

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430122

研究課題名(和文) 癌細胞と宿主免疫の両者を同時にリプログラムする癌根治療法の開発

研究課題名(英文) Research and development of innovative therapeutics for treating cancer by reprogramming both tumor malignancy and abnormal immunity

研究代表者

工藤 千恵 (Kudo-Saito, Chie)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：90424126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ALCAM (CD166)は、がん幹細胞(CSC)と間葉系幹細胞(MSC)に共通して高発現することが知られるが、その機能的役割については未だ明らかでない。本研究では、ALCAMについて分子生物学的、腫瘍生物学的、免疫学的、病理学的な手法を駆使して多面的に解析し、その結果、単にCSCやMSCの目印であるだけでなく、がん細胞の幹細胞性や免疫逃避、免疫抑制性細胞群の免疫抑制活性などを制御する機能分子であることから、ALCAM標的阻害療法は、がん進展に有利に編集された免疫環境をリプログラムして、抗腫瘍免疫を効果的に誘導できることを明らかにした。今後、臨床治療への応用を目指す。

研究成果の概要(英文)：ALCAM (CD166) is known as a marker that is highly expressed in cancer stem cells (CSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) of human and mice. In this study, we additionally found that ALCAM is highly expressed in immunosuppressors such as Tregs and MDSCs as well as MSCs. We conducted comprehensive research in vitro and in vivo, and revealed that ALCAM plays a functional role not only in immunosuppressive activity of these immunosuppressors on induction of tumor-specific CTLs, but also in stemness including self-renewability and chemoresistance of CSCs and MSCs, and that blocking ALCAM successfully induces anti-tumor immunity enough for eliminating tumors by abrogating the cancer-caused immune dysfunction in murine tumor models. Thus, targeting ALCAM may be a distinct and promising strategy for treating cancer by simultaneously reprogramming both tumor malignancy and abnormal immunity in clinical settings.

研究分野：腫瘍免疫、腫瘍生物学

キーワード：ALCAM がん転移 がん幹細胞 免疫抑制 免疫疲弊

1. 研究開始当初の背景

がんの悪性形質は、がん細胞自身の性質や能力だけでなく、周囲の微小環境や宿主環境全体によっても影響を受け、その相互作用によってさらに進化する。我々はこれまで、がん細胞側の悪性形質を対宿主的な観点から免疫学的にも解析するという独自の研究戦略を世界に先駆けて展開し、画期的な新規がん治療法の開発に挑んできた。その結果、EMT制御転写因子である Snail を高発現するがん幹細胞 (CSC) 様の難治性がん細胞は、自らの悪性形質を高めるだけでなく、制御性 T 細胞 (Treg) や骨髄由来抑制性単球 (MDSC)、間葉系幹細胞 (MSC) を全身的に誘導・増幅して、抗腫瘍免疫の誘導を強力に抑制することを分子レベルで明らかにしてきた (Cancer Cell 15:195, 2009; Cancer Res, 2013; OncoImmunology 2-e26528, 2013)。

その中でも特に、CSC 様がん細胞が誘導する MSC は、再生医療分野で従来研究されてきたがん非存在下の正常 MSC とは大きく異なり、より積極的にがん進展を支持しており、中心的な役割を果たしていることを見出した。すなわち、自己増殖能や多分化能などの幹細胞性や、制御性 T 細胞 (Treg) や骨髄由来抑制性単球 (MDSC) などの免疫抑制性細胞群の誘導や増幅を介した免疫抑制誘導活性だけでなく、がん細胞に高い増殖性・転移性・治療抵抗性を付与することができ、しかも、抗腫瘍免疫を抑制するどころか、CTL 機能を不全化して免疫系を破綻させるマルチ機能を有す。我々は、このような異常な MSC の表現型として、『ALCAM (CD166)』を同定した。進行期乳癌患者の腫瘍組織内に MSC 様の ALCAM 陽性細胞がクラスターを形成して多数存在することを確認しており、臨床治療上も ALCAM 標的療法が有用である可能性は高い。しかし、ALCAM の細胞機能に関しては、未だ詳細は分かっていない。

