

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22390311

研究課題名（和文）

婦人科がん幹細胞研究と免疫療法の融合

研究課題名（英文）

Combination of stem cell research and immunotherapy in gynecologic cancer

研究代表者

吉川 史隆 (Fumitaka Kikkawa)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40224985

研究成果の概要（和文）：

卵巣がん細胞株OVCAR3、NOY1でCD133陽性と陰性細胞に分離し、ヌードマウスにおける腫瘍形成能を比較し、CD133陽性細胞で有意に腫瘍形成能の亢進を認め、癌幹細胞としての妥当性を証明した。マイクロアレイ解析を行いCD133陽性細胞で発現増強遺伝子群を同定し、新たな免疫療法のターゲット抗原の探索を行った。免疫療法の実践とし、腫瘍抗原Glypican-3 (GPC3) およびHLA-classIの免疫組織染色を行った。82例の卵巣癌組織での結果、明細胞腺癌のみで陽性を示し、HLA-classIは全82例中72例で陽性であり、GPC3をターゲットとした、卵巣明細胞腺癌の免疫療法の妥当性を証明した。我々はGPC3をターゲットとした、卵巣明細胞腺癌の免疫療法の臨床試験をスタートさせ、臨床効果が得られた症例を2例経験した。

研究成果の概要（英文）：

We noticed CD133 as a stem cell marker in ovarian cancer. The present study was designed to evaluate the tumor-formation ability of CD133+ cells in ovarian YST cell lines and to examine characteristics of CD133+ cells such as cell growth, and invasiveness. Our data suggest that ovarian YST may be maintained by a rare fraction of cancer stem-like cells that express the cell surface marker CD133. CXCR4 levels were markedly higher in NOY1-CD133+ cells than CD133- NOY1 cells. NOY1-CD133+ expressed slightly higher levels of CD44 expression when compared with their CD133- counterparts. We also examined GPC3 expression in surgically resected ovarian carcinoma tissues. We tried immunotherapy in ovarian cancer. We investigated the expression of onco-fetal antigen, GPC3. Our results showed that GPC3 was expressed in tumor cells from 51.6% of ovarian clear cell carcinoma although other histotypes were not stained, GPC3 expression was observed in intracellular lesions as well as in the cell membrane, Furthermore, we showed that HLA-classI was expressed in tumor cells from 90% of ovarian clear cell carcinoma. We showed the validity of GPC3 peptide immunotherapy. We started a phase II clinical trial of the GPC3 derived peptide vaccine for ovarian clear cell adenocarcinoma patients

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：婦人科腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：癌幹細胞、免疫療法、CD133、Glypican-3、卵巣癌

### 1. 研究開始当初の背景

婦人科がん、中でも卵巣がん患者の死亡数は年々増加している。進行・再発卵巣がんの治療は化学療法が中心であり、抗がん剤耐性症例の予後は極めて不良である。近年、がん細胞集団の中に階層性があり、がん幹細胞が存在しており、がんの進展・再発・転移に深く関与することが示されている。抗がん剤や放射線療法などの治療後の再発やそれらの治療に対するがん幹細胞の耐性への関与が推測されている。また、再発・再燃卵巣がんの治療では患者のQOL (Quality of Life) を重視した治療が望まれている。一方で、免疫療法はがんの第4の治療法として期待されているが、まだ標準治療としては確立されておらず、科学的根拠に基づいたがん免疫療法の開発が必要な現状である。しかし、既存の化学療法や放射線療法に抵抗性である生き残ったがん幹細胞を標的とした新規治療法のひとつとしてがん免疫療法は可能性を秘めている。抗原特異的能動免疫療法には、がん抗原由来のペプチド、蛋白、DNA 等をアジュバントとともに投与し、体内で抗原提示細胞を感作し、エフェクター細胞である細胞傷害性T細胞 (CTL) やヘルパーT細胞を活性化、増殖させるワクチン療法と、体外で患者由来の抗原提示細胞である樹状細胞を培養し、がん抗原を感作した後、体内へ戻す抗原感作樹状細胞療法がある。現在までに、様々ながん拒絶抗原およびペプチドが同定され、臨床試験が世界中で行われている。国内では、抗原特異的能動免疫療法の中でもペプチドワクチン療法が精力的に研究され、様々な施設から有効例の報告が散見される。これらの背景をふまえて、今回我々は、難治性婦人科がんに対し、がん幹細胞をターゲットとしたがん免疫療法の開発を指向した。

