

平成 30 年 9 月 9 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04722

研究課題名(和文) がん幹細胞・精子形成機構の免疫制御基盤

研究課題名(英文) Immunological aspects of cancer stem cell and spermatogenesis

研究代表者

廣橋 良彦 (HIROHASHI, Yoshihiko)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30516901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、大腸がん、子宮頸がん、肺がん幹細胞を分離し、cDNA マイクロアレイ法を用いてがん幹細胞の遺伝子発現を検討した。その結果、造腫瘍能が高いがん幹細胞には、正常臓器では精巣にのみ発現する遺伝子群が発現することを見出した。OR7C1, BORIS, SMCP, DNAJB8 などである。重要な事に、これらの精巣関連分子は、がん幹細胞維持に極めて重要な機能を有する反面、免疫療法の標的となりうることを証明した。すなわち、これらの精巣関連分子を免疫療法にて標的することにより、がん幹細胞を治療できる可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we isolated highly tumorigenic cancer stem cells from human colon cancer, cervical cancer and lung cancer cells. We examined the expression profiles of cancer stem cells by cDNA microarray, and we found that numbers of testis-related genes are expressed in cancer stem cells. Those are OR7C1, BORIS, SMCP and DNAJB8. Importantly, gene specific knockdown using siRNAs revealed that testis-related genes have important role in the maintenance of cancer stem cells. And we also identified testis-related gene products can be targeted by immunotherapy. These results indicate that immunotherapy targeting testis-related gene products is a promising approach to target cancer stem cells.

研究分野：実験病理

キーワード：がん幹細胞 免疫療法 精巣抗原

1. 研究開始当初の背景

がんは heterogenous な細胞集団からなり、(1)高い造腫瘍能、(2)自己複製能、(3)多分化能を有するがん細胞亜集団は、がん幹細胞と呼ばれる。がん幹細胞は 休止期にある、トランスポーター分子の発現が高い、抗アポトーシス分子 (IAP) の発現が高い、活性酸素が低い等の分子メカニズムにより、化学療法や、放射線療法、あるいは分子標的治療などの、治療法に対して抵抗性を示す事が示されている。これらの性質を有する為、がん幹細胞は治療後の再発や、遠隔転移といったがん患者の予後を直接左右するイベントに関わる。がん幹細胞研究においては、「どのようにして治療に抵抗性を示すがん幹細胞を有効に排除するか」、が大きなテーマとなっている。

申請者らは、ヒト肺がんやヒト大腸がん細胞株から Hoechst33342 色素を用いて Side population (SP) 細胞として、あるいは、ALDEFUOR 法を用いてがん幹細胞の分離した (Inoda et al. Am J Pathol 2011, Nakatsugawa et al. Lab Invest 2011)。これらのがん幹細胞を用いて、主要組織適合分子 (MHC) 分子 (ヒトの場合は HLA 分子) および抗原分子の発現を調べた。また腫瘍抗原分子の一つである CEP55 由来 HLA-A24 拘束性ペプチドを認識する特異的 CTL (Inoda et al. J Immunother 2009, Inoda et al. Exp Mol Pathol 2011) を用いて検討した。

その結果

1、がん幹細胞は非がん幹細胞と同レベルの HLA 分子を発現する。

2、腫瘍抗原はがん幹細胞および非がん幹細胞との発現様式から 3 グループに分類出来る。

a、がん幹細胞抗原 (がん幹細胞にのみ発現する)

b、共通抗原 (がん幹細胞および非がん幹細胞に発現する)

c、非がん幹細胞抗原 (非がん幹細胞にのみ発現する)

3、がん幹細胞は非がん幹細胞と同じく CTL に感受性を示す。

ことを明らかとした (Inoda et al. Am J Pathol 2011, Hirohashi et al, Oncoimmunology 2012)。

2. 研究の目的

我々はこれまで、がん幹細胞特異的免疫療法を確立するため、がん幹細胞のトランスクリプトーム解析を行った。がん幹細胞特異的発現を示す候補分子に対する細胞障害性 T 細

