

図41-4 I型IFN受容体とIFNシグナルによる抗腫瘍作用発現に関与するメカニズム

キーワード解説

- **I型インターフェロン**：インターフェロン (IFN) は抗ウイルス作用を有するサイトカインとして知られ、その受容体の違いから、I型 (IFN- α/β など)、II型 (IFN- γ)、そしてIII型 (IFN- λ s) の3つに分類される。ウイルス感染時に宿主細胞においてウイルス由来の主に核酸を認識することでその下流でIFN- α/β 遺伝子発現が誘導される。IFNsはさらに抗腫瘍作用や免疫賦活作用も有しており、なかでもIFN- α/β は肝がんや腎がん、脳腫瘍などのヒト悪性腫瘍に対し、多くの場合、化学療法との併用で臨床応用されている。
- **インターフェロンによる“弱いシグナル”**：I型IFNs (IFN- α/β) はウイルス感染が存在しない状態でも微量に産生されていることが報告されていた。このような構成的に産生されている微量なIFN- α/β による“弱いシグナル”は一見、何も役割がないようにみえるが、重要なシグナル増幅作用の役目があることが明らかになってきた。IFN- α/β による“弱いシグナル”がIFN- γ およびIL-6によるシグナル伝達系や、ウイルス感染によるI型IFN産生に対して増強作用があることが示されている。すなわち、このIFN- α/β による“弱いシグナル”は、迅速に効率良く、強力な細胞応答を発現するための重要な調節機構であると考えられる。このような仕組みは、自動車を勢いよく発進させるためには“エンジンをふかしているrevving up”の方が効率が良いという仕組みと類似し、細胞のエンジンを常にふかしておくことは生体防御の細胞応答において重要な役割を担っていると考え、このようなシステムを“revving-up system”と呼んでいる。このような構成的なIFN- α/β シグナルに、細胞のがん化を防ぐための役割があることも示されている。
- **IRF転写因子**：ウイルス感染によるI型IFN遺伝子の転写制御機構の研究過程においてIFN- β 遺伝子の発現調節領域に結合する転写因子IRF-1がT. Taniguchiのグループによって同定されたのが最初である。現在9つのファミリーメンバーが知られており、各々異なった役割を担っていることがわかってきた。I型IFNsの発現誘導に関与するのは主にIRF-3やIRF-7であり、IFNシグナル伝達に関与するのはIRF-2とIRF-9である。IRF-1やIRF-5はストレス応答によるアポトーシスや細胞周期の制御に関わっている。IRF-6は腫瘍抑制因子であるmaspin (mammary serine protease inhibitor) と会合し、乳がん細胞の浸潤と関連することが報告されている。
- **Toll様受容体 Toll-like receptor (TLR)**：ショウジョウバエの体軸形成に関わるToll分子の変異体が真菌感染に対する抵抗力が弱くなるということから感染制御に関与することが初めて見いだされた。そのヒトホモログがToll様受容体 (TLRs) である。現在少なくとも13近くのメンバーから構成されるファミリーを形成している。宿主細胞とは構造的に異なる微生物由来の核酸や脂質、タンパク質などの分子パターンの構造を認識する受容体である。抗原提示細胞などでは、侵入した病原体を感知し、受容体下流でIFNをはじめとするサイトカインやケモカイン、共刺激分子などの発現を誘導することで自然免疫系のみならず適応免疫系の活性化をひき起こす。腫瘍免疫においても関連性が示唆されている。

てきた⁶⁾(図41-4)。これに加え、IFN- α/β によってがん抑制因子であるp53の遺伝子発現誘導が行われることが報告されている⁷⁾。このp53の誘導はIFN- α/β シグナルの下流で、IRF-9を含むISGF3を介して行われる。IFN- α/β 自体にp53を活性化させる作用は認められないが、IFN- α/β 処理による細胞内のp53のタンパク質レベルの増加によって、DNA損傷時のp53を介する応答性が増強されることが示された。これはIFN- α/β 処理によって抗がん剤投与やX線照射の結果誘導されるアポトーシスの程度が増強されることが期待され、効果的なIFN- α/β 併用療法への1つのヒントを提示しているものと考えられる。おそらく生体内におけるIFNの効果は多様性に富んでおり、このような直接作用に加え、特にNK細胞をはじめとする免疫賦活を介する間接的な抗腫瘍作用も併せて発現されるものと考えられる。

一方で、I型IFNシグナルとがん化抑制との関連性についても興味深い知見が得られている。定常状態において、細胞ががん化を起こした場合に免疫システムにより、それを排除する機構が存在していることが知られている。このようなcancer immunoeditingという局面において、I型IFNシグナルが関与し、発がん過程において抑制的に働

いていることが報告されている⁸⁾。実際、ウイルス感染がない状況においても、発現レベルはかなり低いながらもI型インターフェロンが産生されていることが示されている⁹⁾。この微量なIFNによる“弱いシグナル”は、IFN- γ やIL-6によるサイトカインシグナル応答やウイルス感染時のIFN- α/β 産生についてより強力な細胞応答を発現するための調節シグナルとしてその重要性が示されている^{7,9)}。この場合の微量なIFN- α/β 産生のメカニズムは、ウイルス感染時に引き起こされる大量のIFN- α/β 産生機構とは異なっており、IRF-3やIRF-9には依存しないようであるが、詳細な産生メカニズムはまだ明らかにされていない。

41-4・IRFファミリー転写因子

ウイルス感染によるIFN- α/β 遺伝子産生誘導機構の解明はIRFの発見により急速に進展した。IFN- β 遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子として一番はじめに発見されたのがIRF-1であり、マウスやヒトにおいては現在までに9つのメンバーが同定されている¹⁰⁾。N末端側にファミリーメンバー間で共通して保存された領域としてIRFドメインと呼ばれるDNA結合ドメインを有する(図41-5)。IRFは多くの場合ホモ二量体やヘテロ二量体






がんに関連するIRFファミリーメンバー	がんに対する作用	正常組織発現分布	がんとの関連性
IRF-1 (325 a.a.) 	suppressive	広く多臓器に分布	消化器がんや乳がん、白血病などで遺伝子異常や発現低下を認める
IRF-2 (349 a.a.) 	oncogenic	広く多臓器に分布	乳がんが発現増強を認める
IRF-4 (450 a.a.) 	oncogenic	血液系細胞	多発性骨髄腫の細胞で染色体転座1(6;14)(p25;q32)による過剰発現を認める
IRF-5 (504 a.a.) 	suppressive	広く多臓器に分布	ヒト血液系腫瘍や消化器がんが発現消失を認める
IRF-8 (424 a.a.) 	suppressive	血液系細胞	骨髄性白血病で発現低下を認める

図41-5 がんに関連性の深いIRFファミリーメンバー

N末端にはメンバー間で保存された5つのトリプトファン(W)反復配列が特徴のDNA結合領域が存在する。また、中央部分には、メンバー間での会合領域としてIAD(IRF-association domain)ドメインが存在する。括弧内はヒトIRF転写因子でのアミノ酸のサイズを示してある。通常での細胞内局在はIRF-5が細胞質に存在する以外は上記その他のメンバーは、核内に存在している。がん化のプロセスに対して抑制的な作用を示す場合を“suppressive”、ポジティブな作用を示す場合を“oncogenic”と分類した。

を形成することが知られており、その会合に関与する領域がIAD (IRF-association domain) と呼ばれる。これらIRFはIRF-E (IRF-responsive element) あるいはISRE (IFN-stimulated response element) と呼ばれるコンセンサスDNA配列に結合する。その後の遺伝子欠損マウスを用いた解析により、実際にウイルス感染によるIFN- α/β 遺伝子の発現誘導にかかわる主要な必須因子は現在のところIRF-3とIRF-7であると考えられている¹¹⁾。さらに近年、Toll様受容体Toll-like receptor (TLR)などに代表される病原体認識受容体の下流でI型IFNの遺伝子のみならず、炎症性サイトカインやケモカインの発現誘導に関与しているIRFファミリーメンバーが存在していることも明らかとなっている。一方で、IRFファミリーメンバーのなかでは、IFNとは無関係にがん化プロセスと関連性が示唆されているものが多く報告されている。さらに放射線や紫外線照射、あるいは薬剤投与によるDNA損傷時の細胞周期停止や細胞死の誘導に関与することも明らかになってきた¹²⁾。最もよく研究されているのがIRF-1の腫瘍抑制作用である。マウス線維芽細胞では、IRF-1はX線照射やエトポシドなどの薬剤によるDNA損傷時に、p53と同様にATM (ataxia telangiectasia mutated) を介して発現誘導され、p53と協調してp21^{WAF1/Cip1}を発現することで、細胞周期の停止に関与する。しかしながら、IRF-1のがん化抑制への作用はp53とは必ずしも同等ではなく、IRF-1とp53の二重欠損マウスではp53欠損マウスとは異なった種類のがんを発生し、この二重欠損マウス由来の細胞ではシスプラチンなどのDNA損傷による変異が高率にみられるようになる。IRF-1単独欠損ではがんは発生しないことからtumor susceptibility geneとして認識されている。実際に、IRF-1に関しては、消化器がんや乳がん、白血病など、さまざまながんで欠失などの遺伝子異常や発現異常が認められたり、また、全白血球状態の骨髓異形成症候群ではIRF-1 mRNAのスプライシング異常が報告されている。一方で、IRF-2はNIH3T3細胞に強制発現させるとトランスフォーメーションをひき起こす。これはIRF-1を発現させることで抑制されることから、IRF-2とIRF-1はが

ん化に対して相反的に作用していることが考えられている。また、IRF-2が、がん遺伝子として知られているヒストンH4などの遺伝子発現を正に制御している場合も知られている¹³⁾。ヒト乳がん組織におけるIRF-2発現低下が報告されている¹⁴⁾。

