

令和元年6月24日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11729

研究課題名(和文) 口腔がんに対する再発予防がんペプチドワクチン療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of prophylactic peptide vaccine therapy for oral cancer

研究代表者

宮崎 晃亘 (Miyazaki, Akihiro)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：10305237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌細胞株と自家癌特異的細胞傷害活性を有するCTLのペアを作製した。そのCTLクローンは自家癌に加えHLA-A24陽性同種癌細胞に対しても特異的細胞傷害活性を示したことから、共通の腫瘍関連抗原を認識していることが示唆された。より効果的ながんペプチドワクチンの開発に向けて、詳細な解析が進行中である。口腔扁平上皮癌の腫瘍浸潤リンパ球の中で、FoxP3陽性T細胞はCD8陽性T細胞の様に抗腫瘍効果を発揮する可能性が示された。さらに、ヒト癌タイプのpodoplaninを認識する新規単クローン抗体LpMab-23の発現が舌癌における強力な予後不良因子であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん幹細胞は、(1)高い造腫瘍能、(2)自己複製能、(3)多分化能を有する少数のがん細胞亜集団で、がんの治療抵抗性獲得や再発・転移に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究は、次世代がんワクチンとして期待が高いがん幹細胞特異抗原を標的とするがんワクチン開発に焦点を当てており、口腔がん治療における昨今の集学的治療の問題点や限界を補う新たな治療法となり得る可能性が高い先端的研究に位置付けられる。

研究成果の概要(英文)：We established a cancer cell line and autologous cytotoxic T lymphocyte (CTL) pair in oral squamous cell carcinoma (OSCC). The CTL clone showed specific cytotoxic activity against autologous and allogenic tumor cells in an HLA-A24-restricted manner. This finding indicated that the CTL clone recognized a tumor associated antigen presented by HLA-A24 cells. Precise analyses of the CTL-recognized antigens may provide us with substantial strategies toward developing a more effective cancer peptide vaccine. We found that it is possible that FoxP3+ T cells may have site-specific anti-tumor effect similar to CD8+ T cells in OSCC tumor infiltrating lymphocytes. Further, we reported that the reactivity of a novel monoclonal antibody LpMab-23 for human cancer-type podoplanin is a predictor for a poor prognosis of tongue cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：がん免疫療法 口腔がん がんペプチドワクチン療法 がん特異抗原 LpMab-23 がん幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん抗原分子は、がん幹細胞および非がん幹細胞での発現様式から、がん幹細胞特異抗原、がん幹細胞および非がん幹細胞に発現する共通抗原、非がん幹細胞特異抗原の3つに分類される。がん幹細胞は化学療法や放射線治療といった現在の主ながん治療法に対して抵抗性を示すことが知られており、がんの再発・転移など臨床上で患者の生命予後を直接左右するイベントに深く関わっていると考えられる。したがって、口腔がん治療における昨今の集学的治療の問題点や限界を補う新たな治療法として、がん幹細胞特異抗原もしくは共通抗原を標的抗原とした臨床効果の高いがんペプチドワクチン療法の開発が重要な鍵を握っている。

一方、がん微小環境ではがん細胞増殖・浸潤促進的かつ免疫抑制的な環境が形成されている。がん微小環境における免疫病態の解明を進めることにより、新たな診断・治療法開発が期待されている。

### 2. 研究の目的

口腔がんに対する再発・転移予防を目的とした新規がん治療法として、がん幹細胞を標的とするがんペプチドワクチン療法の開発・確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 口腔がんにおけるがん幹細胞の分離・同定と機能解析

口腔がん患者から末梢血液や手術あるいは生検によって得られた組織を一部採取し、口腔がん幹細胞に発現している抗原分子の分離・同定ならびに機能解析を以下の方法で実施する。

##### 1) HLA genotype および serotype の解析

HLA と結合して細胞表面へ提示されるがん抗原ペプチドの構造は、HLA 型によって異なるため、HLA 型を明らかにする必要がある。採取した血液より末梢血単核球を分離し、フローサイトメーター等にて serotype を解析する。末梢血単核球から染色体遺伝子を抽出し、PCR 法にて HLA genotype を解析する。

##### 2) リンパ球の機能解析

採取した血液より末梢血単核球を分離し、それをがん抗原ペプチドで刺激し、細胞傷害活性を解析する。また、サイトカインの産生を ELISPOT アッセイによって解析する。細胞表面抗原はフローサイトメーターによって解析する。

