

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592014

研究課題名(和文) タキサン系抗癌剤耐性分子の臨床的意義の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Clinical usefulness and application of Taxol-resistance molecules

研究代表者

増山 敬祐 (MASUYAMA KEISUKE)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：30181663

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌幹細胞 CD44+細胞は抗癌剤に対し抵抗性を示すことを明らかにした。頭頸部癌由来細胞株を CD44+細胞と CD44-細胞に分離し、タキサン系薬剤耐性遺伝子 TRAG-3 の発現を PCR にて検討した結果、両者において明らかな有意差はなかった。また、CD44+細胞共存下では T 細胞の増殖が抑制され、特に IFN- γ が強く抑制され IL-10 産生は逆に増強した。以上より、癌幹細胞は制御性 T 細胞を優位に誘導し免疫監視機構から逃避させる細胞集団と考えた。したがって、癌幹細胞の薬剤耐性機構として、免疫抑制を介した機序も考慮する必要があると思われる。

研究成果の概要(英文)：We found that head and neck cancer stem cells appeared to be resistant to the treatment of anti-cancer drugs. We did not find any differences of TRAG-3 mRNA expressions between CD44+ and CD44- cells of head and neck cancer cell lines. In addition, CD44+ cells significantly suppressed T cell proliferation. As for cytokine production, IFN- γ was reduced, however, IL-10 was increased when co-cultured with CD44+ cells. Thus, immunosuppressive mechanisms other than TRAG-3 expression may have a role for anti-cancer drug resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：抗癌剤耐性分子、癌幹細胞、制御性 T 細胞

1. 研究開始当初の背景

タキサン系抗癌剤は新規抗癌剤でありドセタキセルとパクリタキセルがある。ドセタキセルはチューブリンの脱重合を促進することで抗腫瘍効果を発揮する。一方、パクリタキセルはチューブリンの脱重合を阻害することで抗腫瘍効果を発揮する。現在、日本ではドセタキセルが適応となっており多剤併用や化学療法放射線

同時併用療法の臨床試験が行なわれている。もう一つのパクリタキセルは、日本では頭頸部癌の適応はないがアメリカにおいては頭頸部癌に対し臨床使用されている。日本でも現在第二相の臨床試験中であり近い将来適応となると思われる。

さて、進行頭頸部扁平上皮癌の治療において、集学的治療の一翼として化学療法放射線同時併用療法あるいは術後の補

助療法として化学療法の果たす役割は大きい。それゆえ、このような新しい抗癌剤は治療に大いに貢献できる。しかしながら、抗癌剤耐性の獲得は治療上大きな障害であり、我々もタキサン系薬剤耐性の患者を多く経験して治療に苦慮している。

興味深いことに、タキサン系薬剤の薬剤耐性に関しては、パクリタキセル耐性の卵巣がん細胞株より耐性遺伝子; Taxol resistance-associated gene 3 (TRAG-3) が同定された (Gene 1999)。この薬剤耐性分子 TRAG-3 は、メラノーマ、乳癌、肺癌などの固形癌で高率に発現していることがわかってきた。さらに cancer testis antigen の一つでもあり、正常組織では精巣にしか発現していない分子である。つまり癌に特異的に発現している分子であり癌抗原になりうる。この点に着目し HLA-A2 及び HLA-DR1/4/7 拘束性の T 細胞エпитープ分子が同定された。(Clin Cancer Res 2003, Cancer Immunol Immunother 2005, J Immunol 2006) また、癌患者の体内にはこのエпитープペプチドを認識する特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が存在することも報告されている。

以上のことから、タキサン系薬剤を用いた化学療法とその耐性分子である TRAG-3 に対する癌免疫療法を併用することにより、頭頸部癌により有効な化学免疫療法の開発を行うことを考えるに至った。

さて、癌と免疫の関係であるが生体内には癌を傷害する様々な免疫担当細胞が存在する。このうち、CTL は癌細胞上の HLA 分子 (HLA class I 分子) に結合した癌抗原由来エпитープ分子を T 細胞受容体で認識することによって活性化され癌細胞を傷害する。