胞 (CTL) 反応性を確認し、がん幹細胞抗原の発見を蓄積してきた。その結果がん幹細胞には多くのがん精巢抗原分子が発現することを発見した。がん精巢抗原とは、正常臓器には精巢にのみ発現が見られ、一方ではがん細胞では異所性に発現する分子群である。精巢は HLA クラス 1 分子発現が無い為、免疫特権臓器として知られ、がん精巢抗原は免疫原性が高い事が知られている。我々は、がん幹細胞に発現するがん精巢抗原は、がん幹細胞免疫療法において極めて有望な抗原分子群であると考えた。さらに、これらががん幹細胞に発現するがん精巢抗原をがん精巢抗原のサブカテゴリと位置づけ、「がん精巢幹細胞抗原」として提唱した。

本申請研究では、がん幹細胞特異的免疫制御の有望な標的候補分子群であるヒトがん精巢幹細胞抗原に対する免疫応答制御の基盤的・包括的解析を行い、がん幹細胞標的ペプチドワクチン療法臨床応用器具現化への第一歩とする。

3. 研究の方法

がん幹細胞のトランスクリプトーム解析 (新規がん精巢幹細胞抗原の同定)

がん幹細胞の分離法として、(1)CD44, CD133 等の細胞表面マーカーによる分離、(2)Side Population (SP) 法、(3)Aldefluor 法、(4)Sphere 培養法などが知られている。本研究において、(2)SP 法、(3)Aldefluor 法 (4) Sphere 培養法を用いて、ヒト大腸癌細胞株 (SW480, HT29, HCT15)、腎細胞癌株 (ACHN)、肺癌細胞株 (LHK2, SBC3, SBC5)、子宮頸癌株 (CaSKi, TC-S) よりがん幹細胞を分離した。cDNA マイクロアレイ法を用い、がん幹細胞のトランスクリプトーム解析を行った。

がん精巢幹細胞抗原の免疫制御解析 (CTL エピトープの同定、CTL クローンの樹立)

Olfactory receptor, family 7, subfamily C, member 1 (OR7C1) は、嗅神経受容体ファミリーに属し、がん幹細胞特異的発現を示すと同時に、正常臓器では精巢にのみ発現を示した。本結果から、OR7C1 が CTL の標的になりうる考え、HLA-A24 結合モチーフを有する候補ペプチドを 5 個デザインし、CTL 誘導を試みた。

子宮頸がん細胞 (CaSKi, TC-S) 肺がん細胞 (SBC3, SBC5) から分離したがん幹細胞のトランスクリプトーム解析から、新規がん精巢抗原 Brother of Regulator of Imprinted Sites (BORIS) を同定した。BORIS は極めて複雑なバリエーションを有し、19 種類のタンパクコード mRNA が存在する。我々は、どのバリ

アントががん幹細胞に発現するか、バリエーション特異的プライマーを合成し発現を確認した。その結果、BORIS subfamily 6 (BORIS sf6) ががん幹細胞に発現することを見出した。そこで、BORIS sf6 は CTL の標的になると考え、BORIS sf6 特異的アミノ酸配列を検索した。

がん幹細胞検出試薬の開発 (免疫組織化学染色可能なモノクローナル抗体)

OR7C1 特異的モノクローナル抗体を作成する為 OR7C1 合成ペプチドをデザインし抗体作成を試みた。

がん患者免疫モニタリングシステムの構築 (テトラマー法、ELISPOT 法)

BORIS C34_24(9) ペプチド特異的テトラマーを合成し、BORIS C34_24(9) ペプチド特異的 CTL を標識可能であることを確認した。また、OR7C1_93(10)、BORIS C34_24(9) ペプチドを用いて ELISPOT 法にて CTL 検出可能であることを確認した。

がん精巣幹細胞抗原治療モデルマウスの作製 (CTL 移入療法モデルマウス)

