

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：18001
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K17282
研究課題名(和文) ナチュラルペプチドの網羅的解析による口腔がん幹細胞特異的再発予防ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of peptide vaccine therapy targeting oral cancer stem cells with comprehensive HLA ligandome analysis

研究代表者
宮本 昇 (Miyamoto, Sho)
琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80749565
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：がんの再発予防にがん幹細胞(CSC)を標的とする免疫療法が有効であると考え、SW480細胞からCSC・非CSCを分離し、両者のHLA-A24に提示されるナチュラルペプチド群を網羅的に解析した。CSCにのみ提示されるIV9ペプチドを同定し、PBMCを刺激してIV9特異的CTLを誘導した。特異的CTLは、CSCのみを認識し、SW480細胞を移植したマウスモデルに静注すると有意に腫瘍形成を抑制した。移植された腫瘍モデルは少数のCSCと多数の非CSCからなることを考慮すると、CSC成分を排除することが、腫瘍形成の制御に必要な条件であり、がん免疫療法の治療・予防戦略における有効性を証明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
がん幹細胞を標的とした、新規ペプチドワクチンの開発に成功した。また本研究を通し、がん幹細胞成分を排除することが、腫瘍形成を制御するのに必要かつ十分な条件であることを証明している。このことは、CTL免疫療法の治療・予防戦略において、がん幹細胞を標的とするものの有効性を示唆する結果となっており、今後のあらゆるがんの再発予防法の開発・研究を行うにあたり、指標となる重要な結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSCs) explain the resistance to chemo/radiotherapies and cancer-initiating abilities of low numbers of cells in vivo. In order to target them through CTL recognition, we first isolated the CSC population from the cancer line, SW480, with an established side-population method. And screened the natural HLA-A24 ligandome by LC-MS/MS, resulting in identification of a CSC-specific natural antigenic peptide, IV9. The IV9 specific CTLs were induced from PBMC stimulated by IV9 peptide. IV9 specific CTL recognized CSCs but not non-CSCs. And in immunodeficient mice, intravenous injection of the IV9 specific CTL successfully prevented growth of the original SW480 cells. As the cancer cells implanted in these mice contained very few CSCs, the elimination of a CSC subset could be the condition necessary and sufficient to control tumor formation in vivo. These results suggest that CTL-based immunotherapies against colorectal CSCs might be useful for preventing relapses.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：ペプチドワクチン がん幹細胞 腫瘍免疫 がん免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんの三大治療法といわれる手術、放射線療法、化学療法に加え、分子標的治療の普及や、免疫チェックポイント阻害剤の保険適応を始めとするがん免疫療法の発展によって、がん治療は日進月歩に進化し、その選択肢も多様化している。しかし、がんの治療法は多数確立されている一方、再発予防法に関してはほぼ皆無である。そこで、代表者らは、がんの再発予防法としてペプチドワクチンに注目し研究を行った。

2. 研究の目的

がんの再発予防を考えるにあたり重要な概念が、がん幹細胞理論である。がんは、大多数の非がん幹細胞と、ごく少数のがん幹細胞から構成され、がん幹細胞は、自己複製能、多分化能、腫瘍形成能、更に化学療法、放射線療法に対する治療抵抗性を有することが明らかになっている。つまりがん幹細胞は、再発・転移・浸潤の根源であり、且つアプローチ方法が非常に限定されるがん細胞の亜集団として、再発予防を考える際に最も優先的に排除すべき細胞と考えられる。そこで、がんの再発予防法としてがん幹細胞を標的としたペプチドワクチンの開発を目標とした。

