

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591141

研究課題名(和文)小細胞肺癌に対する癌幹細胞特異的蛋白質を標的とした新規抗腫瘍免疫療法の開発

研究課題名(英文)Anti-tumor immunotherapy targeting a cancer stem cell-specific protein for small cell lung cancer

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：背景：小細胞肺癌が早期から血行性リンパ行性転移を来すメカニズムとして、比較的多数の癌幹細胞を有していることが考えられている。本研究では、マウスメラノーマ癌幹細胞をプロテオーム解析することで同定した癌幹細胞特異的蛋白質であるDDX3Xに着目した。

結果：小細胞肺癌細胞株は多数の癌幹細胞マーカー陽性癌細胞を含んでおり、DDX3Xの発現も高度であった。遠隔転移を有していない限局型患者12名中5名の血液には、DDX3Xを認識するCD4T細胞が含まれていたが、遠隔転移を有する患者、健常者では全く認められなかった。

DDX3X反応性T細胞はマウス腫瘍モデルにおいて腫瘍退縮効果を示した。

研究成果の概要(英文)：[Background] Small cell lung cancer (SCLC) possesses high tendency to disseminate. However, SCLC patients with paraneoplastic syndrome mediated by immunity against onconeural antigens remain in limited-stage disease (LD) without distant metastases. We previously reported that DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked (DDX3X) is an immunogenic protein preferentially expressed in CD133+ murine melanoma cells exhibiting biological CSC features. [Results] Five of 15 LD-SCLC patients possessed DDX3X-responsive effector T cells. CD4+ effector T cells obtained from peripheral blood of 5 LD-SCLC secreted significantly more IFN γ upon DDX3X antigen stimulation in the presence of CD11c+ autologous dendritic cells. effector T cells from one LD-SCLC patient responded to DDX3X. In contrast, effector T cells obtained from ED-SCLC patients or healthy volunteers never responded to DDX3X. DDX3X-primed CD4+ T cells mediated potent antitumor therapeutic efficacy in murine models.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：DDX3X 小細胞肺癌 抗腫瘍免疫療法

1. 研究開始当初の背景

“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、エフェクターCD4⁺T細胞とTreg間にシーソー型のバランスが見られることを明らかとした。即ち、遠隔転移を持つ進展型(ED)ではTreg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細胞が増加しておりTregは健常者と比較しても増加がなかった。以上より、小細胞肺癌患者における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ことが示唆された。また、この研究の中で、IL-17を産生するTh17型CD4⁺T細胞がLD患者に多く存在することを明らかとした(Koyama, K., Kagamu, H., et al., Clinical Cancer Res., 2008)。さらに、“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(基盤研究C課題番号20590915)においてTh17細胞を誘導する環境、抗原について解析を進めた。この結果、CD133⁺癌幹細胞を接種すると、親株癌細胞を接種した場合にみられるTregの誘導がほとんど見られずTh1, Th17型エフェクターCD4⁺T細胞が誘導されることを見出した。このCSCに存在する高免疫原性抗原を解析するため、大量培養可能なB16メラノーマ癌幹細胞を用いてプロテオーム解析を行った。この結果、DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked (DDX3X)が癌幹細胞特異的であることを見出した。

2. 研究の目的

我々は癌幹細胞(CSC)を標的とする抗腫瘍免疫療法が極めて有効であることを見出した。また、DDX3XがCSC特異的蛋白質であることを明らかとした。CSCを標的とする治療は世界で研究されているが、蛋白質レベルの抗原を明らかにした上で*in vivo*の抗腫瘍効果を示したのは初めてである。さらに、我々は小細胞肺癌にCD133陽性癌細胞が存在すること、この細胞がDDX3Xを発現していることが確認されている。本研究では、小細胞肺癌根治を目指すDDX3X標的抗腫瘍免疫療法の確立を目指す。これは、各種癌が共有する癌幹細胞特異的蛋白質を標的とし癌腫を超えて根治を得る画期的治療法の開発に結びつくものである。

