

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ~ 2011

課題番号：21590445

研究課題名（和文） 上皮間葉転換癌細胞の骨髄集積による全身性免疫抑制機構の解明

研究課題名（英文） Bone metastatic tumor cells induce systemic immunosuppression through increase of immunoregulatory mesenchymal stem cells

研究代表者

工藤 千恵 (KUDO CHIE)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90424126

研究成果の概要（和文）：癌の骨転移は、患者のQOLを著しく低下させ、予後不良を招く要因の一つであるが、癌細胞が骨髄に転移すること自体を阻害できる治療法は未だ確立されていない。そこで、我々は、画期的な骨転移治療法を開発することを目的に、骨転移について、従来の癌細胞側からのみならず、宿主免疫側からも腫瘍免疫学的に網羅的に解析した。骨高転移性のSnail発現癌細胞主体に解析した結果、癌細胞はSnailを発現することで骨髄へ転移し、免疫抑制性の細胞群を増加させて抗腫瘍免疫を全身的に抑制するが、特に、癌幹細胞様の細胞群がこの機序を制御している可能性が高いこと、また、Snail下流で制御される特定分子を阻害することによって、全身性の免疫抑制も骨転移も同時に解除できることなどを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Bone metastasis is frequently caused in cancer patients, and negatively affect their quality of life. However, there are no treatments to inhibit cancer metastasis toward bone itself. We found that Snail⁺ cancer cells preferentially metastasize into bone marrow than other organs, and produce systemic immunosuppression mediating via expansion of various immunoregulatory cells. We identified the Snail-downstream molecules that induce cancer metastasis and increase mesenchymal stem cells. These molecules would be good targets for cancer therapy to efficiently inhibit bone metastasis of cancer cells by breaking a crucial link to immunosuppression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：がん、骨転移、免疫抑制

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は、多くの癌種で骨髄や骨へ転移し、予後不良となることが知られており、特に、乳癌や前立腺癌の患者では約70%、腎癌や肺癌などの癌種では約40%と高率に観察さ

れ、それが原因となって死亡する患者は少なくない (Clin Cancer Res 12:6305-6308, 2006; Nature Med 13:25-26, 2007; Cancer metastasis Rev 27:41-55, 2008)。原因としては、骨髄が血管に富んだ組織であることが

重視されており、そこへ転移した癌細胞は、骨代謝を制御する破骨細胞や骨芽細胞に作用して骨を過剰に溶解あるいは形成させ、骨へと浸潤して癌患者の骨折リスクを高め、骨痛によって QOL を著しく低下させることなどが知られている。

しかし、これまでの治療は、鎮痛剤処方や外科的療法、放射線療法が主体であり、骨転移に特異的な治療法は積極的に開発されてこなかった。最近になって、破骨細胞にアポトーシスを誘導してその増殖を抑制する「ビスフォスフォネート」や、骨内に直接注入して骨転移腫瘍を集中的に治療できる放射線「ストロンチウム」などが開発され、臨床治療に新たに導入されている。また、骨髄内に浸潤・定着した癌細胞が形成する病態機序が近年になってようやく解明されつつあり、転移性の癌が産生する PTHrP や、骨髄間質細胞から産生される RANKL を標的とした抗体治療薬なども現在臨床で開発されている。これらの治療薬は、骨痛を大きく軽減し、確かに臨床上大変有用であることは間違いない。しかし、これらは全て、癌細胞が原発巣から離脱して骨髄・骨組織を目指して転移すること自体を特異的に阻害するわけではなく、既に転移してしまった後の対処療法に過ぎない。つまり、癌細胞の転移そのものを阻害しない限りは、患者体内で癌細胞は生存・増殖し続けるであろう。また、過剰骨溶解・形成阻害薬の投与が長期間に及ぶことによって、薬剤耐性等の問題が出現する可能性もある。癌細胞はなぜ骨髄を好んで転移するのか、それは単に血管に富んだ組織であるからなのか、ではなぜその場に定着して生存・増殖するのかなど、骨髄・骨組織へ癌細胞が集積する機構は根本的には解明されていない。

我々はこれまでに、癌転移を制御する「上皮間葉転換 (EMT)」という癌細胞側の現象が、癌細胞自身の浸潤・転移能を高めると同時に、周囲に免疫抑制を強く誘導することで、自らの転移に有利な環境を作り出していることを明らかにしてきた (Cancer Cell, 15:195-206, 2009)。その研究の過程において、EMT を呈する癌細胞は、他臓器に比較し

