

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890247

研究課題名（和文）

がん微小環境における間質細胞・間葉系幹細胞による免疫抑制機構の解明と克服法の開発
研究課題名（英文）

Elucidation of the mechanism of immunosuppression by mesenchymal stem cells in cancer microenvironments

研究代表者

谷口 智恵 (YAGUCHI TOMONORI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40424163

研究成果の概要（和文）：

本研究では、がん微小環境における間葉系幹細胞 (MSC) の免疫学的役割を解析した。骨髄由来の MSC はがん局所に遊走し、がん細胞の増殖を増長させている可能性がマウスモデルを用いて示された。ヒト MSC は IL6, VEGF などの免疫抑制分子を産生し、樹状細胞を抑制して免疫抑制を誘導している事も分かった。以上より、担癌生体では骨髄由来の MSC ががん局所で免疫抑制を誘導している事、MSC が治療ターゲットとなりうる事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we evaluated the immunological roles of mesenchymal stem cells (MSC) in cancer microenvironment. GFP chimeric mouse models showed that bone marrow-derived MSC migrated to cancer tissues and augmented the tumor growth. Human MSC inhibited dendritic cells functions through the production of a variety of immunosuppressive cytokines such as IL6 and VEGF. These results suggested that MSC induced cancer immune evasion in the cancer microenvironment and can be an attractive target for the restoration of immune competence of cancer patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010 年度	970,000	291,000	1,261,000
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：腫瘍免疫

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：間葉系幹細胞、腫瘍免疫回避、がん免疫療法

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒト腫瘍抗原が同定され、様々ながんワクチン（能動免疫法）の臨床試験が実施されたが、期待されたほど十分な効果は認められていない。しかし、能動免疫法では効果がなかった抗原でも、その抗原特異的な培養 T 細胞を投与する養子免疫療法を行った場合には、RECIST 基準で奏効率 72% という

劇的な治療効果も報告されている (Dudley ME et al. *J Clin Oncol* 26 5233-9 2008)。これらの臨床試験の比較、解析から、能動免疫法の抗腫瘍効果が十分でない原因の一つは、担がん生体における免疫抑制的な環境が引き起こす腫瘍免疫逃避であると考えられている。そこで、本研究申請者の所属する慶應義塾大学医学部先端医科学研究所では、この

腫瘍免疫逃避を克服するために、がん細胞による各種免疫細胞への作用を解析し、がん微小環境における免疫抑制の分子機構を明らかにしてきた。

特に、本研究申請者は、免疫療法前の腫瘍の GeneChip 解析で、治療抵抗性への関与が示唆されている Wnt/ β -catenin 経路の腫瘍における活性化の意義を研究してきた。その結果、腫瘍における Wnt/ β -catenin 経路の恒常的活性化は、IL10 などの免疫抑制物質の産生を誘導し、それによって、樹状細胞 (DC:dendritic cell) や抗腫瘍細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の機能低下を起こすことで、腫瘍免疫逃避の根源的な原因となっていることを明らかにした。また、 β -catenin 阻害剤による免疫抑制の解除と免疫療法の効果増強の可能性を示した。

一方 腫瘍組織においては、間質細胞ががん細胞の進展に関与するとの報告があるが、間質細胞による免疫細胞への作用、ひいては、がん細胞と免疫細胞と間質細胞の三者の相互作用については、まだほとんど研究されていない。最近、腫瘍間質細胞には、骨髄由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) がかなり含まれており、がん細胞の転移などに関与することが報告されている (Chiba H et al. Stem cells 26 2523 2008, Karnoub A E et al. Nature 449 557 2007)。以前から、培養された MSC には免疫抑制作用が報告されており、造血幹細胞移植時の急性 GVHD の治療を目的に臨床の場でも使用されている (Le blanc K et al. Lancet 37 1579 2008) ほどであるが、腫瘍組織中の MSC の免疫細胞への影響については全く報告がない。

当研究室では、最近、癌細胞が上皮間葉転換 (EMT) を起こして転移するときには、様々な免疫抑制性サイトカインや免疫抑制性細胞を誘導して、免疫抑制環境を構築し、転移を促進することを見いだした (Kudo et al. Cancer cell 2009)。興味深い事に、研究申請者は、EMT をおこした癌細胞が産生する免疫抑制因子は、培養 MSC が産生する因子とほぼ同等であることを見いだした。さらに、申請者の行った予備実験では、培養 MSC をがん細胞と同時に移植することにより、腫瘍増殖が促進されることを確認した。したがって、腫瘍組織における免疫抑制環境の構築には、がん細胞だけでなく、MSC も含んだ間質細胞も関与している可能性が高く、その解除のためには、申請者がこれまでの研究で示してきたようながん細胞を標的とした治