エпитープ分子は HLA allele によって規定されているが、TRAG-3 については HLA-A2 拘束性のものが同定されている。

日本人に最も多い HLA allele は HLA-A*2402 であり約 54% を占める。この HLA-A*2402 の binding motif は既にわかっており、position 2 に Y (チロシン) か F (フェニルアラニン) がきて、position 9 或いは 10 に F (フェニルアラニン)、L (ロイシン)、W (トリプトファン)、I (イソロイシン) が結合しやすいことがわかっている。この binding motif にしたがって TRAG-3 のアミノ酸シーケンスをスクリーニングすることで結合候補ペプチドが見つかる。これらのペプチドを人工合成してペプチド特異的 CTL の誘導を試み、新しい TRAG-3 由来の抗原ペプチドが同定できればそれを使用した癌ワクチンが

臨床応用可能となると考えた。

癌ワクチンを初めとする免疫療法は現在多くの施設で臨床試験が行なわれている。我々も低濃度の化学療法と免疫療法を組み合わせた集学的治療のパイロットスタディを行い効果をあげてきた。この新しい方法が集学的治療のひとつとして組み入れられれば、副作用が少なくかつ治療効果の高いより優れた治療法として期待できると思われた。更に antigen spreading の概念から、他のがん関連抗原分子を認識する T 細胞まで誘導・活性化されれば、癌患者体内中の抗腫瘍免疫反応につながり相乗効果を期待できる。副作用には従来の治療法にさんざん悩まされてきたが、この方法は生体内の免疫応答を利用しているため副作用や後遺症もなく QOL の向上も大いに期待できるものと考えた。

2. 研究の目的

(1) まずはタキサン系抗癌剤の耐性分子をターゲットとすることにより、薬剤耐性癌の細胞生物学的解明とその臨床的意義、薬剤耐性分子をターゲットとした免疫応答の解明、そしてそれらの臨床応用へと向けて研究を展開していくことを目的とした。

(2) 同時に行っていた癌幹細胞の研究において、治療抵抗性が癌幹細胞においてより強い事が判明し、頭頸部癌癌幹細胞と非癌幹細胞における抗癌剤に対する耐性の比較試験およびタキサン系抗癌剤の耐性分子の発現を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) まず TRAG-3 の頭頸部癌 (特に扁平上皮癌) における発現とその臨床意義について以下のごとく調べていく予定とした。

- ① TRAG-3 発現が既知の細胞株を用いて RT-PCR 法によって TRAG-3 の発現を確認する。(実験系の確立)
- ② 頭頸部扁平上皮癌由来の細胞株を用いて TRAG-3 の発現を調べる。
- ③ 抗癌剤処理による TRAG-3 発現の変化を調べる。
- ④ 臨床試料より mRNA を抽出し、RT-PCR 法により TRAG-3 発現を調べる。
- ⑤ 臨床因子特に抗癌剤使用の有無と TRAG-3 発現の関連を解析する。

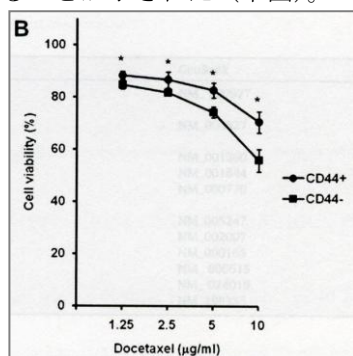
(2) 頭頸部扁平上皮癌由来の細胞株を用いて、CD44+ のポピュレーション (癌幹細胞) と CD44- のそれ (非癌幹細胞) に分離し、それぞれにおける各種抗癌剤に対する抵抗性

をMTS proliferation assayにておよびタキサン系薬剤耐性遺伝子であるTRAG-3の発現をRT-PCR法にて比較検討した。

4. 研究成果

(1) 既知の細胞株および頭頸部扁平上皮癌由来の細胞株7種のうち6種において、TRAG-3 mRNAの発現を認めた。発現量には細胞株により差が認められた。TRAG-3には2つのvariantが存在するが、細胞株によりvariant1および2の発現には差が認められ、また同程度の発現を認めた細胞株も存在した。多くの頭頸部癌細胞株でタキサン系抗がん剤に対する耐性分子の発現が認められたことは、これらに対するキラーT細胞の誘導ひいては癌免疫療法の可能性を示唆するものであると考えられた。

(2) CD44+のポピュレーションは、無血清培地にて増殖を示した。CD133やABCG2の発現がCD44-に比較して有意に高く、かつsphere形成、増殖能、遊走能、浸潤能いずれも亢進していた。さらに、CD44+のポピュレーションはCD44-に比較して、シスプラチン、ドセタキセル、5-FUなどの抗がん剤処理に抵抗性であることが示された(下図)。