##### 3) 血清中の自己抗体価の測定

採取した血液より血清を分離し、ELISA 法によりがん抗原に対する自己抗体価や抗原蛋白量を測定する。

##### 4) がん細胞株の樹立

採取したがん組織およびがん細胞を培養し、がん細胞株を樹立する。

##### 5) がん細胞またはがん組織における各種がん免疫関連遺伝子解析と病理組織学的解析

がん細胞またはがん組織より染色体遺伝子および RNA を抽出し、RT-PCR 法、ノザンプロット法、DNA アレイ法等にて各種がん免疫関連遺伝子の遺伝子レベルでの発現変異解析や免疫染色法にて組織レベルでの蛋白発現解析を行う。とくに口腔がん幹細胞に特異的に発現する関連遺伝子および蛋白の特定を試みる。

6) フローサイトメーターによるがん幹細胞の分離 *in vitro* 及び *in vivo* での造腫瘍能の評価  
フローサイトメーターで Hoechst Assay による Side Population 法や ALDEFLUOR assay を用いて、培養したがん細胞からがん幹細胞としての特徴を有するがん細胞 (SP 陽性細胞や ALDH 陽性細胞) を抽出する。また、*in vitro* ではがん幹細胞の sphere 形成能を、動物モデルを用いて *in vivo* での造腫瘍能について、それぞれがん幹細胞とそれ以外のがん細胞で比較する。

##### 7) 日本人に最も多い HLA-A24 拘束性のがん幹細胞特異抗原ペプチド配列を決定する。

HLA-A24 陽性口腔がん患者末梢血リンパ球から CTL を誘導し、CTL クローンを抽出し、特異的細胞傷害活性を測定する。さらに、動物モデルを用いて *in vivo* での抗腫瘍効果を確認する。

##### (2) 腫瘍微小環境における免疫抑制機構と免疫チェックポイント分子の解析

生検や手術で得られたがん組織を用いて、免疫組織染色により免疫担当細胞あるいは免疫抑制性細胞の発現状況を確認する。また、HLA-A24/ペプチドテトラマーを用いて蛍光染色を行い、腫瘍浸潤 T リンパ球の解析を行う。さらに、免疫抑制的に働くことが知られている腫瘍局所の制御性 T 細胞の発現頻度、HLA class I の発現低下、PD-1/PD-L1 などの免疫チェックポイント分子について分子免疫学的手法により総合的に解析する。

##### (3) 口腔がんにおける抗体医薬の開発

ヒトがんタイプの podoplanin のみを認識する LpMab-23 の抗体医薬としての可能性について免疫組織化学的に検討する。LpMab-23 は東北大学大学院医学系研究科抗体創薬研究分野で、がん細胞に対する特異的抗体作製技術、Cancer-Specific Monoclonal Antibody (CasMab) 法を利用して樹立された podoplanin に対する抗体である。

### 4. 研究成果

(1) 新規口腔扁平上皮癌細胞株 OTM を樹立し、自家癌特異的細胞傷害活性を有する TcOTM clone のペアを作製した。TcOTM clone は自己の OTM のみならず HLA-A24 陽性口腔扁平上皮癌細胞株

OSC-19、HSC-2 に対しても高い細胞傷害活性を示したことから、HLA-A24 陽性口腔扁平上皮癌に発現している共通抗原を認識していることが示唆された。これらの研究成果は、効率的な共通抗原の分離・同定に autologous tumor-CTL ペアの樹立が有用な手段であることが明らかとなった。現在、有望な HLA-A24 拘束性のがん幹細胞特異抗原ペプチドの分離・同定を試みている。

(2) 口腔がん微小環境における免疫担当細胞の局在と臨床病理学的所見ならびに予後との関係を免疫組織化学的に検討した。その結果、invasive front 実質の FoxP3 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の高発現症例は予後良好で、有用なバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。また、進行口腔がんや高悪性度口腔がんで PD-1、PD-L1、PD-L2 が多く発現していることが示された。口腔がんにおける免疫チェックポイント阻害療法の有効性が示唆されるとともに、新規がん免疫療法の開発には、これらの免疫逃避に関与する分子の制御が重要と考えられた。