多発性骨髄腫のある患者由来の細胞では特徴的な染色体転座t(6;14)(p25;q32)が見つかり、この6p25のMUM1 (multiple myeloma 1) 座位がIRF-4であることが判明し、この結果IRF-4が過剰発現しているようだ¹⁵⁾。一方で、IRF-4をラットの線維芽細胞に強制発現させると細胞はトランスフォーメーションを起こすことが知られており、IRF-4の発現と骨髄腫の病因との関連性について報告されている。

IRF-5はその遺伝子の2番目のエキソン内にp53結合配列を認め、X線や紫外線照射、アドリアマイシン (ADR) 処理によりp53依存的に発現誘導され、p53標的遺伝子の1つと考えられている¹⁶⁾。また、IFN- α/β によっても発現誘導されることも知られている¹⁷⁾。さらに、IRF-5を強制発現させたヒトB細胞リンパ腫や大腸がん細胞株においてはp53非依存性にG2/M期停止やアポトーシスを誘導するが、この場合IRF-5下流では、BakやBax、カスパーゼ-8、p21^{WAF1/Cip1}などアポトーシスや細胞周期に関する調節因子の発現が増強していることも報告されている。一方、IRF-5欠損マウスの解析では、DNA損傷による細胞周期の停止には関与しないが、アポトーシス誘導に関与しており、この場合、p53経路とは異なった経路を介することが示されている¹⁸⁾。実際、ヒト血液系腫瘍ではIRF-5遺伝子が欠失し、IRF-5の発現が消失しているものも報告されている。実際、ヒト血液系腫瘍や消化器がんではIRF-5の発現が消失しているものも報告されている^{17,19)}。

血球系に特異的に発現しているIRF-8の遺伝子欠損マウスでは、ヒトの慢性骨髄性白血病chronic myelogenous leukemia (CML) に類似した病態を示すようになる。実際に骨髄性白血病の約7割の患者由来の細胞においてIRF-8 mRNAの発現レベルの低下が認められており、一方で、CMLの慢性期の治療として用いられているIFN α の投与によって

IRF-8が発現誘導されることも報告されている²⁰⁾。

このようにがん化の抑制機構の1つとしてIFNシグナルの重要性が示唆され、また、IRFファミリー転写因子はIFN産生のみならず、IFN系とは異なった経路でがん化のプロセスにも関与するなど、広

く生体防御系において重要な役割を担っていると考えられる。今後、IFN-IRFシステムの研究を推進することはがんに対するIFNの新しい治療ストラテジー構築への展開が期待されると同時に、IRF転写因子が治療の標的分子となることが想定される。

//// 文献 ////

- 1) Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD: How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, 67: 227-264, 1998.
- 2) Belardelli F, Ferrantini M, Proietti E, Kirkwood JM: Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13: 119-134, 2002.
- 3) Gutterman JU: Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 1198-1205, 1994.
- 4) Kirkwood J: Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience. *Semin Oncol*, 29: 18-26, 2002.
- 5) Sakon M, Nagano H, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Yamada A, Kawata S, Imai Y, Iijima S, Monden M: Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer*, 94: 435-442, 2002.
- 6) Clemens MJ: Interferons and apoptosis. *J Interferon Cytokine Res*, 23: 277-292, 2003.
- 7) Takaoka A, Taniguchi T: New aspects of IFN-alpha/beta signalling in immunity, oncogenesis and bone metabolism. *Cancer Sci*, 94: 405-411, 2003.
- 8) Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KC, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, Diamond MS, Koebel CM, Arthur C, White JM, Schreiber RD: A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol*, 6: 722-729, 2005.
- 9) Taniguchi T, Takaoka A: A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 378-386, 2001.
- 10) Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N: IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol*, 19: 623-655, 2001.
- 11) Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T: Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity*, 13: 539-548, 2000.
- 12) Takaoka A, Tamura T, Taniguchi T: Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. *Cancer Sci*, 99: 467-478, 2008.
- 13) Vaughan PS, Aziz F, van Wijnen AJ, Wu S, Harada H, Taniguchi T, Soprano KJ, Stein JL, Stein GS: Activation of a cell-cycle-regulated histone gene by the oncogenic transcription factor IRF-2. *Nature*, 377: 362-365, 1995.
- 14) Doherty GM, Boucher L, Sorenson K, Lowney J: Interferon regulatory factor expression in human breast cancer. *Ann Surg*, 233: 623-629, 2001.
- 15) Iida S, Rao PH, Butler M, Corradini P, Boccadoro M, Klein B, Chaganti RS, Dalla-Favera R: Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nat Genet*, 17: 226-230, 1997.
- 16) Mori T, Anazawa Y, Iizumi M, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H: Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. *Oncogene*, 21: 2914-2918, 2002.
- 17) Barnes BJ, Kellum MJ, Pinder KE, Frisancho JA, Pitha PM: Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death. *Cancer Res*, 63: 6424-6431, 2003.
- 18) Yanai H, Chen HM, Inuzuka T, Kondo S, Mak TW, Takaoka A, Honda K, Taniguchi T: Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 3402-3407, 2007.
- 19) Hu G, Mancl ME, Barnes BJ: Signaling through IFN regulatory factor-5 sensitizes p53-deficient tumors to DNA damage-induced apoptosis and cell death. *Cancer Res*, 65: 7403-7412, 2005.
- 20) Ozato K, Taylor P, Kubota T: The interferon regulatory factor family in host defense: mechanism of action. *J Biol Chem*, 282: 20065-20069, 2007.

がん免疫療法の標的抗原

守田玲菜^{*1}，廣橋良彦^{*2}，鳥越俊彦^{*3}，佐藤昇志^{*4}

*1 札幌医科大学 第1病理 研究生

*2 札幌医科大学 第1病理 助教

*3 札幌医科大学 第1病理 准教授

*4 札幌医科大学 第1病理 教授

『がん免疫療法—実用化へのチャレンジ』

2010年9月 シーエムシー出版刊 抜刷

第2章 がん免疫療法の標的抗原

守田玲菜*¹, 廣橋良彦*², 鳥越俊彦*³, 佐藤昇志*⁴

1 緒言

1991年にメラノーマにおいて、宿主の細胞傷害性T細胞（cytotoxic T cell：以下CTL）で認識されがん組織に特異的もしくは限局的に発現しているがん抗原遺伝子であるMAGEファミリーが発見された²⁾。これ以降、CTLの標的や抗体の標的となり得るようながん抗原分子が多数同定・解析され、腫瘍免疫学や臨床応用に向けた研究が飛躍的に発展を遂げつつある。2010年5月現在、日本国内で治療用がんワクチンは承認・市販されていない。海外では2007年7月にスイスで脳腫瘍に対して自己樹状細胞（dendritic cell：以下DC）を用いたDCVax[®]（Northwest Biotherapeutics社）、2008年4月にロシアで腎がんに対して自己腫瘍から得た熱ショック蛋白（Heat shock protein：HSP）を投与するOncophage[®]（Antigenics社）、2010年4月に米国で前立腺癌に対してProstatic acid phosphatase（PAP）抗原で感作されたDCを用いたProvence[®]（Dendreon社）が承認されている。また、より効果的な治療用がんワクチンを模索すべく臨床試験も数多く施行されており、現在国内で80件近い臨床試験が進行している³⁾。

これまでの報告から、抗原特異的免疫療法（いわゆるがんワクチン療法）単独では*in vitro*での結果と比べ生体での効果が薄く、大半の症例では満足のいく結果が得られないことは周知の事実である。がんワクチン療法をより効果的にするためには、免疫感作方法の工夫、新規アジュバントの開発やがん免疫逃避機構の解明は重要である。一方で、以前より同定されてきたがん抗原は、がんの維持・増殖・浸潤・転移・再発などとの関係について解明されつつあり、標的となるがん抗原をがん化に関する分子機能に基づいて再考することも治療戦略を考える上で非常に重要である。本稿では、がん抗原を機能的側面から分類し概説する。

*1 Rena Morita 札幌医科大学 第1病理 研究生

*2 Yoshihiko Hirohashi 札幌医科大学 第1病理 助教

*3 Toshihiko Torigoe 札幌医科大学 第1病理 准教授

*4 Noriyuki Sato 札幌医科大学 第1病理 教授

2 がん抗原のカテゴリー

がん抗原の多くは腫瘍を認識するCTLを用いたcDNA発現クローニング、DNAマイクロアレイ、RDA法などのDNAサブトラクション法、患者抗体が認識する抗原を解析するSEREX法、マウスを用いて抗原がCTLに認識され得ることを証明するreverse-immunogenetical approachなどで同定される^{2, 4, 5)}。同定された分子の分類方法は様々であるが、前述したMAGEファミリー遺伝子を同定したBoonらのグループは腫瘍と正常組織での発現形式から、①がん共通特異抗原、②過剰発現抗原、③臓器特異的抗原、④遺伝子変異、という分類を提唱している^{6~9)}。この分類は、より腫瘍細胞に特異的で、より汎用な、免疫療法による副作用の少ない（自己免疫疾患様症状や正常組織への傷害性が少ない）抗原を予測する上で有用である。これまでに同定された腫瘍抗原の中には、がんの維持・増殖・浸潤・転移・再発などに関わりのある機能を持った分子も存在する。がん化に関して機能を持たない分子よりは、がんとしての形質を発揮する機能的分子を免疫療法の標的とする方が効率的といえる。前述の発現形式からの分類で副作用などを予測しつつ、機能的側面からアプローチすることは免疫療法の戦略を練る上で重要である。

この機能的な分類としてWeinbergらのグループは、このがんとしての形質を発揮するのに基本となる遺伝子群を次の6つに分類している¹⁰⁾。

- (A) 細胞増殖に関わる遺伝子群
- (B) 成長抑制シグナルに対する不応答性に関わる遺伝子群
- (C) アポトーシス耐性能に関わる遺伝子群
- (D) 無限増殖に関わる遺伝子群
- (E) 血管新生に関わる遺伝子群
- (F) 組織浸潤に関わる遺伝子群

