

胃癌における CD47 発現と治療標的としての
意義に関する臨床的実験的研究

よしだ かずみち
吉田 一路

(外科系プライマリー・ケア学専攻)

防衛医科大学校

平成 25 年度

目次

第 1 章 緒言	1 頁
第 2 章 胃癌切除検体における CD47 の発現と病理学的因子、予後の検討	
第一節 背景	4 頁
第二節 対象と方法	4 頁
第三節 結果	6 頁
第四節 考察	7 頁
第五節 小括	8 頁
第 3 章 CD44 および CD47 陽性胃癌細胞の増殖能、腫瘍形成能に関する検討	
第一節 背景	9 頁
第二節 対象と方法	10 頁
第三節 結果	13 頁
第四節 考察	14 頁
第五節 小括	15 頁
第 4 章 CD47 中和抗体がマクロファージの貪食および胃癌細胞に与える影響に関する検討	
第一節 背景	16 頁
第二節 方法	17 頁
第三節 結果	20 頁

第四節	考察	21 頁
第五節	小括	22 頁
第 5 章	マウス胃癌腹膜播種モデルにおける CD47 中和抗体の抗腫瘍効果に関する検討	
第一節	背景	23 頁
第二節	方法	23 頁
第三節	結果	24 頁
第四節	考察	24 頁
第五節	小括	26 頁
第 6 章	総括	27 頁
第 7 章	結論	28 頁
	謝辞	29 頁
	引用文献	30 頁
	図表	38 頁

第 1 章 緒言

胃癌は世界において罹患数が第 4 位、死亡原因では第 2 位の悪性腫瘍であり、癌死の原因のおよそ 10%を占めている¹⁾。最近、胃癌に対する分子標的治療を含む化学療法が進歩し、切除不能・再発進行胃癌の生存期間(中央値)は 16 ヶ月と改善してきているものの、その効果は乳癌、大腸癌などと比較しても低く、限定的であると言わざるを得ない^{2, 3)}。

近年、癌治療における化学療法や放射線療法への治療抵抗性獲得の要因として、癌幹細胞の存在が注目されている⁴⁻¹²⁾。癌細胞は増殖、周囲組織への浸潤、および遠隔転移などの特徴を有するが、すべての癌細胞がこれらの能力を持つわけではなく、癌幹細胞と呼ばれるごく一部の細胞集団が、自己複製と分化を行いながら腫瘍構成細胞を供給し続けるという概念である。この癌幹細胞モデルという概念は、1960 年代にはすでに提唱されていたものであるが¹³⁾、近年のフローサイトメトリーによる幹細胞純化法や、免疫不全マウスを用いた異種移植による腫瘍形成能評価の進歩を背景に、造血器腫瘍のみならず多くの固形腫瘍における癌幹細胞の分離・同定が可能となった。癌幹細胞とは、腫瘍形成能・多分化能・自己複製能・薬剤耐性の 4 つの性質を持った細胞と定義され、癌幹細胞を標的とした新しい治療法が白血病や乳癌、脳腫瘍などにおいて模索されている。すなわち、これまでの既存の治療方法は、癌幹細胞よりむしろ非癌幹細胞を標的として除去するものであったため、癌幹細胞を標的とした治療方法の確立は、生物学的に非常に合理的であると言える(図 1)。

現在のところ、癌幹細胞を同定する方法としては、side population 分画*を用いる方法、浮遊細胞塊(sphere)を用いる方法、細胞表面マーカーを用いる方

法が主に用いられている。しかし薬剤排出システムを利用した side population 分画細胞の同定や、特殊条件下で培養することで得られる sphere 形成細胞の同定には、極めて精緻な条件設定が必要であることから、臨床検体を用いた報告は少ない。一方で、乳癌、大腸癌、膵癌などの固形癌において、ALDH1 (Aldehyde dehydrogenase 1)、CD133、CD44、CD24、CD166、EpCAM など、癌幹細胞に特異的な表面マーカーが多数報告されているが¹⁴⁻¹⁹⁾、癌腫による特異的な表面マーカーの相違や、表面マーカーの組み合わせなど、癌幹細胞を同定する方法論にまだまだ改善の余地があり、効率的な治療法の確立には、容易かつ普遍的な癌幹細胞の同定が不可欠である。

CD47 はインテグリン関連蛋白とも呼ばれる 50 kDa の細胞表面糖蛋白であり、thrombospondin-1 (TSP-1) の C 末端細胞結合領域への受容体であるとともに、Signal regulatory protein α (SIRP α) と結合し、様々な細胞内シグナルに関与する²⁰⁻²²⁾。CD47 は血球細胞や正常組織などでも発現しているが、最近になって白血病や膀胱癌、前立腺癌などにおいて高発現していることが報告されており^{15, 23-27)}、マクロファージや樹状細胞などの貪食細胞上に発現する SIRP α との相互作用を介して、その貪食を阻止する機能を持つことが報告された^{15, 23, 24, 26-28)}。また CD47-SIRP α シグナルを阻害することで、マクロファージによる癌細胞の貪食を誘導し、治療に応用しようとする試みがなされている^{15, 23-27)}。すなわち、癌細胞に発現する CD47 は、宿主の貪食細胞からの免疫回避に関与すると考えられる(図 2)。また、細胞系列(lineage)マーカー陰性 CD34 陽性 CD38 陰性 CD90 陰性で定義される白血病幹細胞では CD47 が高発現しており、CD47 高発現の白血病症例は低発現症例と比較し、予後不良である事が示されている¹⁵⁾。

そこで本研究は胃癌切除検体における CD47 の免疫組織学的発現と病理学的因子、および生存率との関連について臨床的に検討するとともに、胃癌細胞株における CD47 発現状況、および CD47 発現細胞の腫瘍学的特徴を精査し、*in vitro* およびマウスを用いた *in vivo* での実験的検討により、CD47 が胃癌増殖や生体の免疫能にいかに関与するのかを明らかにし、CD47 を標的とした胃癌治療の可能性を捉える事を目的とした。

* side population 分画 : 細胞膜透過性の DNA 結合色素である Hoechst33342 で染色した細胞を、フローサイトメトリーで縦軸に 400-450nm (青)・横軸に 580-650nm (赤) をプロットした二次元展開を行うと、通常の細胞周期分析でみられる G0/G1 および S/G2M の分画の他に、G0/G1 よりもさらに暗い部分に Hoechst 陰性の細胞集団を認め、この分画を side population 分画と呼んでいる。Side population 分画は ABC トランスポーター阻害剤であるベラパミルを加えると消失するため、ABC トランスポーターを介した細胞外薬剤排泄が活発な細胞集団であると考えられている。Side population 分画には幹細胞が多く含まれる事が示されている。

第 2 章 胃癌切除検体における CD47 の発現と病理学的因子、予後の検討

第一節 目的

臨床検体を用いた腫瘍細胞上の CD47 発現と予後との関連を示す研究は、急性骨髄性白血病¹⁵⁾、非ホジキンリンパ腫²⁶⁾、卵巣癌、神経膠腫、膠芽腫²³⁾などで報告され、腫瘍細胞における CD47 が高発現しているものほど予後不良であることが複数のコホートで示されている。しかし、これらの報告は腫瘍組織内の CD47 mRNA レベルの検討であり、腫瘍細胞での CD47 分子の発現と予後の関連を示した報告はない。

そこで、本章では胃癌切除標本における CD47 の発現を免疫組織学的に検討し、病理学的背景および予後との関連を明らかにすることを目的とした。

第二節 対象と方法

(1) 対象

1995 年から 1997 年までの間、防衛医科大学校病院外科で根治的胃切除術を受けた遠隔転移のない腫瘍深達度が T1b 以深の胃癌症例 115 例を対象とした。

(2) 方法

(a) 免疫染色

ホルマリン固定パラフィン包埋された手術標本上の、腫瘍の中心および腫瘍辺縁から 2 ヶ所以上の部位を用いて組織マイクロアレイを作成した。これを 4 μ m 厚に薄切し、シランコートガラスにマウントしたプレパラートを使用した。

脱パラフィン、浸水処理後、pH 9.0 の target retrieval solution (Dako Japan, Tokyo, Japan) に浸し、120°C 10 分間オートクレイブで加熱して抗原賦活を行い、室温で静置した。4 %スキムミルクを加えて非特異的抗体結合を阻害した。

5%過酸化水素で内因性ペルオキシダーゼ活性をブロッキングした後、加湿チャンバーに移した。1:25(最終濃度 40 μ g/ml)に希釈したマウス抗ヒト CD47 モノクローナル抗体(B6H12, LifeSpan Biosciences, inc., Seattle, WA, USA)を加えて 4°Cで一晩インキュベートした。

プレパラートにペルオキシダーゼ標識ポリマー (EnVision™+System-HRP; Dako, Japan)を加えて 120 分間室温でインキュベートし、0.01 % 過酸化水素添加 0.05 %ジアミノベンジン四塩酸塩液に 10 分間浸した。最後にマイヤーヘマトキシリン染色にて対比染色を行った。

(b) 染色の判定

CD47 は胃癌細胞の細胞膜および細胞質の染色として認められ、最も染色性の高い部位を評価して判定した。200 倍視野中 50 %以上の癌細胞で、細胞質にもほとんど染色が認められないものを very weak、細胞質に弱い染色が認められるものを weak、細胞質および細胞膜に染色が認められるものを moderate、細胞質および細胞膜に強い染色が認められるものを strong と定義し、4 段階の intensity として評価し、moderate 以上を陽性と判定した。

(c) 統計学的解析

CD47 陽性例、陰性例の病理学的背景および予後の比較を行った。

統計学的解析は JMP10 ソフトウェア (SAS institute Japan 株式会社) を用いて行った。2 群間の比較には Student の t 検定、3 群以上の比較には standard one-way analysis of variance (ANOVA) および post-hoc test として Tukey の HSD 検定、単変量、多変量解析には Cox の比例ハザードモデル、生存率の検定には log-rank 検定を用い、いずれも $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

胃癌の臨床病期は International Union Against Cancer' s (UICC) TNM 分類第 7 版²⁹⁾に準拠した。

なお本研究に関しては、防衛医科大学校倫理委員会の審査（承認番号 738）を受け承認されている。

第三節 結果

対象症例の男女比は 77 : 38、平均年齢 63.0 歳、深達度は T1b 40 例 T2 16 例 T3 33 例 T4a 24 例 T4b 2 例、リンパ節転移は N0 47 例 N1 29 例 N2 20 例 N3a 14 例 N3b 5 例で TNM Stage は Stage I 45 例 Stage II 30 例 Stage III 40 例であった。115 症例中 CD47 陽性症例は 57 例 (49.5 %) であった。CD47 陽性症例・陰性症例の組織学的所見を図 3 に示した。

CD47 陽性例、陰性例の病理学的背景を表 1 に示した。CD47 陽性症例では、CD47 陰性症例と比較して占居部位で U 領域の症例が有意に多かったが ($p=0.011$)、年齢、性別、最大腫瘍径、深達度、間質、リンパ節転移、組織型、リンパ管侵襲、静脈侵襲においては両群間に有意差を認めなかった (表 1)。

CD47 陽性症例では陰性症例と比較して全生存率が低く、5 年生存率は 54.8 %

と陰性症例の 79.7 %と比較して有意に低率であった (Log-rank 検定 $p=0.0067$) (図 4)。

また、全生存期間に関与する因子についての単変量解析では占居部位 (ハザード比 2.54, $p=0.0094$)、腫瘍径 (ハザード比 3.81, $p=0.0001$)、深達度 (ハザード比 4.36, $p<0.0001$)、リンパ節転移 (ハザード比 5.66, $p<0.0001$)、CD47 (ハザード比 2.57, $p=0.0062$) が有意な予後因子として選択された。さらにこれらの因子を変量として多変量解析を行うと、占居部位、腫瘍径、リンパ節転移とともに CD47 発現が独立した予後因子 (ハザード比 2.35, $p=0.024$) であることが示された。(表 2)

第四節 考察

胃癌症例の臨床検体において免疫組織学的に CD47 の発現が確認され、CD47 陽性症例では、病理学的には U 領域に占居部位を有する症例が多く、CD47 陰性例と比較して予後不良であった。

胃癌での CD44 の免疫組織学的検討において、CD44 陽性症例は陰性症例と比較して予後不良であったとの報告が多いが³⁰⁻³²⁾、病理学的な特徴に関しては一定の見解は得られていない^{30, 32)}。CD47 染色陽性は、腫瘍占居部位、腫瘍径、リンパ節転移と並んで独立した予後不良因子であった。CD47 陽性症例の占居部位以外の病理学的特徴を見いだせなかったが、対象症例数が少なく、今後の症例の蓄積が必要である。また、腫瘍組織内の腫瘍関連マクロファージの集積やそれらの SIRP α の発現を検討する必要があると考える。

第五節 小括

胃癌切除症例において免疫組織学的 CD47 陽性は腫瘍占居部位、腫瘍径、リンパ節転移と並んで独立した予後不良因子であった。

第3章 CD44 および CD47 陽性胃癌細胞の増殖能、腫瘍形成能に関する検討

第一節 背景

胃癌細胞株において、CD44 陽性細胞が高い増殖能や腫瘍形成能を有し、放射線や抗癌剤への耐性能を有することに加え、胃癌細胞株の CD44 ノックダウンにおいて、スフェロイド形成能や免疫不全マウスでの腫瘍形成能が減弱することから、胃癌における癌幹細胞マーカーとして CD44 が有用であると報告された¹⁷⁾。また臨床検体においても、免疫組織化学染色による CD44 陽性症例が有意に予後不良であったとの報告がある^{14, 30-33)}。

一方、CD47 も CD44 と同様に造血細胞や正常組織などでの発現が報告されている³⁴⁾。ヒト急性白血病の臨床検体においては、正常造血幹細胞と比較して白血病幹細胞には CD47 が高発現していることや、急性白血病細胞における CD47 の高発現は予後不良因子であることが報告されている¹⁵⁾。また、動物実験ではあるが、CD47 中和抗体を投与した際の有害事象は、中等度の好中球減少のみであったとされており¹⁵⁾、CD47 を標的とした治療の可能性が期待される。

そこで本章では、胃癌細胞株での CD44 および CD47 の発現を検討し、それらの低発現、高発現細胞の増殖能、腫瘍形成能を評価して、CD47 発現胃癌細胞の性質を明らかにする事を目的とした。

第二節 対象と方法

(1) 細胞培養

ヒト胃癌細胞株 MKN7, MKN45, MKN74, KATO III は理研バイオリソースセンターより、NUGC3 は独立行政法人 医薬基盤研究所よりそれぞれ有償提供を受けた。すべての細胞株は 10 %非働化ウシ胎児血清(FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)および 100 U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、0.25 μ g/ml アムホテリシン B (Antibiotic-Antimycotic; Invitrogen)を含む、RPMI-1640 培地(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)中で温度 37 °C, CO₂濃度 5 %, 湿度 95 %に設定したインキュベーター環境で培養を行った。

