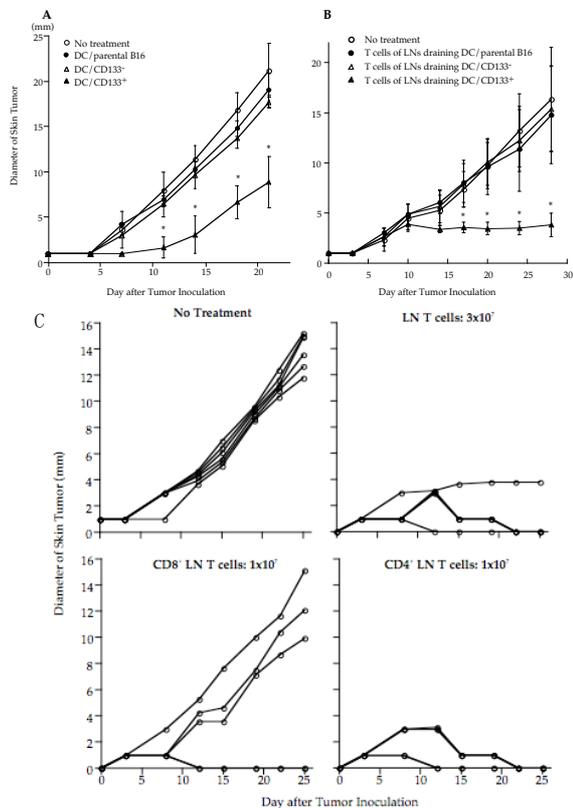


Fig. 3

CSC 抗原によりプライミングされたエフェクターT細胞をCD4+とCD8+ T細胞に分離して親株腫瘍を持つマウスに経静脈的移入したところ、この高い治療効果は、主にCD4+ T細胞により担われていた (Fig. 3C)。

また、CD133+腫瘍細胞接種によりプライミングされたCD4+ T細胞はIL-17, IFN γ を特異的抗原刺激により分泌したが、IL-4の分泌は見られず、Th17-Th1型に分化していることが明らかとなった (Fig. 4)。

- (3) Th17型抗腫瘍T細胞を誘導した抗原を同定する目的で、CD133+腫瘍細胞とCD133-腫瘍細胞のタンパク質発現を二次元電気泳動法により解析したところ、CD133+腫瘍細胞に高発現する4つのタンパク質を同定することができた (Fig. 5)。

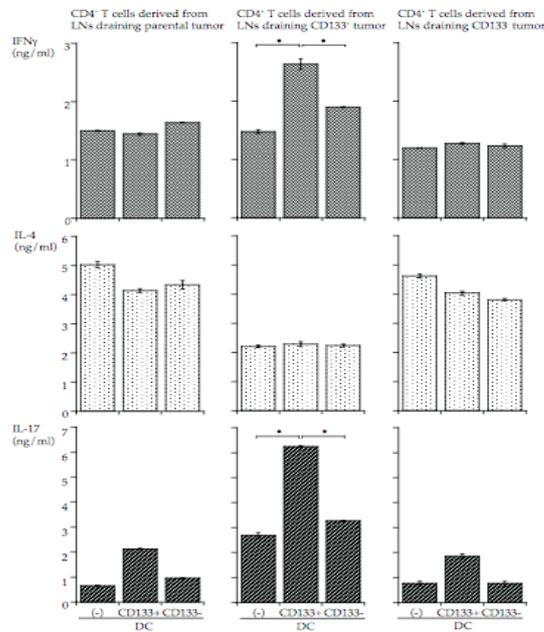


Fig. 4

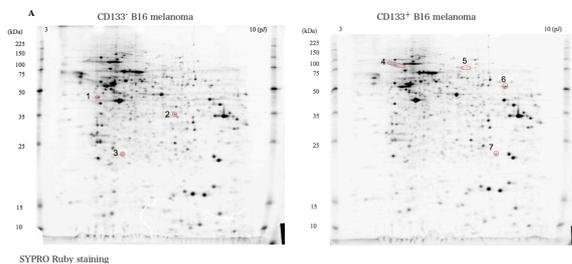


Fig. 5

- (4) 同定したタンパク質の一つである DDX3X は germ cell に強く発現することが知られている RNA helicase活性を持つ蛋白質である。この蛋白質に注目し、合成した DDX3X によるワクチンを行ったところ、CD133+腫瘍細胞そのものによるワクチンよりも高い防御免疫を誘導することが明