これに加え、近年特に注目されているがん幹細胞の概念も取り入れ（(G) 幹細胞性に関わる遺伝子群）、7つのカテゴリーに分類し（図1）、各々についてそのカテゴリーに含まれるいくつかの分子について概説する（表1）。

(A) 細胞増殖に関わる遺伝子群

細胞増殖時、正常細胞は分裂促進に働く成長シグナルが必要であり、このシグナルは必要時のみ活性化する。一方、がん細胞ではある種のがん遺伝子が分裂促進シグナルのように作動し、細胞増殖を促している。これらの遺伝子群はしばしば正常組織にも発現しているが、がん細胞で過剰発現している。これまでの報告から、これらの抗原遺伝子もがん患者のCTLで認識され得ることが判明しており、がん患者生体内では不応答性抗原であることが推測される。このカテゴリーに属する遺伝子はさらに、成長因子受容体に関する抗原、細胞周期に関連する抗原の2つのグ

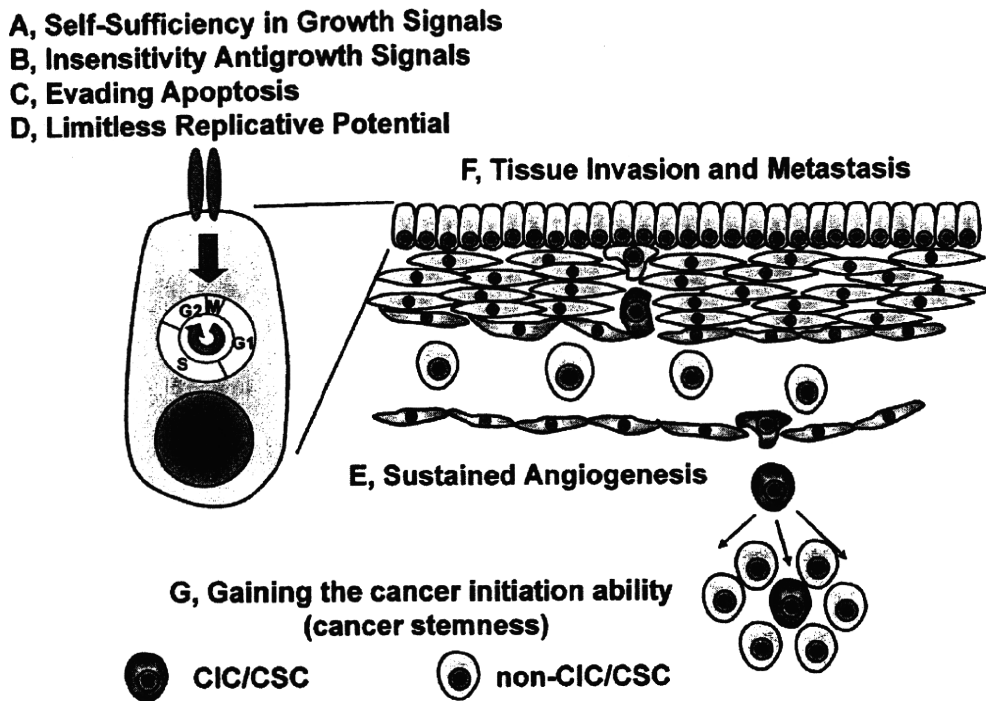


図1 がん抗原の機能的側面に基づいて分類した7つのカテゴリ (文献1)より転用)

表1 抗原ペプチドが同定されているカテゴリ別の代表的抗原

カテゴリ	抗原名
A. 細胞増殖に関わる遺伝子群	p185 ^{HER2/neu} , EGFR, EphA3, FGF5, c-met, cyclin D1, cyclin B1, Aurora-A kinase, Cep55/c10orf3, plk1, STAT1, survivin, survivin 2B
B. 成長抑制シグナルに対する不応性に関わる遺伝子群	MDM2, Aurora-A kinase
C. アポトーシス耐性能に関わる遺伝子群	Bcl-2, Bcl-xL, BAX-delta, Mcl-1, survivin, survivin 2B, ML-IAP/Livin
D. 無限増殖に関わる遺伝子群	hTERT
E. 血管新生に関わる遺伝子群	VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, RGS5, survivin, survivin 2B
F. 組織浸潤に関わる遺伝子群	MMP2
G. 幹細胞性に関わる遺伝子群	SOX2, SOX10

グループに分けられる。前者にはp185^{HER2/neu}, EGFRなどが挙げられ、後者にはcyclin D1, Cep55/c10orf3などが挙げられる。

p185^{HER2/neu}, EGFRはErbBファミリーに属する受容体型チロシンキナーゼであり、細胞のがん化やがんの進展に関わっているがん遺伝子である^{11, 12)}。いずれも正常組織でも低レベルではあるが広範に発現しているが、p185^{HER2/neu}は乳癌、卵巣癌、大腸癌、胃癌などで高発現しEGFRは多くの悪性腫瘍で高発現している。どちらの分子も抗体療法の標的としても知られているが、CTLの標的となるHLA拘束性抗原ペプチドも多く同定されている¹³⁻²⁰⁾。ただし、

p185^{HER2/neu} 抗原配列は免疫原性が低い傾向にあるとの報告もあるため、同時に免疫寛容を克服するような免疫療法デザインが必要と思われる。

Cyclin D1はいくつかの cyclin-dependent kinases (以下 Cdk) と結合して細胞周期を S 期に誘導する蛋白であり²¹⁾、マントル細胞リンパ腫など一部の血液腫瘍で過剰発現しているのは有名であるが、大腸癌・胃癌・肺癌・乳癌などの固形腫瘍でも高発現している。最近、HLA-A2 拘束性抗原ペプチドが同定され、CTL の誘導に成功している²²⁾。また、Cep55/c10orf3 は中心体に局在し、細胞分裂に必須の分子であることが証明され²³⁾、大腸癌で高発現している遺伝子として同定された²⁴⁾。最近、当教室ではマイクロアレイを用いたスクリーニングで乳癌において Cep55/c10orf3 高発現していることを見出した。さらに HLA-A24 拘束性抗原ペプチドを同定し、この抗原ペプチドを認識する乳癌患者からの CTL を誘導できた²⁵⁾。免疫原性が非常に高い分子であり、誘導された CTL を用いた実験では細胞分裂期以外の Cep55 陽性細胞をも障害できることから、免疫治療の候補分子として有望だと考えている。

(B) 成長抑制シグナルに対する不応答性に関わる遺伝子群

正常組織では遺伝子変異などを起こした異常細胞が増殖しないようにいくつかの成長抑制シグナルが働いている。細胞周期制御のブレーキの役割を果たすものとして、Cdk 阻害蛋白質群 (p21・p27 など) が知られている。正常細胞では p21 遺伝子の上流に p53 の結合配列があり、DNA 損傷時には p53 の活性化により p21 が転写され細胞周期停止・細胞増殖抑制に向かう。この p53 の機能を抑制している分子の 1 つに murine double mutant 2 (MDM2) がある。MDM2 はいくつかの悪性腫瘍で高発現していることが知られており²⁶⁾、細胞増殖抑制に関して理にかなう治療標的といえる。MDM2 の HLA-A2 拘束性抗原配列に対する CTL を誘導した報告があるががん患者からの CTL 誘導が困難であったり²⁷⁾、細胞免疫に耐性であるとの報告がある^{28, 29)}。

(C) アポトーシス耐性能に関わる遺伝子群

正常細胞では不要になった細胞や異常になった細胞をアポトーシスによって排除し、臓器・組織内での規律を保つ機能を有している。正常細胞では death ligand の刺激を受けると、アダプター分子を介して caspase-8 が活性化し、その下流にある caspase-3 などのエフェクターカスパーゼを活性化してアポトーシスを引き起こしたり、Bid を限定分解することによりミトコンドリアからシトクロム C などの分子を誘導しミトコンドリア依存性のアポトーシスを引き起こす。細胞内アポトーシスシグナル抑制分子としては、Bcl-2・Bcl-x_L ががん細胞で過剰発現しミトコンドリア依存性のアポトーシスを抑制したり³⁰⁾、survivin などの IAP (inhibitor of apoptosis protein) family が過剰発現し caspase-3 などを阻害することによりアポトーシスを抑制することが知られている³¹⁾。

Bcl-2, Bcl-x_L は造血器腫瘍で高発現しているが固形腫瘍でも高発現しており、いずれも

表2 当教室で施行した大腸癌患者の survivin 2B ペプチドワクチン療法の第1相試験結果（文献1）より転用）

protocol	Adverse events	Tumor marker (not increased)	CT imaging (SD, PR)	CTL detection (tetramer)
Peptide alone	Anemia, Fever, General malaise	2/10 (20%)	4/10 (40%)	2/10 (20%)
Peptide + IFA	Induration, Itching, Fever	0/5 (0%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)
Peptide + IFA + IFN- α	Induration, Itching, Fever, Leucopenia	4/6 (67%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)

CTL, cytotoxic T lymphocyte ; IFA, incomplete Freud's adjuvant ; IFN, interferon.