(2) フローサイトメトリー解析および細胞ソーティング

100 mm 細胞培養皿中で 70 %~90 %の semi-confluent となった胃癌細胞を、培養液を除去した後、リン酸緩衝液(PBS, Dulbecco' s phosphate buffered saline; Sigma-Aldrich)で洗浄し、0.25 %トリプシン-EDTA 液(Invitrogen)を用いて細胞を剥離した。10 %FBS 添加 RPMI-1640 培地を加えて浮遊細胞液とし、126 ×g で 5 分間遠心した。得られた細胞ペレットを HEPES 溶液 (N-2-hydroxyethylpiperazine-N' -2-ethanesulfonic acid; Invitrogen)10 mM および 3 %FBS を含む Hank' s Balanced Salt Solution(HBSS, Invitrogen)に再懸濁し、100 倍希釈、最終濃度 1 %に調整した各抗体を加えて混和し、室温で 30 分間インキュベートした。使用した抗体は、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識マウス抗ヒト CD47 抗体 (クローン B6H12; eBioscience, San Diego, CA, USA)、FITC または Phycoerythrin (PE)標識ラット抗ヒト/マウス CD44 抗体 (ク

ローン IM7; eBioscience)、 FITC 標識マウス抗ヒト HLA-ABC 抗体 (クローン W6/32; eBioscience) であり、Isotype コントロールとして FITC または PE 標識マウス IgG1 κ 抗体 (eBioscience) を使用した。

30 分間のインキュベーション後、3 %FBS を含む HBSS 溶液で 2 回洗浄し、フローサイトメトリーに用いた。フローサイトメトリー解析は BD FACS Calibur Flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) で行い、直前に細胞懸濁液に Propidium iodide (PI) を加えて死細胞を解析から除外した。

細胞ソーティングは BD FACS Vantage SE cell sorter (BD Biosciences) を用いて行った。CD44 高発現もしくは低発現細胞の定義は、それぞれ population 全体の上位 20 %もしくは下位 20 %の蛍光強度の CD44 発現細胞とし、CD47 高発現、低発現細胞も同様に定義した。

フローサイトメトリーの結果は、Flowjo ソフトウェア (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA) で解析した。

(3) スフェロイド培養

細胞ソーティングにより分離された CD47 高発現あるいは低発現細胞を、既報の如く epidermal growth factor (EGF) と basic fibroblast growth factor (bFGF) のみを加えた無血清 RPMI-1640 培地を用い、超低接着性細胞培養プレート中でスフェロイド培養を行った¹⁷⁾。96 ウェル超低接着性細胞培養プレート (Corning Life Science, Acton, MA, USA) 上に 1 ウェル当たり 20 細胞の密度でソーティングした胃癌細胞を播種し、20 ng/ml の human recombinant EGF (Invitrogen) および 10 ng/ml の human recombinant bFGF (Invitrogen) を加えた無血清

RPMI-1640 培地 (200 μ l/ウェル) 中で 3 週間培養した。3 週間後、各ウェル内に形成されたスフェロイドコロニーを顕微鏡下に観察し、画像を撮影保存した。撮影されたスフェロイドコロニーの画像を ImageJ ソフトウェア (Wayne Rasband, the Research Service Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA. ; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いて解析し、コロニーの面積を計算した。独立した実験を 3 回行った。

(4) 細胞増殖アッセイ

96 ウェル細胞培養プレートを用いて、ソーティングした胃癌細胞を 1 ウェル当たり 100 個の密度で播種し、10 %FBS 添加 RPMI1640 培地 (200 μ l/ウェル) 中で 2 週間培養した。培地は 3 日毎に交換した。細胞増殖能の評価は Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いた。独立した実験を 3 回行った。

(5) 免疫不全マウスでの腫瘍形成能評価

8 週齢のオス C.B-17/Icr-scid/scidJcl マウス (severe combined immunodeficiency マウス, SCID マウス, T・B 細胞欠損) を日本クレア株式会社より購入した。1 $\times$ 10⁵ 個の胃癌細胞を 50 μ l の 10 %FBS 添加 RPMI-1640 培地と 50 μ l の Matrigel growth factor reduced (BD Biosciences) の混合液に懸濁し、マウスの背部皮下に接種した。8 週間後マウスを犠死させた後、腫瘍を摘出し重量を測定した。独立した実験を 5 回行った。

(6) 統計学的解析

統計学的解析は JMP10 ソフトウェアを用いて行った。2 群間の比較には Student t 検定、3 群以上の比較には standard one-way analysis of variance (ANOVA) および post-hoc test として Tukey の HSD 検定を用い、いずれも $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

なお、本研究は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認（承認番号 10082）を受け、「防衛医科大学校動物実験に関するマニュアル」に準拠した。

第三節 結果

（１）胃癌細胞株における CD44 および CD47 の発現

今回検討した 5 種の胃癌細胞株 (MKN7、MKN45、MKN74、NUGC3、KATOIII) において、フローサイトメトリーにより CD44 および CD47 の発現が確認できた (図 5)。特に MKN45 および MKN74 胃癌細胞株は、細胞全体の約 90 % が CD44、CD47 ともに陽性であり、以後の検討は、この 2 つの胃癌細胞株を用いることとした (図 6)。

（２）CD47 高発現および低発現細胞のスフェロイド形成能

MKN45、MKN74 のいずれの胃癌細胞株においても CD47 高発現細胞 (CD47^{high}) は低発現細胞 (CD47^{low}) と比較して、形成されたスフェロイドコロニーの面積が有意に大きかった。(図 7・図 8)

（３）CD44 および CD47 発現胃癌細胞の *in vitro* での増殖能

In vitro の実験系において、MKN45、MKN74 のいずれの胃癌細胞株においても CD44^{high} は CD44^{low} と比較して有意に増殖能が高かった。同様に CD47^{high} は CD47^{low} と比較して有意に増殖能が高かった (図 9)。次に CD44 および CD47 の発現別に、細胞を CD44^{high}CD47^{high}、CD44^{high}CD47^{low}、CD44^{low}CD47^{high}、CD44^{low}CD47^{low} の 4 つの分画にソーティングし、各々の細胞増殖能を評価した。その結果、MKN45、MKN74 のいずれの胃癌細胞株においても CD44^{high}CD47^{high} が最も細胞増殖能が高く、CD44^{low}CD47^{low} では最も増殖能が低かった。(図 10)

(4) CD44 および CD47 発現胃癌細胞の *in vivo* での腫瘍形成能

免疫不全マウス (SCID マウス) の背部皮下に接種された胃癌細胞は、CD44^{high}CD47^{high} のみに接種後 3~4 週間で皮下腫瘍を触知しえた。接種 8 週間後にはいずれの細胞分画においても皮下腫瘍が視認できたが、CD44^{high}CD47^{high} では、腫瘍重量が最も大きかった。逆に CD44^{low}CD47^{low} では、形成した腫瘍重量が最も小さかった。(MKN45 図 11、MKN74 図 12) なお、形成された腫瘍はホルマリン固定パラフィン包埋切片のヘマトキシリン・エオジン染色にて、癌腫であることを確認した。

第四節 考察

今回検討した全ての胃癌細胞株で CD44 と CD47 が発現していた。CD44^{high}CD47^{high} 細胞は *in vitro* での増殖能、*in vivo* での腫瘍形成能が高く、また、CD47^{high} 細胞はスフェロイド形成能も高く、胃癌幹細胞としての特徴を有していた。(CD44^{high} 細胞も同様にスフェロイド形成能が高かったが、図は示していない。)

Takaishi ら¹⁷⁾は、MKN45 および MKN74 胃癌細胞株を用いて、CD44 陽性細胞は陰性細胞と比較して、スフェロイド形成能、腫瘍形成能が高いことを報告しており、我々と同様の結果であった。また胃癌において CD44 variant がグルタミン酸-シスチントランスポーターを安定化させ、癌細胞内のグルタチオン濃度をコントロールすることで細胞内の活性酸素を低く保つことが報告されており、この活性酸素への防御機構が CD44 陽性癌細胞の高い増殖能、腫瘍形成能の根拠の一つと考えられている³⁵⁾。

一方、CD47 の発現については、Wang ら³⁶⁾が、免疫不全マウス (non-obese diabetic/severe combined immunodeficient マウス, NOD-SCID マウス) へのブタ B 細胞性リンパ腫細胞の生着実験において、通常状態では生着しないが、腫瘍細胞にヒト CD47 を強制発現させることによってマウスに腫瘍を形成させることができたことを報告している。我々の検討でも CD44^{high}CD47^{high} 細胞は CD44^{high}CD47^{low} 細胞と比較し、腫瘍形成能が高く、ヒト CD47 の発現がマウスでの腫瘍細胞増殖と腫瘍形成に一定の役割を持つと考えられた。

以上から、CD44^{high}CD47^{high} 細胞は、腫瘍増殖能、腫瘍形成能が旺盛な細胞集団であると考えられた。

第五節 小括

胃癌細胞株において CD44^{high}CD47^{high} 細胞はスフェロイド形成能、増殖能、腫瘍形成能が高いなど、癌幹細胞の性質を有していた。

第4章 CD47 中和抗体がマクロファージの貪食および胃癌細胞に与える影響に関する検討

第一節 背景

前章において、CD47^{high}細胞はCD47^{low}細胞と比較して、細胞増殖能、腫瘍形成能、スフェア形成能が高いことを示した。したがって、これらの細胞集団を標的とした治療法が、より効果的な戦略であるといえる。実際に急性骨髄性白血病細胞^{15, 18, 37)}、急性リンパ性白血病細胞^{26, 37)}、慢性骨髄性白血病細胞³⁷⁾、非ホジキンリンパ腫細胞³⁷⁾などの造血器悪性腫瘍細胞や、膀胱癌細胞^{27, 37)}、平滑筋肉腫細胞²⁴⁾、卵巣癌細胞・乳癌細胞・結腸癌細胞・膠芽腫細胞²³⁾などの固形癌細胞において、動物実験でCD47 中和抗体の抗腫瘍効果が観察されている。

CD47 中和抗体の治療効果発現機序として、CD47-SIRP α シグナルが阻害されることにより、宿主マクロファージの癌細胞貪食が促進することによる癌細胞の除去が考えられるが、これ以外にも Hypoxia inducible factor-1 α (HIF1 α) 経路を介したアポトーシスの誘導や³⁸⁻⁴⁰⁾、CD47 中和抗体が PI3K/Akt 経路を介して腫瘍細胞増殖を直接的に抑制することが報告されている⁴¹⁾。すなわち、CD47 抗体の抗腫瘍効果として、宿主の貪食作用の促進による間接作用と、腫瘍細胞に対する直接作用が考えられるが、胃癌細胞に関するCD47 中和抗体の作用に関しては不明である。

そこで本章では、CD47 中和抗体がヒトおよびマウスマクロファージの胃癌細胞貪食に与える影響を検討するとともに、CD47 中和抗体存在下での胃癌細胞のアポトーシスおよび細胞増殖に関して実験的検討を加え、CD47 中和抗体の *in vitro* での抗腫瘍効果を明らかにする事を目的とした。

第二節 方法

(1) ヒトおよびマウスマクロファージを用いた胃癌細胞貪食に関する検討

(a) ヒト末梢血単核球(Peripheral Blood Mononuclear Cells; PBMCs)の分離

30 ml の新鮮末梢血を健常ボランティアより採取し、Lymphocyte Separation Medium (LSM, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) 上に浮遊後に、 $128\times g$ で 5 分間遠心し、密度勾配遠心分離法により単球、リンパ球層を分離した。PBMCs の細胞ペレットは RPMI-1640 培地に懸濁した。

(b) マウス骨髓細胞(Bone Marrow Cells; BMCs)の分離

8 週齢の Balb/c マウス (日本クレア株式会社) を犠死させた直後に大腿骨を無菌的に採取して、両端を切断して管状とした後、骨髓を氷冷 PBS でフラッシュして BMCs をコンカルチューブに回収した。 $128\times g$ で 5 分間遠心し、細胞ペレットを RPMI-1640 培地に懸濁した。

(c) マクロファージの分化誘導

マクロファージの分化誘導は既報の protocol に従い行った⁴²⁻⁴⁵⁾。すなわち、 5×10^7 個のヒト PBMCs、またはマウス BMCs を 10 % FBS 添加 RPMI-1640 培地 10 ml に懸濁し poly-D-lysine コート 100 mm ディッシュ (Biocoat; BD Biosciences) に播種して 2 時間培養した。その後、上清と非接着性細胞を除去し、PBS で洗浄した。Human recombinant M-CSF (eBioscience) 50 ng/ml を添加した 10 % FBS 添加 RPMI-1640 培地を加え 7 日間培養した。その際 M-CSF を含む培養液は 3 日毎

に交換した。7 日間の培養後、培養液を除去し PBS で数回洗浄したのち 1 ml の 0.25%トリプシン - EDTA 溶液を加えて緩徐にタッピングしながら 30 分間室温で反応させ、マクロファージを剥離させた。浮遊マクロファージを 10 %FBS 添加 RPMI-1640 培地に再懸濁し、 $126\times g$ で 5 分間遠心した。

(d) ヒトおよびマウスマクロファージを用いた胃癌細胞貪食アッセイ

ヒト PBMCs 由来マクロファージ、およびマウス BMCs 由来マクロファージの癌細胞貪食能を、マウス抗ヒト CD47 中和抗体(クローン B6H12, functional grade antibody; eBioscience) 又はコントロール抗体 (HLA-ABC 抗体あるいは Isotype 抗体)存在下で比較した。

マクロファージの貪食能は、既報の如く評価した^{15, 23, 24, 26, 27)}。すなわち、24 ウェル細胞培養プレートに 5×10^4 個/ウェルで PKH67GL (Sigma-Aldrich)により緑色に蛍光標識されたマクロファージを播種し、6 時間培養してマクロファージをプレートに接着させた。次に培養液を無血清 RPMI-1640 培地に交換し、2 時間培養した後、 2×10^5 個の PKH26GL (Sigma-Aldrich)により赤色に蛍光標識された胃癌細胞を加え、 $10\ \mu g/ml$ 濃度のマウス抗ヒト CD47 中和抗体、あるいはマウス抗ヒト HLA-ABC 抗体(クローン W6/32; eBioscience), マウス IgG1 κ Isotype 抗体(eBioscience)を加えて 2 時間培養した。加温 PBS で数回洗浄して浮遊胃癌細胞を除去し、0.4%パラホルムアルデヒドを加えて細胞を固定した。

マクロファージの胃癌細胞貪食評価は Phagocytic index を用いた。

Phagocytic index は 100 個のマクロファージ当たりの貪食された癌細胞数として定義し、蛍光顕微鏡 BZ-8000(株式会社キーエンス)を用いてランダムに選択し

た視野で観察記録した。ヒト PBMCs 由来マクロファージを用いた貪食能評価は 5 名のボランティアより採取した血液を用いて、それぞれ独立した実験を行った。マウス BMCs 由来マクロファージを用いた貪食能評価は 4 匹の Balb/c マウスから採取した骨髓細胞を用いて、独立した実験を 4 回行った。

CD47 抗体と同程度の intensity で胃癌細胞に結合する事がフローサイトメトリーで確認できた HLA-ABC 抗体を Isotype 抗体と並んでコントロール抗体として用いた。(図 15c)