て骨髄に特に優位に転移することを発見した。そこで、この研究を発展させれば、前述の疑問に対する答え、つまり、癌細胞が骨髄・骨組織へ集積する機構を解明できるかも知れず、多くの癌患者に提供し得る有効な新規治療法を開発できるだろうと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、骨髄・骨転移の新規診断法や新規癌治療法の臨床開発に結び付けることを最終目標に、癌細胞の骨転移機構について、癌細胞側のみならず、宿主免疫側からも網羅的に解明する。さらに、“骨髄という場での癌細胞の増殖”という同観点から、癌の転移に限らず、「癌幹細胞」や「白血病」の病態解明にも本研究を発展させていく。癌細胞が幹細胞性を獲得するためには EMT が重要な役割を果たしていることが最近示されたが (Cell 133:704-715, 2008)、骨髄 niche における癌幹細胞の集積やその機序や、宿主免疫との相互関係については、未だ明らかでない。また、骨髄内で発生・増殖し、重篤な免疫抑制も呈する白血病については、EMT との関連性が示唆されているものの (Oncogene 24:3073-3082, 2005)、病態形成を説明し得る詳細な機序は未だ明らかでない。これらの点を明らかにすることで、癌の難治性全般をより深く総合的に理解できると考えられ、これを基盤にして癌の根治療法の開発に結び付けて行く。

3. 研究の方法

(1) 各種癌細胞株

臨床で骨髄・骨転移が高率に見られる乳癌や前立腺癌、骨髄内で発生・増殖し、免疫抑制が問題となっている白血病など、様々なヒト癌細胞株、また、マウスメラノーマ細胞株 B16 F10 や、過去に樹立した数種の Snail 強制発現細胞株を用いた。

(2) 骨転移制御因子ならびに癌幹細胞マーカーの同定

Snail 発現に伴って誘導される下流分子を同定するため、Snail 強制発現細胞株と親株の遺伝子発現を cDNA microarray で網羅的に比較した。その中から、リウマチ関節炎や骨粗

鬆症など様々な骨関連疾患で知られる分子を抽出し、RT-PCR法やELISA法、免疫組織学的手法、フローサイトメトリーなどで解析することで、候補分子を絞り込んだ。癌幹細胞(CSC)マーカーの同定にあたっては、候補分子を指標に特定の細胞集団に分画し、それぞれの癌形成能や分化能などを解析して癌幹細胞性を比較評価した。

(3) 同定した分子機能の総合的解析

同定した分子の発現意義を追究するため、まずは、Snail や同定した遺伝子に特異的な siRNA を各種癌細胞に導入し、細胞増殖、細胞浸潤、サイトカイン産生、細胞表面抗原発現量などを指標に、癌細胞側への影響を解析した。一方、腫瘍細胞培養上清や同定した分子のリコンビナント蛋白、特異的な中和抗体などを用いてマウスの骨髄細胞や脾臓細胞などを刺激し、骨芽細胞・破骨細胞への分化、免疫細胞の構成比率、細胞機能・活性などを指標に、免疫細胞側からも解析した。

(4) 担癌マウスを用いた *in vivo* 治療実験

骨転移や癌幹細胞に対する治療の標的分子としての有用性を評価するため、Snail 強制発現 B16-F10 細胞株を移植(皮下と静脈内の両方)したマウスを用いて、腫瘍移植5日後に皮下移植腫瘍内へ siRNA を接種した。腫瘍増殖、骨転移、脾臓の抗腫瘍免疫活性などを指標に、その治療効果を評価した。

(5) ペプチドワクチンの開発

Snail やその下流分子を標的としたペプチドワクチン療法を確立するため、HLA 結合予測アルゴリズム BIMAS を利用して、日本人で高頻度に見られる HLA-A24 に優位に拘束性が予測される CTL エピトープペプチド配列を得た。その配列をもとに数種のペプチドを合成し、健常人末梢血由来 CD8⁺ T 細胞を IL2 と同一健常人由来 APC 存在下で数回繰り返し刺激することで、CTL 誘導が可能かどうかを比較・評価した。