HLA-A2拘束性抗原によるCTL誘導が確認されている^{32, 33)}。

Survivinはがん細胞では高発現しているが、正常組織でごく微量に発現しているが、免疫原性が比較的高い遺伝子と考えられている³⁴⁾。SurvivinのCTLを誘導するHLA拘束性抗原ペプチドは多数報告がある³⁵⁻⁴⁰⁾。また、我々はsurvivinのsplicing variantであるsurvivin 2BにコードされるHLA-A24拘束性抗原ペプチドを同定し、消化器癌、口腔癌、尿路上皮癌などで臨床試験を施行している⁴¹⁾。大腸癌患者で施行した第1相試験の結果を表2に示すが、survivin 2Bペプチドワクチン単独では、腫瘍マーカーの頭打ちが見られた症例は2/10症例（20%）、画像上腫瘍縮小（partial response）・普遍（stable disease）が見られた症例は4/10症例（40%）であったが、interferon- α （以下IFN- α ）を併用することにより腫瘍マーカーの評価で4/6症例（67%）、画像上の評価で4/6症例（67%）の効果が得られた。また、HLAテトラマー（腫瘍抗原ペプチド・MHC複合体の4量体）を用いた抗原認識T細胞の評価でも、ペプチド単独よりもIFN- α を併用したほうが効果が高い傾向にあった¹⁾。

(D) 無限増殖に関わる遺伝子群

通常の体細胞では分裂するたびに末端構造のテロメア（(TTAGGG) n ）が短くなり、極端に短縮してしまうと染色体構造が不安定となる。染色体構造の安定化のために、テロメアの短縮がある閾値を超えた時点で正常細胞では細胞分裂が停止してしまう。分裂停止した細胞はその後DNA損傷などの傷害を受け、最終的にはアポトーシスが起こり、排除されてしまう。しかし、がん細胞ではテロメラーゼにより短縮したテロメアを伸張する機構が働いており、テロメア長を保っている。テロメラーゼ（ヒトではhuman telomerase reverse transcriptase catalytic subunit：以下hTERT）は正常組織では生殖細胞など一部にしか発現していないが、がん組織においては高頻度に高発現しており⁴²⁾、複数のHLA拘束性抗原ペプチドが同定され⁴³⁻⁴⁸⁾、臨床試験も進行している。

(E) 血管新生に関わる遺伝子群

低酸素部・低栄養部に酸素・養分を供給するために血管形成（血管新生）が引き起こされる。低酸素状態がtriggerとなり転写因子であるHypoxia-induced factor (HIF)が活性化されvascular endothelial growth factor（以下VEGF）が転写・発現亢進し、血管内皮細胞に発現している受容体型チロシンキナーゼであるVEGF受容体（以下VEGF-R）を介して血管内皮細胞の増殖・遊走を引き起こす。VEGF-Rファミリーの中でもこのシグナル伝達の中心的な役割を果たしているのがVEGF-R2であるが、VEGF-R1を介したシグナルも協調して血管新生促進に作用する。がん組織ではこのVEGF・VEGF-Rを介した血管新生が誘導されており、腫瘍の進展に寄与している。VEGFは抗体療法の標的としても有名であるが、最近HLA-B27拘束性抗原ペプチドが同定された⁴⁹⁾。またVEGF-R1・R2ともに、HLA-A2/Kbトランスジェニックマウスを用いた実験系でHLA-A2拘束性抗原ペプチドが同定されている^{50, 51)}。

(F) 組織浸潤に関わる遺伝子群

がんが組織浸潤するために、細胞外基質を分解する蛋白分解酵素群としてMatrix metalloproteases（以下MMP）遺伝子群が知られている。MMPファミリーには23個の遺伝子が知られているが、その中でもMMP-2, MMP-9はがん細胞での発現が高く、腫瘍の浸潤・転移に関わっていると推測されている。MMPのがん組織での高発現は、予後不良患者、進行がんの患者で見られ、転移の危険性が高いとの報告がある⁵²⁾。MMPが患者の予後に影響を与える分子であるため、免疫療法の標的分子として大変魅力的であると思われる。しかし、MMPは正常組織でも発現し免疫寛容が誘導されていることが予想されるため、免疫療法に応用するためには工夫が必要である。MMP-2がHLA-A2拘束性にCTLの標的となることが報告されているが、この報告で同定された抗原ペプチドは $\alpha v \beta 3$ 陽性細胞にcross presentationされることによって初めてCTLに認識される⁵³⁾。全身に発現する自己抗原分子でありながら、腫瘍特異的に反応する機序が解明された貴重な報告である。

(G) 幹細胞性に関わる遺伝子群

近年、がんにも正常組織で見られるような自己複製能・多分化能を有する少数の幹細胞を頂点としたヒエラルキーが存在することが証明されてきている。白血病で研究が先行しているが、固形腫瘍でも盛んに研究が行われている。がん幹細胞（Cancer initiating cells/Tumor initiating cells：以下CIC）は、自己複製能・多分化能を持ち、腫瘍形成能が高いと想定される。CICはがん細胞全体の数%以下であるが、腫瘍の形成・維持に必須であり、がんの再発・転移にも関していると考えられている。CICを標的とした治療はがん克服のために重要と考えられるが、従来の化学療法や放射線療法に抵抗性であることが知られている。CICに対する免疫療法に関しては未だ解明されておらず、標的となり得るかについての解析は大変興味深い。

SRY (sex determining region Y)-box 2 (SOX2) は神経幹細胞の自己複製能を維持するのに必要な遺伝子として同定され、SOX2・Oct-3/4・c-Myc・Klf4を線維芽細胞に遺伝子導入することによりiPS細胞を作成できる⁵⁴⁾。このことはSOX2遺伝子が幹細胞の形質発現に非常に重要な役割を果たしていると考えられる。このSOX2はすでに神経系腫瘍関連抗原としてHLA拘束性抗原ペプチドが同定されている⁵⁵⁾。我々は肺癌からのCICの抗原分子候補としてSOX2を同定し、HLA-A24拘束性抗原ペプチドを同定している(データ未発表)。SOX2はCICを傷害する免疫療法の標的として有望であるが、正常幹細胞に発現していて生体内では免疫寛容を受けている可能性や正常幹細胞を障害することから予測不能な副作用が出る可能性がある。このことから、正常幹細胞には発現していないが幹細胞性維持に必要な遺伝子を同定・標的にしたり、SOX2などの幹細胞性を司る遺伝子の上位で制御するような分子でしかも癌細胞のみに発現している遺伝子を同定・標的にするなど工夫が必要と考えられる。

また、前述したCep55/c10orf3は大腸癌細胞株においてCICにも発現し、同定したHLA-A24拘束性ペプチドを認識するCTLは非CICと同様に、CICも傷害することを拮んでいる(現在投稿中)。

3 結語

がん免疫療法の標的抗原について、機能的側面に基づいたカテゴリーに分類して概説した。個々に列挙した各々に分類される分子は、紙面に限りがあるため、ごく一部しか紹介していない。この機能的側面に即した分類は、がんの生物学的側面を理解する上で有用であるばかりでなく、他の治療法を併用する場合において有用であると考えられる。

化学療法や放射線療法などの既存の治療法は、副作用が強い割には、固形腫瘍では生存率・QOLなどの飛躍的な改善といった大きな成果が得られていないのが現状である。免疫療法はこれらの治療に比べると副作用も比較的弱く、がん細胞にとって「致命的」で「直接的」な作用を期待できる抗原分子をデザインすることも可能である。度重なる化学療法や放射線療法により宿主の免疫能力が低下してしまう前に、これらの既存の治療と相補的な関係で治療デザインすることも可能である。ただ、現状では既存の治療を凌駕する成績は残念ながら得られていない。より効果的な免疫療法が開発できれば、既存の治療とともにスタンダードながん治療として確立されることが考えられる。

文 献

- 1) Hirohashi Y, Torigoe T, Inoda S, *et al.*, *Cancer Sci* (100): 798-806, 2009
- 2) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, *et al.*, *Science* (254): 1643-47, 1991
- 3) <http://rctportal.niph.go.jp>
- 4) Sahin U, Tureci O, Schmitt H, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (92): 11810-13, 1995
- 5) Kawakami Y, Fujita T, Matsuzaki Y, *et al.*, *Cancer Sci* (95): 784-91, 2004
- 6) Van den Eynde BJ, van der Bruggen P., *Curr Opin Immunol.* (9): 684-93, 1997
- 7) Houghton AN, Gold JS, Blachere NE, *Curr Opin Immunol* (13): 134-40, 2001
- 8) Van der Bruggen P, Zhang Y, Chaux P, *et al.*, *Immunol Rev* (188): 51-64, 2002
- 9) <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>
- 10) Hanahan D, Weinberg RA, *Cell* (100): 57-70, 2000
- 11) Eccles SA. *J Mammary Gland Bio Neoplasia* (6): 393-406, 2001
- 12) Lurje G, Lenz HJ: *Oncology* (77): 400-10, 2009
- 13) Fick B, Blevins TL, Wharton JT *et al.*, *J Exp Med* (181): 2109-17, 1995
- 14) Kawashima I, Hudon SJ, Tsai V *et al.*, *Hum Immunol* (59): 1-14, 1998
- 15) Scadino A, Alves P, Gross DA *et al.*, *Eur J Immunol* (31): 3261-70, 2001
- 16) Scadino A, Gross DA, Alves P *et al.*, *J Immunol* (168): 5900-6, 2002
- 17) Brossart P, Stuhler G, Flad T *et al.*, *Cancer Res* (58): 732-6, 1998
- 18) Rongcun Y, Salazar-Onfray F Charo J *et al.*, *J Immunol* (163): 1037-44, 1999
- 19) Kawashima I, Rsai V, Southwood S *et al.*, *Cancer Res* (59): 431-5, 1999
- 20) Okugawa T, Ikuta Y, Takahashi Y *et al.*, *Eur J Immunol* (30): 3338-40, 2004
- 21) Hunter T, Pines J., *Cell* (61): 1071-4, 1991
- 22) Kondo E, Maecker B, Weihrauch MR *et al.*, *Clin Cancer Res* (14): 6574-79, 2008
- 23) Fabbro M, Zhou BB, Takahashi M *et al.*, *Dev Cell* (9): 477-88, 2005
- 24) Sakai M, Shimokawa T, Kobayashi T *et al.*, *Oncogene* (25): 480-6, 2006
- 25) Inoda S, Hirohashi Y, Torigoe T *et al.*, *J Immunother* (32): 474-85, 2009
- 26) Momand J, Jung D, Wilczynski S *et al.*, *Nucleic Acids Res* (26): 3453-9, 1998
- 27) Asai T, Storkus WJ, Mueller-Berghaus J *et al.*, *Cancer Immun* (2): 3, 2002
- 28) Stanislawski T, Voss RH, Lotz C *et al.*, *Nat Immunol* (2): 962-70, 2002
- 29) Ramirez F, Ghani Y, Stauss H, *Int Immunol* (16): 327-34, 2004
- 30) Findley H.W, Gu L, Yeager A.M, Zhou M. *Blood* (89): 2986-93, 1997
- 31) Salvesen G.S, Duckett C.S., *Nature Rev Mol Cell Biol* (3): 401-10, 2002
- 32) Andersen MH, Svane IM, Kvistborg P *et al.*, *Blood* (105): 728-34, 2005
- 33) Andersen MH, Reker S, Kvistborg P *et al.*, *J Immunol* (175): 2709-14, 2005
- 34) Altieri DC, *Nat Rev Cancer* (3): 46-54, 2003
- 35) Reker S, Meier A, Holten-Andersen L *et al.*, *Cancer Biol Ther* (3): 173-9, 2004
- 36) Schmitz M, Diestelkoetter P, Weigle B *et al.*, *Cancer Res* (60): 4845-9, 2000
- 37) Andersen MH, Pedersen LO, Capeller B *et al.*, *Cancer Res* (61): 5964-8, 2001
- 38) Andersen MH, Soerensen RB, Becker JC *et al.*, *J Transl Med* (4): 38, 2006
- 39) Kobayashi J, Torigoe T, Hirohashi Y *et al.*, *J Transl Med* (7):1, 2009