一方、ALCAM は、CSC にも高発現しており、自己増殖する上で極めて重要な役割を果たしていることが知られる。しかし、MSC と同様、CSC 活性全般における ALCAM 機能や ALCAM 下流の細胞内シグナル伝達系などは未だ明らかでない。また、*in vivo* 治療実験では、ヒト腫瘍を移植した免疫不全マウスしか用いられていないため、免疫系への ALCAM 阻害の影響などはほとんど解析されていない。CSC と MSC の両者を同時に制御できれば、がん進展に有利に編集された免疫環境を正しく修正でき、がんを攻撃・排除するための抗腫瘍免疫をより一層効果的に誘導・増強できる治療が可能となるかも知れない。

2. 研究の目的

本研究では、まずは、がん細胞と免疫系の両

側面から ALCAM 分子の機能的役割を多面的に解析し、抗腫瘍免疫ネットワークにおける ALCAM 発現の意義を明らかにする。そして、将来的な臨床応用を見据えて、がん細胞によって負に編集された免疫系を正しく初期化し、より効果的に抗腫瘍免疫を誘導できる新たながん治療法の開発に挑む。

3. 研究の方法

(1) ALCAM 発現免疫細胞群の同定

我々はこれまで、Snail 発現がん細胞を移植したマウスでは、骨髄や脾臓中の CD45 陽性分画にも ALCAM 発現細胞が増加してくることを見出している。しかし、ALCAM 以外の表現型や性状、機能などの特性については、一切明らかでない。そこで、マウスやヒトの末梢血細胞や骨髄細胞などを用いて、CD45+ALCAM+細胞集団をフローサイトメトリーなどで解析するとともに、その細胞分画を分離して T 細胞増殖系や樹状細胞分化誘導系などへ添加し、その影響を解析する。

(2) ALCAM 下流シグナル伝達系の解析

ALCAM の結合様式には、高親和性の ALCAM-CD6 ヘテロ結合と、低親和性の ALCAM-ALCAM ホモ結合の二種類が知られており、CD6 の下流では ERK1/2-p38-JNK が活性化されることが示されている。しかし、ヘテロ結合時の ALCAM 側、あるいは、ホモ結合時の ALCAM については、その下流のシグナル伝達系や幹細胞性や免疫抑制誘導活性に結び付く一連のシグナルカスケードなどはほとんど分かっていない。そこで、ALCAM を発現するがん細胞や免疫細胞などを各種シグナル阻害剤や siRNA など処理し、表現型、性状、活性などへの影響を解析する。

(3) 可溶性 ALCAM 産生の意義

ADAM17/TACE によって切断された可溶性 ALCAM (sALCAM) が報告されているが、がん病態との関連性については未だ明らかでない。そこで、細胞培養上清や担癌マウスの血清などを用いて sALCAM 量を ELISA で測定するとともに、sALCAM の作用活性を明らかにするため、がん細胞や免疫細胞への添加培養による影響を解析する。

(4) *In vivo* 抗腫瘍免疫応答の解析

ALCAM を標的とする治療が臨床治療上有用か否かを見極めるため、ALCAM 陽性または陰性のマウス腫瘍細胞株を移植したマウス担がんモデルを用いて、ALCAM 特異的な siRNA や中和抗体などを用いた ALCAM 阻害治療を行い、腫瘍サイズや転移量、マウス生存日数などの抗腫瘍効果だけでなく、抗腫瘍免疫の増強系

(T 細胞, 樹状細胞, NK 細胞など)と抑制系 (Treg, DCreg, MDSC, MSC など)の両面から免疫応答を広範に比較解析する。

(5) 臨床解析

様々ながん種の患者から採取した市販の腫瘍組織や末梢血細胞などを用いて、ALCAM 発現や ALCAM と密接な関係が示唆された分子群の発現を同時に解析し、臨床病態との関連性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) がん細胞における ALCAM 発現の解析