OR7C1_93(10) 特異的 CTL クローンおよび BORIS C34_24(9) 特異的 CTL クローンを、がん幹細胞移植免疫不全マウスに移入し、抗がん作用を検討した。

がん精巣幹細胞抗原機能解析 (siRNA 法、ゲノム編集法、遺伝子過剰発現法)

OR7C1 および BORIS の 機能を検索する為、遺伝子過剰発現および siRNA によるノックダウンを実験を行い、OR7C1 および BORIS の分子機能を検討した。

4. 研究成果

がん幹細胞のトランスクリプトーム解析 (新規がん精巣幹細胞抗原の同定)

がん幹細胞のトランスクリプトーム解析の結果、がん幹細胞にはがん精巣抗原 (OR7C1, BORIS, DNAJB8)、ストレス耐性分子 (HSP27, MAPK13)、シアリル Tn 抗原産生酵素 (ST6GALNAC1) が発現することを確認した。(Oncotarget 2015, Oncotarget 2016, PLoS One 2016, Clin Cancer Res 2016, Oncotarget 2017 など)

これらのがん幹細胞特異分子の中で、がん精巣抗原は正常臓器では精巣にのみ発現を示したが、他の分子はがん特異性は低く、免疫療法の標的分子となる可能性は低いと考えた。

がん精巣幹細胞抗原の免疫制御解析 (CTL

エピトープの同定、CTL クローンの樹立)

OR7C1 にコードされ候補ペプチドを用いて CTL 誘導を試みた結果、OR7C1_93(10) および OR7C1_34(10) ペプチドにおいて、ペプチド特異的 CTL 反応を、HLA-A24 陽性健常ドナーおよび HLA-A24 陽性大腸がん患者から誘導する事を確認した。

OR7C1_93(10) ペプチド特異的 CTL クローンを限界希釈法にて樹立した。同 CTL クローンは、大腸がん (SW480, HT29, HCT15) から分離したがん幹細胞 (SP 細胞) を特異的に障害することを確認した。本結果は、大腸がんにおいて新規がん精巣抗原 OR7C1 は期待出来る。(Clin Cancer Res 2016)

BORIS sf6 特異的 CTL エピトープを検索した結果、HLA-A2 結合モチーフを有する配列を見出した (BORIS C34_24(9))。同ペプチドを用いて、CTL クローンを作成した。BORIS C34_24(9) ペプチド特異的 CTL クローンは、子宮頸がん幹細胞および肺がん幹細胞特異的細胞障害性を示す事を見出した。本結果は、BORIS sf6 特異的免疫療法が、子宮頸がんおよび肺がんに有効である可能性を示唆した (Oncotarget 2016, PLoS One 2017)。

がん幹細胞検出試薬の開発 (免疫組織化学染色可能なモノクローナル抗体)

ヒト大腸がん組織を用いて OR7C1 特異的ポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。その結果、OR7C1 発現が高い大腸がん症例では、有意に OS が悪い事が判明した。すなわち、OR7C1 は大腸がんにおける予後予測マーカーになる事が示唆される。

OR7C1 合成ペプチドを用いて免疫したマウスは、ELISA 法にて OR7C1 特異的反応を示した。さらに、同免疫マウスから作成したハイブリドーマをスクリーニングした結果、OR7C1 ペプチドに ELISA 法で反応を示すクローン樹立出来た。しかしながら、本クローンは、ウエスタンブロット法、免疫組織化学染色における OR7C1 検出を確認することはできなかった。今後、OR7C1 を検出できるモノクローナル抗体作成が課題となる。

がん患者免疫モニタリングシステムの構築 (テトラマー法、ELISPOT 法)

BORIS C34_24(9) ペプチド特異的テトラマーおよび、OR7C1_93(10)、BORIS C34_24(9) ペプチドを用いて ELISPOT 法にて CTL 検出可能であることを確認した。

がん精巣幹細胞抗原治療モデルマウスの作製 (CTL 移入療法モデルマウス)