### 2. 研究の目的

本研究での第一義の目的は、婦人科悪性腫瘍においてがん幹細胞の研究から特異抗原を同定し、それを標的とするペ

チドワクチン療法を中心としたがん免疫療法構築のための基礎的評価、研究を行うことである。具体的な研究目的は以下の三項目に焦点を置き検討を行った。

- (1) 卵巣がんに対するペプチドワクチン療法の確立
- (2) がん幹細胞をターゲットとした細胞特異抗原の同定
- (3) がん幹細胞ニッチの同定および免疫回避機構に関する検討

### 3. 研究の方法

(1): 卵巣がんに対するペプチドワクチン療法の確立—GPC3 ペプチドワクチン療法—

①腫瘍抗原としての GPC-3 および HLA 等免疫関連分子の発現の検討

手術あるいは生検等で得られた腫瘍組織において免疫組織染色を行い発現の有無や細胞内分布を調べる。もしくは RT-PCR を行い、発現している遺伝子の種類と程度を検索する。さらに腫瘍組織の一部は酵素にて個々の細胞にほぐし、将来 CTL の標的細胞や抗原提示細胞として使用が出来るように凍結保存する。また可能であれば腫瘍組織から primary culture によって、腫瘍細胞株の樹立を試み、同様な目的のため保存する。

②エピトープペプチドによる CTL の誘導能及び細胞傷害性の検討と CTL の誘導  
エピトープペプチドを抗原提示細胞の認識に働く、樹状細胞または自己活性化 B 細胞にパルスし、CD8 陽性細胞から CTL が誘導可能か検討する。また誘導した CTL が腫瘍細胞で実際に発現している腫瘍抗原を認識し、傷害できるかを検討する。これには腫瘍細胞株を主に用いるが、拘束性 HLA を発現していない場合は、HLA 遺伝子を導入して検討する。

難治性卵巣がんに対する GPC3 ペプチドワクチン療法

③研究協力機関である国立がんセンター東病院から GPC3 ペプチドワクチンの供与を受け、臨床第 II 相試験として難治性卵巣がんに対する GPC3 ペプチドワクチ

ン療法を平成 22 年度中にも実施する。

(2): がん幹細胞をターゲットとした細胞特異抗原の同定

①表面マーカーによる婦人科がん幹細胞候補の選定

我々は卵黄嚢腫瘍におけるがん幹細胞の同定およびその解明について CD133 をがん幹細胞分離の表面マーカーとして用いて研究してきた。CD133 のみで十分ながん幹細胞マーカーとは我々は考えていないため、その同定純度を上げるために固形がん幹細胞の表面抗原として報告のある CD44、CD24、CD19、CD90、CD150、Sca-1、血管内皮細胞の表面抗原である Flk-1、Flt-1、CD31、CD105、CD144 などをおよび組み合わせて検討することによりがん幹細胞仮説の概念により近い細胞群の同定を試みる。婦人科悪性腫瘍細胞株におけるこれら表面マーカーの発現頻度を確認した後、陽性および陰性細胞群に分取して細胞機能実験、腫瘍形成能を評価していく。

② Spheroid 形成による婦人科がん幹細胞同定の試み

表面マーカーを用いる以外のがん幹細胞分離方法として、3 次元培養プレートをを用いた Spheroid 形成による分離について検討する。我々の卵黄嚢腫瘍における検討や他がん種における報告でも CD133 陽性細胞を一度分取しても、通常の 2 次元培養下では陽性細胞比率を高く維持し続けられず、時間経過とともに分取前の発現頻度に戻っていく。そのため、medium などの培養条件の工夫や 3 次元培養法などで Spheroid 形成をすることによって表面マーカーでの分離と相補的にがん幹細胞同定のための実験を行っていく。

