

がん幹細胞と腫瘍免疫

合山 進

1. はじめに

1990年代にJohn Dickのグループが行った研究は、多くのがん研究者に衝撃を与えた。彼らは急性骨髄性白血病患者から採取した白血病細胞を免疫不全マウス（SCIDマウス、次いでNOD/SCID）に移植して生着の有無を調べ、CD34⁺CD38⁻というヒト造血幹細胞と同じ表面マーカーを発現する細胞のみがマウスへの生着能を持つことを示した^{1,2)}。続いてClarkeのグループはこの手法を乳がんに応用し、乳がんの幹細胞としてCD44⁺/CD24⁻細胞を同定した³⁾。その後同様の研究がさまざまながんに対して行われ、脳腫瘍、大腸がん、卵巣がんなどでもNOD/SCIDマウスに生着できる細胞画分が同定された。これら一連の研究を通じて、がんの中の幹細胞——がん幹細胞——という概念が一般に広まることとなった。がん細胞も幹細胞を頂点とするヒエラルキーを形成しているというコンセプトは美しく、またこれらの幹細胞を標的とすることでがんを根絶できる可能性を示唆しており、根治的治療開発への期待が高まった。

がん幹細胞研究が発展する原動力となったのは、NOD/SCIDマウスの発見である。NOD/SCIDマウスは従来の免疫不全マウスに比較して圧倒的にヒト細胞の生着が優れており、このマウスの登場以降、患者由来のヒトがん細胞を免疫不全マウスに移植する、いわゆる patient derived xenograft (PDX) モデルの作製が盛んに行われるようになった。しかしNOD/SCIDマウスにはまだNK細胞活性が残っていたため、NOD/SCIDマウスにIL-2R γ の欠失マウスを掛け合わせてNK細胞も不活化したNOGマウスやNSGマウスが開発され、現在では世界中で広く使用されている。ところがその結果、より免疫を抑制したNSGマウスやNOG

マウスを用いると、当初は特定の画分にしか存在しないと考えられていたがん幹細胞が実はさまざまな画分に存在すること、またその存在部位は個々の症例によって異なっていることが判明した⁴⁾ (表1)。これらの結果は、「がん幹細胞」としての性質が、レシビエントマウスの免疫能によって規定される流動的なものであることを示している。

2010年代に入って腫瘍免疫の重要性が明らかになると、免疫不全マウスを用いたがん幹細胞研究は、免疫の影響を考慮していない古い概念として軽視された時期もあった。しかし最近になって、幹細胞学と免疫学の融合が進み、腫瘍免疫との関係を取り込んだ新しいがん幹細胞学が再び脚光を浴びている。筆者らは最近、p53活性化薬を投与する白血病治療モデルを用いて、一部の白血病幹細胞が腫瘍免疫からの攻撃を免れることで治療抵抗性を示すことを見いだした⁵⁾。本稿では我々の研究成果を中心に、がん幹細胞と腫瘍免疫についての最近の研究動向を紹介する。

2. 急性骨髄性白血病とp53

p53は最も有名ながん抑制因子であり、多くの腫瘍でp53の変異・欠失が認められる。急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML) は正常の分化能を失った骨髄系細胞が異常に増殖する血液がんの一種であり、p53変異・欠失の頻度は5~10%程度である。この頻度は他の固形腫瘍と比べて特別高いわけではないが、実はp53変異・欠失がないAML症例の多くでp53の機能が低下している⁶⁾。たとえばAML患者の3分の1以上で、p53の分解を促進するユビキチンリガーゼMDM2の過剰発現が認められる。また、MLL転座など一部の白血病融合遺伝子にはp53の機能を抑制する作用があり、これが白血病の悪化に寄与している。これらのp53が「機能的に」抑制されているAML症例の予後はp53変異・欠失例と同様に不良であるが、野生型のp53自体は存在する。したがって、p53機能低下AMLに対しては、p53の発現や機能を回復させる薬剤が著効する可能性があると考えられた。

3. p53活性化とNK細胞の協調による相乗的白血病治療効果

そこで筆者らは、MLL転座型白血病のマウスモデルを

東京大学大学院新領域創成科学研究科 先進分子腫瘍学 (〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1 2号館2F)

Cancer stem cells and tumor immunity

Susumu Goyama (Division of Molecular Oncology, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930162