(3) 頭頸部癌由来の細胞株を用いて、CD44+細胞とCD44-細胞に分離し、それぞれにおけるTRAG-3の発現をRT-PCRにて検討した。その結果、CD44+およびCD44-いずれの細胞株においてもTRAG-3の2つのバリエーションの発現を認めた。さらにRT-PCRにてTRAG-3発現の差を検討したが、両者に明らかな有意差は認めなかった。

(4) 頭頸部癌幹細胞であるCD44+細胞は、docetaxelをはじめ各種抗がん剤に対してCD44-細胞に比較して抵抗性を示すことが我々の研究で明らかになった。しかしながら、この結果から、両者の抗がん剤抵抗性は単純にTRAG-3発現の有無や程度によるものではないことが示唆されるようである。さらに、CD44+細胞は、TregやMDSCsのような免疫抑制細胞を優位に誘導することを我々は明らかにしている。したがって、今後は癌幹細胞

による免疫抑制機構を制御できるような免疫療法の開発が望ましいと考えられる。

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9件)

- ① Chikamatsu K, Ishii H, Takahashi, G, Okamoto A, Moriyama M, Sakakura K, Masuyama K. Resistance to apoptosis-inducing stimuli in CD44+ head and neck squamous cell carcinoma cells. *Head Neck* (査読有) (in press), 2011.
- ② Yamanishi T, Chikamatsu K, Takahashi G, Endo S, Masuyama K. Immune regulation by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with Japanese cedar pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol.* (査読有) (in press), 2011.
- ③ Chikamatsu K, Takahashi G, Sakakura K, Ferrone S, Masuyama K. Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* (査読有) 33:208-215, 2011.
- ④ Ishii H, Chikamatsu K, Sakakura K, Miyata M, Furuya N, Masuyama K. Primary tumor induces sentinel lymph node lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* (査読有) 46:373-378, 2010.
- ⑤ Chikamatsu K, Sakakura K, Takahashi G, Okamoto A, Furuya N, Whiteside TL, DeLeo AB, Masuyama K. CD4+ T-cell responses to HLA-DP5-restricted wild-type sequence p53 peptides in patients with head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother.* (査読有) 58:1441-1448, 2009.

- ⑥ Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* (査読有) 45:633-639, 2009.
- ⑦ Masuyama K, Chikamatsu K, Ikagawa S, Matsuoka T, Takahashi G, Yamamoto T, Endo S. Analysis of helper T cell responses to Cry j 1-derived peptides in patients with nasal allergy: candidate for peptide-based immunotherapy of Japanese cedar pollinosis. *Allergol Int.* (査読有) 58:63-70, 2009.
- ⑧ Chikamatsu K, Sakakura K, Matsuoka T, Endo S, Takahashi G, Matsuzaki Z, Masuyama K. Analysis of T helper responses and FOXP3 gene expression in patients with Japanese cedar pollinosis. *Am J Rhinol.* (査読有) 22:582-588, 2008.
- ⑨ Chikamatsu K, Sakakura K, Yamamoto T, Furuya N, Whiteside TL, Masuyama K. CD4+ T helper responses in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* (査読有) 44:870-877, 2008.

[学会発表] (計 18 件)