3. 研究の方法

1. DDX3Xの発現が小細胞肺癌患者の予後と相関し、がん治療選択に寄与するバイオマーカーとなりうることを明らかにする。

1) 小細胞肺癌、非小細胞肺癌の手術検体及び気管支鏡生検検体を用いて、

CD133, CD44, CD24, DDX3Xの発現を解析する。DDX3Xについてはポジティブコントロールで陽性となる免疫組織化学染色に適した抗体をすでに確認している。

2) 小細胞肺癌患者末梢血に誘導されたエフェクターT細胞と制御性T細胞の解析

すでに限局型小細胞肺癌患者末梢血には腫瘍抗原を認識するエフェクターCD4⁺T細胞が存在していることを明らかとしている。このT細胞がDDX3Xするか、DDX3X特異的T細胞の存在と予後が相関するかについて検討を行う。

小細胞肺癌末梢血からファイコールを用いて単核球分画を分離し、CD4, CD8, CD62L, CD25, FoxP3発現をフローサイトメトリーにより解析する。これによりエフェクターT細胞・制御性T細胞比率を解析する。

DDX3X抗原刺激によるサイトカイン産生解析: DDX3Xをパルスした樹状細胞とCD62L^{low}CD4⁺T細胞、CD62L^{low}CD8⁺T細胞をそれぞれ共培養し分泌されたIFN γ , IL-17, IL-4をELISAにより解析する。T細胞分画の純化にはdynabeadsTM, microbeadsTM (autoMACSTM)を用いる。

化学療法後のDDX3X反応性T細胞推移を経時的に検討する。末梢血中CD62L^{low}CD4⁺T細胞に関して、Th1, Th2, Th17比率を解析する試みとしてT-bet, GATA-3, ROR γ t発現をrealtime PCR, cytosolic FACSにより解析する。

2. DDX3X knock downによる解析:

細胞: B16メラノーマ幹細胞、HCT116(ヒト大腸癌)、87.5(ヒト小細胞肺癌)、MCF7(ヒト乳癌)細胞; これらの細胞はDDX3Xを発現していることをすでに確認している。

DDX3X knock down: shRNAの手法を用いてDDX3X knock downを行う。B16メラノーマ幹細胞に対して5種類のshRNA配列についてレンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入をすでに終了し、ウエスタンブロッティングにより2種類のshRNA配列によりDDX3X発現低下したクローンを得ている。ヒト癌細胞へのshRNA導入を順次施行していく。

癌幹細胞形質の評価;

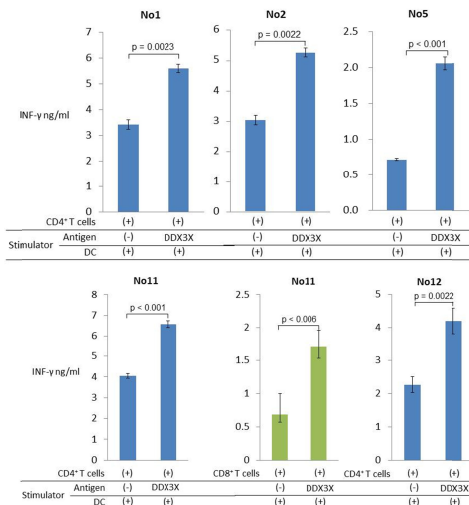
DDX3X発現量の比較的少ない肺腺癌細胞株を用いて、DDX3X強制発現腫瘍を確立し、癌幹細胞形質との

関連を解析する。

- i. 無血清培地における spheroid 形成能、軟寒天培地での増殖能を評価することで足場非依存的増殖能を評価する。
- ii. 細胞表面抗原として CD133, CD24, CD44, CXCR4, ATP transporter, insulin-like growth factor receptor などをフローサイトメトリーにより解析する。
- iii. ウェスタンブロッティングにより幹細胞形質に重要と考えられている Oct-4, Sox2, β -catenin, Bmi1, hedgehog, hTERT などの発現を解析する。
- iv. 抗がん剤耐性、放射線耐性への影響を評価する。抗がん剤耐性、放射線耐性の低下が見られた場合には HDAC, ERCC1, DNA 修復遺伝子産物、anti-apoptotic protein の発現について検討する。