© 2021 公益社団法人日本生化学会

表1 代表的なヒトがん幹細胞研究

	文 献	がん幹細胞マーカー	移植部位	マウス
急性骨髄性 白血病	Bonnet & Dick, <i>Nat. Med.</i> 3 (1997)	CD34 ⁺ /CD38 ⁻	経静脈投与	NOD/SCID
	Taussig et al., <i>Blood</i> 112 (2008)	CD34 ⁺ /CD38 ⁺ /-	経静脈・骨髄投与	NOD/SCID, NSG など
	Sarry et al., <i>J. Clin. Invest.</i> 121 (2011)	さまざま	経静脈投与	NSG
	Eppert et al., <i>Nat. Med.</i> 17 (2011)	さまざま	骨髄投与	NOD/SCID + CD122
乳がん	Al-Haji et al., <i>PNAS.</i> 100 (2003)	CD44 ⁺ /CD24 ⁻	乳腺周囲脂肪体	NOD/SCID
	Gineslier et al., <i>Cell Stem Cell</i> 5 (2007)	ALDH1 ⁺	Mammary fat pad	NOD/SCID
	Meyer et al., <i>Cancer Res.</i> 70 (2010)	CD44 ⁺ /CD49f ⁺ /CD133 ⁺	Mammary fat pad	NOD/SCID
脳腫瘍	Singh et al., <i>Nature</i> 432 (2004)	CD133 ⁺	脳	NOD/SCID
	Ogden et al., <i>Neurosurgery</i> 62 (2008)	さまざま	脳	Nude ラット
	Chen et al., <i>Cancer Cell</i> 17 (2010)	さまざま	脳	Nude マウス
大腸がん	O'Brien et al., <i>Nature</i> 445 (2007)	CD133 ⁺	腎被膜下	NOD/SCID
	Ricci-Vitiani et al., <i>Nature</i> 445 (2007)	CD133 ⁺	皮下	SCID
	Dalerba et al., <i>PNAS.</i> 104 (2007)	EpCAM (high) /CD44 ⁺	皮下	NOD/SCID
	Shmelkov et al., <i>J. Clin. Invest.</i> 118 (2008)	CD133 ⁺ /-	皮下	NOD/SCID
メラノーマ	Schatton et al., <i>Nature</i> 451 (2008)	ABCB5 ⁺	皮下	NOD/SCID
	Quintana et al., <i>Nature</i> 456 (2008)	ほぼ全細胞	皮下	NSG
	Boiko et al., <i>Nature</i> 466 (2010)	CD271 ⁺	皮内	Rag2/IL2R γ (-)
	Quintana et al., <i>Cancer Cell</i> 18 (2010)	ほぼ全細胞	皮下	NSG

用いて、AMLに対するp53活性化薬の効果を検証した。ヒストンメチル化酵素MLLはさまざまな分子と融合遺伝子を形成することが知られており、代表的なMLL転座型融合遺伝子MLL-AF9は、エピゲノム修飾の変化を介して白血病の発症を強力に誘導する。我々はこのMLL-AF9を導入したマウス骨髄細胞をレシピエントマウスに移植してAMLの発症を誘導し、これらのマウスをp53-MDM2結合阻害剤DS-5272（週3回，100mg/kg）を用いて治療する実験を行った⁵⁾。DS-5272は、E3リガーゼMDM2とp53の結合を阻害することでp53を安定化し、その活性を増強する作用を持つ⁷⁾。DS-5272は予想どおり非常に強い治療効果を示し、白血病マウスの生存期間も大きく延長した。

次に、この白血病治療モデルにおける腫瘍免疫の役割を調べるため、同じMLL-AF9白血病細胞を、正常の免疫を持つ通常のマウス（C57BL/6マウス）と、T細胞、B細胞、NK細胞の機能を喪失した免疫不全マウス（NSGマウス）に移植し、それぞれのマウスをDS-5272で治療する実験を行った（図1A）。興味深いことに、通常マウスに白血病細胞を移植した場合に比べて、免疫不全マウスに移植した場合にはDS-5272の治療効果が著しく減弱していた（図1B）。また、p53活性化薬投与前後における個々の免疫細胞の活性を調べたところ、治療開始後にNK細胞が強く活性化していることを見いだした。一方、CD8⁺細胞障害性T細胞の活性に大きな変化は認めなかった。そこで、免疫正常の通常マウスから抗体を用いてNK細胞を除去す