(2) CD47 中和抗体存在下でのアポトーシスの検出

MKN45 および MKN74 胃癌細胞株にマウス抗ヒト CD47 中和抗体(クローン B6H12; eBioscience) 10 μ g/ml を投与し、48 時間培養した。同濃度のマウス IgG1 κ (functional grade antibody; eBioscience) をコントロール抗体として使用した。アポトーシスの検出は、Annexin V Apoptosis Detection Kit (BioVison, San Francisco, CA, USA) を用いてフローサイトメトリーで解析し、PI 陰性・Annexin V 陽性分画をアポトーシス細胞と定義した。独立した実験を 3 回行った。

(3) CD47 中和抗体存在下での胃癌細胞増殖の評価

MKN45・MKN74 胃癌細胞を CD47^{high} および CD47^{low} にソーティングし、 1×10^4 細胞/ウェルで 6 ウェル組織培養プレートに播種した。

胃癌細胞を含む各ウェルに 0.1 μ g/ml, 1.0 μ g/ml, 10 μ g/ml の B6H12 抗体を投与した CD47 抗体群および同濃度のマウス IgG1 κ Isotype 抗体を投与したコントロール群の 2 群に分け、1 週間培養を行った。各抗体を含む培養液は 3 日

毎に交換した。細胞増殖能の評価は Cell Counting Kit-8 を用いた。独立した実験を 3 回行った。

(4) 統計学的解析

統計学的解析は JMP10 ソフトウェアを用いて行った。2 群間の比較には Student の t 検定、3 群以上の比較には standard one-way analysis of variance (ANOVA) および post-hoc test として Tukey の HSD 検定を用い、いずれも $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

健常ボランティアからの末梢血採取に関しては、防衛医科大学校倫理委員会より承認(承認番号 738)を受けた。

第三節 結果

(1) CD47 中和抗体存在下でのヒト、マウスマクロファージの胃癌細胞貪食

CD47 中和抗体は同濃度のコントロール抗体と比較して、ヒトマクロファージの胃癌細胞貪食を有意に促進した。(図 13, 図 15a) 一方で、マウスマクロファージを用いた実験では、Isotype 抗体と比較して、CD47 中和抗体のみならず HLA-ABC 抗体においても有意に胃癌細胞貪食を亢進した。(図 14, 図 15b)

(2) CD47 中和抗体によるアポトーシスの誘導

MKN45、MKN74 に CD47 中和抗体を添加し、48 時間後のアポトーシスを評価したところ、コントロールと比較して有意なアポトーシスの増加は認められなか

った。(図 16)

(3) CD47 中和抗体存在下での胃癌細胞増殖

MKN45、MKN74 胃癌細胞株において、CD47 中和抗体の濃度や CD47 の発現に関わらず、細胞増殖能に変化を認めなかった。(図 17)

第 4 節 考察

胃癌細胞に対する CD47 中和抗体の影響を検討したところ、マクロファージとの共培養ではヒト、マウス由来のいずれのマクロファージにおいても胃癌細胞の貪食を促進させた。しかし、CD47 中和抗体は胃癌細胞のアポトーシス誘導や増殖能に影響を及ぼさなかった。

B 細胞性白血病細胞や正常 T 細胞において CD47 抗体がアポトーシスを引き起こすと報告されている^{38-40, 46)}。一方で Majeti ら¹⁵⁾は、ヒト急性骨髄性白血病細胞では CD47 中和抗体のアポトーシスの誘導効果を認めなかったと報告している。

Sick ら⁴⁷⁾は、4 種の星状細胞腫株 (U87、U373、SW1783、CCF-STTG1) を用いて、CD47 中和抗体投与によって、腫瘍細胞の増殖が濃度依存性に抑制されることを示した。本検討では CD47 中和抗体の濃度や、胃癌細胞の CD47 の発現程度によって細胞増殖に対して有意な影響を与えなかった。したがって CD47 中和抗体のアポトーシスや細胞増殖能に対する影響は、悪性腫瘍の種類によって相違があることが窺われた。

マウス BMCs 由来のマクロファージでは、CD47 中和抗体のみならず HLA-ABC 抗体の投与においても胃癌細胞の貪食が亢進した。Zhao ら²⁵⁾はヒト腫瘍細胞をマ

ウスに移植する異種移植モデルにおける CD47 抗体の効果について、Fc 依存性食食の存在を指摘しており、今回の結果においても、HLA-ABC 抗体が胃癌細胞に結合することによるオプソニン効果によるものと考えられた。マクロファージの食食反応は CD47-SIRP α 系などの抗食食シグナルと Fc レセプターや補体レセプターなどの食食シグナルによってコントロールされている^{25, 48, 49)}。すなわち、CD47 中和抗体や HLA-ABC 抗体は Fab 領域で癌細胞に結合し、抗体の Fc 領域がマウスマクロファージの Fc レセプターと結合し、食食を促進する。一方、マウス IgG1 抗体の Fc 領域とヒトマクロファージの Fc レセプターは結合しないことが証明されており^{50, 51)}、今回のヒトマクロファージを用いた実験系で、HLA-ABC 抗体が癌細胞の食食を促進しなかったことが説明できる。CD47 中和抗体投与によるヒトマクロファージの胃癌細胞食食は Fc 非依存性であり、CD47-SIRP α シグナルの阻害による効果であると考えられた。

第 5 節 小括

CD47 中和抗体は、CD47-SIRP α シグナルの阻害により Fc 非依存的にヒトマクロファージの胃癌細胞食食を促進した。また CD47 中和抗体投与により、胃癌細胞のアポトーシスの誘導や増殖の抑制は観察されなかった。

第5章 マウス胃癌腹膜播種モデルにおける CD47 中和抗体の抗腫瘍効果に関する検討

第一節 背景

前章において、*in vitro* で CD47 中和抗体の添加によって、マクロファージの胃癌細胞の貪食能が促進されることを証明した。

In vivo における実験では、これまで免疫不全マウスへのヒト由来の急性骨髄性白血病¹⁵⁾、急性リンパ性白血病²⁶⁾、平滑筋肉腫²⁴⁾、卵巢癌、乳癌、膠芽腫などの腫瘍細胞を移植したモデルにおいて、CD47 中和抗体の抗腫瘍効果が示されている²³⁾。しかし、胃癌に関してはその報告はなく、*in vivo* での胃癌治療における CD47 中和抗体投与の意義は不明である。

そこで本章では、MKN45 胃癌細胞を用いて、胃癌腹膜播種モデルにおける CD47 中和抗体の治療効果を明らかにする事を目的とした。

第二節 方法

(1) 胃癌腹膜播種モデルでの CD47 中和抗体の治療効果の検討

6 週齢のオスヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu) を日本クレア株式会社より購入し、8 週齢で実験に使用した。

ヌードマウスの腹腔内に PBS 500 μ l に懸濁した 5×10^6 個の MKN45 細胞を投与し、同時に CD47 中和抗体、あるいは HLA-ABC 抗体、IgG1 κ Isotype 抗体をそれぞれ 100 μ g/100 μ l を腹腔内投与した。各群 10 匹で検討し、生存期間、ならびに体重の推移を経時的に測定した。

(2) 統計学的解析

統計学的解析は JMP10 ソフトウェアを用いて行った。2 群間の比較には Student の t 検定、3 群以上の比較には standard one-way analysis of variance (ANOVA) および post-hoc test として Tukey の HSD 検定、生存率の検定には log-rank 検定を用い、いずれも $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

なお、本研究は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認（承認番号 10082）を受け、「防衛医科大学校動物実験に関するマニュアル」に準拠して実施した。

第三節 結果

胃癌腹膜播種マウスの生存期間の中央値は、CD47 中和抗体群で 75 日、HLA-ABC 抗体群 64 日、Isotype 抗体群 46.5 日と、CD47 中和抗体群で他の 2 群と比較して有意に生存期間が延長していた。(Isotype 対 HLA-ABC $p=0.0246$, Isotype 対 B6H12 $p=0.0003$, HLA-ABC 対 B6H12 $p=0.0187$) (図 18a)

各群の腹膜播種マウスは経時的に体重減少を認め、腹部の膨隆や腹壁の硬結を触知した。図 18b に腹膜播種モデルマウスの開腹所見を示した。CD47 中和抗体群では体重減少が他の群と比べ緩やかであり、3 週目以降の体重は Isotype 抗体群や HLA-ABC 抗体群と比較し有意差を認めた(図 18c)。

第四節 考察

本章では他癌腫同様に、胃癌腹膜播種モデルにおいて CD47 中和抗体投与による治療効果を証明した。また CD47 中和抗体は、生命予後の延長のみならず、当

初からの体重減少も緩徐であり、腹膜播種に対する効果的な治療法としても注目される。

Zhao ら²⁵⁾は、HER2 陽性乳癌細胞に対して trastuzumab 抗体（抗 HER2 抗体）を投与する際に、CD47 阻害を阻害すると trastuzumab 抗体単独投与よりも好中球の抗体依存性細胞傷害(Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity; ADCC)活性が増強したと報告している。ADCC にはマクロファージだけでなくナチュラルキラー(NK)細胞や顆粒球などが関与するため、CD47 中和抗体の効果発現機序として ADCC 活性の増強も考慮する必要があると考えられた。

前章において、*in vitro*でのマウスマクロファージを用いた食食能評価では、CD47 中和抗体と HLA-ABC 抗体で差は認められなかったが、胃癌腹膜播種モデルマウスにおいては CD47 中和抗体の治療効果は有意に HLA-ABC 抗体のそれを上回っていた。マクロファージの食食反応は CD47-SIRP α 系などの抗食食シグナルのほか、Fc や補体レセプターなどの食食促進シグナルの調整によってコントロールされている^{48, 49)}。したがって CD47 中和抗体を投与した際に、HLA-ABC 抗体と比較してより顕著に治療効果が現れた機序として、Fc レセプターへの結合による食食促進シグナルの亢進に加えて、CD47 - SIRP α 系による抗食食シグナルの阻害の可能性がある。これらの機序によるマクロファージの CD47 発現細胞の食食の結果、細胞増殖、腫瘍形成能が低下し、生存期間を延長した可能性が考えられた。

第五節 小括

CD47 中和抗体はコントロール抗体と比較して体重減少を抑え、また生存期間を有意に延長した。その機序として CD47 中和抗体の Fc レセプターへの結合による貪食促進シグナルの亢進に加えて、CD47 - SIRP α 系による抗貪食シグナルの阻害により、マクロファージによる腫瘍細胞の貪食が亢進した可能性、あるいは、増殖能、腫瘍形成能が高い CD47 高発現細胞が選択的に排除された可能性が考えられた。

第 6 章 総括

胃癌における CD47 発現の検討と治療標的としての意義について臨床的、実験的に検討を行い、以下の知見を得た。

1. 臨床検体において、免疫組織学的に CD47 が陽性であることは、腫瘍占居部位、腫瘍径、リンパ節転移と並んで独立した予後不良因子であった。

2. 胃癌細胞株において CD47 の発現を確認した。CD47 高発現細胞はスフェロイド形成能、腫瘍増殖能、腫瘍形成能が高く、癌幹細胞の特徴を有していた。

3. CD47 中和抗体は、CD47-SIRP α シグナルの阻害により、ヒトマクロファージの胃癌細胞貪食を促進した。

4. CD47 中和抗体は胃癌細胞の増殖やアポトーシスへの直接的効果を有さなかった。

5. 胃癌腹膜播種モデルマウスにおいて CD47 中和抗体は体重減少を抑え、また生存期間を有意に延長した。

第 7 章 結論

胃癌切除標本において CD47 陽性症例が有意に予後不良であった。また、胃癌細胞株を用いた基礎実験において CD47 高発現細胞が高い増殖能、腫瘍形成能を有し、癌幹細胞の特徴を有していた。CD47 中和抗体の投与はヒトマクロファージによる胃癌細胞貪食を亢進し、マウス腹膜播種モデルの生存期間を延長した。

CD47 発現細胞を標的とした胃癌治療は、増殖能、腫瘍形成能が高い細胞集団を標的とし、免疫担当細胞の癌細胞の貪食を促進させる可能性があり、これまでの抗癌剤、分子標的薬とは機序の異なった新しい治療戦略となる可能性が考えられた。(図 19)

謝辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました防衛医科大学校外科学講座の長谷和生教授並びに山本順司教授に深甚なる感謝の意を表します。また、細胞培養・セルソーティングなどの技術的な御指導、御教示を頂きました共同利用研究施設 松村耕治講師、終始に渡り御指導頂いた防衛医科大学校外科学講座 辻本広紀講師に深く感謝致しますとともに、ご協力頂いた教室の諸先生方に御礼申し上げます。

本研究の主旨は、第 84 - 85 回日本胃癌学会総会・第 112 - 113 回外科学会総会・第 67 - 68 回日本消化器外科学会総会・第 71 回日本癌学会総会において発表した。

引用文献

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012;62:10-29.
2. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, *et al.* Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet.* 2010;376:687-97.
3. Koizumi W, Tanabe S, Saigenji K, Ohtsu A, Boku N, Nagashima F, *et al.* Phase I/II study of S-1 combined with cisplatin in patients with advanced gastric cancer. *Br J Cancer.* 2003;89:2207-12.
4. Kang MJ, Kim HP, Lee KS, Yoo YD, Kwon YT, Kim KM, *et al.* Proteomic analysis reveals that CD147/EMMPRIN confers chemoresistance in cancer stem cell-like cells. *Proteomics.* 2013;13:1714-25.
5. Vangipuram SD, Buck SA, Lyman WD. Wnt pathway activity confers chemoresistance to cancer stem-like cells in a neuroblastoma cell line. *Tumour Biol.* 2012;33:2173-83.
6. Steg AD, Bevis KS, Katre AA, Ziebarth A, Dobbin ZC, Alvarez RD, *et al.* Stem cell pathways contribute to clinical chemoresistance in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18:869-81.
7. Siddique HR, Saleem M. Role of BMI1, a stem cell factor, in cancer recurrence and chemoresistance: preclinical and clinical evidences. *Stem*

Cells. 2012;30:372-8.

8. Lopez J, Poitevin A, Mendoza-Martinez V, Perez-Plasencia C, Garcia-Carranca A. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer*. 2012;12:48.
9. Izumiya M, Kabashima A, Higuchi H, Igarashi T, Sakai G, Iizuka H, *et al*. Chemoresistance is associated with cancer stem cell-like properties and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res*. 2012;32:3847-53.
10. Misawa A, Katayama R, Koike S, Tomida A, Watanabe T, Fujita N. AP-1-Dependent miR-21 expression contributes to chemoresistance in cancer stem cell-like SP cells. *Oncol Res*. 2010;19:23-33.
11. Ahmed N, Abubaker K, Findlay J, Quinn M. Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes facilitate chemoresistance in recurrent ovarian cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010;10:268-78.
12. Crea F, Danesi R, Farrar WL. Cancer stem cell epigenetics and chemoresistance. *Epigenomics*. 2009;1:63-79.
13. Bruce WR, Van Der Gaag H. A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo. *Nature*. 1963;199:79-80.
14. Wakamatsu Y, Sakamoto N, Oo HZ, Naito Y, Uraoka N, Anami K,

- et al.* Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer. *Pathol Int.* 2012;62:112-9.
15. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs Jr KD, *et al.* CD47 Is an Adverse Prognostic Factor and Therapeutic Antibody Target on Human Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Cell.* 2009;138:286-99.
 16. Chan KS, Volkmer JP, Weissman I. Cancer stem cells in bladder cancer: a revisited and evolving concept. *Curr Opin Urol.* 2010;20:393-7.
 17. Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SSW, Shibata W, Vigneshwaran R, *et al.* Identification of Gastric Cancer Stem Cells Using the Cell Surface Marker CD44. *Stem Cells.* 2009;27:1006-20.
 18. Jaiswal S, Jamieson CHM, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, *et al.* CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell.* 2009;138:271-85.
 19. Wenqi D, Li W, Shanshan C, Bei C, Yafei Z, Feihu B, *et al.* EpCAM is overexpressed in gastric cancer and its downregulation suppresses proliferation of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135:1277-85.
 20. Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway. *Trends Cell Biol.* 2009;19:72-80.
 21. Barclay AN. Signal regulatory protein alpha (SIRPalpha)/CD47

interaction and function. *Curr Opin Immunol.* 2009;21:47-52.