療に加えて、間質細胞を標的にした治療法の開発が重要であると考えられた。

また、これまで、MSC は骨髄単核球を数週間培養した後の付着細胞としてしか分離できず、培養操作を経ているため、それが、必ずしも生体内の MSC と同等である保証はなかった。最近、我々が共同研究を行っている慶應義塾大学生理学教室では、2つの抗体を用いて、マウス及びヒトの MSC を従来の数十万倍に濃縮し、培養操作を経ないで直接骨髄から分離する方法を開発した (Morikawa S et al. Biochem Biophys Res Commun 379 114 2009)。この方法を用いれば、より生体内の状態に近い MSC を用いて、MSC が腫瘍免疫応答に与える影響を解析できると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、がん組織の間質細胞、特に骨髄由来の間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) が各種免疫細胞に対して及ぼす作用、また、がん細胞・免疫細胞・間質細胞の三者の相互作用を検討し、がん微小環境における免疫抑制の分子機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) マウス MSC の分離および培養

マウス骨髄を乳鉢を用いて粉碎し、更にコラゲナーゼ処理を 37 度で一時間行い、CD45 および TER119 陰性分画の中で、Sca-1 および PDGFR 陽性の分画をセルソーターを用いて分離した。分離した細胞 (P S 細胞) は、MEM α + GlutaMax + 10% FCS で培養した。

(2) ヒト MSC の分離法

ヒト骨髄球を二種類のマーカーで染色しセルソーターを用いて分離した。分離した細胞は DMEM + 10% FCS + bFGF (20ng/ml) で培養した。

(3) GFP キメラマウスの作製、腫瘍の移植

まず EGFP マウス骨髄をコラゲナーゼ処理し骨髄球を採取する。もしくはさらに上記の方法で MSC を分離する。野生型 C57BL/6 マウス (WT マウス) の骨髄からも骨髄球を分離する。GFP 血球キメラマウスは、10.5Gy の放射線照射された WT マウスに、上記 EGFP マウス由来骨髄球を静注移植することで作製し、約 60 日後、血球の 90% 以上が EGFP を発現していることを FACS で確認している。

GFP MSC キメラマウスは、10.5Gy の放射線照射された WT マウスに、上記 EGFP マウス由来 MSC および WT マウス由来骨髄球を静注移植することで作製した。腫瘍を移植する場合は側腹部に 5×10^5 の癌細胞を移植した。MSC を移植する場合は 2.5×10^5 個移植した。移植 2 週間後に腫瘍を摘出、コラゲナーゼ処理後 FACS を用いて MSC を解析した。

(4)癌細胞

MC38、B16 などの癌細胞株は ATCC より購入し、RPMI1640+10%FCS で培養した。

(5)サイトカインの濃度測定

MSC を 24 時間培養液中で培養しその上清に含まれるサイトカインを Bioplex(Biorad 社)を用いて網羅的に解析、測定した。

(6)ヒト樹状細胞の誘導

健常人より末梢血を採血し、フィコール遠心分離法で単核球を分離、CD14 磁気ビーズ(Miltenyi 社)を用いて CD14 陽性単核球を分離した。この細胞を GM-CSF (100ng/ml)と IL-4 (50ng/ml)存在下で 6 日間培養し樹状細胞に分化させた。MSC が樹状細胞に与える影響を解析するとき、この過程で MSC の培養上清を 20%含む状態で培養した。Day6 に LPS (1ug/ml)で刺激、24 時間後に上清を回収し産生された TNF α や IL12 を ELISA で測定した。

4. 研究成果

(1)培養 MSC は腫瘍の増殖を促進する。

MSC が腫瘍の悪性形質の一つである増殖に影響を与えるかを *in vivo* で評価した。PDGFR α +, Sca1 + 細胞(P α S 細胞)を MSC としてマウス骨髄より分離、培養し、大腸がん細胞(MC38)とともにマウスに皮下移植し腫瘍の増殖を観察した。その結果、MC38 は MSC と共に移植された場合、単独で皮下移植された場合に比べて増殖が亢進することが分かった(図 1A)。このことから MSC はがんの増殖に対して何らかの影響を与えていることが示唆された。また、この腫瘍中には、移植から二週間後でも GFP 陽性の MSC 由来の細胞が存在することが分かった。(図 1B)

