

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 古塩 純  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 590 号  
学位授与の日付 平成 26 年 3 月 24 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
博士論文名 DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked is an immunogenic target of cancer stem cells  
(DEAD/H box polypeptide 3, X-linked (DDX3X 蛋白)は癌幹細胞の免疫学的な標的である)  
論文審査委員 主査 教授 西條 康夫  
副査 准教授 川村 俊彦  
副査 教授 成田 一衛

### 博士論文の要旨

背景と目的：近年、癌細胞にも正常細胞と同様な幹細胞システムが存在することが明らかになってきている。これらは癌幹細胞と呼ばれ、腫瘍の浸潤、再発、転移に関与すると考えられている。そのため、癌を根治させるには癌幹細胞の根絶が必要と考えられるが、これら癌幹細胞が持つ薬剤排出ポンプや DNA 修復遺伝子のため、通常の化学療法、放射線療法に耐性を示し、癌治療の障壁となっている。そこで申請者らは、癌幹細胞をターゲットとした抗腫瘍免疫療法の確立を目的に研究を進めている。これまでに申請者らは、癌幹細胞の特徴をもつ CD133 陽性マウスメラノーマ細胞のワクチンによって、癌幹細胞特異的なエフェクター T 細胞が産生されること、そしてこれらが CD133 陽性メラノーマを駆逐し、親株メラノーマを治癒に導くことを報告した。さらに申請者らは、CD133 陽性マウスメラノーマの解析により、DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked (DDX3X 蛋白) が CD133 陽性腫瘍細胞に優位に発現していることを確認した。この DDX3X 蛋白が癌幹細胞に特異的なタンパク質であり、かつ、癌幹細胞特異的免疫療法の有望な標的であることを明らかにする目的で研究を行った。

方法：＜腫瘍細胞の分離＞細胞分離用磁気ビーズを用いて AutoMACS で分離を繰り返し、90%以上の純度をもつ CD133 陽性メラノーマ細胞を得た。

＜ワクチンモデル＞マウス骨髄細胞を GM-CSF 存在下に培養し樹状細胞 (Dendric cell:DC) を得た。その後、DC と照射した B16 メラノーマ細胞、または DDX3X 蛋白を共培養した後、マウスに皮下接種し、その 3 週間後に親株 B16 メラノーマをマウスに皮下接種した。

＜養子免疫療法モデル＞共培養した DC/腫瘍細胞、または DC/DDX3X 蛋白でマウスにワクチンを行い、1 週間後に所属リンパ節採取し、CD62L (L-selectin) low T 細胞に分離した後、vitro 下で anti-CD3、IL-2 を加え培養した。活性化 T 細胞を、親株 B16 メラノーマ細胞を皮下接種したマウスに移入し、腫瘍径を測定した。

＜DDX3X 蛋白の knockdown＞DDX3X 蛋白の Knockdown には shRNA レンチウイルスプラスミドを用いた。ま

た Knockdown した細胞株の蛋白発現についてはウエスタンブロットで確認した。

<サイトカイン ELISA> T細胞に対して抗 CD3 抗体または DC で捕捉された腫瘍抗原による刺激を加えた。培養液の上清を回収し、ELISA kit を用いて IFN- $\gamma$ 、IL-4, and IL-17 の分析を行った。

結果：DDX3X 蛋白でプライミングした CD4+T 細胞に対して CD133 陽性メラノーマ細胞による抗原刺激を加えたところ、特異的な IFN $\gamma$ 、IL-17 の産生を示した。一方で、CD133 陽性メラノーマ細胞でプライミングされた CD4+T 細胞は、DDX3X 蛋白による抗原刺激に対して同様に IFN $\gamma$ 、IL-17 の産生を示した。

次に DDX3X 蛋白のワクチンを行い、治療群である DDX3X 蛋白群で protective model、therapeutic model のいずれにおいても対照群と有意差をもって高い抗腫瘍効果を示した。