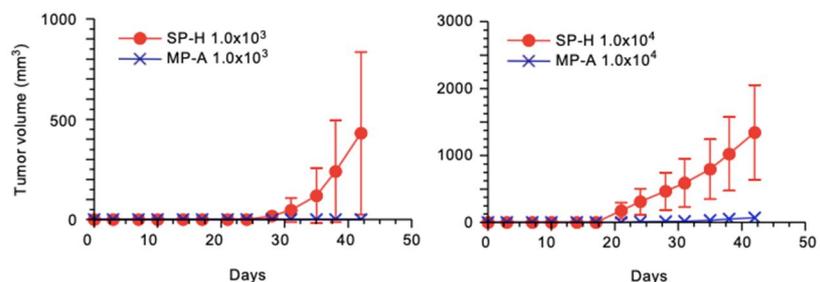
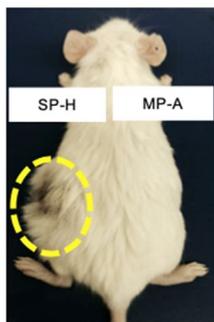
また、代表者らは新規ペプチドの同定法として、がん細胞の HLA-A24 分子に結合したペプチドである「ナチュラルペプチド」のみを特異的に抽出し配列解析するシステムを開発した (Kochin V, et al. HLA-A24 ligandome analysis of colon and lung cancer cells identifies a novel cancer-testis antigen and a neoantigen that elicits specific and strong CTL responses. *Oncoimmunology* 2017)。この方法で得られるペプチドは、従来のマイクロアレイやシーケンスなどの遺伝子レベルの検索からペプチド配列を予測するものとは異なり、すべて実際にがん細胞が HLA-A24 に提示するものであり、かつ解読に十分な量が提示されているペプチドである。従って、がんの「ナチュラル抗原ペプチド」としてより一層高い抗腫瘍効果が期待できる。この手法を、がん幹細胞の解析に用いることを目指した。

3. 研究の方法

幹細胞分離法を用いて、細胞株よりがん幹細胞の性質を有する細胞株 SW480-SP、非がん幹細胞の性質を有する細胞株 SW480-MP の樹立に成功した。続いて、この両者の HLA-A24 に提示されるペプチド群の網羅的な解析を行った。その結果、SW480-SP のみに提示されるペプチド IV9 とコードする遺伝子 ASB4 が確認された。この IV9 ペプチドを用いて、特異的 CTL の誘導、及び特異的 CTL による抗腫瘍効果の検証を行った。