(3) Stage I, II 早期舌扁平上皮癌切除組織を用いて LpMab-23 の発現を免疫組織化学的に検討し、その発現と臨床病理学的所見の関係および予後について Cox 比例ハザードモデルを用いて解析した。LpMab-23 の発現が頸部リンパ節後発転移を予測する上で強力な予後因子であることが示され、バイオマーカーとしての有用性のみならず転移予防の抗体医薬品としての可能性が示唆された。さらに、頸部後発転移症例 12 例の転移リンパ節における LpMab23 の発現について検討し、12 例中 10 例の転移リンパ節で LpMab-23 の発現を認めた。さらに、被膜外浸潤を認めた頸部後発リンパ節転移巣の大多数で LpMab-23 の強発現を認め、LpMab-23 が腫瘍浸潤能に関与している可能性が考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 12 件)

Shimizu S, Hiratsuka H, Koike K, Tsuchihashi K, Sonoda T, Ogi K, Miyakawa A, Kobayashi J, Kaneko T, Igarashi T, Hasegawa T, Miyazaki A. Tumor-infiltrating CD8+ T-cell density is an independent prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Cancer Med*. 2019 Jan;8(1):80-93. doi: 10.1002/cam4.1889. 査読有

Nishiyama K, Maruyama R, Niinuma T, Kai M, Kitajima H, Toyota M, Hatanaka Y, Igarashi T, Kobayashi JI, Ogi K, Dehari H, Miyazaki A, Yorozu A, Yamamoto E, Idogawa M, Sasaki Y, Sugai T, Tokino T, Hiratsuka H, Suzuki H. Screening for long noncoding RNAs associated with oral squamous cell carcinoma reveals the potentially oncogenic actions of DLEU1. *Cell Death Dis*. 2018 Aug 1;9(8):826. doi: 10.1038/s41419-018-0893-2. 査読有

Shimizu S, Miyazaki A, Sonoda T, Koike K, Ogi K, Kobayashi JI, Kaneko T, Igarashi T, Ueda M, Dehari H, Miyakawa A, Hasegawa T, Hiratsuka H. Tumor budding is an independent prognostic marker in early stage oral squamous cell carcinoma: With special reference to the mode of invasion and worst pattern of invasion. *PLoS One*. 2018 Apr 19;13(4):e0195451. doi: 10.1371/journal.pone.0195451. eCollection 2018. 査読有

Miyazaki A, Nakai H, Sonoda T, Hirohashi Y, Kaneko MK, Kato Y, Sawa Y, Hiratsuka H. LpMab-23-recognizing cancer-type podoplanin is a novel predictor for a poor prognosis of early stage tongue cancer. *Oncotarget*. 2018 Apr 20;9(30):21156-21165. doi: 10.18632/oncotarget.24986. eCollection 2018 Apr 20. 査読有

金関貴幸, 宮本昇, 鳥越俊彦: がん幹細胞特異的抗原 ASB4 を利用したがん免疫治療. *臨免疫・アレルギー科* 2018; 69(5):499-504.

Miyamoto S, Kochin V, Kanaseki T, Hongo A, Tokita S, Kikuchi Y, Takaya A, Hirohashi Y, Tsukahara T, Terui T, Ishitani K, Hata F, Takemasa I, Miyazaki A, Hiratsuka H, Sato N, Torigoe T. The Antigen ASB4 on Cancer Stem Cells Serves as a Target for CTL Immunotherapy of Colorectal Cancer. *Cancer Immunol Res*. 2018 Jan 25. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0518. 査読有

Okamoto JY, Miyazaki A, Kobayashi JI, Miyamoto S, Sasaki T, Kanaseki T, Hirohashi Y, Torigoe T, Hiratsuka H. Induction and Analysis of Cytotoxic T-Lymphocytes that Recognize Autologous Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res*. 2017 Sep;37(9):4889-4897.

Kawata M, Ogi K, Nishiyama K, Miyamoto S, Nakagaki T, Shimanishi M, Miyazaki A, Hiratsuka H. Additive effect of radiosensitization by 2-deoxy-D-glucose delays DNA repair kinetics and suppresses cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2017 Nov;46(10):979-985. doi: 10.1111/jop.12606. 査読有

宮本昇, 金関貴幸, 廣橋良彦, 塚原智英, 菊池泰弘, 佐藤昇志, 鳥越俊彦. がん幹細胞の単離と免疫治療に向けた標的抗原の同定. *日臨免疫会誌*. 2017; 40: 40-47.