22. Brown EJ, Frazier WA. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol.* 2001;11:130-5.

23. Willingham SB, Volkmer JP, Gentles AJ, Sahoo D, Dalerba P, Mitra SS, *et al.* The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:6662-7.

24. Edris B, Weiskopf K, Volkmer AK, Volkmer JP, Willingham SB, Contreras-Trujillo H, *et al.* Antibody therapy targeting the CD47 protein is effective in a model of aggressive metastatic leiomyosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:6656-61.

25. Zhao XW, van Beek EM, Schornagel K, Van der Maaden H, Van Houdt M, Otten MA, *et al.* CD47-signal regulatory protein-α (SIRPα) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:18342-7.

26. Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, Jan M, Weissman-Tsukamoto R, Zhao F, *et al.* Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 2011;71:1374-84.

27. Chan KS, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, *et al.* Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:14016-21.

28. Chao MP, Majeti R, Weissman IL. Programmed cell removal: a new obstacle in the road to developing cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:58-67.
29. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, International Union against Cancer. TNM classification of malignant tumours. 7th ed: Wiley-Blackwell; 2010.
30. Chen S, Hou JH, Feng XY, Zhang XS, Zhou ZW, Yun JP, *et al*. Clinicopathologic significance of putative stem cell marker, CD44 and CD133, in human gastric carcinoma. *J Surg Oncol*. 2013;107:799-806.
31. Doventas A, Bilici A, Demirell F, Ersoy G, Turna H, Doventas Y. Prognostic significance of CD44 and c-erb-B2 protein overexpression in patients with gastric cancer. *Hepatogastroenterology*. 2012;59:2196-201.
32. Yamaguchi A, Goi T, Yu J, Hirono Y, Ishida M, Iida A, *et al*. Expression of CD44v6 in advanced gastric cancer and its relationship to hematogenous metastasis and long-term prognosis. *J Surg Oncol*. 2002;79:230-5.
33. Muller W, Schneiders A, Heider KH, Meier S, Hommel G, Gabbert HE. Expression and prognostic value of the CD44 splicing variants v5 and v6 in gastric cancer. *J Pathol*. 1997;183:222-7.
34. Reinhold MI, Lindberg FP, Plas D, Reynolds S, Peters MG, Brown EJ. In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *J Cell Sci*. 1995;108:3419-25.
35. Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, Oshima H,

et al. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell*. 2011;19:387-400.

36. Wang C, Wang H, Ide K, Wang Y, Van Rooijen N, Ohdan H, *et al.* Human CD47 expression permits survival of porcine cells in immunodeficient mice that express SIRPalpha capable of binding to human CD47. *Cell Transplant*. 2011;20:1915-20.

37. Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, Alizadeh AA, Gentles AJ, Volkmer J, *et al.* Calreticulin Is the Dominant Pro-Phagocytic Signal on Multiple Human Cancers and Is Counterbalanced by CD47. *Sci Transl Med*. 2010;2:63ra94-63ra94.

38. Sagawa M, Shimizu T, Fukushima N, Kinoshita Y, Ohizumi I, Uno S, *et al.* A new disulfide-linked dimer of a single-chain antibody fragment against human CD47 induces apoptosis in lymphoid malignant cells via the hypoxia inducible factor-1α pathway. *Cancer Sci*. 2011;102:1208-15.

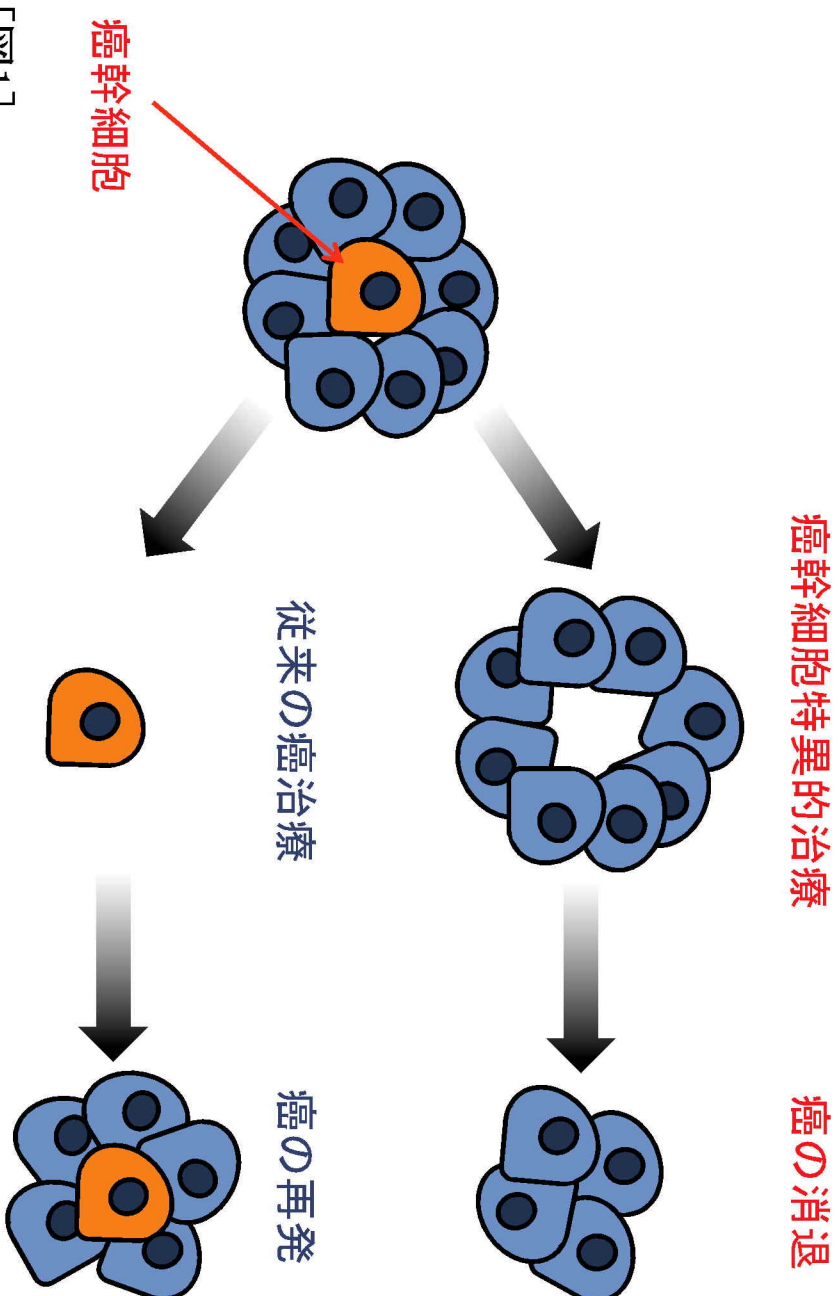
39. Mateo V, Brown EJ, Biron G, Rubio M, Fischer A, Deist FL, *et al.* Mechanisms of CD47-induced caspase-independent cell death in normal and leukemic cells: link between phosphatidylserine exposure and cytoskeleton organization. *Blood*. 2002;100:2882-90.

40. Mateo V, Lagneaux L, Bron D, Biron G, Armant M, Delespesse G, *et al.* CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med*. 1999;5:1277-84.

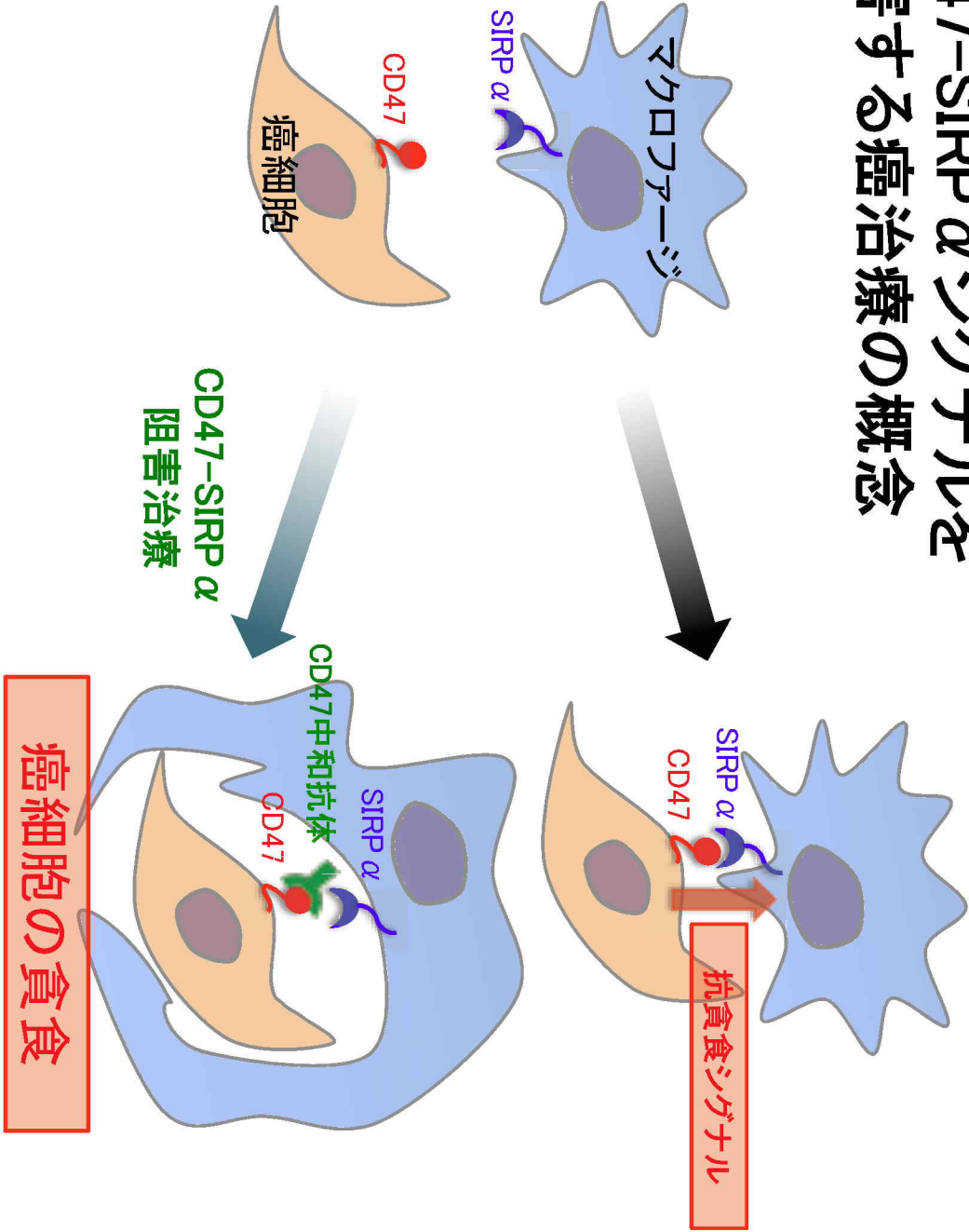
41. Sick E, Boukhari A, Deramaudt T, Ronde P, Bucher B, Andre P, *et al.* Activation of CD47 receptors causes proliferation of human astrocytoma but not normal astrocytes via an Akt-dependent pathway. *Glia*. 2011;59:308-19.
42. Way KJ, Dinh H, Keene MR, White KE, Clanchy FI, Lusby P, *et al.* The generation and properties of human macrophage populations from hemopoietic stem cells. *J Leukoc Biol*. 2009;85:766-78.
43. Hume DA, Ross IL, Himes SR, Sasmono RT, Wells CA, Ravasi T. The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol*. 2002;72:621-7.
44. Brugger W, Kreutz M, Andreesen R. Macrophage colony-stimulating factor is required for human monocyte survival and acts as a cofactor for their terminal differentiation to macrophages in vitro. *J Leukoc Biol*. 1991;49:483-8.
45. Becker S, Warren MK, Haskill S. Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free cultures. *J Immunol*. 1987;139:3703-9.
46. Pettersen RD, Hestdal K, Olafsen MK, Lie SO, Lindberg FP. CD47 signals T cell death. *J Immunol*. 1999;162:7031-40.
47. Sick E, Boukhari A, Deramaudt T, Rondé P, Bucher B, André P, *et al.* Activation of CD47 receptors causes proliferation of human astrocytoma but not normal astrocytes via an Akt-dependent pathway. *Glia*. 2010;59:308-19.

48. Oldenborg PA, Gresham HD, Lindberg FP. CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates Fcgamma and complement receptor-mediated phagocytosis. *J Exp Med.* 2001;193:855-62.
49. Okazawa H, Motegi S, Ohyama N, Ohnishi H, Tomizawa T, Kaneko Y, *et al.* Negative regulation of phagocytosis in macrophages by the CD47-SHPS-1 system. *J Immunol.* 2005;174:2004-11.
50. Andersen JT, Daba MB, Berntzen G, Michaelsen TE, Sandlie I. Cross-species binding analyses of mouse and human neonatal Fc receptor show dramatic differences in immunoglobulin G and albumin binding. *J Biol Chem.* 2010;285:4826-36.
51. Zhou J, Johnson JE, Ghetie V, Ober RJ, Ward ES. Generation of mutated variants of the human form of the MHC class I-related receptor, FcRn, with increased affinity for mouse immunoglobulin G. *J Mol Biol.* 2003;332:901-13.