- 40) Reker S, Becker JC, Svane IM *et al.*, *Int J Cancer* (108): 937-41, 2004
- 41) Hirohashi Y, Torigoe T, Maeda A *et al.*, *Clin Cancer Res* (8): 1731-9, 2002
- 42) Stewart SA, Weinberg RA, *Annu Rev Cell Dev Biol* (22): 531-57, 2006
- 43) Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM, *Immunity* (10): 673-9, 1999
- 44) Hernandez J, Garcia-Pons F, Lone YC *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* (99): 12275-80, 2002
- 45) Minev B, Hipp J, Firat H *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (97): 4796-801, 2000
- 46) Vonderheide RH, Anderson KS, Hahn WC *et al.*, *Clin Cancer Res* (7): 3343-8, 2001
- 47) Arai J, Yasukawa M, Ohminami H *et al.*, *Blood* (97): 2903-7, 2001
- 48) Adotevi O, Mollier K, Neuveut C *et al.*, *Clin Cancer Res* (12): 3158-67, 2006
- 49) Weinzierl AO, Maurer D, Altenberend F *et al.*, *Cancer Res* (68): 2447-54, 2008
- 50) Wada S, Tsunoda T, Baba T *et al.*, *Cancer Res* (65): 4939-46, 2005
- 51) Ishizaki H, Tsunoda T, Wada S *et al.*, *Clin Cancer Res* (12): 5841-9, 2006
- 52) Deryugina EI, Quigley JP: *Cancer Metastasis Rev* (25): 9-34, 2006
- 53) Godefroy E, Moreau-Aubry A, Diez E *et al.*, *J Exp Med* (202): 61-72, 2005
- 54) Takahashi K, Yamanaka S, *Cell* (126): 663-76, 2006
- 55) Schmitz M, Temme A, Senner V *et al.*, *Br J Cancer* (96): 1293-301, 2007

Side population cells have the characteristics of cancer stem-like cells/cancer-initiating cells in bone sarcomas

M Murase^{1,2,5}, M Kano^{1,2,5}, T Tsukahara^{*,1,2}, A Takahashi³, T Torigoe^{2,3}, S Kawaguchi¹, S Kimura¹, T Wada¹, Y Uchihashi⁴, T Kondo⁴, T Yamashita¹ and N Sato²

¹Department of Orthopaedic Surgery, Sapporo Medical University School of Medicine, South-1, West-16, Chuo-ku, Sapporo 060-8543, Japan; ²Department of Pathology, Sapporo Medical University School of Medicine, South-1, West-17, Chuo-ku, Sapporo 060-8556, Japan; ³Cancer Vaccine Laboratory, Japan Science and Technology Corporation, North-19, West-11, Kita-ku, Sapporo 060-0819, Japan; ⁴Team for Cell Lineage Modulation, RIKEN Center for Developmental Biology, 2-2-3, Minatogima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe 650-0047, Japan

BACKGROUND: Several human cancers have been found to contain cancer stem-like cells (CSCs) having cancer-initiating ability. However, only a few reports have shown the existence of CSCs in bone and soft tissue sarcomas. In this study, we identified and characterised side population (SP) cells that showed drug-resistant features in human bone sarcoma cell lines.

METHODS: In seven osteosarcoma cell lines (OS2000, KIKU, NY, Huo9, HOS, U2OS and Saos2) and in one bone malignant fibrous histiocytoma (MFH) cell line (MFH2003), the frequency of SP cells was analysed. Tumourigenicity of SP cells was assessed *in vitro* and *in vivo*. Gene profiles of SP cells and other populations (main population; MP) of cells were characterised using cDNA microarrays.

RESULTS: SP cells were found in NY (0.31%) and MFH2003 (5.28%). SP cells of MFH2003 formed spherical colonies and re-populated into SP and MP cells. In an NOD/SCID mice xenograft model, 1×10^3 sorted SP cell-induced tumourigenesis. cDNA microarray analysis showed that 23 genes were upregulated in SP cells.

CONCLUSIONS: We showed that SP cells existed in bone sarcoma cell lines. SP cells of MFH2003 had cancer-initiating ability *in vitro* and *in vivo*. The gene profiles of SP cells could serve as candidate markers for CSCs in bone sarcomas.

British Journal of Cancer (2009) 101, 1425–1432. doi:10.1038/sj.bjc.6605330 www.bjancer.com

Published online 29 September 2009

© 2009 Cancer Research UK

Keywords: cancer stem-like cell; cancer-initiating cell; osteosarcoma; bone malignant fibrous histiocytoma; side population

Over the past three decades, there have been remarkable advances in the treatment of bone and soft tissue sarcomas. These include the introduction of adjuvant chemotherapy, establishment of guidelines for adequate surgical margins and the development of post-excision reconstruction (Fletcher *et al*, 2002; Lewis, 2007). However, the prognosis of non-responders to chemotherapy is still poor and the mechanisms of tumourigenesis of bone and soft tissue sarcomas remain to be demonstrated.

Generally, cancer masses are considered to be a complex of heterogeneous but equally malignant cell populations. However, recent stem cell research on the development of normal organs has drawn attention to the existence of a 'cancer stem-like cell (CSC)' counterpart, which is characterised by its self-renewal capacity, differentiation potential, and cancer-initiating ability (Visvader and Lindeman, 2008). On the basis of these characteristics, CSCs have been postulated to be responsible for driving the growth of tumours and for the recurrence of neoplasms after current therapeutic modalities are used.

Initial attempts to characterise CSCs were accomplished using cell surface molecules in acute myeloid leukaemia. Several groups that found CSCs capable of initiating leukaemia were found in the CD34⁺CD38⁻ fraction (Warner *et al*, 2004). Recently, CSCs have been isolated from several human solid tumours that have markers for putative normal stem cells, including breast cancer (CD44⁺CD24⁻ESA⁺) (Al-Hajj *et al*, 2003), pancreatic cancer (CD44⁺CD24⁻ESA⁺, CD133⁺CXCR4⁺) (Hermann *et al*, 2007; Li *et al*, 2007), brain cancer (CD133⁺) (Singh *et al*, 2004), prostate cancer (CD44⁺ $\alpha_2\beta_1^{\text{hi}}$ /CD133⁺) (Collins *et al*, 2005), hepatocellular carcinoma (CD133⁺) (Yin *et al*, 2007) and colon cancer (CD133⁺) (Ricci-Vitiani *et al*, 2007).

On the other hand, in the analysis of haematopoietic stem cells, a sub-population that effluxes the DNA-binding dye Hoechst 33342 out of the cell membrane through an ATP-binding cassette (ABC) transporter was recognised as a stem cell population (Goodell *et al*, 1996; Zhou *et al*, 2002; Robinson *et al*, 2005). This cell population expressing the ABC transporter was defined as side population (SP) cells, which were distinguished from cells of the other population (main population; MP). Recent studies demonstrated that SP cells could be characterised as CSCs in primary tissues of gastrointestinal cancers (Haraguchi *et al*, 2006) and ovarian cancer (Szotek *et al*, 2006). SP cells were also shown in established tumour cell lines with different origins, such as glioma (Kondo *et al*, 2004), breast (Kruger *et al*, 2006) and thyroid cancer monoclonal cell lines (Mitsutake *et al*, 2007).

*Correspondence: Dr T Tsukahara, Department of Pathology, Sapporo Medical University School of Medicine, South-1, West-17, Chuo-ku, Sapporo 060-8556, Japan; E-mail: tsukahara@sapmed.ac.jp

⁵ These authors contributed equally to this work.

Received 17 March 2009; revised 16 June 2009; accepted 21 August 2009; published online 29 September 2009

To date, however, distinct molecular markers on CSCs are still lacking in many cancers. Moreover, only a few reports have shown the existence of CSCs in bone and soft tissue sarcomas (Gibbs *et al*, 2005; Wu *et al*, 2007; Tirino *et al*, 2008). In this study, with the goal of determining specific markers of CSCs, we identified and characterised SP cells having cancer-initiating ability in osteosarcoma and bone malignant fibrous histiocytoma cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and culture

Seven human osteosarcoma (OS) cell lines (OS2000, KIKU, NY, Huo9, HOS, U-2OS and Saos2) and one bone human malignant fibrous histiocytoma (MFH) cell line (MFH2003) were used. OS2000, KIKU and MFH2003 were established in our laboratory (Wada *et al*, 1988; Nabeta *et al*, 2003; Tsukahara *et al*, 2006). The other cell lines were kindly donated by or purchased from the Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (Tokyo, Japan) and from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). MFH2003 and OS2000 were cultured with Iscove's modified Dulbecco's Eagle's medium (IMDM; GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) containing 10% FBS and the others were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) containing 10% FBS in a 5% CO₂ incubator at 37°C.