4. 研究成果

1. 小細胞肺癌患者に誘導される DDX3X 特異的 T 細胞



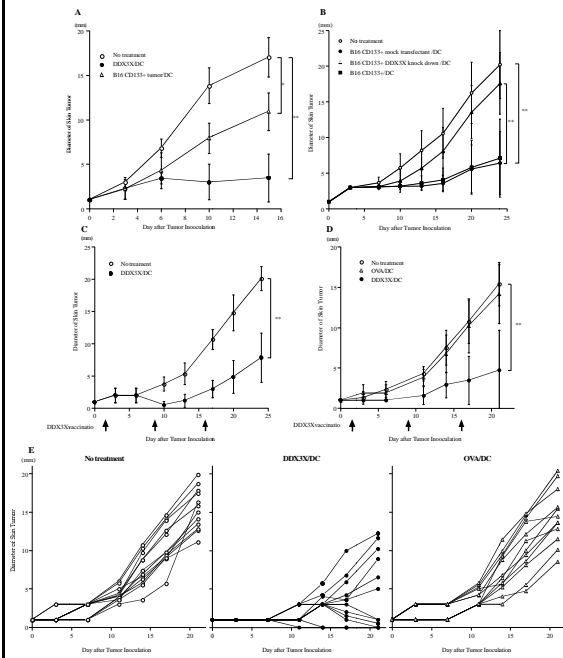
SCLC-LD 15 名、SCLC-ED 8 名、治癒した SCLC-LD 5 名、健常者 6 名の末梢血中リンパ球を解析した結果、SCLC-LD 15 名中 5 名の末梢血由来 CD62L^{low} CD4⁺ T cells, 1 名の CD62L^{low} CD8⁺ T cells より DDX3X 特異的 IFN 産生が認められた。

SCLC-ED、治癒後 SCLC-LD、健常者から得られた CD62L^{low} CD4⁺ T cells、CD62L^{low} CD8⁺ T cells からは DDX3X 特異的 IFN 産生は認められなかった。この結果は、AACR annual meeting において発表した。

2. DDX3X 特異的 T 細胞による抗腫瘍効果

マウスメラノーマを用いて DDX3X によるワクチン効果を検討した。Fig.1 に示したように、樹状細胞に DDX3X 蛋白をパルスして皮下接種したマウスはメラノーマの成長遅延、拒絶を示した。

Fig. 1



次に、DDX3X パルス樹状細胞でワクチンした所属リンパ節から DDX3X 特異的 T 細胞を分離し、皮下腫瘍モデルを用いて抗腫瘍効果を検討した。Fig.2 に示したように DDX3X 特異的 CD4⁺ T 細胞に高い抗腫瘍効果があることが明らかとなった。この結果は、*Cancer Immunology Immunotherapy* に発表した。