③ CD133 由来のがん拒絶抗原ペプチド同定

我々は、日本人の 60% が所有する HLA-A24 と、40% が所有する HLA-A2 に着目した。日本人では、85% がこれらの HLA のいずれかを有しており、また欧米白人でも HLA-A2 は最も頻度の高い HLA クラス I 遺伝子である。まず、ヒト HLA-A24 結合ペプチドと同様の性質をもつペプチドを結合するマウス H-2K<sup>d</sup> 分子を発現する BALB/c マウス、ならびに HLA-A2 を発現するトランスジェニックマウス (HLA-A2Tgm) を用いて、H-2K<sup>d</sup> (≡ HLA-A24) あるいは HLA-A2 分子に結合して CD133 陽性がん細胞を破壊するマウス CTL を誘導できる、CD133 由来のがん拒絶抗原ペプチドを同定する。その後、各ペプチドに特異的な CTL の誘導の有無を ELISPOT 法により検討する。

(3): がん幹細胞ニッチの同定および免疫回避機構に関する検討

① 腹膜中皮細胞は卵巣がん幹細胞のニッチであるかの検討

まず In vitro において CD133 の発現が確認されている NOY1 および卵巣癌細胞株 OVCA3 細胞を幹細胞分離マーカー CD133 の陽性および陰性細胞に分離し、腹膜中皮細胞との共培養下にて、CD133 の発現維持能、コロニー形成能、マトリゲル浸潤能を検討し、腹膜中皮細胞との相互作用により癌幹細胞の機能が維持されるか否かの検討を行う。また、in vivo においても腹膜中皮細胞との共培養後の移植により移植率が増加するかの検討を行う

我々は CD133 陽性細胞に対するケモカインの関与に着目している。腹膜中皮細胞からは CXCR4 の基質である SDF-1 が高濃度に分泌されていることも確認しており SDF-1-CXCR4 シグナルが卵巣がん幹細胞ニッチに結びつく際に働いているといことを証明するために CXCR4 中和抗体、12G5 による CD133 の発現維持能、コロニー形成能、マトリゲル浸潤能の抑制効果についても検討を予定する。

② 腹膜中皮細胞性ニッチによるがん幹細胞免疫回避機構への関与の検討

腹膜中皮細胞性ニッチ-がん幹細胞間のサイトカイン、増殖因子 (TGF- $\beta$ 、VEGF, stem cell factor, FGF など)、ケモカイン (SDF-1 など)、接着分子 (カドヘリン、 $\alpha$ -カテニンなど)、細胞外マトリックス (フィブロネクチン、ヒアルロン酸など) などのシグナルを各種中和抗体、siRNA などの抑制系の併用により各種抗がん剤耐性の変化とアポトーシス関連蛋白の発現を検討する。

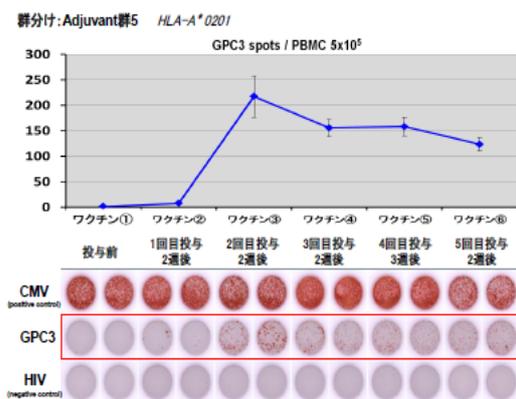
#### 4. 研究成果

(1): 卵巣がんに対するペプチドワクチン療法の確立—GPC3 ペプチドワクチン療法—

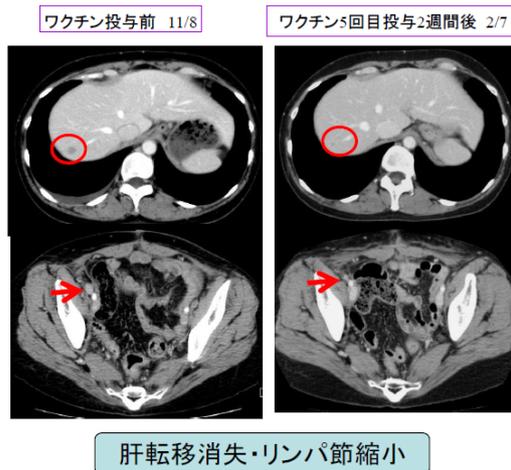
卵巣明細胞腺癌に対する HLA-A24 および A2 結合性 GPC3 由来ペプチドワクチン療法の臨床第 II 相試験を行い、免疫学的モニタリングおよび臨床経過から、その有用性および安全性を評価した。また、本臨床試験に参加した HLA-A2402 陽性患者の末梢血単核球 (PBMC) から GPC3 ペプチド特異的 CTL のクローン樹立を試みた。卵巣明細胞腺癌患者のうち、①初回治療終了後、臨床的寛解が得られている寛解群、②初回治療後の残存腫瘍に対して Second-line 化学療法を予定されている非寛解群、③今後化学療法施行予定のない再発・進行群の 3 群を対象とした。投与スケジュールは初回から 6 回投与までが 2 週毎、7 回目以降は 6 週毎ワクチン