癌幹細胞を標的とした治療の概念

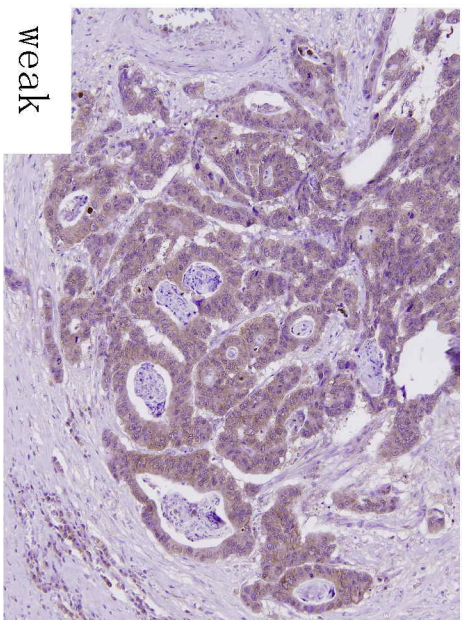
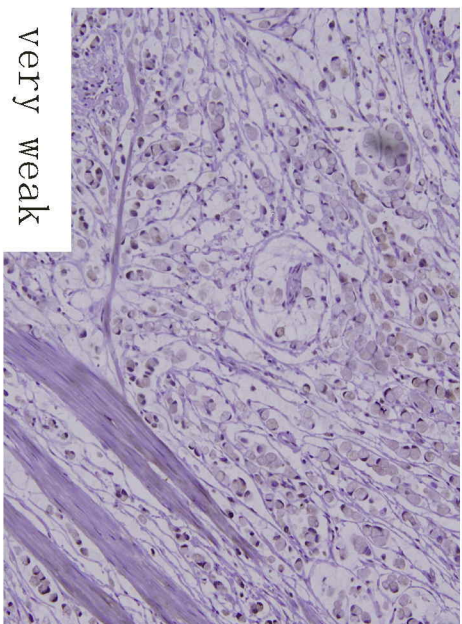


CD47-SIRP α シグナルを 阻害する癌治療の概念

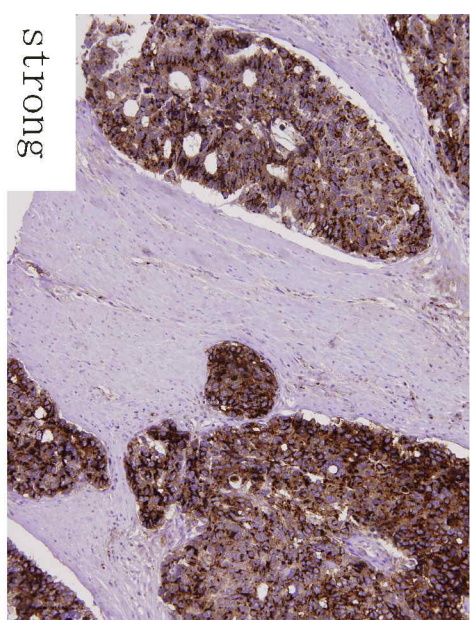
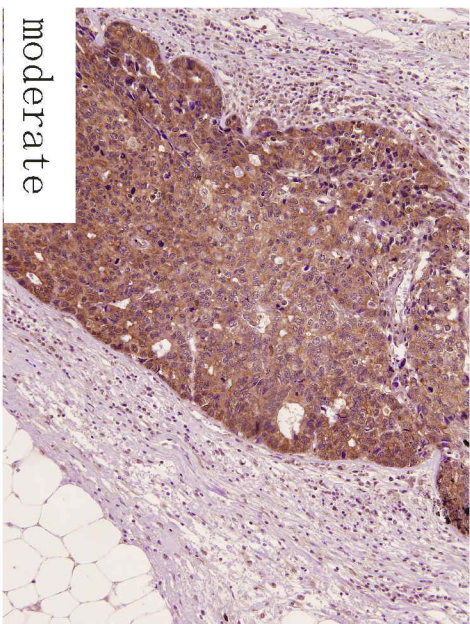


[図2]

CD47陰性



CD47陽性



200倍顕微鏡視野での代表的な染色像を示した。

[図3]

胃癌組織マイクロアレイでのCD47の免疫組織学的染色

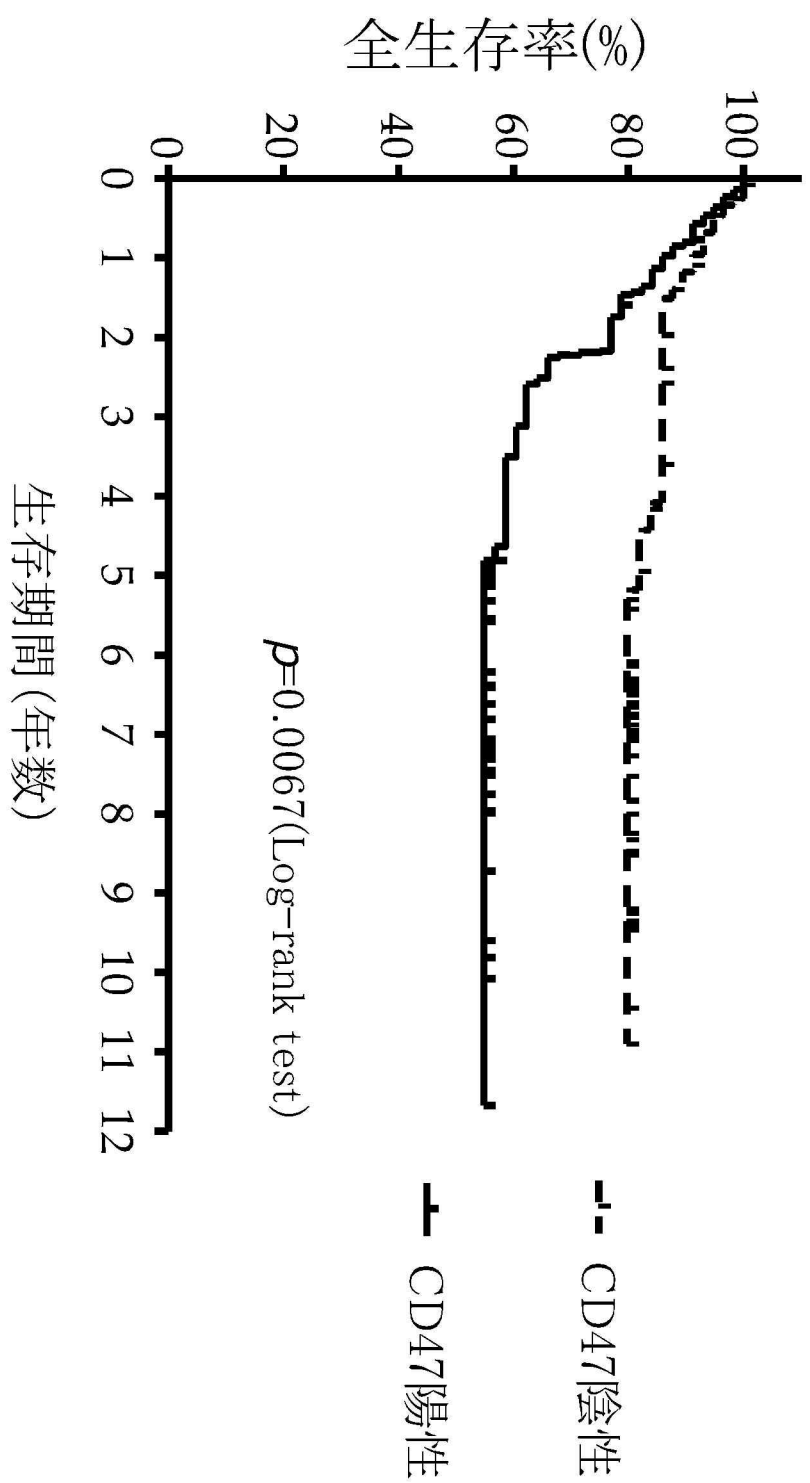
[表 1] CD47 陽性・陰性例の病理学的背景①

		CD47 陽性 (n=57)	CD47 陰性 (n=58)	p 値
年齢		63.1 ± 11.3	62.9 ± 11.4	0.542
性別		男: 40 女: 17	男: 37 女: 21	0.466
深達度	T1b	22 (38%)	18 (31%)	0.725
	T2	8 (14%)	8 (14%)	
	T3	13 (23%)	20 (34%)	
	T4a	13 (23%)	11 (19%)	
	T4b	1 (2%)	1 (2%)	
リンパ節転移	N0	21 (37%)	26 (45%)	0.088
	N1	11 (19%)	18 (31%)	
	N2	12 (21%)	8 (14%)	
	N3a	11 (19%)	3 (5%)	
	N3b	2 (4%)	3 (5%)	
TNM Stage	I	21 (37%)	24 (42%)	0.442
	II	13 (23%)	17 (29%)	
	III	23 (40%)	17 (29%)	
組織型	分化型	26 (46%)	32 (55%)	0.305
	未分化型	31 (54%)	26 (45%)	

CD47 陽性・陰性例の病理学的背景②

最大腫瘍径		49.6 ± 26.2	49.1 ± 25.2	0.548
主占居部位	U	18 (31%)	7 (12%)	0.011
	M	26 (46%)	26 (45%)	
	L	13 (23%)	25 (43%)	
間質	髄様	5 (9%)	3 (5%)	0.755
	中間	35 (61%)	36 (62%)	
	硬性	15 (26%)	15 (26%)	
	不明	2 (4%)	4 (7%)	
浸潤増殖様式	INF a	3 (5%)	1 (2%)	0.605
	INF b	32 (56%)	37 (64%)	
	INF c	20 (35%)	17 (29%)	
	不明	2 (4%)	3 (5%)	
リンパ管侵襲	ly:0	5 (9%)	6 (10%)	0.777
	ly:1	20 (35%)	23 (40%)	
	ly:2	24 (42%)	19 (33%)	
	ly:3	8 (14%)	10 (17%)	
静脈侵襲	v:0	16 (28%)	14 (24%)	0.647
	v:1	24 (42%)	23 (40%)	
	v:2	14 (25%)	18 (31%)	
	v:3	3 (5%)	3 (5%)	

赤字の p 値は統計学的に有意であることを示す。



【図4】

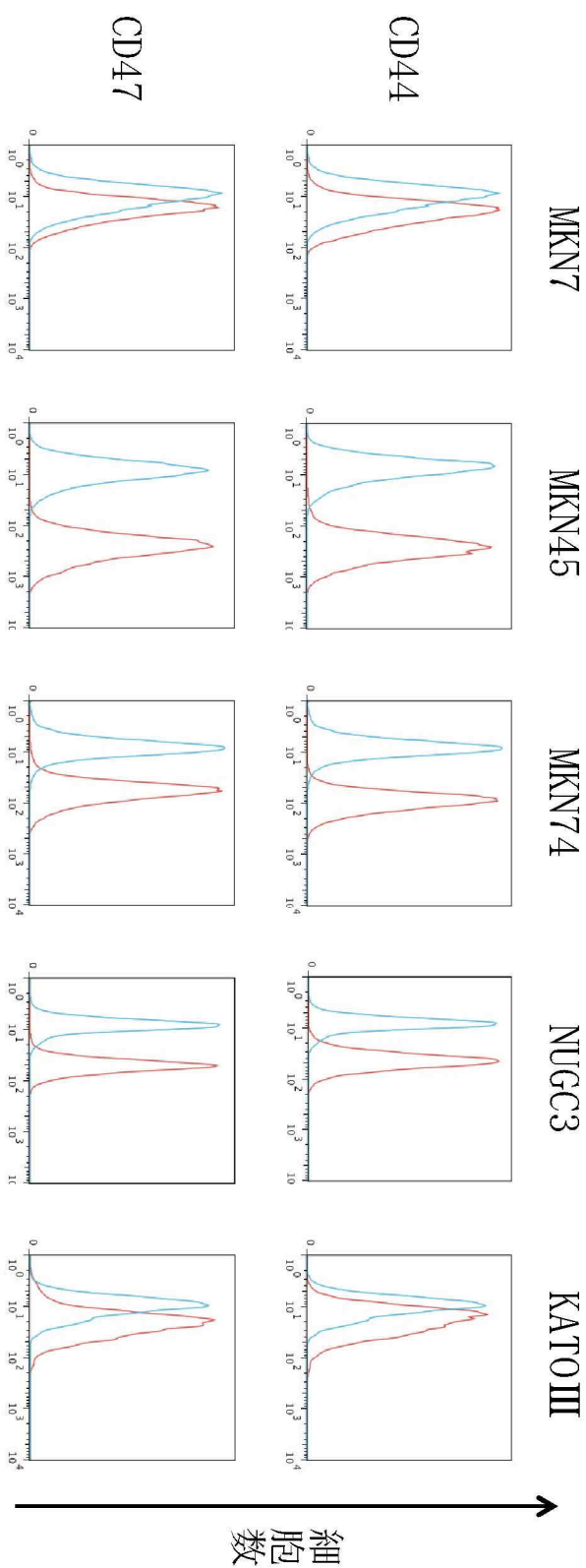
CD47陽性例・陰性例の術後生存曲線

全生存期間

	単変量解析			多変量解析		
	ハザード比	95%信頼区間	p値	ハザード比	95%信頼区間	p値
年齢(60≦)	1.86	0.92-4.06	0.081			
性別 (男)	1.30	0.64-2.83	0.47			
腫瘍占居部位 (U領域)	2.54	1.27-4.93	0.0094	2.17	1.00-4.58	0.049
腫瘍径 (5cm≦)	3.81	1.91-8.10	0.0001	2.88	1.37-6.42	0.0048
組織型 (未分化型)	1.76	0.91-3.52	0.093			
間質 (硬性)	1.50	0.72-2.94	0.26			
腫瘍深達度 (T3≦)	4.36	2.07-10.28	<.0001	2.01	0.82-5.44	0.12
リンパ節転移 (N1≦)	5.66	2.40-16.60	<.0001	3.32	1.25-10.54	0.0138
CD47陽性	2.57	1.29-5.46	0.0062	2.35	1.11-5.27	0.024

赤字のp値は統計学的に有意であることを示す。

[表2] COXの比例ハザードモデルを用いた単変量・多変量解析

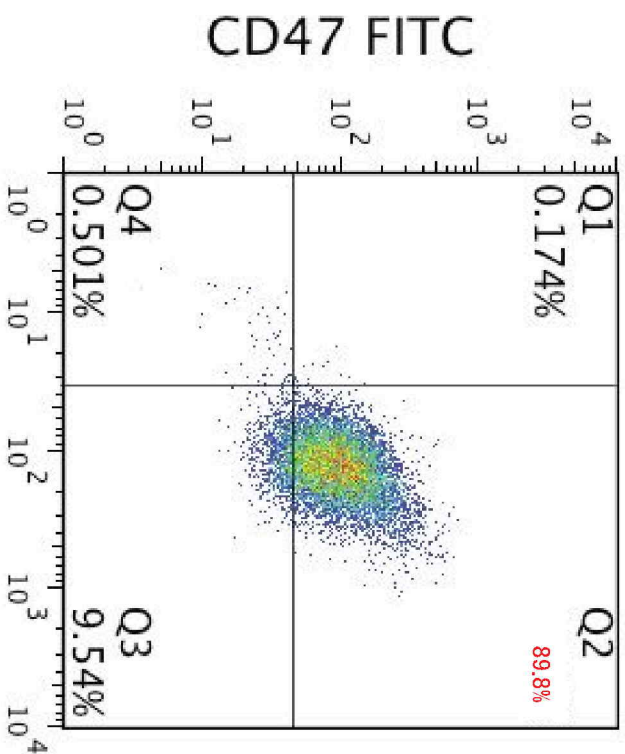


FITC

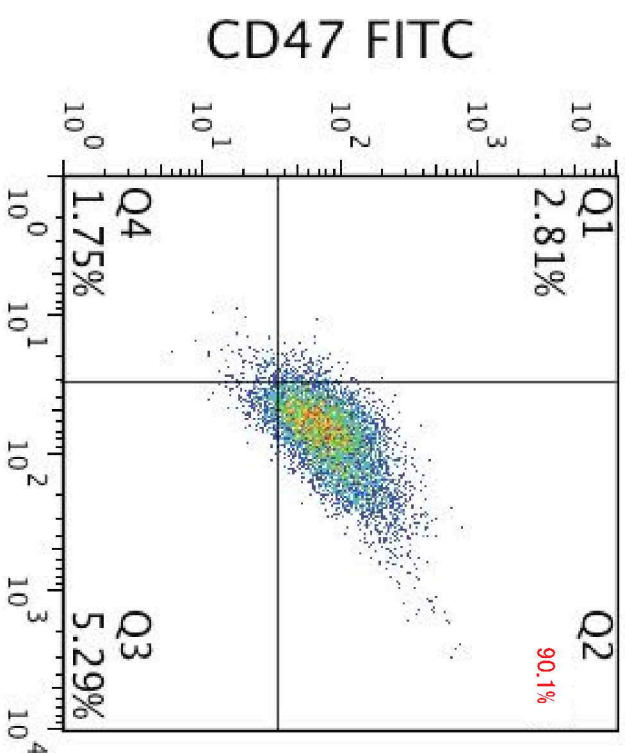
赤のヒストグラムはFITC標識CD44、CD47の各抗体、青のヒストグラムはFITC標識Isotype抗体での蛍光強度を示した。