らかとなった (Fig. 6)。

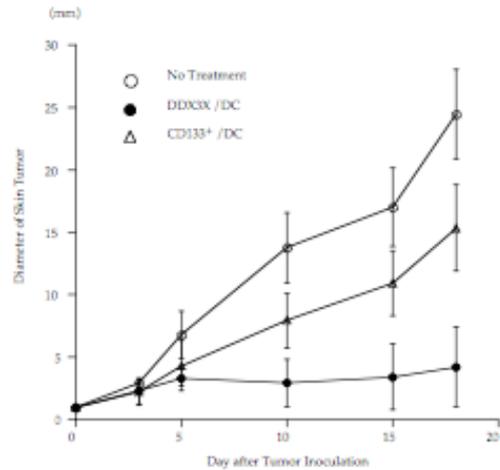


Fig. 6

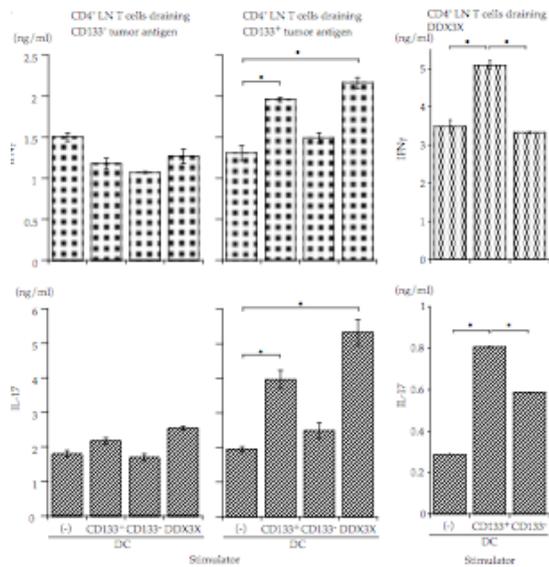


Fig. 7

さらに、CD133+腫瘍細胞を特異的に認識するCD4+ T細胞はDDX3Xを、また、DDX3Xを特異的に認識するCD4+ T細胞はCD133+腫瘍細胞を認識してサイトカイン分泌することが確認された (Fig. 7)。

- (5) immunoblottingにより解析した結果、DDX3Xはヒト正常細胞(NHEK, HMEC, NHBE)にはわずかにしか発現していないが、小細胞肺癌(87.5, S2)、肺腺癌(A549)、乳癌(MCF7)、大腸癌(HCT116)、において発現していること、癌幹細胞マーカー陽性癌細胞(87.5, HCT116, MCF7)にはさらに高発現していることを明らかとした (Fig. 8)。



Fig. 8

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)