投与した。2012年10月末までに23症例に投与し、そのうち18例(寛解群13例、化学療法併用群1例および進行群5例)における効果判定と免疫学的モニタリングを行った。また、HLA-A\*2402陽性であった進行群患者2名のワクチン投与後PBMCをGPC3ペプチドとIL-2およびIL-15で刺激し、GPC3ペプチド特異的CTLの誘導を試みた。GPC3-Dextramer陽性CD8陽性細胞をシングルセルソートし、CTLクローンを作製した。CTLクローンの機能解析として、GPC3-Dextramer解析およびIFN- $\gamma$  ELISPOT assayを行った。なお、本研究において、臨床試験や臨床検体を用いた研究は施設の倫理審査委員会に申請し承認を得た。2012年10月末時点で、寛解群の平均観察期間は14.6か月であり、全例で再発は認めていない。進行群6例中1例でPRの臨床効果(肝転移、傍大動脈および右外腸骨リンパ節転移の縮小あり、新規病変なし)を認めた。Ex vivo IFN- $\gamma$  ELISPOT アッセイを用いた免疫学的モニタリングにて18例全例でGPC3特異的CTLが末梢血中に増加した(図1)。

卵巣明細胞腺がんGPC3ペプチドワクチン投与患者のGPC3特異的CTLの検出例

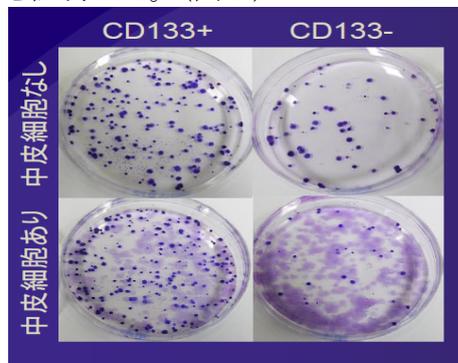


ペプチド特異的CTL誘導ではそれぞれの患者PBMCから12個および10個のクローンが樹立された。CTLクローンはすべてDextramer解析で、GPC3デキストラマー陽性のGPC3ペプチド特異的CD8陽性キラーT細胞であり、GPC3ペプチドをパルスした標的細胞に対してIFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイにおいても明らかなGPC3ペプチド特異性が認められた。本臨床試験において卵巣明細胞腺がん患者におけるGPC3ペプチドワクチンの免疫学的効果が認められ、臨床的にも安全性が確認できつつある。進行群9例中2例において奏功を認めた。ここにペプチドワクチン7回目の投与後により肝転移が消失した症例におけるCT画像をお示しする(図2)。



(2): がん幹細胞をターゲットとした細胞特異抗原の同定  
NOY1におけるCD133の発現を検討し、セルソーティングによりCD133陽性細胞と陰性細胞に分離を行い、ヌードマウスにおける腫瘍形成能を比較検討し、CD133陽性細胞において有意に腫瘍形成能の亢進を認め、CD133陽性細胞がこれらの細胞において癌幹細胞として妥当であることを証明した。さらに、セルソーティングによりCD133陽性細胞、陰性細胞をそれぞれ分取し、マイクロアレイ解析を行い、CD133陽性細胞で発現増強している遺伝子群を同定し、新たな免疫療法のターゲットとなる抗原の探索を行い、CXCR-4などががん幹細胞高発現因子の同定を行った。

(3): がん幹細胞ニッチの同定および免疫回避機構に関する検討  
我々はCD133陽性および陰性細胞と腹膜中皮細胞との共培養の結果から、腹膜中皮細胞はCD133発現維持に関与するとともに、CD133陽性細胞においてのみ、コロニー形成能、腹膜浸潤能を亢進し、がん幹細胞ニッチとしての機能をもつことを証明した。(図3)