Kochin V, Kanaseki T, Tokita S, Miyamoto S, Shionoya Y, Kikuchi Y, Morooka D, Hirohashi Y, Tsukahara T, Watanabe K, Toji S, Kokai Y, Sato N, Torigoe T. HLA-A24 ligandome analysis of colon and lung cancer cells identifies a novel cancer-testis antigen and a neoantigen that elicits specific and strong CTL responses. 2017; 6: e1293214. 査読有

Shionoya Y, Kanaseki T, Miyamoto S, Tokita S, Hongo A, Kikuchi Y, Kochin V, Watanabe K, Horibe R, Saijo H, Tsukahara T, Hirohashi Y, Takahashi H, Sato N, Torigoe T. Loss of tapasin in human lung and colon cancer cells and escape from tumor-associated antigen-

specific CTL recognition. *Oncoimmunology*. 2017; 6: e1274476. 査読有

Kaneko T, Dehari H, Sasaki T, Igarashi T, Ogi K, Okamoto JY, Kawata M, Kobayashi JI, Miyazaki A, Nakamori K, Hiratsuka H. Hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition is regulated by phosphorylation of GSK3- via PI3 K/Akt signaling in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016 Dec;122(6):719-730. doi: 10.1016/j.oooo.2016.06.008. 査読有

〔学会発表〕(計 20 件)

Miyamoto S, Kanaseki T, Miyazaki A, Torigoe T. Development of peptide vaccine therapy targeting colon cancer stem cells with HLA ligandome analysis. 10th Annual PEGS Europe Protein & Antibody Engineering Summit. 2018年11月12-16日. リスボン(ポルトガル).

Miyamoto S, Kanaseki T, Miyazaki A, Hiratsuka H, Torigoe T. A cancer-stem cell specific antigen, ASB4, as a unique target for effective CTL immunotherapy of colorectal cancer. *Immuno-Oncology Europe 2018 (3rd Annual Immuno-Oncology Summit Europe)*. 2018年3月19-23日. ロンドン(英国).

土橋 恵, 中津川宗秀, 金関貴幸, 宮本 昇, 宮崎晃亘, 鳥越俊彦. がん幹細胞抗原 ASB4 を標的とした T 細胞受容体遺伝子治療の開発. 第 107 回日本病理学会総会. 2018年6月21-23日. 口イトン札幌・ニトリ文化ホール・さっぽろ芸文館(北海道札幌市).

Ogi K, Nakagaki T, Idogawa M, Miyazaki A, Tokino T, Sasaki Y. Targeted next-generation sequencing of 50 cancer-related genes in Japanese patients with oral squamous cell carcinoma. 第 77 回日本癌学会学術総会. 2018年9月27-29日. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪(大阪府・大阪市).

Nishiyama K, Maruyama R, Niinuma T, Kitajima H, Niinuma T, Igarashi T, Kobayashi JI, Ogi K, Dehari H, Yamamoto E, Kai M, Miyazaki A, Tokino T, Suzuki H. Screening for long non-coding RNAs associated with oral cancer reveals the potentially oncogenic actions of Inc-A. 第 77 回日本癌学会学術総会. 2018年9月27-29日. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪(大阪府・大阪市).

Tsuchihashi K, Nakatsugawa M, Asanuma H, Miyazaki A, Torigoe T. Association of PD-1, PD-L1 and PD-L2 expression with clinicopathological factors in tongue squamous cell carcinoma. 第 77 回日本癌学会学術総会. 2018年9月27-29日. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪(大阪府・大阪市).

宮本 昇, 佐々木敬則, 土橋 恵, 五十嵐友彦, 小林淳一, 荻 和弘, 出張裕也, 宮崎晃亘, 平塚博義. 網羅的な HLA リガンドーム解析による新規がん幹細胞抗原ペプチドの同定と免疫療法への応用. 第 36 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会. 2018年1月25, 26日. 新潟グランドホテル. (新潟県・新潟市).

中井裕美, 宮崎晃亘, 小林淳一, 清水翔太, 土橋 恵, 岡本準也, 阪本結生, 金子 剛, 渡邊さくら, 平塚博義. 新規癌特異抗原 LpMab23 の発現は早期舌扁平上皮癌の予後因子になりうる. 第 36 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会. 2018年1月25, 26日. 新潟グランドホテル. (新潟県・新潟市).