る実験、および免疫不全マウスに正常マウスから採取したNK細胞を移植する実験を行ったところ、NK細胞の有無がp53活性化薬の治療効果を規定していることが判明した。これらの実験により、機能的にp53が抑制されているMLL-AF9白血病細胞に対してはp53活性化薬がとてもよく効くこと、そして生体内でp53活性化薬が十分な治療効果を発揮するためには、免疫細胞、特にNK細胞との協調が重要であることが明らかとなった。

4. 治療抵抗性白血病幹細胞の特性

p53活性化薬の投与によりMLL-AF9白血病マウスの白血病細胞数は大きく減少するが、根治することはできず、最終的にはすべてのマウスが白血病を発症して死亡した。そこで治療中も残存する少数の治療抵抗性白血病細胞について解析したところ、さまざまな興味深い特性が明らかとなった。

まず、白血病細胞の骨髄内分布を調べる実験により、治療後に残存する白血病細胞は、骨端部や骨表面付近のendosteal領域に集積することが判明した（図1C）。この結果は、骨芽細胞など骨表面付近に存在する細胞が、白血病幹細胞が生き残るための特別な場所（ニッチ）を提供していることを示唆している。また、治療後に残存した白血病細胞における遺伝子や表面マーカーの発現パターンを調べたところ、低酸素誘導因子Hif1 α や免疫チェックポイ