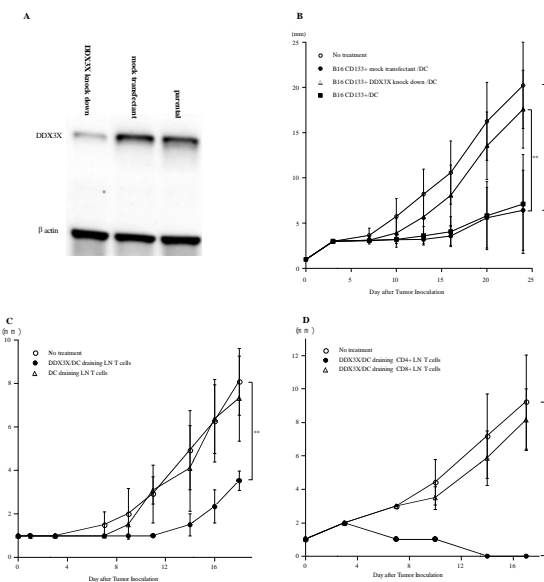


Fig. 2

3. DDX3X による癌幹細胞化誘導

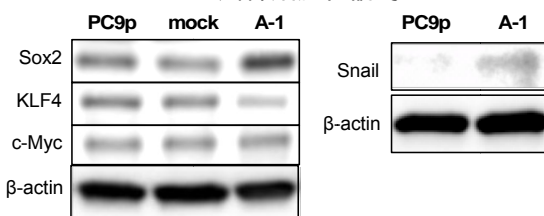


Fig. 3

DDX3X が癌幹細胞化に与える影響を調べる

ために、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌細胞株である PC9 を用いて検討した。PC9 に DDX3X を強制発現させた A-1 細胞を確立し、幹細胞化、EMT 化に重要と考えられている転写因子発現を調べた。この結果、Fig.3 の通り A-1 細胞は Sox2, Snail を高発現するようになることが明らかとなった。

さらに、DDX3X の強制発現により癌幹細胞マーカーALDH, CD44 発現が増加し(Fig. 4)、足場非依存的増殖能を獲得した(Fig.5)。

Fig. 4

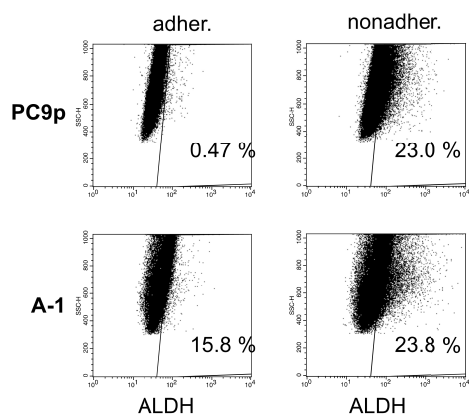
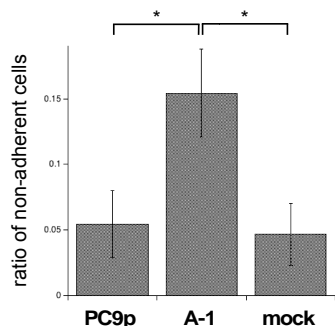


Fig. 5



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. Koshio, J., Kagamu, H., Nozaki, K., Saida, Y., Tanaka, T., Shoji, S., Igarashi, N., Miura, S., Okajima, M., Watanabe, S., Yoshizawa, H., and Narita, I. (2013) DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked is an immunogenic target of cancer stem cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **62**, 1619-1628 査読あり
2. Ishikawa, D., Takeuchi, S., Nakagawa, T., Sano, T., Nakade, J., Nanjo, S., Yamada, T., Ebi, H., Zhao, L., Yasumoto, K., Nakamura, T., Matsumoto, K., Kagamu, H., Yoshizawa, H., and Yano, S. (2013) mTOR inhibitors control the growth of EGFR mutant lung cancer even after acquiring resistance by HGF. *PLoS one* **8**, e62104 査読あり

3. Baba, J., Watanabe, S., Saida, Y., Tanaka, T., Miyabayashi, T., Koshio, J., Ichikawa, K., Nozaki, K., Koya, T., Deguchi, K., Tan, C., Miura, S., Tanaka, H., Tanaka, J., Kagamu, H., Yoshizawa, H., Nakata, K., and Narita, I. (2012) Depletion of radio-resistant regulatory T cells enhances antitumor immunity during recovery from lymphopenia. *Blood* **120**, 2417-2427 査読あり
4. Ichikawa, K., Kagamu, H., Koyama, K., Miyabayashi, T., Koshio, J., Miura, S., Watanabe, S., Yoshizawa, H., and Narita, I. (2012) Epitope diversification driven by non-tumor epitope-specific Th1 and Th17 mediates potent antitumor reactivity. *Vaccine* **30**, 6190-6197 査読あり
5. Miyabayashi, T., Kagamu, H., Koshio, J., Ichikawa, K., Baba, J., Watanabe, S., Tanaka, H., Tanaka, J., Yoshizawa, H., Nakata, K., and Narita, I. (2011) Vaccination with CD133(+) melanoma induces specific Th17 and Th1 cell-mediated antitumor reactivity against parental tumor. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **60**, 1597-1608 査読あり
6. Watanabe, S., Tanaka, J., Ota, T., Kondo, R., Tanaka, H., Kagamu, H., Ichikawa, K., Koshio, J., Baba, J., Miyabayashi, T., Narita, I., and Yoshizawa, H. (2011) Clinical responses to EGFR-tyrosine kinase inhibitor retreatment in non-small cell lung cancer patients who benefited from prior effective gefitinib therapy: a retrospective analysis. *BMC cancer* **11**, 1 査読あり