OR7C1_93(10) 特異的 CTL クローンおよび BORIS C34_24(9) 特異的 CTL クローンは、が

ん幹細胞移植免疫不全マウスにおいて、有意な抗腫瘍効果を示した (Clin Cancer Res 2016, Oncotarget 2016)。同結果は、OR7C1 および BORIS ががん幹細胞標的免疫療法の標的分子として機能する事を示唆する。

がん精巢幹細胞抗原機能解析 (siRNA 法、ゲノム編集法、遺伝子過剰発現法)

OR7C1 機能を検索する為、OR7C1 過剰発現および siRNA によるノックダウンを行った。その結果、OR7C1 は大腸がん幹細胞維持に重要な機能を有する事を確認した (Clin Cancer Res 2016)。

BORIS sf6 が特異的に、がん幹細胞維持に関わるか検討する為に、BORIS sf1, sf4, sf6 発現ベクターを作成し、過剰発現し、免疫不全マウスにおける像腫瘍能との関連性を検討した。その結果 BORIS sf6 がもっとも高い造腫瘍能を示す事を見出した。本結果は、多くの BORIS パリアントの中でも、sf6 ががん幹細胞特異的発現を示すと同時に、BORIS sf6 ががん幹細胞維持に関わる事が示唆された。

これらの研究結果から、OR7C1 および BORIS ががん幹細胞標的免疫療法の候補分子として有望であることが示唆された。本研究結果をもって、OR7C1 および BORIS を用いたがん幹細胞標的免疫療法の臨床試験開始を予定している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計42件)

1: Ogawa T, Hirohashi Y, Murai A, Nishidate T, Okita K, Wang L, Ikehara Y, Satoyoshi T, Usui A, Kubo T, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Kutomi G, Furuhashi T, Hirata K, Sato N, Mizuguchi T, Takemasa I, Torigoe T. ST6GALNAC1 plays important roles in enhancing cancer stem phenotypes of colorectal cancer via the Akt pathway. Oncotarget. 2017 Nov 8;8(68):112550-112564. doi: 10.18632/oncotarget.22545. (査読あり)

2: Kusumoto H, Hirohashi Y, Nishizawa S, Yamashita M, Yasuda K, Murai A, Takaya A, Mori T, Kubo T, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Kondo T, Sato N, Hara I, Torigoe T. Cellular stress induces cancer stem-like cells through expression of DNAJB8 by activation of heat shock factor 1. Cancer Sci. 2018 Mar;109(3):741-750. doi: 10.1111/cas.13501. (査読あり)

3: Inoue R, Hirohashi Y, Kitamura H,

Nishida S, Murai A, Takaya A, Yamamoto E, Matsuki M, Tanaka T, Kubo T, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Sato N, Masumori N, Torigoe T. GRIK2 has a role in the maintenance of urothelial carcinoma stem-like cells, and its expression is associated with poorer prognosis. Oncotarget. 2017 Apr 25;8(17):28826-28839. doi:10.18632/oncotarget.16259. (査読あり)

4: Yasuda K, Hirohashi Y, Mariya T, Murai A, Tabuchi Y, Kuroda T, Kusumoto H, Takaya A, Yamamoto E, Kubo T, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Tamura Y, Hirano H, Hasegawa T, Saito T, Sato N, Torigoe T. Phosphorylation of HSF1 at serine 326 residue is related to the maintenance of gynecologic cancer stem cells through expression of HSP27. Oncotarget. 2017 May 9;8(19):31540-31553. doi:10.18632/oncotarget.16361. (査読あり)

5: Kubo T, Hirohashi Y, Matsuo K, Sonoda T, Sakamoto H, Furumura K, Tsukahara T, Kanaseki T, Nakatsugawa M, Hirano H, Furuhashi T, Takemasa I, Hasegawa T, Torigoe T. Mismatch Repair Protein Deficiency Is a Risk Factor for Aberrant Expression of HLA Class I Molecules: A Putative "Adaptive Immune Escape" Phenomenon. Anticancer Res. 2017 Mar;37(3):1289-1295. (査読あり)