Identification of side population

Cell suspensions were labelled with dye Hoechst 33342 (Cambrex Bio Science Walkersville Inc., MD, USA) using the methods described by Goodell *et al* (1996) with some modifications. Briefly, cells were trypsinised and re-suspended in pre-warmed DMEM supplemented with 5% FBS at a concentration of $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Hoechst33342 dye was added at a final concentration of 2.5 or $5.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ in the presence or absence of verapamil (50 or $75 \mu\text{M}$; Sigma-Aldrich) as an inhibitor of the ABC transporter. The cells were incubated at 37°C for 90 min with continuous shaking. At the end of the incubation, the cells were washed with ice-cold PBS with 5% FBS, centrifuged at 4°C and resuspended in ice-cold PBS containing 5% FBS. Propidium iodide (at a final concentration of $1 \mu\text{g ml}^{-1}$; Molecular Probes - Invitrogen, Eugene, OR, USA) was used to gate viable cells. Flow cytometry and cell sorting were performed using FACSVantage SE (BD Biosciences, Bedford, MA, USA), EPICS ALTRA (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA) and FACS Aria II (BD Biosciences). The Hoechst 33342 dye was excited at 357 nm and its fluorescence was analysed using dual wavelengths (blue, 402–446 nm; red, 650–670 nm).

RNA preparation

Total RNAs were extracted from SP cells and MP cells using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Using an Amino Allyl MessageAmp aRNA Kit Ver. 2 (Sigma-Aldrich Japan, Ishikari, Japan), amino allyl-modified aRNAs were prepared from total RNAs from SP and MP cells as previously described (Takeuchi *et al*, 2008).

Real-time PCR analysis

Total RNA was reverse transcribed using the SuperScriptIII reverse transcriptase enzyme (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed with SYBR Green Real-time Core Reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions on an ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Primers were designed to generate a PCR product of <200 bp. The thermal cycling conditions were 94°C for 2 min, followed by 35 cycles of

15 s at 94°C, 30 s at 60°C and 30 s at 72°C. Levels of expression were normalised to the *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (G3PDH) housekeeping gene.

Spherical colony formation assay

Spherical colony formation assay was performed as described by Gibbs *et al* (2005) with some modifications. Briefly, cells were plated at 2000 cells per well in six-well ultra-low attachment plates (Corning Inc., Corning, NY, USA). Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM) and MSCBM SingleQuots (Takara Bio Inc., Ohtsu, Japan) were used for cell culture. Fresh aliquots of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor were added every other day. On day 14, the numbers of colonies were counted.

Xenograft model

Sorted SP and MP cells of MFH2003 were collected and re-suspended at 1×10^2 – 1×10^5 cells per $50 \mu\text{l}$ of PBS, followed by addition of $50 \mu\text{l}$ of Matrigel (BD Biosciences). This cell-Matrigel suspension was subcutaneously injected into the backs of 4- to 6-week-old non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mice (NOD.CB17-Prdck^{scid}/J, Charles River Laboratory, Yokohama, Japan) under anaesthesia. Mice were observed for up to 12 weeks.

Gene expression profiling using cDNA microarrays

The aRNAs from SP cells were labelled with Cy5 dye and those from MP cells were labelled with Cy3 dye. The dye-labelled aRNA samples were hybridised to a 29 138-spot Human Panorama Micro Array (Sigma-Aldrich) for 16 h at 45°C. The intensities of Cy5 and Cy3 fluorescence for every gene spot on the hybridised array were measured with a GenePix 4000B scanner (Axon Instrument, Austin, TX, USA), and were analysed with GenePix Pro 5.0 software (Axon Instrument). Global normalisation of the resultant data was carried out using Excel 2004 (Microsoft, Redmond, WA, USA). As a result, 24 730 genes were available for further analysis. The average expression ratio of Cy5 to Cy3 was obtained for each gene. A dye-swap experiment (labelling SP and MP cells with Cy3 and Cy5, respectively) was also performed. An average ratio of more than 2.0, reproducible in two experiments, was determined to indicate differential upregulation in SP cells.

RESULTS

Identification of SP cells in human bone sarcoma cell lines

To identify the CSCs of bone sarcomas, we tried to detect side population (SP) cells in bone and soft tissue sarcoma cell lines. As depicted in Figure 1A, the NY and MFH2003 cell lines included 0.38 and 5.28% SP cells, respectively. In each case, the percentage of SP cells was markedly diminished by treatment with verapamil, which is an inhibitor of the pumps responsible for the exclusion of Hoechst dye, indicating that this population truly represented SP cells. SP cells were hardly detected in the other cell lines (Figure 1B). Therefore, MFH2003, containing the highest proportion of SP cells, was selected and further analysed.

Isolation of SP cells and their repopulation as both SP and MP cells

After excluding dead cells and cellular debris on the basis of scatter signals and propidium iodide fluorescence, MFH2003 cells were sorted into SP and MP cells. As shown in Figure 2A, the G1 gate showed the SP cells that had negative/low patterns of staining with Hoechst 33342, and the G2 gate showed the main population cells that were positively stained with Hoechst 33342. To ascertain the

purity of sorted cells, the obtained SP (G1) cells and MP (G2) cells were re-analysed. The purity levels were 92.86 and 90.78% in the SP population and MP population, respectively. These results supported the specificity for further analysis using the resultant SP and MP cells.

To examine whether SP cells could generate both SP and MP cells, sorted SP and MP cells were further cultured *in vitro*. On day 14, the cells were re-stained with Hoechst 33342 and analysed by flow cytometry. We observed that SP cells re-populated both SP and MP cells. The ratio of SP cells to MP cells was still much higher than that before sorting. In contrast, SP cells were not detected in sorted MP cells.

Expression of *ABCG2* mRNA, which is a marker of SP cells, was increased in SP cells (Figure 2B). These results also supported the specificity for further characterisation of SP cells, especially with regard to their cancer-initiating ability.

Spherical colony formation

We next evaluated the ability of SP and MP cells to generate spherical colonies. A total of 2000 SP and MP cells were sorted and cultured immediately under conditions of serum starvation, providing an anchorage-independent environment. On day 14, SP cells showed spherical colony formation (Figure 3A). On the

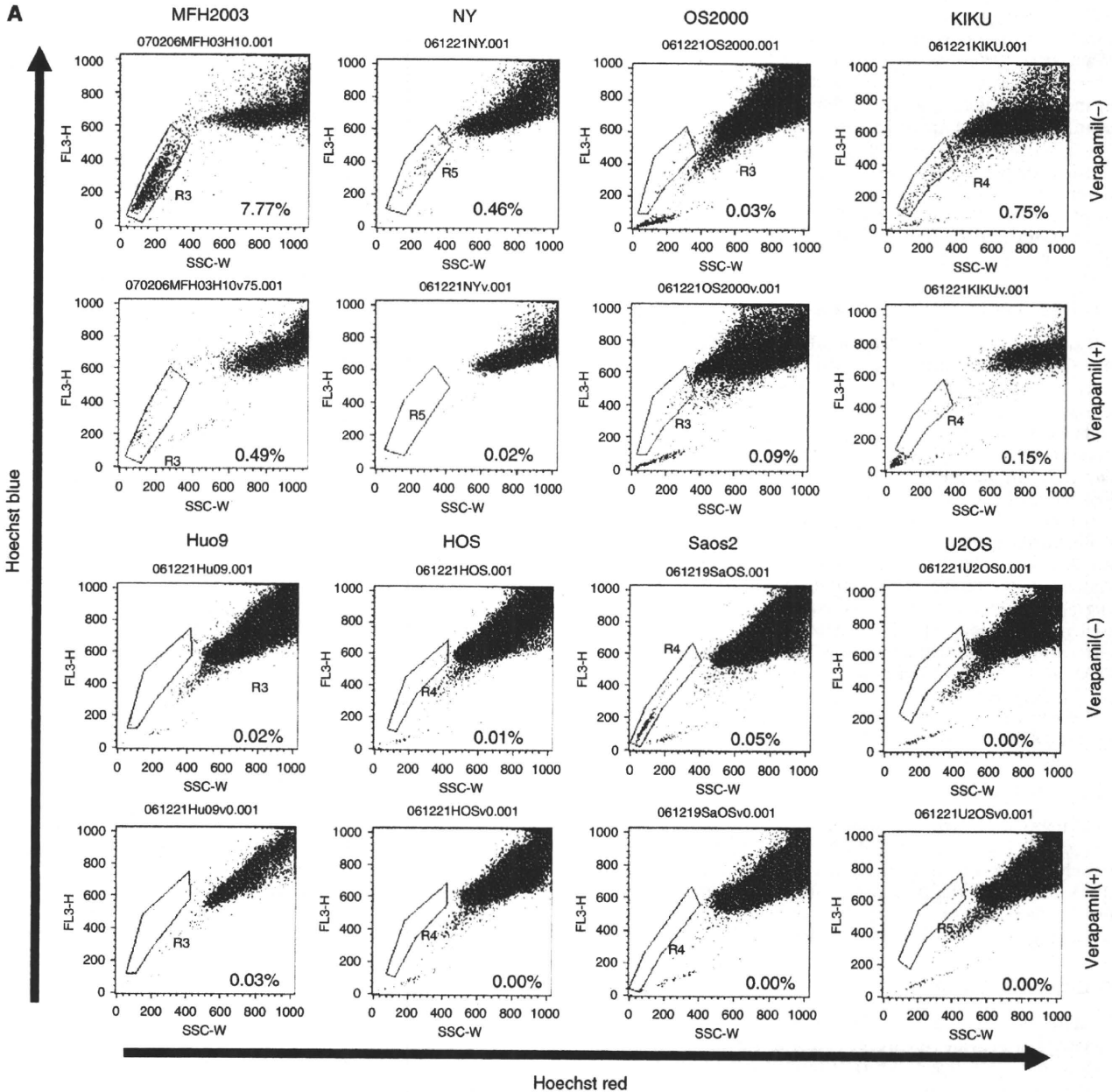


Figure 1 Detection of side population cells in bone sarcoma cell lines. (A) The populations of SP cells of seven osteosarcoma cell lines (NY, OS2000, KIKU, Huo9, HOS, Saos2 and U2OS) and of one bone MFH cell line (MFH2003), in the presence or absence of verapamil, are shown. SP cells are marked by black dotted lines to show the proportion of SP cells among total living cells. (B) The mean proportions of SP cells in cell lines. These results were reproducible in at least two independent experiments.