4. 研究成果

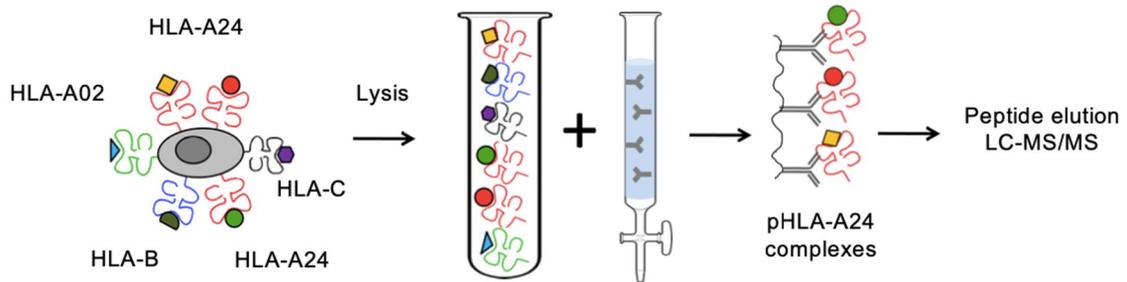
(1) がん幹細胞・非がん幹細胞の分離



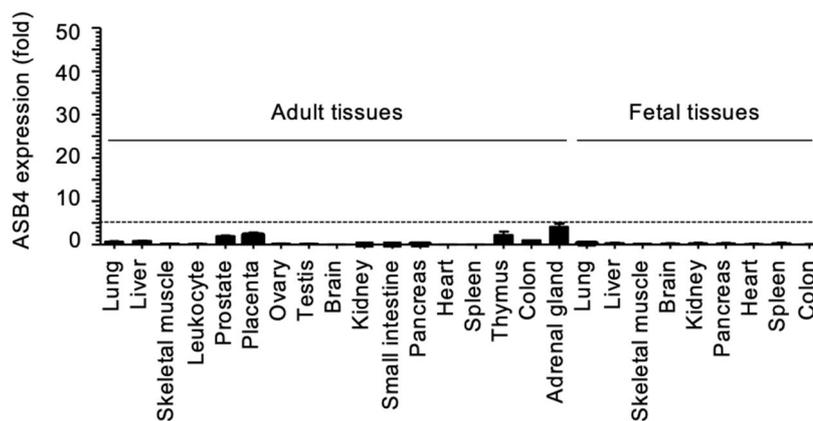
ヒト大腸がん SW480 細胞株から、幹細胞の分離法の一つである side population 法を用いて、がん幹細胞分画より SW480-SP 細胞株、非がん幹細胞分画から SW480-MP 細胞株を樹立した。SW480-SP は、SW480-MP と比較して、高い腫瘍形成能を示すことに加え、優位な sphere 形成能を持つことなどから、がん幹細胞としての性質を有していると考えられた。

(2) ナチュラルペプチドの網羅的解析による口腔がん幹細胞特異的ペプチドの同定

SW480-SP、SW480-MP 両者を、HLA-A24 特異的抗体を用いた affinity purification とマスマスペクトロメトリーによるナチュラルペプチド群の網羅的解析 (HLA リンゴドーム解析) を行った。解析の結果、計 178 のペプチド配列を同定した。

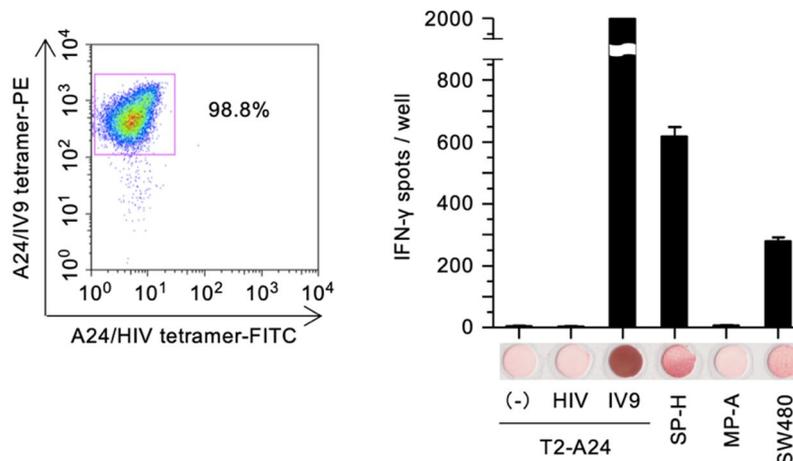


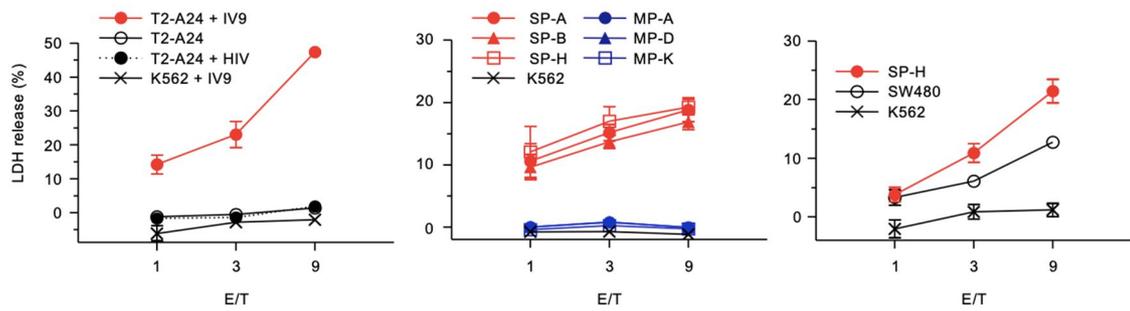
そのうち、SW480-SP のみに認められたものが 35、SW480-MP のみに認められたものが 86、SW480-SP、SW480-MP 両者に重複して認められたものが 57 であった。SW480-SP にのみ特異的に提示されるペプチド群のうちコードする遺伝子が正常組織に発現していないものを複数絞り込んだ。そのうちの一つに IV9 ペプチドがあり、ペプチドをコードする遺伝子 ASB4 を同定した。ASB4 遺伝子はアンキリンリピート配列と、SOX box 配列をコードしている。既報では報告は少なく、マウスにおいては精巢に発現し、ユビキチン化リガーゼとして働くことが分かっている。また、がんにおける詳細な機能は明らかにされていないが、ヒト肝細胞癌において、癌の遊走、浸潤に関与している報告がされている。ASB4 の遺伝子発現を調べた結果、正常組織、胎性組織に発現を認めず、一方でがん細胞においては、大腸癌、腎細胞癌、肝臓癌、肺癌、口腔扁平上皮癌に発現を認めた。