6: Horibe R, Hirohashi Y, Asano T, Mariya T, Suzuki T, Takaya A, Saijo H, Shionoya Y, Kubo T, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Watanabe K, Atsuyama E, Toji S, Hirano H, Hasegawa T, Takahashi H, Sato N, Torigoe T. Brother of the regulator of the imprinted site (BORIS) variant subfamily 6 is a novel target of lung cancer stem-like cell immunotherapy. PLoS One. 2017 Mar 1;12(3):e0171460. doi: 10.1371/journal.pone.0171460. (査読あり)

7: Wang L, Hirohashi Y, Ogawa T, Shen M, Takeda R, Murai A, Yamamoto E, Kubo T, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Nishidate T, Okita K, Kutomi G, Sato N, Takemasa I, Torigoe T. LY6/PLAUR domain containing 3 has a role in the maintenance of colorectal cancer stem-like cells. Biochem Biophys Res Commun. 2017 Apr 29;486(2):232-238. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.112. Epub 2017 Feb 24. (査読あり)

8: Takeda R, Hirohashi Y, Shen M, Wang L,

Ogawa T, Murai A, Yamamoto E, Kubo T, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Nishidate T, Okita K, Kutomi G, Sato N, Takemasa I, Torigoe T. Identification and functional analysis of variants of a cancer/testis antigen LEMD1 in colorectal cancer stem-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Apr 8;485(3):651-657. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.081. (査読あり)

9: Saijo H, Hirohashi Y, Torigoe T, Horibe R, Takaya A, Murai A, Kubo T, Kajiwara T, Tanaka T, Shionoya Y, Yamamoto E, Maruyama R, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Tamura Y, Sasaki Y, Tokino T, Suzuki H, Kondo T, Takahashi H, Sato N. Plasticity of lung cancer stem-like cells is regulated by the transcription factor HoxA5 that is induced by oxidative stress. *Oncotarget.* 2016 Aug 2;7(31):50043-50056. doi: 10.18632/oncotarget.10571. (査読あり)

10: Takaya A, Hirohashi Y, Murai A, Morita R, Saijo H, Yamamoto E, Kubo T, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Tamura Y, Takemasa I, Kondo T, Sato N, Torigoe T. Establishment and Analysis of Cancer Stem-Like and Non-Cancer Stem-Like Clone Cells from the Human Colon Cancer Cell Line SW480. *PLoS One.* 2016 Jul 14;11(7):e0158903. doi: 10.1371/journal.pone.0158903. (査読あり)

11: Mariya T, Hirohashi Y, Torigoe T, Tabuchi Y, Asano T, Saijo H, Kuroda T, Yasuda K, Mizuuchi M, Saito T, Sato N. Matrix metalloproteinase-10 regulates stemness of ovarian cancer stem-like cells by activation of canonical Wnt signaling and can be a target of chemotherapy-resistant ovarian cancer. *Oncotarget.* 2016 May 3;7(18):26806-22. doi: 10.18632/oncotarget.8645. (査読あり)

12: Yamauchi M, Hirohashi Y, Torigoe T, Matsumoto Y, Yamashita K, Kayama M, Sato N, Yotsuyanagi T. Wound healing delays in -Klotho-deficient mice that have skin appearance similar to that in aged humans - Study of delayed wound healing mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 May 13;473(4):845-852. doi:10.1016/j.bbrc.2016.03.138. (査読あり)

13: Yasuda K, Hirohashi Y, Kuroda T, Takaya A, Kubo T, Kanaseki T, Tsukahara T,

Hasegawa T, Saito T, Sato N, Torigoe T. MAPK13 is preferentially expressed in gynecological cancer stem cells and has a role in the tumor-initiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Apr 15;472(4):643-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.03.004. (査読あり)