FITC : Fluorescein isothiocyanate

【図5】 フローサイトメトリー解析での胃癌細胞株のCD44・CD47の発現



MKN45



MKN74

フローサイトメトリ解析によるMKN45・MKN74胃癌細胞株のCD44・CD47発現

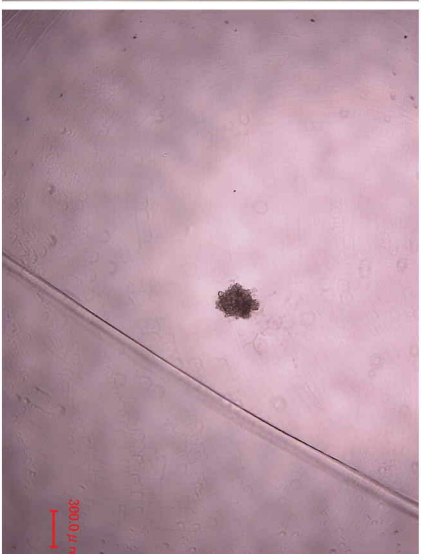
【図6】

FITC : Fluorescein isothiocyanate
PE : Phycoerythrin

MKN45 CD47^{high}



MKN45 CD47^{low}



MKN74 CD47^{high}

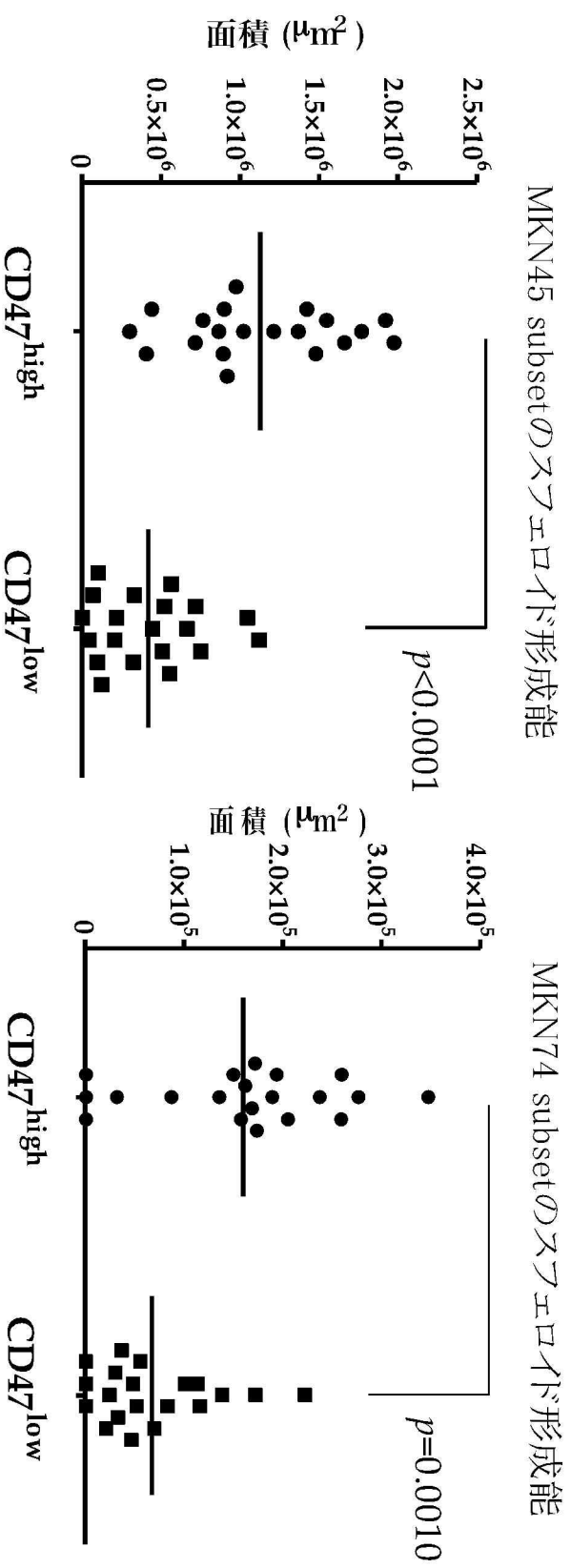


MKN74 CD47^{low}



[図7]

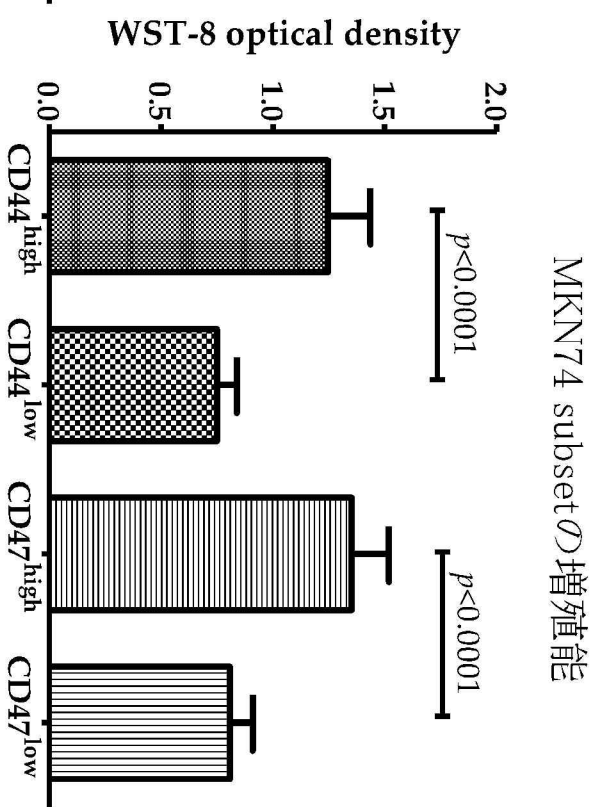
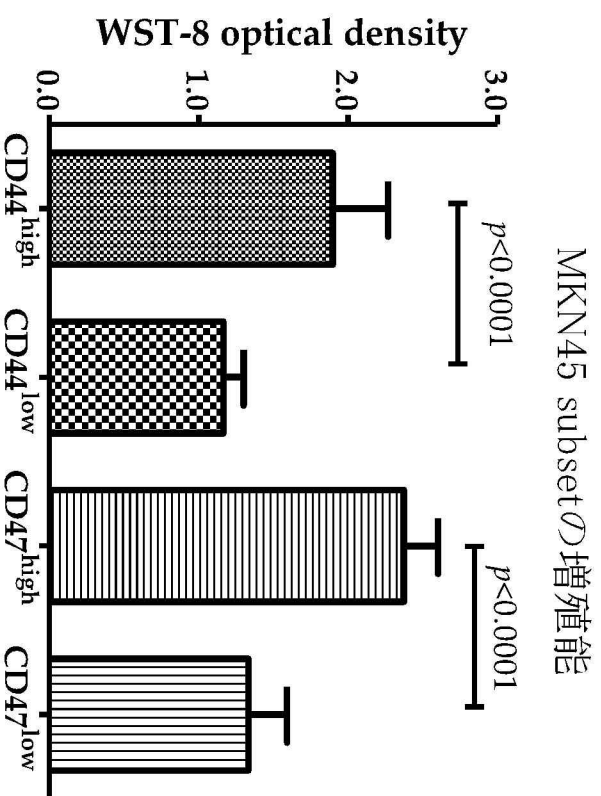
MKN45・MKN74胃癌細胞のCD47^{high}とCD47^{low}のスフェロイド形成



MKN45・MKN74胃癌細胞の非接着性無血清培地でのスフェロイド形成能

各胃癌細胞のsubsetが形成したスフェロイドの面積を図にプロットした。

[図8]



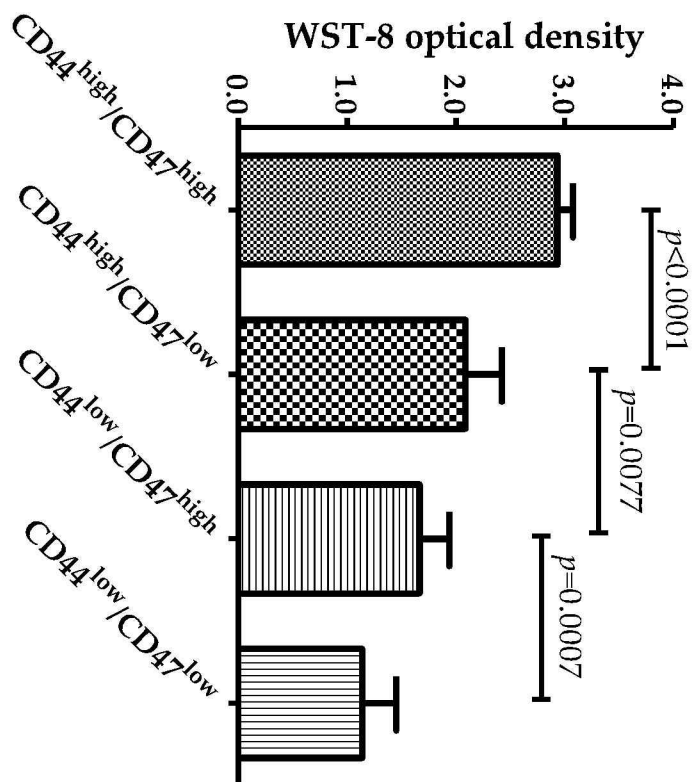
Student t検定

縦軸のWST-8 optical densityは生細胞数を反映している。CD44^{high}およびCD47^{high}分画には増殖能の高い細胞が存在する。

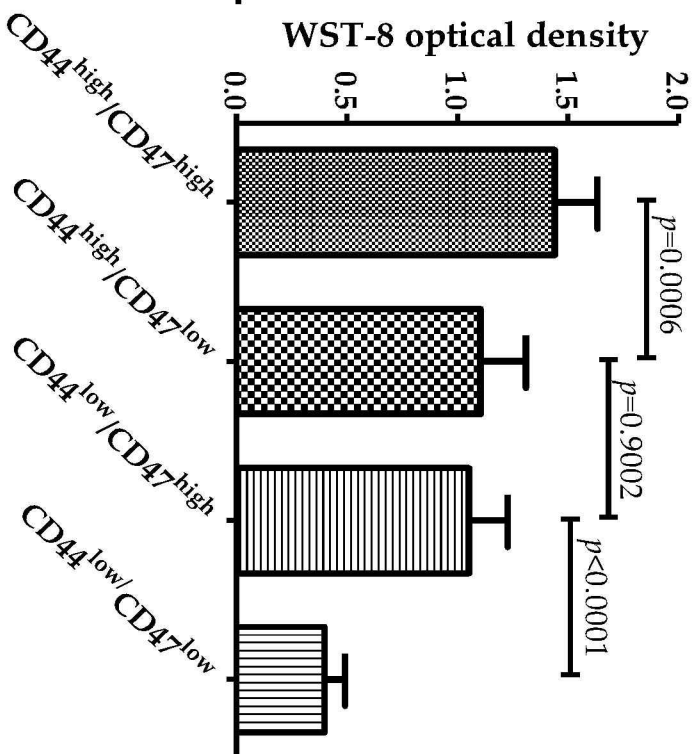
[図9]

CD44とCD47の発現別の胃癌細胞増殖能

MKN45 subsetの増殖能



MKN74 subsetの増殖能

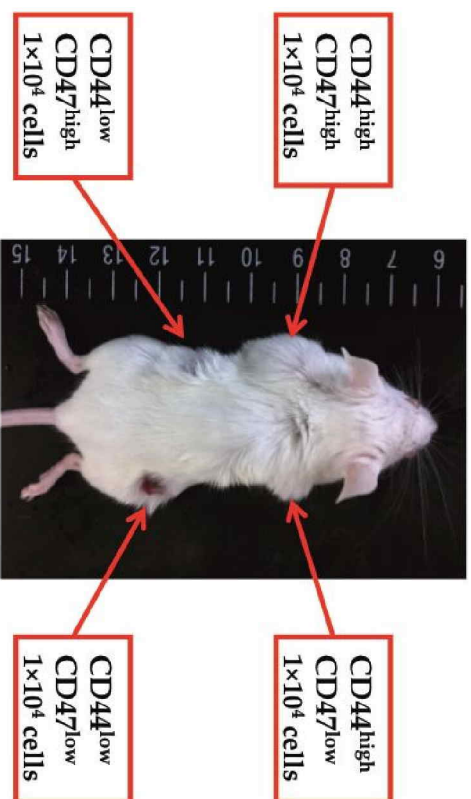


ANOVAおよびTukeyのHSD検定

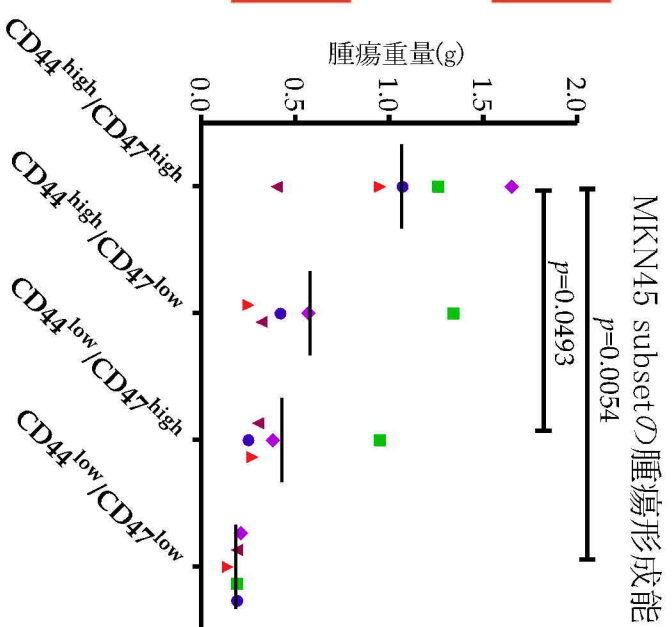
縦軸のWST-8 optical densityは生細胞数を反映している。CD44^{hi}CD47^{hi}分画には最も増殖能の高い細胞が存在する。

[図10]