Nishiyama K, Maruyama R, Niinuma T, Kitajima H, Ogi K, Dehari H, Miyazaki A, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Hiratsuka H, Suzuki H. Identification of long non-coding RNAs potentially involved in oral squamous cell carcinoma. 第 76 回日本癌学会学術総会. 2017年9月28-30日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

Ogi K, Kawata M, Nakagaki T, Nishiyama K, Miyamoto S, Miyazaki A, Hiratsuka H. The additive effects of radiosensitization by 2-deoxy-D-glucose in oral squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. 第 76 回日本癌学会学術総会. 2017年9月28-30日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

清水翔太, 宮崎晃亘, 小林淳一, 中井裕美, 岡本準也, 平塚博義. EBV 陰性リンパ上皮癌における腫瘍浸潤リンパ球の免疫組織学的解析. 第 41 回日本頭頸部癌学会. 2017年6月8, 9日. ウェスティン都ホテル京都. (京都府京都市).

西山廣陽, 竹田康佑, 中垣貴文, 都倉堯明, 佐々木敬則, 荻 和弘, 宮崎晃亘, 平塚博義. 口腔扁平上皮癌に關与する長鎖非コード RNA の同定. 第 71 回日本口腔科学会学術集会. 2017年4月26-28日. ひめぎんホール(愛媛県松山市).

岡本準也, 宮崎晃亘, 小林淳一, 宮本 昇, 中井裕美, 土橋 恵, 中垣貴文, 荻 和弘, 平塚博義. 口腔がんに対する新たなペプチドワクチン療法に向けての基礎的研究. 第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会. 2017年1月26-27日福岡国際会議場(福岡県・福岡市).

Miyamoto S, Kanaseki T, Takahashi A, Kochin V, Hongo A, Hirohashi Y, Sato N, Torigoe T. The ASB4 natural peptide for CTL immunotherapy targeting cancer stem cells. 第 45 回日本免疫学会学術集会. 2016年12月5-7日. 沖縄コンベンションセンター, ラグナガーデンホテル(沖縄県・宜野湾市).

Miyamoto S, Kanaseki T, Kochin V, Hiratsuka H, Torigoe T. Identification of an HLA-A24 natural antigenic peptide for CTL immunotherapy targeting colon cancer stem cells. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016年10月6-8日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

宮本 昇, 金関貴幸, 廣橋良彦, 塚原智英, 佐藤昇志, 鳥越俊彦. HLA-A24 リガンドーム解析による大腸がん幹細胞抗原ペプチド同定とがんワクチン応用. 第 44 回日本臨床免疫学会総会 2016 年 9 月 8-10 日. 京王プラザホテル(東京都・新宿区).

Miyamoto S, Kanaseki T, Takahashi A, Kochin V, Hongo A, Hirohashi Y, Sato N, Torigoe T. Anti-tumor CTL effect targeting the ASB4 gene-derived natural peptide presented by HLA-A24 of human colon cancer stem cells. 16th International Congress of Immunology. 2016 年 8 月 21-26 日. メルボルン(オーストラリア).

宮本 昇, 金関貴幸, 高橋あかり, Kochin V, 本郷 歩, 廣橋 良彦, 鳥越俊彦, 佐藤昇志. An HLA-A24 natural antigenic peptide (NAP) for CTL immunotherapy targeting colon cancer stem cells. 第 20 回 日本がん免疫学会総会 2016 年 7 月 27-29 日. 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市).

岡本準也, 宮崎晃亘, 小林淳一, 宮本 昇, 荻 和弘, 出張裕也, 平塚博義. 口腔がんにおける新規がん抗原の同定と免疫療法の基礎的研究. 第 40 回日本頭頸部癌学会. 2016 年 6 月 9-10 日. ソニックシティ(埼玉県・さいたま市).

宮本 昇, 金関貴幸, 高橋あかり, Kochin V, 本郷 歩, 廣橋良彦, 佐藤昇志, 鳥越俊彦. ヒトがん幹細胞を標的とする ASB4 抗原ペプチドを用いた CTL 免疫療法. 第 105 回日本病理学会総会 2016 年 5 月 12-14 日. 仙台国際センター(宮城県・仙台市).

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 小林 淳一

ローマ字氏名: (KOBAYASHI, Jun-ichi)

所属研究機関名: 札幌医科大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号(8桁): 80404739

研究分担者氏名: 宮本 昇

ローマ字氏名: (MIYAMOTO, Sho)

所属研究機関名: 札幌医科大学

部局名：医学部

職名：研究員

研究者番号（8桁）：80749565

研究分担者氏名：岡本 準也

ローマ字氏名：(OKAMOTO, Jun-ya)

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：研究員

研究者番号（8桁）：10749592

研究分担者氏名：中井 裕美

ローマ字氏名：(NAKAI, Hiromi)

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：研究員

研究者番号（8桁）：80792126

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。