14: Morita R, Hirohashi Y, Torigoe T, Ito-Inoda S, Takahashi A, Mariya T, Asanuma H, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Kutomi G, Mizuguchi T, Terui T, Ishitani K, Hashino S, Kondo T, Minagawa N, Takahashi N, Taketomi A, Todo S, Asaka M, Sato N. Olfactory Receptor Family 7 Subfamily C Member 1 Is a Novel Marker of Colon Cancer-Initiating Cells and Is a Potent Target of Immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2016 Jul 1;22(13):3298-309. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1709. (査読あり)

15: Asano T, Hirohashi Y, Torigoe T, Mariya T, Horibe R, Kuroda T, Tabuchi Y, Saijo H, Yasuda K, Mizuuchi M, Takahashi A, Asanuma H, Hasegawa T, Saito T, Sato N. Brother of the regulator of the imprinted site (BORIS) variant subfamily 6 is involved in cervical cancer stemness and can be a target of immunotherapy. *Oncotarget.* 2016 Mar 8;7(10):11223-37. doi: 10.18632/oncotarget.7165. (査読あり)

16: Yamashita M, Hirohashi Y, Torigoe T, Kusumoto H, Murai A, Imagawa T, Sato N. Dnajb8, a Member of the Heat Shock Protein 40 Family Has a Role in the Tumor Initiation and Resistance to Docetaxel but Is Dispensable for Stress Response. *PLoS One.* 2016 Jan 11;11(1):e0146501. doi: 10.1371/journal.pone.0146501. (査読あり)

17: Hirohashi Y, Torigoe T, Tsukahara T, Kanaseki T, Kochin V, Sato N. Immune responses to human cancer stem-like cells/cancer-initiating cells. *Cancer Sci.* 2016 Jan;107(1):12-7. doi: 10.1111/cas.12830. (査読あり)

18: Hirohashi Y, Torigoe T, Mariya T, Kochin V, Saito T, Sato N. HLA class I as a predictor of clinical prognosis and CTL infiltration as a predictor of chemosensitivity in ovarian cancer. *Oncoimmunology.* 2015 Mar 23;4(5):e1005507. (査読あり)

〔学会発表〕(計9件)

廣橋良彦：癌精巢抗原 BORIS は婦人科癌幹

細胞性に関与し、免疫療法のターゲットになりうる、第 56 回日本臨床細胞学会秋期大会、2017 年。

廣橋良彦：Immunoreaction to cancer stem cells、第 63 回日本病理学会秋期特別総会、2017 年。

廣橋良彦：がん幹細胞に注目したがん免疫療法、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年。

廣橋良彦：癌精巢抗原 BORIS の肺癌幹細胞様細胞における発現と BORIS 抗原を標的とした免疫療法の検討、第 20 回日本がん免疫学会総会、2016 年。

廣橋良彦：がん幹細胞標的免疫療法の開発、第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会（招待講演）2016 年。

廣橋良彦：がん精巢抗原は、がん幹細胞標的免疫療法の有力な候補になる、第 105 回日本病理学会総会、2016 年。

廣橋良彦：がん幹細胞を標的とした免疫療法、第 5 回北海道探索病理学研究シンポジウム（招待講演）2015 年。

廣橋良彦：Establishment of cancer stem cell-targeting immunotherapy、第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会（招待講演）2015 年。

廣橋良彦：免疫療法でがんは治せるのか？“次世代のがん免疫療法”、日本耳鼻咽喉科学会第 98 回和歌山地方部会総会（招待講演）2015 年。

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 6 件）

名称：BORIS 由来腫瘍抗原ペプチド
発明者：浅野拓也、鳥越俊彦、廣橋良彦、佐藤昇志、渡邊一絵、厚山恵理、田路真悟
権利者：札幌医科大学、株式会社医学生物学研究所
種類：特許
番号：特願 2014-194391
出願年月日：2014 年 9 月 24 日
国内外の別：国内

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣橋 良彦 (HIROHASHI, Yoshihiko)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30516901