CD44・CD47の発現別の胃癌細胞増殖能



皮下接種8週間後

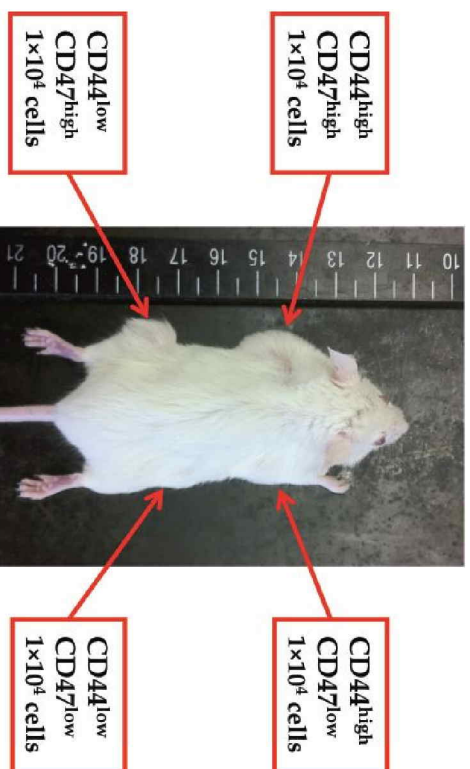


ANOVAおよびTukeyのHSD検定

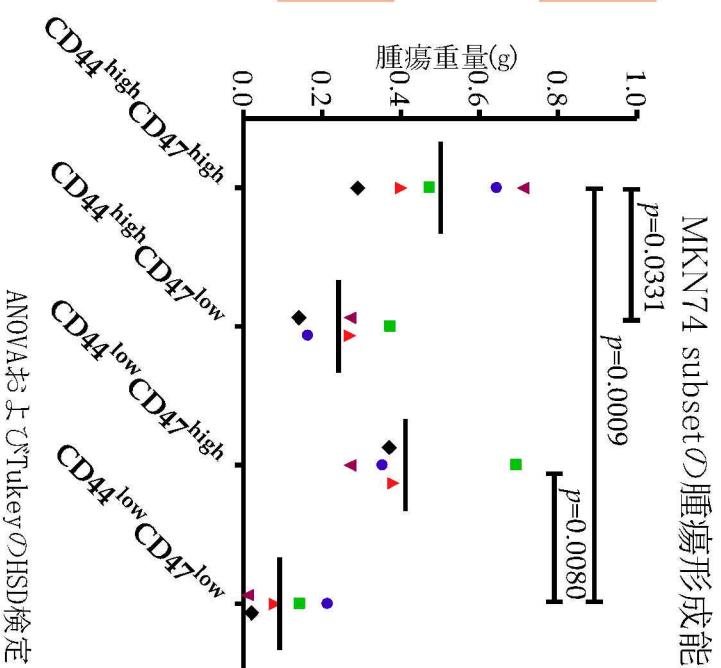
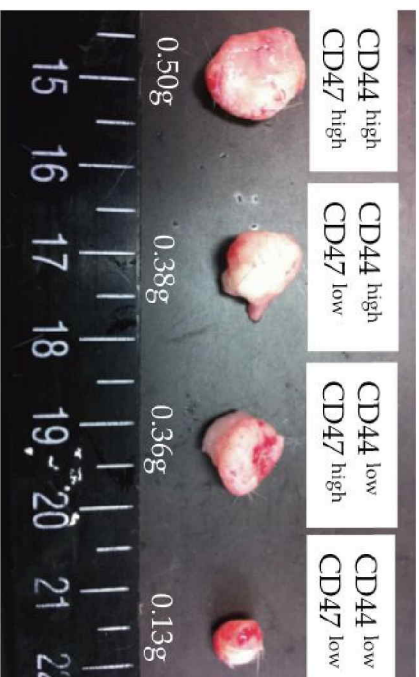
MKN45細胞の各subsetが形成した腫瘍重量をプロットした。プロットの異なる色・形は各々異なるマウスでの腫瘍を示している。

【図11】

CD44・CD47発現別のMKN45胃癌細胞の腫瘍形成能



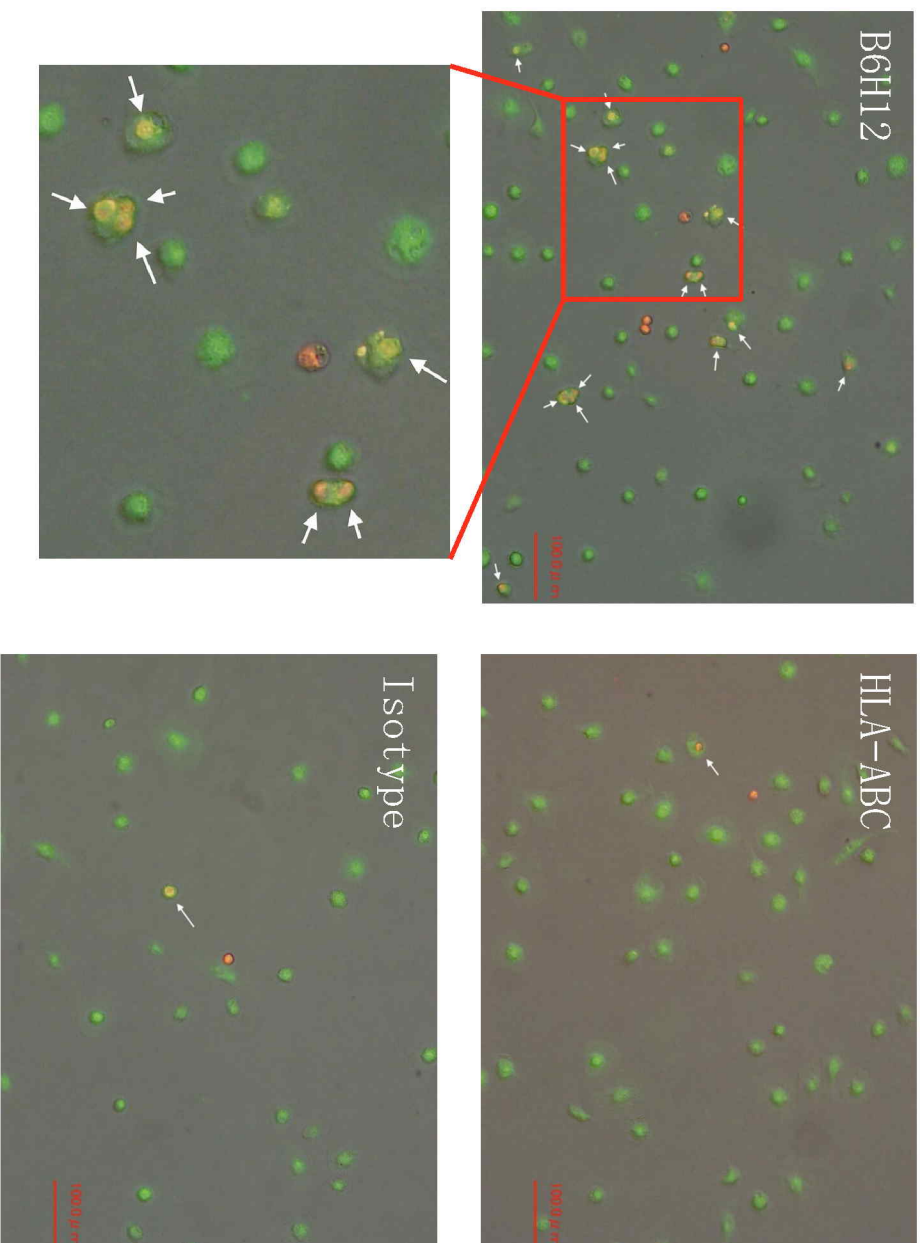
皮下接種8週間後



MKN74細胞の各subsetが形成した腫瘍重量をプロットした。プロットの異なる色・形は各々異なるタイプの腫瘍を示している。

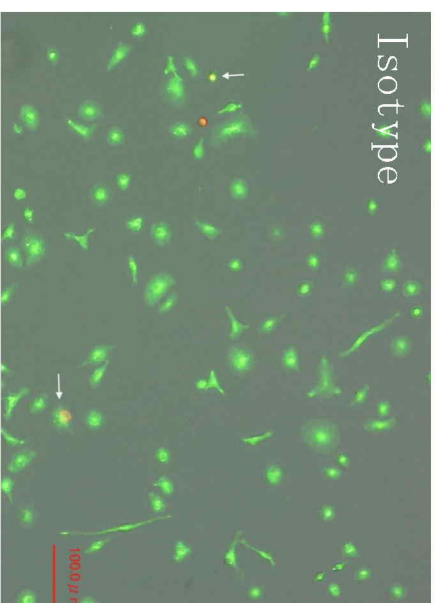
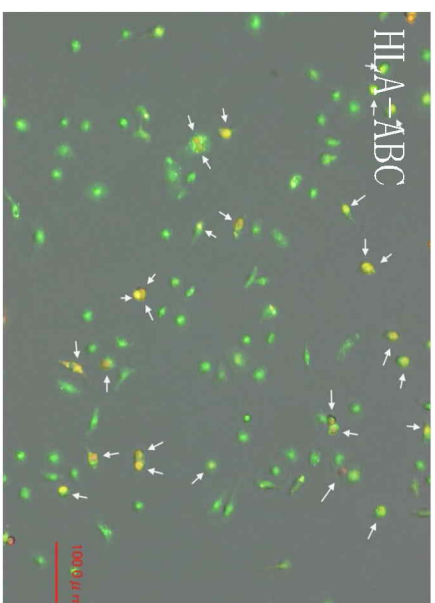
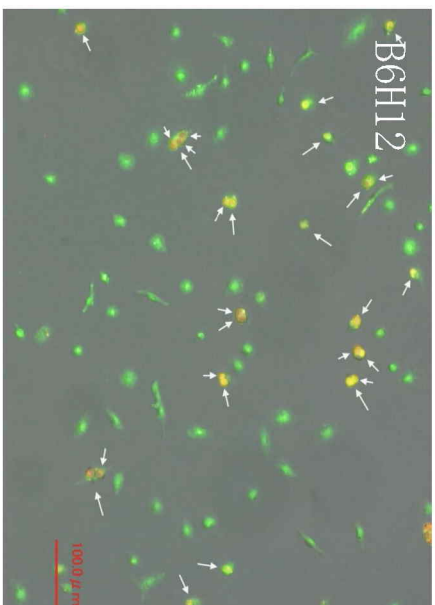
[図12]

CD44・CD47発現別のMKN74胃癌細胞の腫瘍形成能



各抗体投与時の蛍光顕微鏡写真を示した。マクロファージは緑色・胃癌細胞は赤色蛍光標識されている。矢印はマクロファージに貪食された癌細胞を示す。

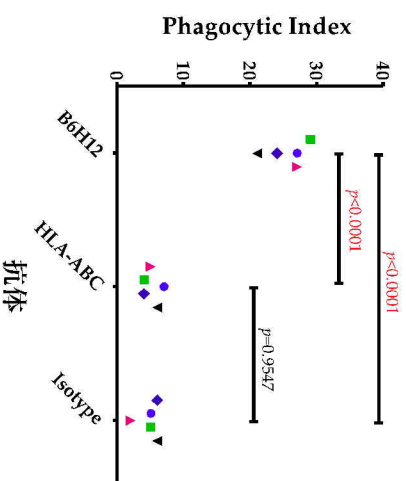
【図13】 ヒトPBMCs由来マクロファージとMKN45細胞を用いた胃癌細胞貪食アッセイ



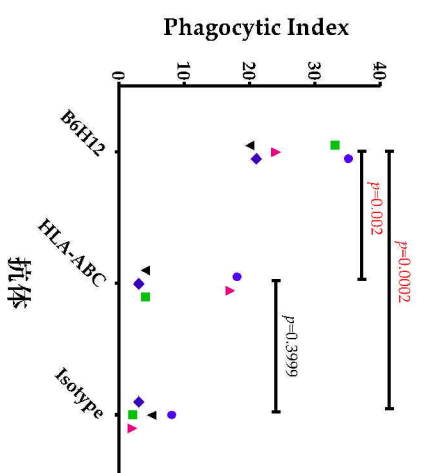
各抗体投与時の蛍光顕微鏡写真を示した。マクロファージは緑色・胃癌細胞は赤色蛍光標識されている。矢印はマクロファージに貪食された癌細胞を示す。

【図14】 マウスBMCs由来マクロファージとMKN45細胞を用いた胃癌細胞貪食アッセイ

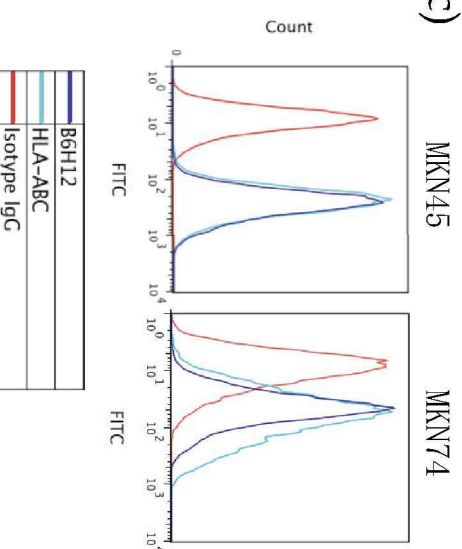
a) ヒトマクロファージのMKN45貪食



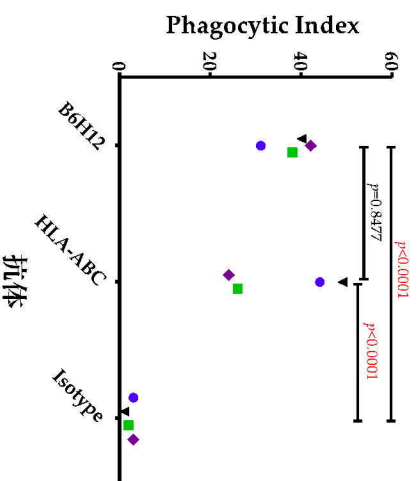
ヒトマクロファージのMKN74貪食



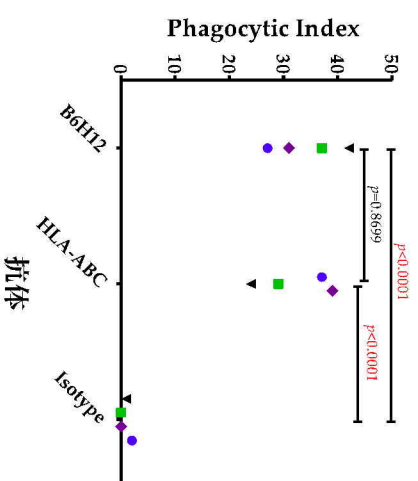
c)