- ① Hayashi, M., T. Koya, H. Kawakami, T. Sakagami, T. Hasegawa, H. Kagamu, T. Takada, Y. Sakai, E. Suzuki, E.W. Gelfand, and F. Gejyo. 2010. A prostacyclin agonist with thromboxane inhibitory activity for airway allergic inflammation in mice. *Clin Exp Allergy* 40:317-326. 査読有
- ② Hayashi, Y., H. Kuriyama, H. Umezu, J. Tanaka, T. Yoshimasu, T. Furukawa, H. Tanaka, H. Kagamu, F. Gejyo, and H. Yoshizawa. 2009. Class III beta-tubulin expression in tumor cells is correlated with resistance to docetaxel in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *Intern Med* 48:203-208. 査読有
- ③ Koya, T., T. Hasegawa, J. Tanaka, H. Kawakami, M. Hayashi, H. Kagamu, I. Narita, M. Arakawa, and E. Suzuki. 2009. Effect of ciclesonide on bronchial asthma in athletes. *J Asthma* 46:1032-1036. 査読有
- ④ Koya, T., C. Tsubata, H. Kagamu, K. Koyama, M. Hayashi, K. Kuwabara, T. Itoh, Y. Tanabe, T. Takada, and F. Gejyo. 2009. Anti-interferon-gamma autoantibody in a patient with disseminated Mycobacterium avium complex. *J Infect Chemother* 15:118-122. 査読有
- ⑤ Koyama, K., H. Kagamu, S. Miura, T. Hiura, T. Miyabayashi, R. Itoh, H. Kuriyama, H. Tanaka, J. Tanaka, H. Yoshizawa, K. Nakata, and F. Gejyo. 2008. Reciprocal CD4⁺ T-cell balance of effector CD62L^{low} CD4⁺ and CD62L^{high} CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in small cell lung cancer reflects disease stage. *Clin Cancer Res* 14:6770-6779. 査読有

- ⑥ Miura, S., H. Kagamu, H. Tanaka, H. Yoshizawa, and F. Gejyo. 2008. Appropriate timing of CD40 ligation for RNA-Pulsed DCs to induce antitumor immunity. *Scand J Immunol* 67:385-391. 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 日本癌学会学術総会, oral session, 宮林貴大、各務博、小山建一、太田毅、栗山英之、田中純太、田中洋史、吉澤弘久、下条文武、Immunotherapy to eliminate cancer stem cells, 名古屋国際会議場, 2008年10月29日
- ② ECCO 15 – 34th ESMO Multidisciplinary Congress, Takao Miyabayashi, Hiroshi Kagamu, Kenichi Koyama, Hideyuki Kuriyama, Junta Tanaka, Hiroshi Tanaka, Hirohisa Yoshizawa, Koh Nakata, Fumitake Gejyo, DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked is a CD133⁺ tumor-specific protein and induces antitumor immunity., Berlin, 20-24 September 2009
- ③ 日本癌学会学術総会 international session, 宮林貴大、各務博、小山建一、馬場順子、渡部聡、田中純太、田中洋史、吉澤弘久、中田光、成田一衛, Cancer stem cell targeted immunotherapy mediates potent antitumor reactivity against established parental melanoma. パシフィコ横浜, 2009年10月1日
- ④ American Association for Cancer Research annual meeting, Takao Miyabayashi, Hiroshi Kagamu, Jun Koshio, Kosuke Ichikawa, Junko Baba, Satoshi Watanabe, Hiroshi Tanaka, Junta Tanaka, Hirohisa Yoshizawa, Koh Nakata, Ichiei Narita, Cancer stem cells express specific immunogenic proteins that induce Th17-dominant immunity resulting in regression of parental tumor in vivo., Washington DC, 17-21 April, 2010
- ⑤ 日本癌学会学術総会, 古塩純、各務博、市川紘将、馬場順子、宮林貴大、渡部聡、田中洋史、田中純太、吉澤弘久、中田光、成田一衛, Cancer stem cells express specific immunogenic proteins that induce Th17-dominant immunity. 大阪国際会議場, 2010年9月24日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

各務 博 (KAGAMU HIROSHI)
新潟大学・医歯学系・講師
研究者番号：30418686

(2) 研究分担者

中田 光 (NAKATA KOU)
新潟大学・医歯学総合病院・教授
研究者番号：80207802

吉澤 弘久 (YOSHIKAWA HIROHISA)
新潟大学・医歯学総合病院・准教授
研究者番号：50282984

田中 洋史 (TANAKA HIROSHI)
新潟大学・医歯学総合病院・特任助教
研究者番号：80463991