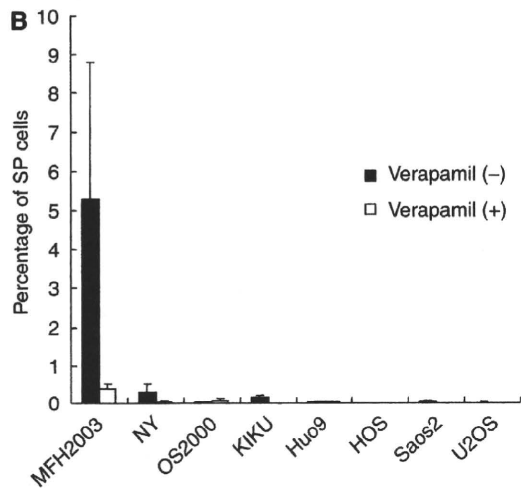


Figure 1 Continued.

other hand, as shown in Figure 3B, most MP cells died and the others formed a few small colonies. We removed spherical colonies from the suspension culture and attempted again to determine whether the cells could attach to a substratum. As shown in Figure 3C, cells were seen expanding from the sphere. In Figure 3D, the number of colonies is shown, indicating clearly that, among MFH2003 cells, SP, but not MP, cells had the potential for spherical colony formation.

Cancer-initiating ability of SP and MP cells *in vivo*

To address the issue of whether tumorigenic activity differed between SP and MP cells, $1 \times 10^2 - 1 \times 10^5$ SP and MP cells sorted from MFH2003 were injected into NOD/SCID mice (Figure 4A). To rule out the effects of the toxicity of Hoechst, we routinely performed (i) depletion of dead cells by PI staining and (ii) a viability check using trypan-blue staining after cell sorting. Almost all MP cells were viable as SP cells. Subcutaneous tumour formation was induced by the injection of 1×10^3 SP cells (Table 1). We also observed that 1×10^4 SP cells formed a larger tumour mass than did 1×10^3 SP cells (data not shown). In contrast, at least 1×10^5 MP cells were required to give rise to a tumour. Macroscopic and microscopic findings of a tumour derived from SP cells are shown in Figure 4A and B. These results supported the hypothesis that SP cells have a high cancer-initiating ability, similar to CSCs. At 8 weeks after xenotransplantation, the frequencies of SP and MP cells in a formed tumour derived from 1×10^4 SP cells were analysed *ex vivo*. SP cells were hardly detected in the tumour. Most SP cells re-populated into MP cells *in vivo* in 8 weeks (data not shown).

Identification of upregulated genes in SP cells

Finally, we performed gene expression profiling of SP cells using cDNA microarrays. As shown in Table 2, 23 genes were found to be upregulated in SP cells, compared with MP cells. Although the functions of upregulated genes varied, these results suggested that the factors connected to DNA transcription, transport of substrates, cell proliferation and apoptosis might have a role in the cancer-initiating ability of SP cells. In addition, the increased expression of *ABCG2* in SP cells confirmed the accuracy of the gene expression profiling analysis.

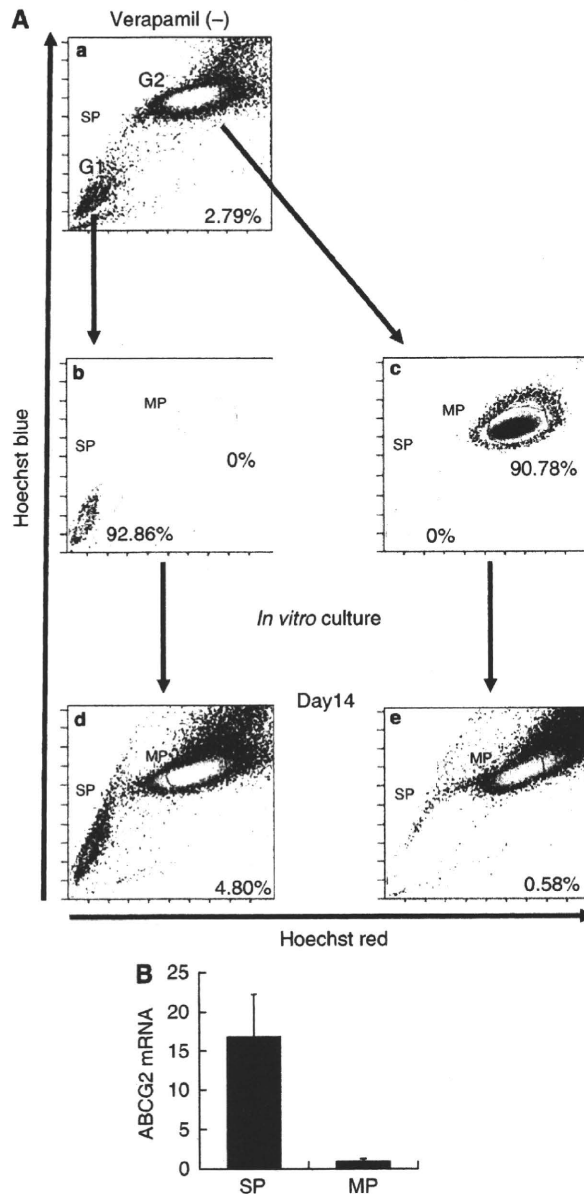


Figure 2 The re-population of SP cells into both SP and MP cells. (A) The populations of SP cells and MP cells before cell sorting are shown. SP cells were gated as G1, and MP cells were gated as G2. (b, c) The proportions of SP cells among the total living cells are indicated. Isolated SP cells (b) and MP cells (c) after cell sorting. The proportions of SP and MP cells among the total living cells are indicated. (d, e) The populations of SP cells (d) and MP cells (e) after 2-week *in vitro* culture with medium containing 10% FBS are also shown. Experiments were repeated in triplicate with similar results. (B) The relative expression of *ABCG2* was evaluated in SP cells and MP cells by real-time PCR.

DISCUSSION

In this study, we showed that (i) small SP populations existed in one osteosarcoma cell line and one bone MFH cell line; (ii) SP cells derived from MFH2003 could re-populate both SP and MP cells *in vitro*; (iii) SP cells could form spherical colonies and re-populate into SP and MP cells; (iv) SP cells had tumorigenesis in an *in vivo* xenograft model; and (v) factors regarding transcription, cell proliferation and apoptosis were upregulated in SP cells.

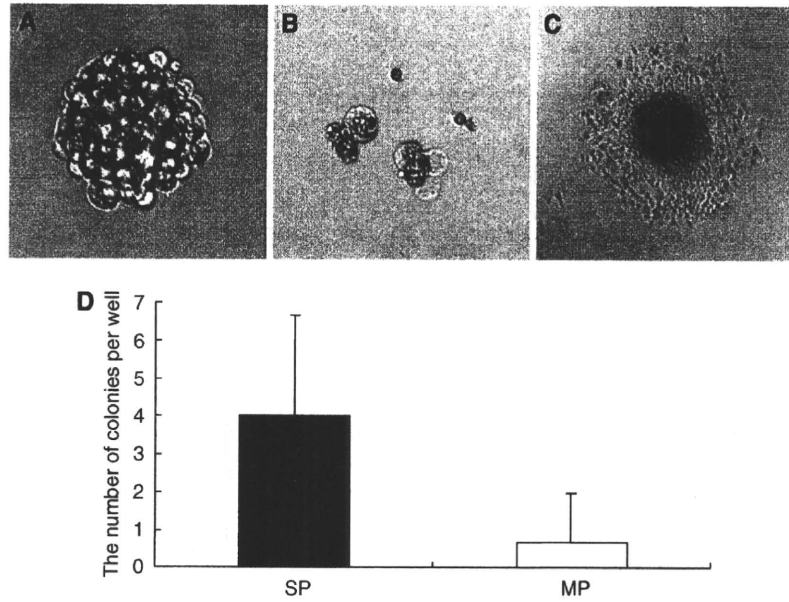


Figure 3 Tumorigenesis of SP and MP cells *in vitro*. (A and B) The features of spherical colonies derived from resultant SP cells (A) and MP cells (B) cultured without serum in an anchorage-independent manner for 2 weeks. (C) Spherical colony removed from the suspension culture and allowed to attach to a substratum. Adherent cells can be seen expanding from the sphere. (D) The numbers of resultant spherical colonies from SP cells and MP cells were counted. Data are representative of three independent experiments.