がん細胞に発現する ALCAM の分子機能を明らかにするため、様々なヒトがん細胞株 (乳がん、大腸がん、膵がん、肺がん、悪性黒色腫、白血病、リンパ腫) を用いて、RT-PCR 法で ALCAM の mRNA 発現を解析した。その結果、乳がんと大腸がんで高発現しており、特に、高転移性の細胞株で ALCAM 発現が著しく亢進していることが分かった。つまり、ALCAM 高発現性は、特に乳がんと大腸がんの病態形成に寄与している可能性が推察された。

(2) がん細胞における ALCAM 機能の解析

ALCAM 高発現 subpopulation を含むヒトとマウスの乳がん細胞株 (MCF7, 4T1) を用いて、ALCAM 陰性/陽性の細胞分画に分離、または、ALCAM 陽性細胞分画に ALCAM 特異的な siRNA を導入して、ALCAM 発現に伴う EMT/CSC 関連遺伝子発現や細胞機能などの変化を腫瘍生物学的に比較解析した。その結果、ALCAM 発現の低下に伴って、EMT/CSC 関連遺伝子の発現は低下し、Sphere 形成、Matrigel 浸潤、化学療法剤に対する抵抗性は有意に低下することが分かった。つまり、ALCAM は、がん細胞の逃避性や幹細胞性を制御する重要な機能分子であると考えられる。

(3) 免疫細胞における ALCAM 発現の解析

ALCAM を発現する免疫細胞集団の特性を明らかにするため、マウス骨髄細胞や脾臓細胞を免疫学的に解析し、CD45+ALCAM+細胞は免疫抑制性の Foxp3+CTLA4+ Treg や CD11b+Gr1+ MDSC と、無反応性の Tim3+PD1+疲弊 T 細胞から構成され、これらは担がんに伴って増加することが分かった。つまり、ALCAM は従来報告されている“活性化マーカー”というよりはむしろ、担がん下の免疫異常を代表する分子マーカーと考えられる。また、ヒト末梢血細胞においても、マウスで同定した ALCAM 発現免疫抑制性細胞群が存在することを明らかにし、臨床的 relevancy を確認できた。

(4) 免疫細胞における ALCAM 機能の解析

リコンビナント sALCAM で CD8+ T 細胞を刺激すると、ごく低濃度でも CD8+ T 細胞は疲弊状態から細胞死に至ることが分かった。つまり、生体内で sALCAM が増加すると抗腫瘍免疫が破綻してしまうことを示唆する。一方、様々なシグナル阻害剤で処理した解析では、この ALCAM 作用は、これまで報告されている CD6 とのヘテロ結合による ERK1/2 ではなく、PI3K-Akt-mTOR を介していることを見出した。つまり、がん治療において、mTOR 阻害剤などとの併用による相乗効果が期待された。

(5) マウスを用いた ALCAM 阻害治療実験

上記 in vitro 実験結果から、がん微小環境における ALCAM の分子機能を標的として阻害することで、がん細胞の弱体化と同時に、免疫系を正しく修正できる可能性が示唆されたことから、その仮説を検証すべく、マウスメラノーマ B16-F10 などを皮下・静脈内移植したマウス担がんモデルを用いて、ALCAM 阻害抗体を投与した。その結果、特に転移モデルにおいては ALCAM+細胞や sALCAM が全身的に増加し、しかし、ALCAM 阻害療法によって、皮下腫瘍増殖や肺転移などは有意に抑制され、マウスの生存期間も延長されることが分かった。つまり、ALCAM を標的とした阻害治療は、がん治療において有用であることを示唆している。

(6) 臨床解析

市販の患者由来腫瘍組織について免疫組織化学的解析を行い、腫瘍細胞株で高発現性が確認された乳がんや大腸がんを含む様々ながん種の腫瘍組織において、ALCAM 発現が亢進していることを確認した。したがって、ALCAM を標的としたがん治療は、臨床治療においても有用である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