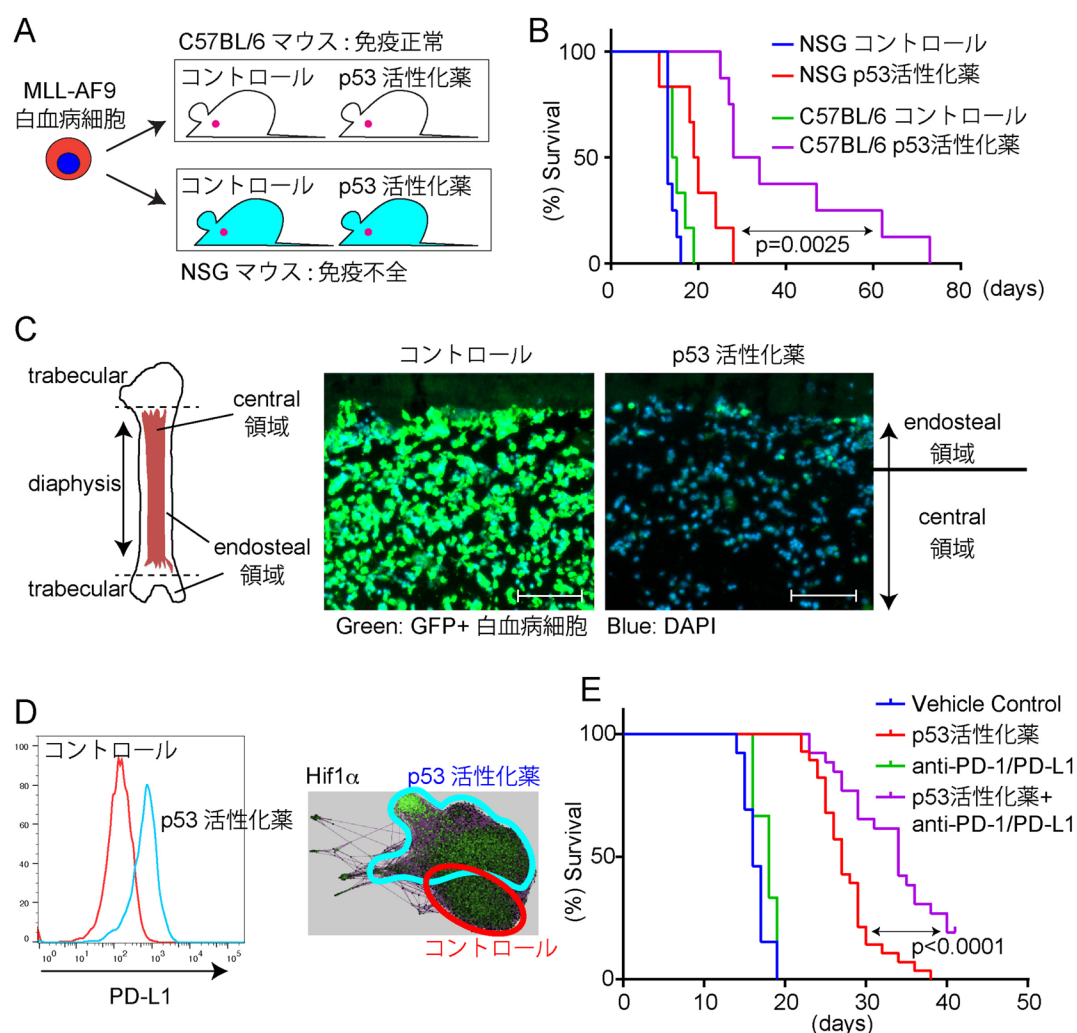


図1 p53 活性化薬は腫瘍免疫と協調して白血病の進展を抑制する

(A, B) MLL-AF9 白血病細胞を免疫正常 C57BL/6 マウスと免疫不全 NSG マウスに移植し、コントロールもしくは p53 活性化薬で治療した。C57BL/6 マウスに移植した場合は p53 活性化薬が著効を示したが、その治療効果は NSG マウスに移植した場合は大きく低下した。(C) p53 活性化薬投与後に残存する GFP⁺ 白血病細胞は、骨表面近くの endosteal 領域に集積した。scale bar: 100 μm。(D) p53 活性化薬投与後に残存する GFP⁺ 白血病細胞では PD-L1 の発現が上昇し (FACS 解析: 左)、Hif1α の発現が上昇した (Mass Cytometry: 右)。(E) 免疫チェックポイント阻害薬 (抗 PD-1/PD-L1 抗体) は単独では白血病発症を抑制できないが、p53 活性化薬と協調して強い抗白血病効果を示した。

ント分子 PD-L1 の発現が上昇していた (図 1D)。Hif1α は PD-L1 の発現を制御する上流因子であることが以前に報告されており⁸⁾、MLL-AF9 白血病細胞においても、Hif1α の機能抑制により PD-L1 の発現も低下した。したがって、Hif1α-PD-L1 経路の活性化も治療抵抗性白血病幹細胞の特徴の一つと考えられた。そこで、白血病治療モデルにおいて Hif1α-PD-L1 経路を阻害する実験を行い、この経路が白血病の治療抵抗性において果たす役割を検証した。Hif1α や PD-L1 遺伝子を単独でノックアウトしても白血病細胞の増殖にほとんど変化はないが、興味深いことに、p53 活性化薬への感受性が上昇してより治療が効きやすくなった。また同様に、Hif1 阻害薬 Echinomycin や PD-L1 抗体を単独で投与しても白血病に対する治療効果は認めないが、p53

活性化薬と併用することで相乗効果が生じ、より強い治療効果を示した (図 1E)⁵⁾。これらの結果は、p53 活性化薬と免疫チェックポイント阻害薬や Hif1α 阻害剤の組み合わせが、白血病に対する有効な治療戦略になりうることを示唆している。

5. 白血病幹細胞の免疫回避機構

我々のマウス白血病モデルを用いた解析により、骨髓内の endosteal 領域に存在する白血病幹細胞では Hif1α-PD-L1 経路が活性化しており、そのため腫瘍免疫の攻撃を受けにくい性質を持つことが明らかとなった (図 2)。さらに最近、ヒト AML 患者サンプルを活用した研究により、