(3) 同定したペプチドによる特異的 CTL 誘導、CTL クローンの樹立

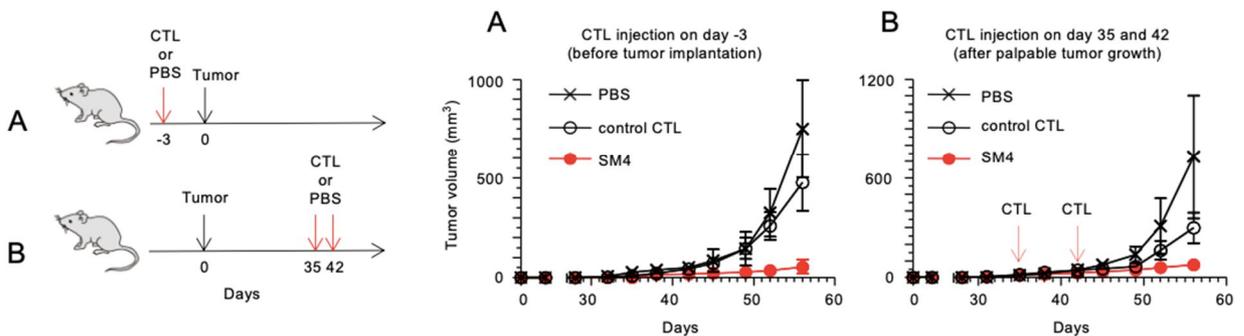
IV9 合成ペプチドを用いて HLA-A24 陽性のがん患者および正常人の末梢血 PBMC を刺激したところ、両者においてテトラマー陽性 CTL が誘導でき、誘導した CTL よりクローンの樹立に成功した。CTL クローンは SW480-SP を特異的に認識し傷害するが、非がん幹細胞成分 SW480-MP は認識しなかった。また SW480 以外の細胞株においても、HLA-A24 陽性で ASB4 遺伝子を発現している腎細胞癌 Caki-1 や口腔扁平上皮癌 OSC-70 において CTL クローンによる細胞障害性が確認された。





(4) in vitro での抗腫瘍効果の検討

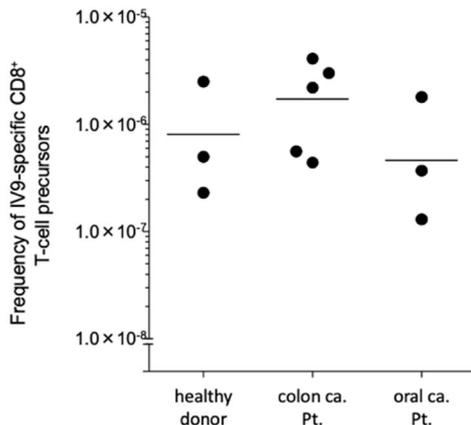
SW480 を免疫不全マウスに移植して腫瘍を形成し、その腫瘍に対して特異的 CTL が抗腫瘍効果を及ぼすか検証した。A 予防モデル：腫瘍移植 3 日前に特異的 CTL を静注したもの、B 治療モデル：腫瘍移植 35、42 日後に 2 回特異的 CTL を移植したもの、の 2 種類のモデルで検証した。AB 両者において、特異的 CTL を静注した群で有意に腫瘍形成を防ぐことができた。