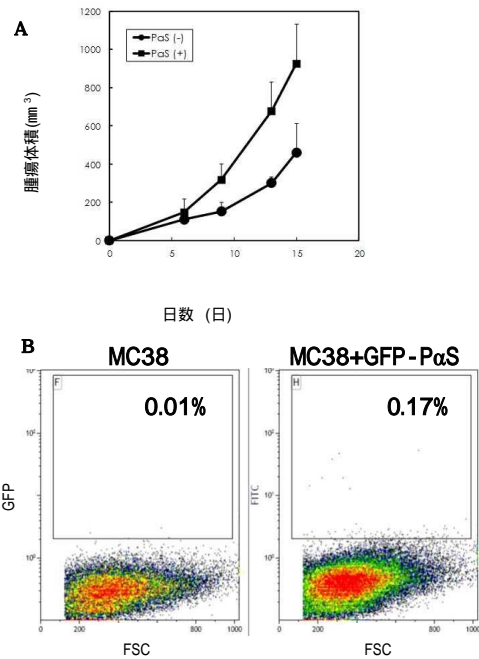


図 1:MSC(P α S 細胞)は腫瘍組織内で癌増殖を促進する (A)P α S と共移植された MC38 がん細胞は増殖が促進した。(B)腫瘍組織内には GFP 陽性の P α S 由来の細胞が認められた。

(2)MSC はがん局所に遊走する。

がん局所に骨髄由来の MSC が移動してくるかどうかについて 2 種類のマウスモデルを構築し検討した。最初のマウスモデルでは、GFP マウスの骨髄をコラゲナーゼ処理し MSC をより多く回収した状態で野生型(WT)マウスに移植し、骨髄由来の MSC 及び血球が GFP で標識されているマウス(GFP-血球キメラマウス)を作製した。このマウスに悪性黒色腫、肉腫、大腸癌など各種マウスの癌細胞株を皮下移植し、腫瘍が増大した時点で組織中の GFP 陽性かつ MSC マーカー陽性(PDGFR α , Sca1)細胞の割合を FACS にて測定した。その結果、大腸癌細胞株および悪性黒色腫で骨髄由来 MSC が腫瘍中に遊走することが分かった(図 2A)。

2 つめのマウスモデルでは、GFP マウスより骨髄 MSC (PDGFR α +, Sca1+)を、WT マウスより骨髄細胞を採取し、WT マウスに骨髄移植し MSC 由来の細胞のみが GFP でマーキングされたキメラマウスを作製した。このマウスに大腸がん細胞を皮下に移植したところ、2-3 週間後に腫瘍局所に GFP 陽性細胞を認めた(図 2B)。このことから、骨髄由来の MSC が癌局所に移動していることが分かった。

今後、これらのがん局所の MSC の遺伝子プロファイルを GeneChip などを用いて網羅的に解析し骨髄 MSC と比較、がんの悪性形質にどのように影響を与えるかを解析する。

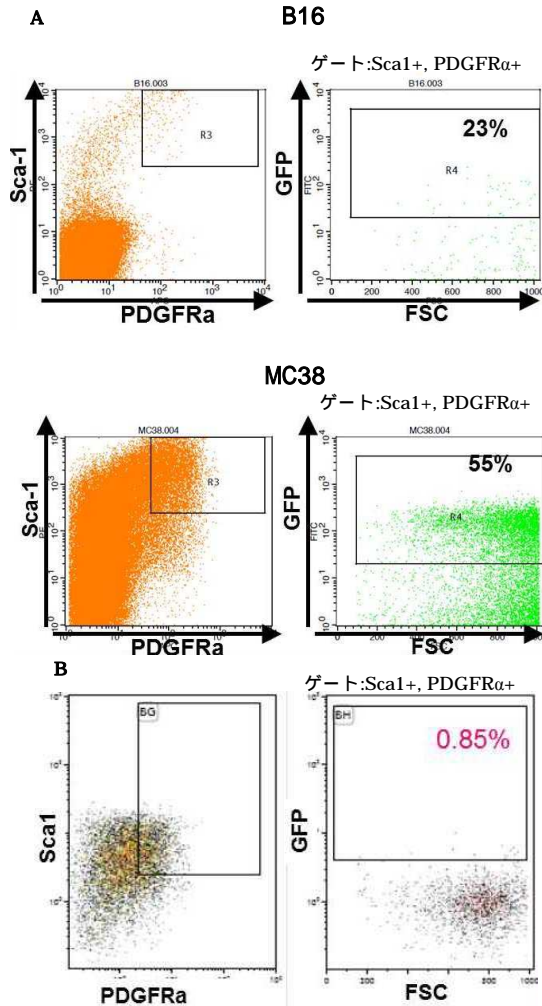


図2: MSC(P⁺S⁺細胞)は骨髄から癌組織局所に移動する (A) GFP-血球キメラマウスに皮下移植された B16 メラノーマ組織内、および MC38 大腸がん組織内には GFP 陽性の PαS 細胞が存在する。(B) GFP-MSC キメラマウスに皮下移植された MC38 大腸がん組織内には GFP 陽性の PαS 細胞が存在する。