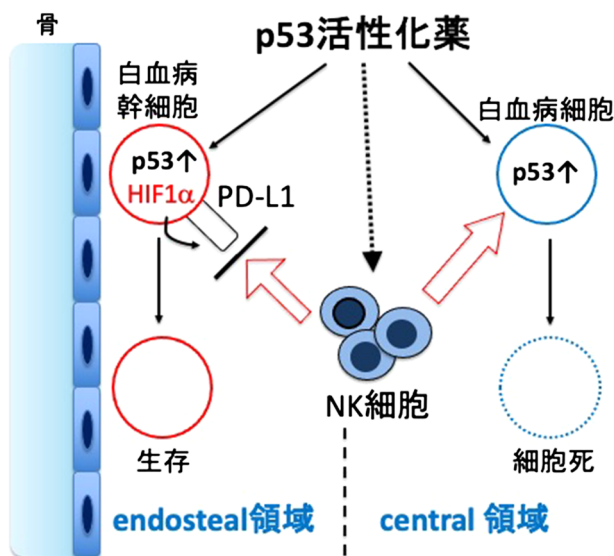


図2 治療抵抗性白血病幹細胞の特徴

p53活性化薬は白血病細胞内でp53を活性化するとともに、NK細胞の活性化も誘導し、相乗効果で強い治療効果を示す。骨髄内のendosteal領域に存在する白血病幹細胞ではHif1 α -PD-L1経路が活性化しており、そのためNK細胞の攻撃を受けにくく、治療抵抗性を示す。

NKG2Dリガンドの発現が低いAML細胞は幹細胞様の遺伝子発現パターンを示し、免疫不全マウスへの生着能が高く、化学療法に耐性であることが示された⁹⁾。NKG2DリガンドにはNK細胞を活性化する役割があることから、新規発症のAMLでは、NK細胞の監視・攻撃から逃れやすいという性質がAML幹細胞の特徴の一つであると考えられる。

一方、造血幹細胞移植後の症例では、ドナー由来のT細胞がgraft-versus-leukemia (GVL) 効果を発揮してAMLの再発を抑制していることがよく知られている。これに関して、移植後に再発したAML症例ではMHC class II遺伝子の発現が高頻度に低下していることが報告された¹⁰⁾。したがって、造血幹細胞移植後という特殊な環境下では、MHC class II遺伝子の発現が低下したAML幹細胞が、CD4⁺T細胞に認識されにくくなることでGVLを逃れ、再発に寄与しているものと考えられる。

6. 固形腫瘍幹細胞の免疫回避機構

さらに最近の研究で、固形腫瘍のがん幹細胞も免疫を回避する性質を有していることがわかってきた。たとえば21種類の固形腫瘍における遺伝子発現パターンを解析した研究により、幹細胞関連遺伝子の発現が高い腫瘍(≡がん幹細胞の多い腫瘍)の予後は悪く、免疫細胞の浸潤が少ないことが示された¹¹⁾。また、幹細胞様の遺伝子発現パターンを示す腫瘍では、内在性レトロウイルス

(endogenous retrovirus: ERV) やインターフェロン経路遺伝子の発現が抑制されていた。ERVの発現上昇やインターフェロン経路の活性化は炎症を誘導してT細胞を引き寄せる作用を持っており、これらの遺伝子発現が低いというがん幹細胞の性質が、腫瘍内への免疫細胞浸潤を抑えていると考えられる。また実験的にも、さまざまな固形腫瘍幹細胞がT細胞やNK細胞の活性化を抑制する性質を持つことが示されている^{12, 13)}。脳腫瘍や大腸がんのがん幹細胞は、TGF- β , IL-10, IL-4, IL-13などのサイトカインを分泌することでT細胞やNK細胞の活性を抑制する。また、CD200やPD-L1など腫瘍免疫抑制作用を持つ分子の高発現もさまざまな固形腫瘍幹細胞で認められる。さらに、固形腫瘍幹細胞ではしばしばHLAやNKG2Dリガンドの発現が低下しており、それぞれT細胞もしくはNK細胞からの攻撃回避に貢献している。このように固形腫瘍においても、「免疫の攻撃を受けにくい」という性質は、がん幹細胞の特徴の一つであると考えられる。

7. おわりに

がん幹細胞の概念が免疫不全マウスを用いた実験で確立したこともあり、がん幹細胞と腫瘍免疫との関連はこれまであまり調べられてこなかった。しかし、腫瘍免疫療法の特徴として長期生存例が多いことを考えると、免疫ががん幹細胞根絶の鍵を握っていることは間違いない。今回筆者らは、p53活性化薬を活用したマウス白血病治療モデルを用いて、治療抵抗性白血病細胞が骨のendosteal領域に潜み、Hif1 α -PD-L1経路を活性化させることでNK細胞からの攻撃を免れていることを見いだした⁵⁾。同様の免疫回避機構は他の固形腫瘍幹細胞についても報告されており、がん幹細胞の一般的な性質と考えられる。すなわちがん幹細胞は、自己複製能と多能性という「幹細胞」としての性質に加え、免疫からの攻撃を受けにくいという特性も有した細胞と定義することができる。がん幹細胞のこの防御機構を突破し、腫瘍免疫の力を最大限活用する治療法の開発が、今後の大きな課題である。