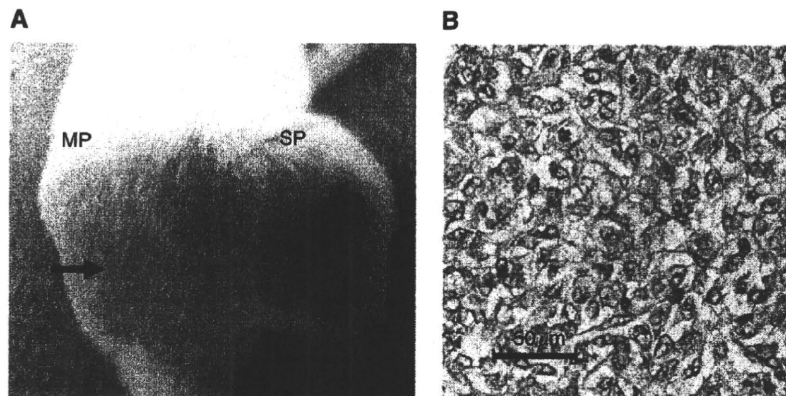


Figure 4 The features of xenotransplanted SP cells *in vivo*. (A) Macroscopic features of 1×10^3 each of SP and MP cells in an NOD/SCID mouse at 12 weeks after xenotransplantation. Black arrow indicates the site of injection of MP cells. (B) Histological findings of the xenotransplanted tumour derived from SP cells (1×10^4). Haematoxylin and eosin staining (original magnification: $\times 200$) is shown.

Table 1 Tumorigenesis of SP and MP cells in NOD/SCID mice

	Cell number for injection			
	1×10^2	1×10^3	1×10^4	1×10^5
MFH2003				
SP cells	0/5	1/5	2/5	1/2
MP cells	0/5	0/5	0/5	1/2

SP and MP cells were isolated separately and injected into the backs of the subcutaneous space of NOD/SCID mice. Tumour formation was observed for 12 weeks after injection.

We observed proportions of SP cells of 0.31 and 5.28% in NY and MFH2003, respectively. The proportions of SP cells we observed were similar to those in most previous reports, with

2% noted in human breast cancer cell line MCF7, 0.4% in rat C6 glioma, 1.2% in human HeLa carcinoma (Kondo *et al*, 2004) and 4–37% in neuroblastoma cell lines (Hirschmann-Jax *et al*, 2004).

The SP cells were defined by the efflux of Hoechst 33342, a cell-permeable DNA-specific bisbenzimidazole dye, through an ABC transporter. Therefore, SP cells are considered to be resistant to multi-chemotherapeutic drugs and to confer malignant phenotypes to tumours (Dean *et al*, 2005). Hence, the characterisation of SP cells might be a useful tool for analysis of CSCs, especially when specific CSC surface markers are unknown.

We found that SP cells could re-populate both SP cells and MP cells *in vitro*. These results suggested that SP cells were capable of self-renewal and also generated MP cells by asymmetric division. This indicated that a tumour hierarchy might exist in bone MFH. Previous studies have also shown that SP cells can divide asymmetrically and display a capacity for self-renewal similar to

Table 2 List of genes upregulated in SP cells of MFH2003

Gene symbol	Gene name	Accession no.	Gene ontology	Expression ratio (SP/MP)	
				Cy5/Cy3	Cy3/Cy5
ANKRD11	Ankyrin repeat domain 11	NM_013275	Electron transport	2.1	2.7
SLC2A4	Solute carrier family 2, member 4	NM_001042	Carbohydrate transport	2.2	2.5
KIAA1440	KIAA1440	AB037861	Unknown	2.2	3.3
SURF6	Surfeit 6	NM_006753	Ribosome biogenesis	2.3	2.8
VPF	Vascular permeability factor	M27281	Cell proliferation	3.0	3.5
C20orf14	Chromosome 20 open reading frame 14	NM_012469	RNA processing	2.1	3.6
PHLDA3	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 3	NM_012396	Physiological processes	2.1	2.4
ZNF19	Zinc finger protein 19	NM_152907	Regulation of transcription	2.8	2.4
MCL1	Myeloid cell leukaemia sequence 1	NM_021960	Apoptosis	2.1	3.9
APOE	Apolipoprotein E	NM_000041	Lipid transport	2.1	3.8
NR4A2	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	NM_006186	Regulation of transcription	2.5	4.1
IRX3	Iroquois-related homeobox 3	BC023667	Regulation of transcription	3.3	2.9
GNB3	Guanine nucleotide-binding protein, β -polypeptide 3	NM_002075	G-protein coupled receptor protein signaling	2.1	5.0
NLRP12	NLR family, pyrin domain containing 12	NM_144687	Apoptosis	2.1	2.3
PTN	Pleiotrophin	NM_002825	Neurogenesis	2.0	2.6
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G, member 2	NM_004827	Transport	2.2	2.9
APOLI	Apolipoprotein L	NM_145343	Lipid transport	2.2	2.6
MDFI	MyoD family inhibitor	NM_005586	Unknown	2.8	3.1
PRSS15	Protease, serine, 15	NM_004793	ATP-dependent proteolysis	2.1	2.5
MSX1	Msh homeo box homolog 1	NM_002448	Regulation of transcription	2.1	2.8
LDLR	Low density lipoprotein receptor	NM_000527	Cholesterol metabolism	2.1	3.1
LMNA	Lamin A/C	NM_170707	Cellular morphogenesis	2.1	2.9
MVK	Mevalonate kinase	BC016140	Cholesterol biosynthesis	2.2	2.1

Genes showing the ratio more than 2.0, which were reproducible in two experiments, were listed.

normal stem cells (Kondo *et al*, 2004; Singh *et al*, 2004). On the other hand, we also observed that most SP cells xenotransplanted in NOD/SCID mice re-populated into MP cells *in vivo*. SP cells might hardly be maintained *in vivo* for long time, that is, more than 8 weeks. In other words, the niche of the mouse model might not be adequate for the maintenance of SP cells derived from bone sarcoma cell lines, such as MFH2003.

The ability of SP cells to generate spherical colonies was higher than that of MP cells. This is consistent with previous studies (Patrawala *et al*, 2005; Mitsutake *et al*, 2007). We recognised that the difference was not a consequence of longer retention of Hoechst dye in MP cells, because MP cells were viable after staining with the dye, followed by sorting and maintenance in a culture medium with FBS. However, we cannot completely rule out the possibility that the difference was due to some effect of the Hoechst dye, which is potentially cytotoxic (Durand and Olive, 1982).

We could detect a higher tumorigenic potential of SP cells than of MP cells *in vivo* using a NOD/SCID xenograft model. In the field of bone and soft tissue sarcoma, only Wu *et al* (2007) succeeded in showing the *in vivo* cancer-initiating ability of CSCs derived from bone and soft tissue sarcomas, using SP cells isolated from fresh primary tumour tissues. The ability to consistently isolate MFH2003-derived SP cells allowed us to conduct SP cell-specific gene profiling. Moreover, it might become possible to identify CTL-defined CSC-specific tumour antigens for immunotherapy targeting CSCs. Thus far, we have been trying to identify CTL-defined tumour antigens by forward and reverse immunological approaches and have carried out antigenic peptide vaccination trials in bone and soft tissue sarcomas (Sato *et al*, 2002; Ida *et al*, 2004; Tsukahara *et al*, 2004, 2008a, b, 2009; Kawaguchi *et al*, 2005; Kimura *et al*, 2008). Currently, we are trying to establish autologous CTL clones recognising SP cells of MFH2003 from tumour-infiltrating lymphocytes.

Thus far, only Oct3/4, Nanog and CD133 were reported to be candidates for CSC-specific markers in bone and soft tissue sarcoma (Gibbs *et al*, 2005; Tirino *et al*, 2008). Therefore, the gene profile of SP cells might help to expand the possibility of an effective isolation of CSCs from bone and soft tissue sarcomas

using these specific markers. In the current gene expression profiling, 23 genes with various functions were upregulated in SP cells. Among them, eight genes (*VPF*, *c20orf14*, *MCL1*, *NR4A2*, *IRX3*, *NLRP12*, *PTN* and *LMNA*) might be considered to be potential tumorigenic factors in malignancies. *VPF*, generally known as vascular endothelial growth factor, regulates vascular permeability, angiogenesis, cell migration and apoptosis in tumours (Nagy *et al*, 2008). *C20orf14* is upregulated in lymphoma (Su *et al*, 2008) and HPV16/18-positive cervical cancer (Vazquez-Ortiz *et al*, 2007). *MCL1* is a member of the B-cell lymphoma (*BCL*) family. *MCL-1* negatively regulates pro-apoptotic factors (*Bak* and *Bax*) (Chen *et al*, 2007) and accelerates leukaemogenesis (Beverly and Varmus, 2009). *NR4A2* belongs to the steroid nuclear hormone receptor superfamily and has a role in cell transformation in cervical cancer (Ke *et al*, 2004). *IRX3* is epigenetically inactivated by methylation in CpG islands in brain tumours (Ordway *et al*, 2006) and prostate cancer (Morey *et al*, 2006). *NLRP12*, also known as *RNO2/monarch-1*, is reported to activate inflammation in humans (Ye *et al*, 2008). *PTN* is an angiogenic factor that stimulates tumour-associated vascular formation in many malignancies. (Perez-Pinera *et al*, 2008). *LMNA* is reported to encode lamin A, which is a putative colonic epithelial stem cell marker and is also a prognostic factor in colorectal cancer (Willis *et al*, 2008). On the other hand, four genes (*ANKRD11*, *PHLDA3*, *APOLI* and *MSX1*) are known as tumour-suppressor factors. *ANKRD11* is a p53-interacting protein and activates the transcription of p53 in breast cancer. *PHLDA3* is a positive regulator of Fas-dependent death signalling, related to cisplatin-mediated apoptosis (Kerley-Hamilton *et al*, 2005). *APOLI* is classically thought to be involved in lipid transport and metabolism and has rarely been characterised with regard to cell survival. Although the structure of *APOLI* is similar to that of the anti-apoptotic proteins of the *Bcl-2* family (Vanhollebeke and Pays, 2006), it can induce autophagic cell death (Wan *et al*, 2008). *MSX1*, a homeobox gene important for embryonic neural crest development, can induce the inhibition of tumour-initiating ability in soft agar *in vitro*. Taken together, the gene expression profiling in SP cells derived from MFH2003 containing various tumour-proliferative and tumour-suppressive factors might indicate the complexity of maintaining the