b) マウスマクロファージのMKN45貪食



マウスマクロファージのMKN74貪食

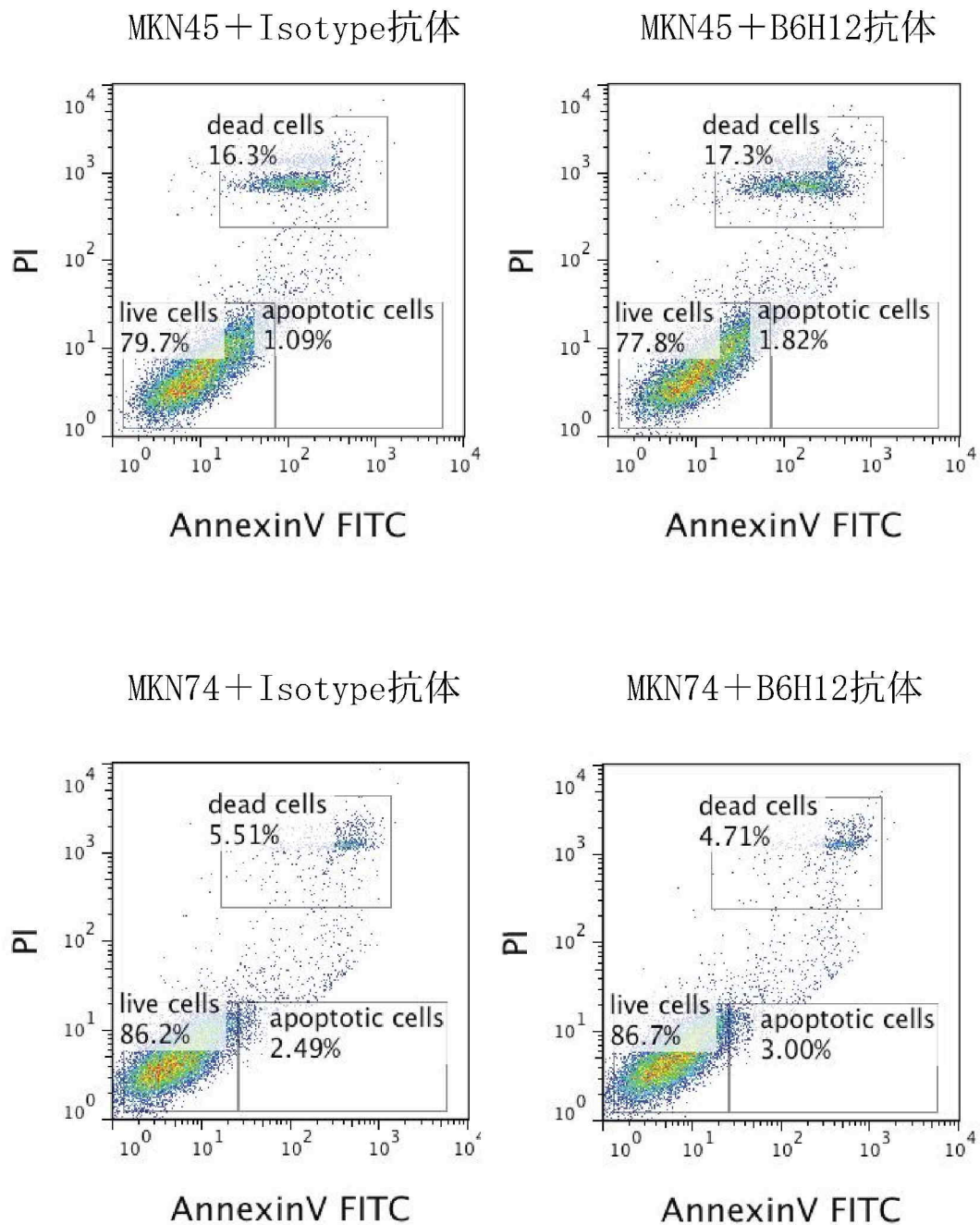


a), b) ヒトおよびマウスマクロファージの Phagocytic indexをプロットした。Phagocytic indexはマクロファージ100個あたりの貪食された胃癌細胞数で定義した。色、形の異なるプロットは、各々異なる独立した実験の結果を示している。

c) MKN45、MKN74胃癌細胞への各抗体の結合をフローサイトメトリーで評価した。

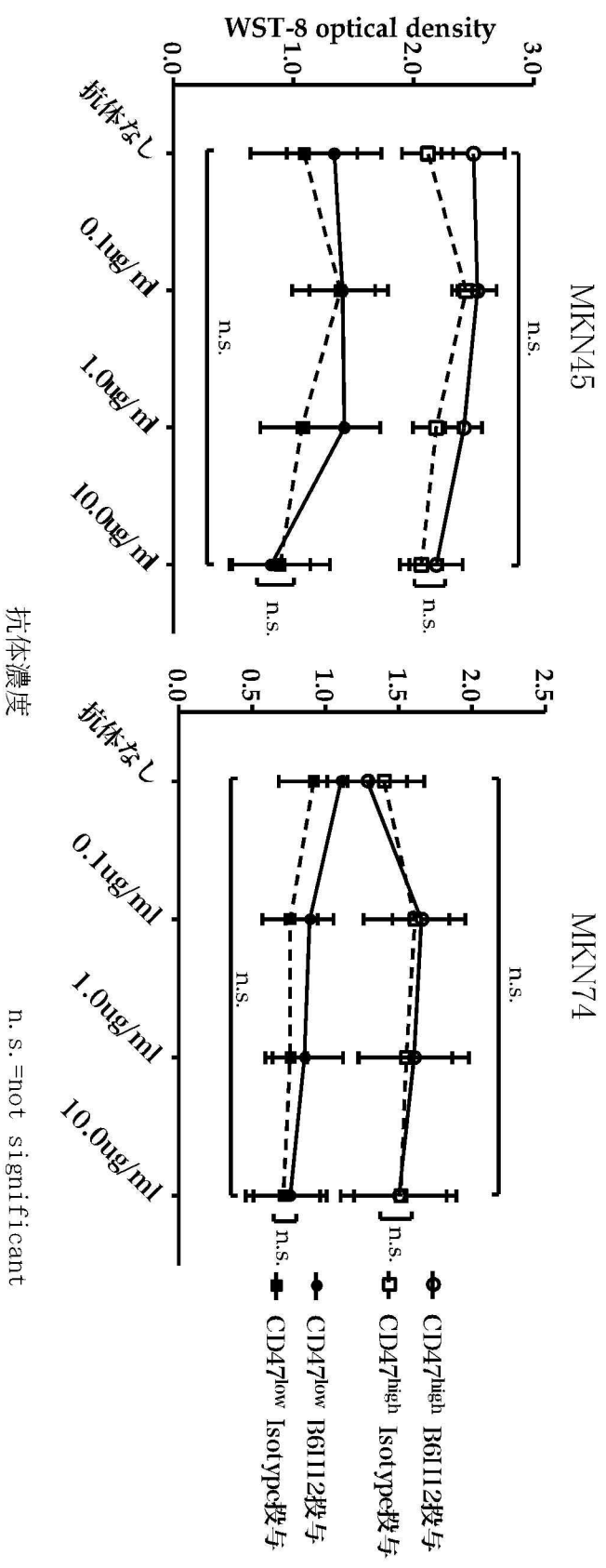
【図15】 ヒトおよびマウスマクロファージを用いた胃癌細胞貪食アッセイの結果

[図16] CD47中和抗体及びIsotype抗体存在下での
胃癌細胞アポトーシス検出アッセイ



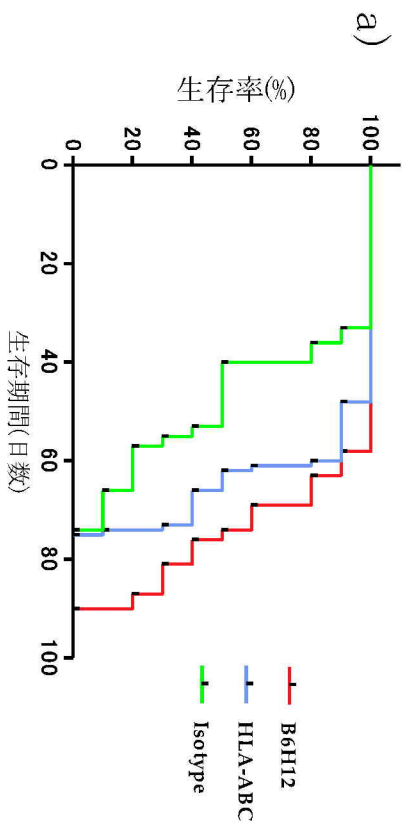
Annexin V Apoptosis detection kitによるアポトーシスの検出
アポトーシス細胞はPI陰性かつAnnexin V陽性分画で定義される。

PI : Propidium iodide



CD47中和抗体(B6H12)およびI sotype抗体投与下での胃癌細胞株の増殖を示した。縦軸のWST-8 optical densityは生細胞数を反映している。抗体の濃度、CD47の発現の有無に関わらずB6H12抗体とI sotype抗体とで増殖の差を認めなかった。

[図17] CD47中和抗体及びI sotype抗体投与下での胃癌細胞増殖

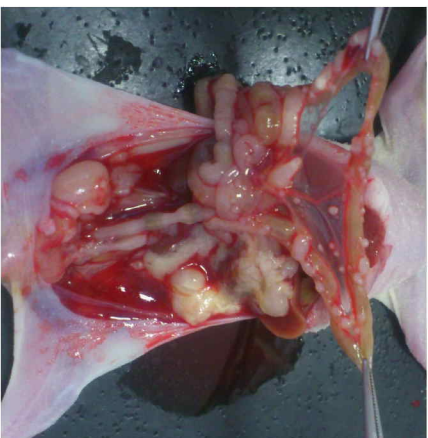


a) MKN45腹膜播種モデルマウスの生存曲線を投与抗体別に表示した。

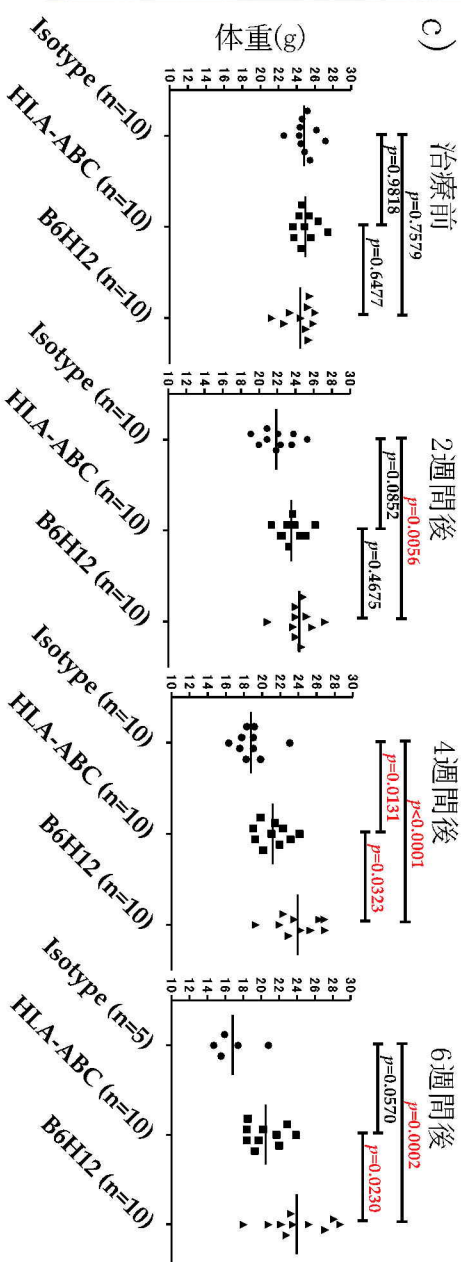
b) MKN45腹膜播種モデルマウスでの腹膜播種を示した。腸管および腸間膜に多数の播種結節を認めた。

c) MKN45腹膜播種モデルマウスの体重を経時的にプロットした。赤字のP値は統計学的に有意である事を示す。

b)

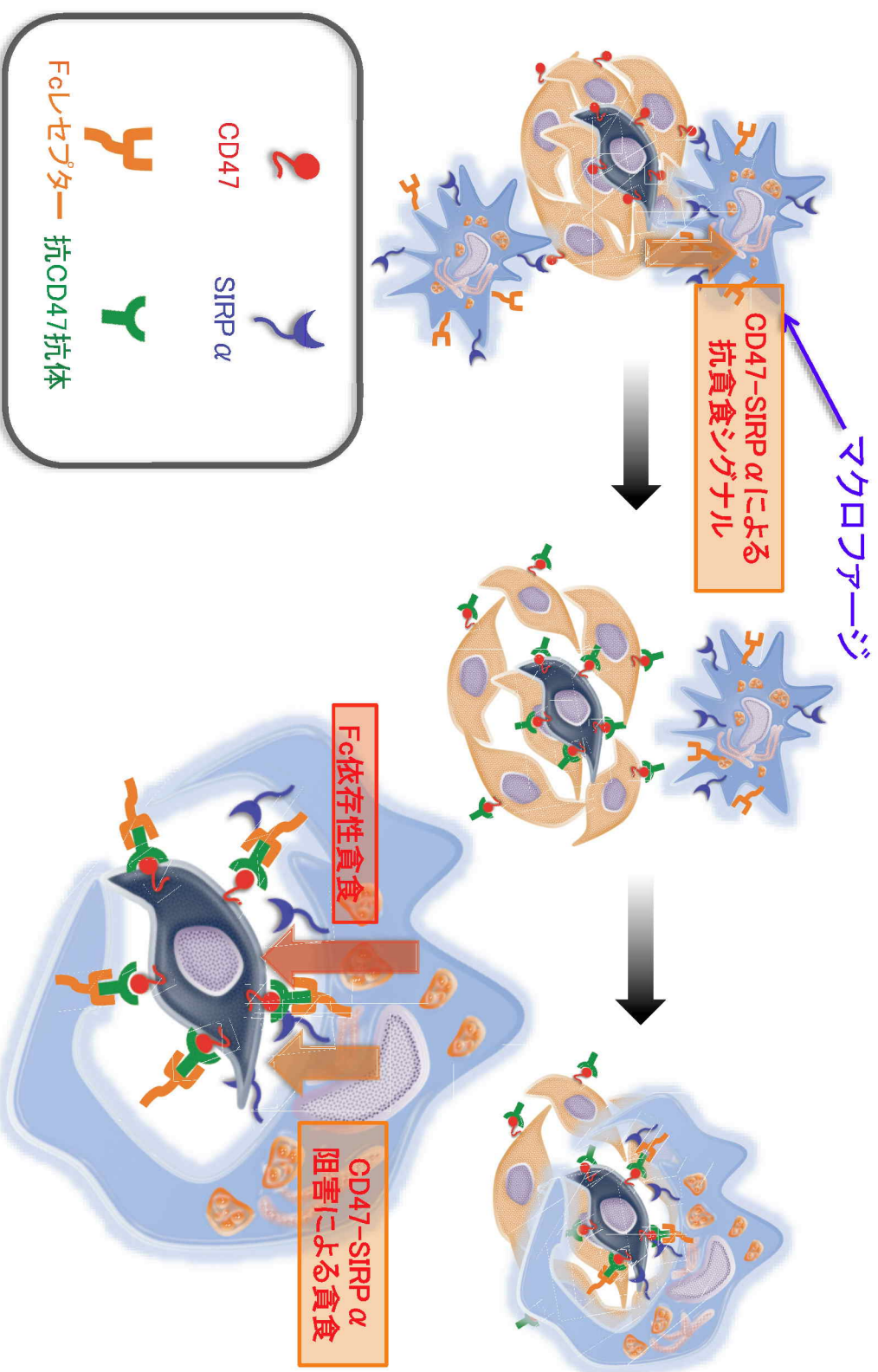


c)



[図18]

MKN45腹膜播種モデルマウスでのCD47中和抗体の治療効果



CD47中和抗体はFcおよびCD47-SIRP α 阻害により癌細胞の食食を惹起する可能性がある