文 献

- 1) Bonnet, D. & Dick, J.E. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.*, **3**, 730-737.
- 2) Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., & Dick, J.E. (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, **367**, 645-648.
- 3) Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., & Clarke, M.F. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 3983-3988.
- 4) Goyama, S., Wunderlich, M., & Mulloy, J.C. (2015) Xenograft

- models for normal and malignant stem cells. *Blood*, **125**, 2630–2640.
- 5) Hayashi, Y., Goyama, S., Liu, X., Tamura, M., Asada, S., Tanaka, Y., Fukuyama, T., Wunderlich, M., O'Brien, E., Mizukawa, B., et al. (2019) Antitumor immunity augments the therapeutic effects of p53 activation on acute myeloid leukemia. *Nat. Commun.*, **10**, 4869.
 - 6) Quintas-Cardama, A., Hu, C., Qutub, A., Qiu, Y.H., Zhang, X., Post, S.M., Zhang, N., Coombes, K., & Kornblau, S.M. (2017) p53 pathway dysfunction is highly prevalent in acute myeloid leukemia independent of TP53 mutational status. *Leukemia*, **31**, 1296–1305.
 - 7) Miyazaki, M., Uoto, K., Sugimoto, Y., Naito, H., Yoshida, K., Okayama, T., Kawato, H., Miyazaki, M., Kitagawa, M., Seki, T., et al. (2015) Discovery of DS-5272 as a promising candidate: A potent and orally active p53-MDM2 interaction inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.*, **23**, 2360–2367.
 - 8) Noman, M.Z., Desantis, G., Janji, B., Hasmin, M., Karray, S., Dessen, P., Bronte, V., & Chouaib, S. (2014) PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 alpha., and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J. Exp. Med.*, **211**, 781–790.
 - 9) Paczulla, A.M., Rothfelder, K., Raffel, S., Konantz, M., Steinbacher, J., Wang, H., Tandler, C., Mbarga, M., Schaefer, T., Falcone, M., et al. (2019) Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion. *Nature*, **572**, 254–259.
 - 10) Christopher, M.J., Petti, A.A., Rettig, M.P., Miller, C.A., Chendamarai, E., Duncavage, E.J., Klco, J.M., Helton, N.M., O'Laughlin, M., Fronick, C.C., et al. (2018) Immune escape of relapsed AML cells after allogeneic transplantation. *N. Engl. J. Med.*, **379**, 2330–2341.
 - 11) Miranda, A., Hamilton, P.T., Zhang, A.W., Pattnaik, S., Becht, E., Mezheyeuski, A., Bruun, J., Micke, P., de Reynies, A., & Nelson, B.H. (2019) Cancer stemness, intratumoral heterogeneity, and immune response across cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 9020–9029.
 - 12) Codd, A.S., Kanaseki, T., Torigo, T., & Tabi, Z. (2018) Cancer stem cells as targets for immunotherapy. *Immunology*, **153**, 304–314.
 - 13) Ravindran, S., Rasool, S., & Maccalli, C. (2019) The cross talk between cancer stem cells/cancer initiating cells and tumor microenvironment: The missing piece of the puzzle for the efficient targeting of these cells with immunotherapy. *Cancer Microenviron.*, **12**, 133–148.

著者寸描

●合山 進 (ごうやま すすむ)



東京大学大学院新領域創成科学研究科先進分子腫瘍学分野教授。博士 (医学)。

■略歴 1974年福岡県に生る。99年東京大学医学部医学科卒業。2001年東京大学医学部附属病院血液腫瘍内科に入局。09年7月シンシナティ小児病院医療センターに研究留学。15年に帰国し、東京大学医科学研究所細胞療法分野准教授。20年より現職。

■研究テーマと抱負 近年の様々な技術革新により、「がんを治す」ことは遠い未来の夢ではなく、現実的な目標となってきた。造血器腫瘍の病態生理を解明し、それを新規治療法の開発につなげたい。

■ウェブサイト <https://webpark2162.sakura.ne.jp>

■趣味 バドミントン、将棋。