4. 研究成果

(1) 骨高転移性 Snail 発現癌細胞による免疫抑制性細胞群の増加

まず、Snail が骨転移を引き起こす要因であることを検証するため、Snail 強制発現癌細胞株だけでなく、内因性の Snail を高発現する種々の癌細胞株をマウスに移植し、全身の臓器への転移を解析したところ、他臓器に比較して明らかに優位に骨髄に転移することが確認された。そこで、次に、転移した癌細胞が骨髄環境に与える影響を免疫学的に解析した。各種アッセイ系においてマウス骨髄細胞を癌細胞の培養上清で3-7日間刺激培養した結果、TRAP⁺ 破骨細胞の分化は強く抑制されるが、免疫抑制活性を示す間葉系幹細胞(MSC)や CD11c⁺Gr1⁺ MDSC が顕著に増加すること、また、Snail 発現癌細胞株を移植したマウスの骨髄内でも同様に、破骨細胞の分化は極端に抑制され、免疫抑制性の細胞群は増加しており、そのマウスの脾臓由来 CD8⁺ T 細胞の CTL 活性は極めて低下していることが分かった。Snail 特異的な siRNA を導入して発現を阻害することによって、これらの骨転移や免疫抑制は解除されたことから、Snail がこの機序を制御していることが確認された。

(2) 骨転移とMSC誘導の両者を司るSnail下流分子の同定

Snail は転写因子であるため、治療の標的とするのは難しい。そこで、Snail が制御するこの機序を直接作動させているエフェクター分子を同定することにした。まず、Snail 強制発現細胞株と親株との間で cDNA microarray を行い、遺伝子発現を網羅的に比較解析、その中から Snail 発現と正の相関性を示し、さらに、リウマチ関節炎や骨粗鬆症など様々な骨関連疾患で知られる分子を抽出し、実際の mRNA やタンパクの発現を解析した。これら候補遺伝子に特異的な siRNA を用いて、癌細胞側と宿主免疫側の両面から前述同様に解析した結果、ある特定の分子が癌細胞の骨転移性と MSC 誘導の両者を制御していることを見出した。この分子は、種々のヒト白血病株でも高発現していた。これに特異的な siRNA を用いた *in vivo* 治療実験によって免疫抑制は解除され、抗腫瘍免疫が全身的に増強されることで、腫瘍増殖や骨転移が有意に抑制できることも分かった。

(3) CSCマーカーの同定ならびにその分子の免疫学的意義

次に、同 cDNA microarray 解析データを活用し、新たな CSC マーカーを同定することにした。CSC の幹細胞性獲得には EMT が重要な役割を果たしているものの、未だヒトやマウス、または、癌種を超えて統一された普遍的マーカーが報告されておらず、しかも、宿主免疫との相互関係はほとんど明らかにされていないからである。高増殖性などを指標に、幹細胞性と相関する上、絶対的に多種類の癌種で発現している分子マーカーを新たに同定することに成功した。興味深いことに、この分子を発現する細胞集団は、これまで見てきた免疫抑制をごく少数でも極めて強力に誘導できること、つまり、全身性の免疫抑制機序を司る正体である可能性が示された。

(4) Snailならびに同定分子のCTLエピトープペプチド構築

悪性要因を根本的に排除するだけでなく、骨髄へ転移・増殖する癌細胞を攻撃・排除するための別のアプローチとして、強力な抗腫瘍免疫を宿主内に誘導することも一つの戦略と考え、HLA結合予測アルゴリズムBIMASを利用して、Snailや同定した分子ペプチドワクチンを確立することにした。健常人末梢血由来 CD8+ T細胞を用いて検討した結果、各分子特異的なCTLを効果的に誘導できるHLA A24拘束性のCTLエピトープペプチドを構築することができた。

以上のように、骨転移に伴って誘導される全身性の免疫抑制機序を分子レベルで解明することに成功し、新たな治療法開発の可能性を提示することができた。特に、癌の起源と考えられ、近年世界中で精力的に研究されている CSC に関して得られた知見は極めて重要で、様々な癌に共通した根治療法を確立する上で大きなヒントが得られたと考えている。

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1件)

(1)Yaguchi T, Kudo Saito C, Yutaka

Kawakami, et al.: The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies, International Journal of Hematology 93: 294-300, 2011、査読有

[学会発表](15件)