また、申請者らは、CD133 陽性メラノーマ細胞のワクチンで示された抗腫瘍効果が DDX3X 蛋白の knockdown によって消失することを確認した。

DDX3X 蛋白による養子免疫療法モデルにおいても、DDX3X 蛋白でプライミングした活性化 CD4+T 細胞を親株メラノーマが生着したマウスに移入したところ、対照群に比して有意差をもって抗腫瘍効果を示した。

申請者らは、この DDX3X 蛋白についてヒト細胞株での発現をウエスタンブロットで確認した。実験を行ったすべての腫瘍細胞株に DDX3X 蛋白の発現を認め、特に HCT116 (ヒト大腸癌細胞株)、87.5 (ヒト小細胞肺癌株)、MCF7 (ヒト乳癌株) など癌幹細胞としての特徴をもつ細胞群でより高発現を認めた。

考察と結論：DDX3X 蛋白は X 染色体上に存在し、ATP 依存性 RNA helicase 活性を有しており、mRNA、miRNA を含んだ RNA 代謝に深く関与していることが知られている。この蛋白を過剰発現させることで、上皮間葉移行や腫瘍浸潤など、癌幹細胞の特徴を導くことが示されており、一方で、DDX3X 蛋白の knockdown により髄芽腫のもつ neurosphere 形成能が失われることなども報告されている。申請者らは DDX3X 蛋白の knockdown により、メラノーマ癌幹細胞がもつ幹細胞としての性質が失われることを示し、また本研究において、様々な癌腫のヒト腫瘍細胞で癌幹細胞の特徴を有する細胞株に優位に DDX3X 蛋白が発現していることを示した。これらのことから、DDX3X 蛋白は癌幹細胞に特異的なタンパク質であり、かつ、癌幹細胞としての振る舞いを決定づける重要な役割を担っていると考えられた。

また、申請者らは、メラノーマ癌幹細胞特異的 CD4+T 細胞に対する DDX3X 蛋白の抗原刺激で優位なサイトカイン産生が得られることを示し、この DDX3X 蛋白が MHC-class II 拘束性の高い免疫原性をもったエピトープをもつことが推測された。さらに申請者らは、DDX3X 蛋白を用いたワクチンモデル、ワクチン治療モデル、養子免疫療法モデルを確立し、DDX3X 蛋白を用いた免疫療法による親株メラノーマに対する抗腫瘍効果を示した。

本研究における結果から、DDX3X 蛋白が抗腫瘍免疫において高い免疫原性をもち、抗腫瘍効果を導くことが示された。よって申請者らは、DDX3X 蛋白が抗腫瘍免疫療法における有望な標的抗原になりうると結論づけた。

#### 審査結果の要旨

癌幹細胞の特徴をもつ CD133 陽性マウスメラノーマは、DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked (DDX3X 蛋白) を高発現している。本研究ではこの DDX3X 蛋白が癌幹細胞特異的であるかまた癌幹細胞特異的免疫療法の有望な標的であるかを検討した。DDX3X 蛋白でプライミングした CD4+T 細胞は CD133 陽性メラノーマ細胞刺激で IFN $\gamma$ 、IL-17 の産生を示した。DDX3X 蛋白ワクチンにより protective model、therapeutic model のいずれにおいても対照群に比べて高い抗腫瘍効果を示した。DDX3X 蛋白でプライミングした活性化 CD4+T 細胞をメラノーマ担癌マウスに移入したところ、抗腫瘍効果を示した。DDX3X

蛋白はHCT116（ヒト大腸癌細胞株）、87.5（ヒト小細胞肺癌株）、MCF7（ヒト乳癌株）など癌幹細胞としての特徴をもつ細胞群でより高発現を認めた。本研究より DDX3X 蛋白は癌幹細胞に特異的なタンパク質であり、抗腫瘍免疫療法における有望な標的抗原になりうると結論づけた。本研究は癌幹細胞に対する免疫療法の可能性を示したものであり、十分に学位論文に値する。