さらに我々はCD133陽性細胞においてCXCR4の発現が亢進していることを確認

し、CXCR4 中和抗体投与したところ腹膜中皮細胞によって促進した、CD133 陽性細胞のコロニー形成能、腹膜浸潤能は抑制され、ヌードマウスを用いた腹膜播種モデルにおいても CD133 陽性細胞の腹膜播種を抑制した。

#### 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 5 件)

1) Mitsui H, Shibata K, Suzuki S, Umezu T, Mizuno M, Kajiyama H, Kikkawa F. Functional interaction between peritoneal mesothelial cells and stem cells of ovarian yolk sac tumor in peritoneal dissemination. *Gynecol Oncol.* 124(2):303-10.2012.

2) Hirose T, Torikai H, Yanagisawa M, Kamei M, Imahashi N, Demachi-Okamura A, Tanimoto M, Shiraiishi K, Ito M, Miyamura K, Shibata K, Kikkawa F, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K, Akatsuka Y. Mismatched human leukocyte antigen class II-restricted CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells may mediate selective graft-versus-leukemia effects following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Sci.* 102(7):1281-1286, 2011.

3) Yoshikawa T, Suzuki S, Shirakawa H, Nobuoka D, Motomura Y, Tanaka Y, Nakatsura T. HLA-2-restricted glypican-3 peptide-specific CTL clones induced by peptide vaccine show high avidity and antigen-specific killing activity against tumor cells. *Cancer Sci.* 102(5):918-25. 2011

4) Suzuki S, Yoshikawa T, Hirose T, Shibata K, Kikkawa F, Akatsuka Y, Nakatsura T. Glypican-3 could be an effective target for immunootherapy combined with chemotherapy against ovarian clearcell carcinoma. *Cancer Sci.* 102(9):1622-9.2011

5) Suzuki S, Terauchi M, kajiyama H, Shibata K, Kikkawa F. Identification and characterization of cancer stem cells in ovarian yolk sac tumors. *Cancer Science* 101(10):2179-85. 2010.

[学会発表] (計 5 件)

1) 鈴木史朗、柴田清住、吉川聡明、中面哲也、吉川史隆、卵巣明細胞腺癌に対するGPC3ペプチドワクチン療法における免疫モニタリングおよびGPC3ペプチド特異的CTLの誘導、第71回日本癌学会、札幌、2012年9月20日、ロイトン札幌

2) 柴田清住、吉川史隆 婦人科癌に対する特異的癌免疫療法—明細胞腺癌を対象としたGPC3特異的ペプチドワクチン療法の第I, II相臨床試験 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月5日、名古屋国際会議場

3) 鈴木史朗、吉川聡明、廣澤友也、柴田清住、吉川史隆、中面哲也 卵巣明細胞腺癌に対するGPC3由来ペプチドワクチン療法の可能性 第70回日本癌学会学術総会、名古屋 2011年10月5日、名古屋国際会議場

4) 近藤紳司、岡村文子、牧寛之、Rong Zhang、植村靖史、藤田貢、山本英子、柴田清住、吉川史隆、葛島清隆 内因性HLAの発現を抑制し目的のHLA-A24を発現する人工抗原を用いた卵巣がんを傷害するCTLの誘導 第70回日本癌学会学術総会、名古屋 2011年10月4日、名古屋国際会議場

5) 松村寛子、柴田清住、梅津朋和、梶山広明、那波明宏、吉川史隆 卵巣がん幹細胞と腹膜中皮細胞の相互作用 第48回日本婦人科腫瘍学会、筑波 2010年7月8日、つくば国際会議場

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

吉川 史隆 ( Kikkawa Fumitaka )  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：40224985

##### (2) 研究分担者

柴田 清住 ( Shibata Kiyosumi )  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：90335026

梶山 広明 ( Kajiyama Hiroaki )  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：00345886

中面 哲也 ( Nakatsura Tetsuya )  
国立がんセンター・東病院臨床開発センター・室長  
研究者番号：30343354

那波 明宏 ( Nawa Akihiro )  
愛媛大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：9024285

##### (3) 連携研究者

なし