(3)MSC はがん局所で癌細胞と融合する。

上記の図 2A の悪性黒色腫細胞株 B16 を用いたモデルでは、腫瘍中の GFP 陽性 MSC 細胞をソーティングし培養した。その中の 1 クロームは DNA 含有量が B16 と骨髄 MSC の合計に等しかった。さらに、GFP 陽性であるが、メラノサイト特異的の蛋白である gp100 が陽性であった(図 3)。以上のことからこのクロームは B16 と骨髄由来 MSC の融合細胞であると推測された。このことから、骨髄中の

MSC はがん局所に移動しかつ、一部はがん細胞と融合する可能性が示唆された。今後このような融合細胞ががんの微小環境中でがん細胞の悪性形質にどのように影響を及ぼすかを解析していく予定である。

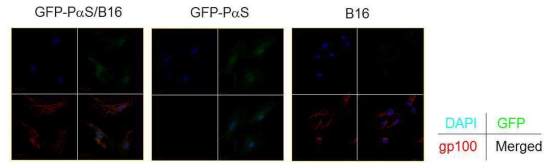


図3: がん組織内で MSC と腫瘍細胞は融合する (A) B16、培養 GFP-PαS、GFP-PαS と B16 の融合細胞(GFP-PαS/B16)の GFP および gp100 の発現を免疫染色で解析した。B16 では gp100 のみ、GFP-PαS では GFP のみ、融合細胞では GFP と gp100 両方の発現がみられた。

(4)ヒト MSC は免疫抑制物質を産生し、樹状細胞を抑制する。

ヒトの骨髄より二つのマーカーを用いて MSC をソーティングし数種類の MSC クロームを作製、産生しているサイトカインを測定したところ、特に IL6、VEGF、MCP-1 などがどのクロームでも高産生されていた。ヒト MSC が樹状細胞に与える影響を評価するために、MSC の培養上清を 20% 含む状態でヒト単球を樹状細胞に分化させ LPS で刺激し産生されるサイトカインを測定した。IL12 や TNFα などの炎症性サイトカインは MSC の上清の添加により減少し、免疫抑制性サイトカインである IL10 の産生は増加した(図 4)。以上の結果より、本マーカーでヒト骨髄球より分離された培養 MSC は樹状細胞の機能を抑え、免疫抑制を誘導する可能性が示唆された。

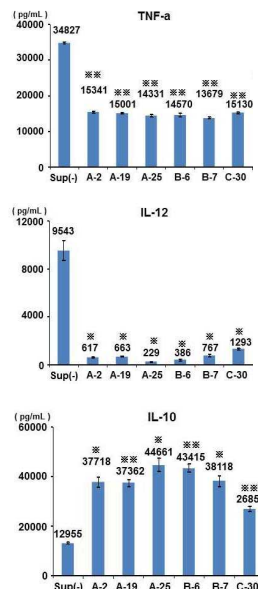


図4: ヒトMSCは樹状細胞の活性化を抑制する

ヒト MSC の各クローム (A-2~C30) の培養上清は LPS 刺激による樹状細胞からの IL12、TNFα の産生を抑制し、IL10 の産生を増加させる。

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 5 件)

1. Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Ueda R, Iwata-Kajihara T, Nishio H, Kawamura N, Kawakami Y. The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies. Int J Hematol (2011) 93: 294–300 査読有
<http://www.springerlink.com/content/c478p246673x144p/fulltext.pdf>
2. Tahara H, Yaguchi T (57 人中 53 番目) et al. Emerging concepts in biomarker discovery; The US-Japan workshop on immunological molecular markers in oncology. J Transl Med. 7: 45 2009 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19534815>

[学会発表] (計 14 件)

1. Yaguchi T, Goto Y, Kido K, Mochimaru H, Sakurai T, Tsukamoto N, Kudo-Saito C, Fujita T, Sumimoto H, Kawakami Y., Immune escape of human melanoma via activated Wnt/ β -catenin signaling., 14th International Congress of Immunology 2010, Kobe International Convention Center, 2010/8/25
2. 河上裕、住本秀敏、工藤千恵、塚本信夫、植田良、梶原知子、川村直、谷口智憲, シンポジウム 2 「次世代がん免疫療法の開発に向けた基礎・応用研究」 「がん免疫逃避機構とその制御」, 第 14 回日本がん免疫学会, KKR ホテル熊本, 2010/7/23
3. 谷口智憲、岩田-梶原知子、川村直、工藤-斉藤千恵、住本秀敏、河上裕、MAPK signaling is a potential target for improvement of immunotherapy through reversal of immunosuppressive tumor microenvironment. 第 39 回日本免疫学会総会、大阪、2009 年 12 月 2-4 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

谷口 智憲 (YAGUCHI TOMONORI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 40424163