[学会発表](計 6 件)

1. Satoshi Shoji, Hiroshi Kagamu, Koichiro Nozaki, Tomohiro Tanaka, Natsue Igarashi, Ko Sato, Satoshi Watanabe, Hirohisa Yoshizawa, and Ichiei Narita
DDX3X plays a critical role in a novel EGFR-TKI resistance mechanism correlating with CSC-like properties, 2013.9.4
日本癌学会総会(横浜)
2. Koichiro Nozaki, Hiroshi Kagamu, Jun Koshio, Kosuke Ichikawa, Yu Saida, Tomohiro Tanaka, Satoru Mirura, Satoshi Watanabe, Hirohisa Yoshizawa, and Ichiei Narita
DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked plays an oncogenic roles to induce cancer stem cell-like properties, 2013.4.9
American Association for Cancer Research 2013 annual meeting, Washington DC, USA
3. Koichiro Nozaki, Hiroshi Kagamu, Jun Koshio, Kosuke Ichikawa, Yu Saida, Tomohiro Tanaka, Satoru Mirura, Satoshi

Watanabe, Hirohisa Yoshizawa, and Ichiei Narita
DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked plays an oncogenic roles to induce cancer stem cell-like properties, 2012.9.24
European Society for Medical Oncology
2012 annual meeting, Viena, Austria
Best Poster Award

4. Koichiro Nozaki, Hiroshi Kagamu, Jun Koshio, Kosuke Ichikawa, Yu Saida, Tomohiro Tanaka, Satoshi Watanabe, Hirohisa Yoshizawa, and Ichiei Narita
Oncogenic roles of DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked

日本癌学会総会（札幌）2012.9.20

5. Kosuke Ichikawa, Hiroshi Kagamu, Jun Koshio, Yu Saida, Junko Baba, Takao Miyabayashi, Satoshi Watanabe, Hiroshi Tanaka, Junta Tanaka, Hirohisa Yoshizawa, Koh Nakata, and Ichiei Narita
DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked is a CD133⁺ tumor-specific protein and induces antitumor immunity, 2011.9.23

European Society for Medical Oncology
2011 annual meeting. Stockholm, Sweden

6. Jun Koshio, Hiroshi Kagamu, Yu Saida, Kosuke Ichikawa, Junko Baba, Takao Miyabayashi, Satoshi Watanabe, Hiroshi Tanaka, Junta Tanaka, Hirohisa Yoshizawa, Koh Nakata, and Ichiei Narita
DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked is a CD133⁺ tumor-specific protein and induces antitumor immunity, 2011.4.3

American Association for Cancer Research
2011 annual meeting, Orland, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：癌幹細胞に発現する分子をターゲットとした癌を診断、治療する方法
発明者：各務博、成田一衛、林隆史、後藤義博

権利者：同上

基礎出願

出願番号：特願2012-193757

出願日：2012/09/04

種類：特許

番号：PCT/JP2013/074172

出願年月日：2013年9月3日

国内外の別：国外

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

各務 博 (Hiroshi Kagamu)

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 (Ko Nakata)

新潟大学医歯学総合病院 教授

研究者番号：80207802

土田 正則 (Masanori Tsuchida)

新潟大学 医歯学系 教授

研究者番号：60293221

(3) 連携研究者

()

研究者番号：