① Kinoshita T, Kudo-Saito C, et al. (15人中10番目): Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes differs depending on histological type and smoking habit in completely resected non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 査読有, 27: 2117-2123, 2016, DOI:10.1093/annonc/mdw319

② Kudo-Saito C, Fuwa T: Targeting ALCAM in the cryo-treated tumour microenvironment successfully induces systemic anti-tumour immunity. *European Journal of Cancer*, 査読有, 62:54-61, 2016, DOI:10.1016/j.ejca.2016.04.013

③ Kudo-Saito C: Cancer-associated mesenchymal stem cells aggravate tumor progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 査読有, 3:23, 2015, DOI:10.3389/fcell.2015.00023

④ Kudo-Saito C, Yura M, Yamamoto R: Induction of immunoregulatory CD271+ cells by metastatic tumor cells that express human endogenous retrovirus H. *Cancer Research*, 査読有, 74:1361-1370, 2014, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1349

[学会発表] (計 1 2 件)

① Kudo-Saito C, Ishida A, Shoya Y, Toyoura M: Blocking FSTL1 breaks tumor-supportive vicious circulation. *日本癌学会*, 10/8/2016, パシフィコ横浜 (神奈川)

② Ogiwara Y, Toyoura M, Aoki K, Kudo-Saito C: Targeting FSTL1 is a new approach to treatment of pediatric cancers. *日本癌学会*, 10/6/2016, パシフィコ横浜 (神奈川)

③ Kudo-Saito C: Targeting FSTL1 augments therapeutic activity of immune checkpoint inhibitors. *International Cancer Immunotherapy Conference*, 9/28/2016, New York (USA)

④ Kudo-Saito C, Toyoura M, Shoya Y, Ishida A, Kon R: Blocking FSTL1 reprograms cancer-caused abnormal immunity. *米国癌学会議*, 4/19/2016, New Orleans (USA)

⑤ Kudo-Saito C, Ishida A, Toyoura M: Anti-FSTL1 blocking mAb reprograms and activates anti-tumor immunity for treating cancer metastasis. *日本癌学会*, 10/10/2015, 名古屋国際会議場 (愛知)

⑥ Ishida A, Shouya Y, Toyoura M, Kudo-Saito C: Establishment of anti-FSTL1 mAb as a next generation of immune checkpoint inhibitors. *日本癌学会*, 10/9/2015, 名古屋国際会議場 (愛知)

⑦ Toyoura M, Ishida A, Shouya Y, Kudo-Saito C: Establishment of monoclonal antibodies specific for a tumor aggravator FSTL1. *日本癌学会*, 10/9/2015, 名古屋国際会議場 (愛知)

⑧ Kudo-Saito C, Toyoura M, Shouya Y, Ishida A, Saito K, Awada C: Targeting FSTL1 improves immune suppression and dysfunction accompanied by bone metastasis. *Cell Symposia: Cancer*

Inflammation & Immunity, 6/14/2015, Sitges (Spain)

⑨ Kudo-Saito C, Fuwa T, Murakami K: Differential efficacy of immune checkpoint inhibitors on bone metastasis and its associated immune dysfunction. *米国癌学会*, 4/19/2015, Philadelphia (USA)

⑩ Kudo-Saito C, Fuwa T, Murakami K: ALCAM+ MSC-derived hypertrophic adipocytes cause immune exhaustion leading to tumor progression. *日本免疫学会*, 12/11/2014, 京都国際会館 (京都)

⑪ Kudo-Saito C, Yamamoto R, Yura M: Tumor heterogeneity caused by mesenchymal stem cells in tumor microenvironment. *日本癌学会*, 9/26/2014, パシフィコ横浜 (神奈川)

⑫ Kudo-Saito C, Fuwa T, Murakami K: Immune dysfunction cascades caused by ALCAM+ mesenchymal stem cells toward tumor progression. *米国癌学会議*, 4/6/2014 (San Diego (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 千恵 (KUDO-SAITO, Chie)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：90424126