- (1)発表者：工藤千恵
発表標題：癌細胞による巧妙な免疫回避機構
学会名：日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
発表年月日：2012年2月16日
発表場所：滋賀
- (2)発表者：工藤千恵
発表標題：Systemic immunosuppression initiated by Snail⁺ tumor cells metastasizing into bone marrow via generation of immunoregulatory mesenchymal stem cells
学会名：日本免疫学会
発表年月日：2011年11月28日
発表場所：千葉阪
- (3)発表者：河上裕、工藤千恵、他
発表標題：Enhanced metastasis through immunosuppressive cancer microenvironment and its control by targeting signaling molecules
学会名：日本癌学会
発表年月日：2011年10月4日
発表場所：名古屋
- (4)発表者：工藤千恵
発表標題：骨髄転移性癌細胞による全身性免疫抑制の誘導とその阻害法の開発
学会名：日本がん転移学会
発表年月日：2011年7月1日
発表場所：浜松
- (5)発表者：工藤千恵
発表標題：Systemic immunosuppression initiated by Snail⁺ tumor cells metastasizing into bone marrow via generation of immunoregulatory mesenchymal stem cells
学会名：日本がん免疫学会
発表年月日：2011年6月30日
発表場所：大阪
- (6)発表者：河上裕、工藤千恵、他
発表標題：がん細胞による免疫抑制機構とその制御

- 学会名：日本医学会総会
発表年月日：2011年4月8日
発表場所：東京
- (7)発表者：不破貴史、工藤千恵、他
発表標題：Identification of the specific molecule governing cancer metastasis toward bone
学会名：日本癌学会
発表年月日：2010年9月24日
発表場所：大阪
- (8)発表者：工藤千恵
発表標題：Eradication of cancer metastasis by breaking a crucial link to systemic immunosuppression underlying poor outcome
学会名：日本癌学会
発表年月日：2010年9月23日
発表場所：大阪
- (9)発表者：河上裕、工藤千恵、他
発表標題：Possible improvement of cancer immunotherapy based on the analyses of anti-tumor immune responses in human
学会名：国際がん生物学シンポジウム
発表年月日：2010年8月28日
発表場所：金沢
- (10)発表者：河上裕、工藤千恵、他
発表標題：Immunosuppression by human cancer cells and its control for effective immunotherapy
学会名：国際免疫学会
発表年月日：2010年8月27日
発表場所：神戸
- (11)発表者：工藤千恵、他
発表標題：Immunosuppression mediated by mesenchymal stem cells and Treg cells during Snail-induced cancer EMT
学会名：国際免疫学会
発表年月日：2010年8月26日
発表場所：神戸
- (12)発表者：工藤千恵、他
発表標題：CCL2 is critical for immunoresistance in association with cancer EMT
学会名：米国癌学会
発表年月日：2010年4月21日
発表場所：ワシントン DC
- (13) 発表者：工藤千恵
発表標題：Translational research for cancer therapy based on immunological

- analysis of the interaction between cancer EMT and host immunity
学会名：日本免疫学会
発表年月日：2009年12月4日
発表場所：大阪
- (14)発表者：工藤千恵、他
発表標題：Systemic immunosuppression induced by preferential metastasis of Snail⁺ cancer cells into bone marrow
学会名：日本免疫学会
発表年月日：2009年12月3日
発表場所：大阪
- (15) 発表者：工藤千恵
発表標題：Cancer metastasis and multiple immunosuppressions simultaneously caused by Snail-induced EMT in cancer cells
学会名：日本癌学会
発表年月日：2009年10月3日
発表場所：横浜

〔産業財産権〕

- 出願状況（計3件）
- (1)名称「がんワクチン」
発明者：工藤千恵
権利者：慶應義塾
種類：特許
番号：PCT/JP2011/057777
出願年月日：2011年3月29日
国内外の別：国内・国外
- (2)名称「抗腫瘍剤およびそのスクリーニング法」
発明者：工藤千恵
権利者：慶應義塾
種類：特許
番号：PCT/JP2010/066890
出願年月日：2010年9月29日
国内外の別：国内・国外
- (3) 名称「がんの診断方法と治療方法」
発明者：工藤千恵
権利者：慶應義塾
種類：特許
番号：PCT/JP2009/065955
出願年月日：2009年9月11日
国内外の別：国外

6 . 研究組織

(1)研究代表者

工藤 千恵 (KUDO CHIE)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：90424126

(2)研究分担者

河上 裕 (KAWAKAMI YUTAKA)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：50161287