- ① 近松一朗, 坂倉浩一, 山本卓典, 森山元大, 増山敬祐. 頭頸部扁平上皮癌患者の免疫抑制に及ぼす myeloid-derived suppressor cell の役割. 第 29 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 (大分) 平成 23 年 2 月 10-12 日
- ② Chikamatsu K, Ishii H, Takahashi G, Sakakura K, Ferrone S, Masuyama K. Immunosuppressive properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. 4th World Congress of International Federation of
- Head and Neck Oncologic Societies. Seoul, Korea, June 15-19, 2010.
- ③ Ishii H, Chikamatsu K, Sakakura K, Miyata M, Furuya N, Masuyama K. Primary tumor induces sentinel lymph node lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. 4th World Congress of International Federation of Head and Neck Oncologic Societies. Seoul, Korea, June 15-19, 2010.
- ④ 近松一朗, 石井裕貴, 宮田政則, 坂倉浩一, 古屋信彦, 増山敬祐. 口腔癌におけるリンパ節転移メカニズムの検討: 原発巣とセンチネルリンパ節におけるリンパ管増生の関係. 第 111 回日本耳鼻咽喉科学会総会 (仙台) 平成 22 年 5 月 20-22 日
- ⑤ Ishii H, Chikamatsu K, Sakakura K, Miyata M, Furuya N, Masuyama K. Expression of VEGF-C in oral squamous cell carcinoma correlates with sentinel lymph node lymphangiogenesis. American Head and Neck Society 2010 Annual Meeting. Las Vegas, USA. April 28-29, 2010.
- ⑥ Chikamatsu K, Ishii H, Okamoto A, Takahashi G, Sakakura K, Masuyama K. CD44+ cancer stem-like cells are responsible for treatment resistance in squamous cell carcinoma of the head and neck. American Head and Neck Society 2010 Annual Meeting. Las Vegas, USA. April 28-29, 2010.
- ⑦ Chikamatsu K, Takahashi G, Sakakura K, Ferrone S, Masuyama K. Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. 101st Annual Meeting American Association for Cancer

Research. Washington DC, USA, April 17-21, 2010.

- ⑧ 近松一朗, 石井裕貴, 高橋吾郎, 坂倉浩一, 増山敬祐. Tumor microenvironmentにおける CD44+ cancer stem cell の免疫抑制機構に果たす役割. 第 28 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 (福井) 平成 22 年 2 月 18-20 日
- ⑨ 石井裕貴, 近松一朗, 高橋吾郎, 坂倉浩一, 増山敬祐. CD44+ cancer stem cell は様々なアポトーシス誘導刺激に対して抵抗性を示す. 第 28 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 (福井) 平成 22 年 2 月 18-20 日
- ⑩ Chikamatsu K, Okamoto A, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K. Immunological properties of CD44+ cancer stem cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. 2nd World Congress of the International Academy of Oral Oncology. Toronto, Canada, July 8-11, 2009.
- ⑪ Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K. Cancer stem cells as mediators of treatment resistance in squamous cell carcinoma of the head and neck. 2nd World Congress of the International Academy of Oral Oncology. Toronto, Canada, July 8-11, 2009.
- ⑫ 近松一朗, 坂倉浩一, 増山敬祐. 頭頸部扁平上皮癌における癌幹細胞の免疫抑制機構に果たす役割. 第 13 回日本がん免疫学会 (北九州) 平成 21 年 6 月 24-25 日
- ⑬ 近松一朗, 高橋吾郎, 増山敬祐. 頭頸部扁平上皮癌における治療抵抗性細胞としての癌幹細胞の解析. 第 33 回日本頭頸部癌学会 (札幌) 平成 21 年 6 月 11-12 日

⑭ Chikamatsu K, Okamoto A, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K. Expansion and characterization of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. 100th Annual Meeting American Association for Cancer Research. Denver, USA, April 18-22, 2009.

⑮ 近松一朗, 岡本篤司, 初鹿恭介, 高橋吾郎, 増山敬祐. 頭頸部扁平上皮癌における癌幹細胞の同定とその免疫学的解析. 第 27 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 (千葉) 平成 21 年 2 月 13-14 日

⑯ Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, Masuyama K. Isolation and characterization of cancer stem cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. 7th International Conference on Head and Neck Cancer. San Francisco, USA, July 19-23, 2008

⑰ Chikamatsu K, Sakakura K, Okamoto A, Whiteside TL, DeLeo AB, Masuyama K. Th1/Th2 CD4+ T helper responses against wild-type sequence p53 peptides in HLA-DP5 patients with head and neck cancer. 7th International Conference on Head and Neck Cancer. San Francisco, USA, July 19-23, 2008

⑱ Chikamatsu K, Sakakura K, Yamamoto T, Whiteside TL, DeLeo AB, Masuyama K. CD4+ Th responses to HLA-DP5-restricted wild-type sequence p53 peptides in patients with head and neck cancer. 99th Annual Meeting American Association for Cancer Research. San Diego, USA, April 12-16, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増山 敬祐 (MASUYAMA KEISUKE)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：30181663

(2) 研究分担者

近松 一郎 (CHIKAMATSU ICHIRO)
山梨大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30301378

(H20～H21：連携研究者)

(3) 連携研究者

松岡 伴和 (MATSUOKA TOMOKAZU)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：30313810