移植された腫瘍モデルは、少数のがん幹細胞と多数の非がん幹細胞からなることを考慮すると、がん幹細胞成分を排除することが、腫瘍形成を制御するのに必要かつ十分な条件であり、CTL 免疫療法の治療・予防戦略において、がん幹細胞を標的とすることの有効性を示唆する結果となった。

(5) がん患者 PBMC を用いた特異的 CTL 誘導の検証

IV9 合成ペプチドを用いて HLA-A24 陽性の大腸がん、口腔がん患者および正常人の末梢血 PBMC を刺激し、特異的 CTL の誘導頻度の解析を行った。その結果、それら 3 群においてそれぞれ特異的 CTL の誘導が確認でき、誘導頻度に有意差は認められなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hongo A, Kanaseki T, Tokita S, Kochin V, Miyamoto S, Hashino Y, Codd A, Kawai N, Nakatsugawa M, Hirohashi Y, Sato N, Torigoe T	4. 巻 10
2. 論文標題 Upstream Position of Proline Defines Peptide-HLA Class I Repertoire Formation and CD8(+) T Cell Responses.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2849-2855
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 金関貴幸, 宮本昇, 鳥越俊彦	4. 巻 69
2. 論文標題 がん幹細胞特異的抗原ASB4を利用したがん免疫治療	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 499-504
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 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.	4. 巻 -
2. 論文標題 The Antigen ASB4 on Cancer Stem Cells Serves as a Target for CTL Immunotherapy of Colorectal Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okamoto JY, Miyazaki A, Kobayashi JI, Miyamoto S, Sasaki T, Kanaseki T, Hirohashi Y, Torigoe T, Hiratsuka H.	4. 巻 37
2. 論文標題 Induction and Analysis of Cytotoxic T-Lymphocytes that Recognize Autologous Oral Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 4889-4897
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawata M, Ogi K, Nishiyama K, Miyamoto S, Nakagaki T, Shimanishi M, Miyazaki A, Hiratsuka H.	4. 巻 46
2. 論文標題 Additive effect of radiosensitization by 2-deoxy-D-glucose delays DNA repair kinetics and suppresses cell proliferation in oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Oral Pathol Med	6. 最初と最後の頁 979-985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 宮本昇、宮崎晃亘、仲宗根敏行、西原一秀、荻和弘、出張裕也
2. 発表標題 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腫瘍ワクチンへの応用
3. 学会等名 第64回公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本昇
2. 発表標題 A cancer-stem cell specific antigen, ASB4, as a unique target for effective CTL immunotherapy of colorectal cancer
3. 学会等名 平成31年度札幌医科大学大学院医学研究科前期研修プログラム (基礎講義) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sho Miyamoto, Takayuki Kanaseki, Akihiro Miyazaki, Toshihiko Torigoe
2. 発表標題 Development of peptide vaccine therapy targeting colon cancer stem cells with HLA ligandome analysis
3. 学会等名 PEGS Europe Protein & Antibody Engineering Summit 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sho Miyamoto, Takayuki Kanaseki, Akihiro Miyazaki, Hiroyoshi Hiratsuka, Toshihiko Torigoe
2. 発表標題 A cancer-stem cell specific antigen, ASB4, as a unique target for effective CTL immunotherapy of colorectal cancer
3. 学会等名 3rd Annual Immuno-Oncology Summit Europe (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本昇
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第36回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考