

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592041

研究課題名(和文)胆道癌幹細胞を標的とした癌ペプチドワクチン療法の開発

研究課題名(英文)Development of cancer peptide vaccine for biliary tract cancer stem cells

研究代表者

有賀 淳 (ARUGA, Atsushi)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：40221056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：胆道癌は早期発見が困難であり、未だ有効な治療法の少ない、極めて予後不良な疾患である。さらに、ヒトの癌治療において真に有効な治療効果を得るためには癌幹細胞を標的とした治療が重要であることが示唆されている。今回、胆道癌に対する新しい治療法として、胆道癌幹細胞特異抗原を標的とした癌治療ワクチンの開発を目指して、ヒト胆道癌幹細胞特異抗原の同定を試みた。その結果、胆道癌幹細胞特異抗原候補としてLY6K, GPC3, WT1, WDR16, CDH3, MUC1の6抗原が同定された。これより胆道癌に対する癌治療ワクチン開発がさらなる進展を遂げることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Biliary tract cancer (BTC) is known as a poor-prognosis disease because it is difficult to diagnose in early stage and there are few effective treatments. Furthermore, it has been suggested that the treatment for cancer stem cell should be important to obtain the true efficacy in human cancer therapy. The object of this research is to identify cancer stem cell-specific antigens for the development of therapeutic cancer vaccine for biliary tract cancer. In this study, we could identify 6 antigens as biliary tract cancer stem cell-specific antigen candidates, LY6K, GPC3, WT1, WDR16, CDH3, and MUC1. It is expected that this results will bring a bright future to develop the therapeutic cancer vaccine for biliary tract cancer.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：癌ペプチドワクチン 胆道癌 癌幹細胞 免疫療法 癌抗原

1. 研究開始当初の背景

胆道癌は早期発見が困難であり、未だ有効な治療法の少ない、極めて予後不良な疾患である。根治的治療は外科手術のみとされており、効果的な抗癌剤も少なく、新しい治療法の開発が急務とされている。近年、癌治療の新しい選択肢として癌免疫療法が研究されており、そのひとつとして癌特異抗原を標的とした癌治療ワクチンの臨床開発が進められている。我々も胆道癌に対する癌治療ワクチンの開発を目指して、自己腫瘍抗原もしくは人工合成抗原をパルスした樹状細胞ワクチンや癌特異抗原のアミノ酸配列を基に人工合成したペプチドワクチンの開発を目指して、臨床試験を実施している。最近の研究より、組織再生に重要とされる幹細胞の発見と機能解析が進められ、癌組織にも癌幹細胞が存在することが報告されている。ヒトの癌治療において真に有効な治療効果を得るためには癌幹細胞を標的とした治療が重要であることが示唆されており、様々な試みが研究されている。しかし、癌幹細胞は化学療法や放射線治療に抵抗性が高く、有効な治療手段は未だ確立されていない。そのような現状において、癌免疫療法、特に癌幹細胞特異抗原を標的とした癌治療ワクチンは癌幹細胞に対する新しい治療法としてその可能性が期待されるひとつと考えられている。

2. 研究の目的

ヒト胆道癌に発現する胆道癌特異抗原を検索し、その中でも特に胆道癌幹細胞に高率に高発現する胆道癌幹細胞特異抗原を同定して、胆道癌幹細胞特異抗原のアミノ酸配列を基に人工合成したペプチドワクチンの新規開発を目指して本研究を立案実施した。

3. 研究の方法

(1)ヒト培養胆道癌細胞の準備：ヒト胆道癌における癌抗原及び胆道癌幹細胞における癌幹細胞特異抗原を検索するために、ヒト胆管癌培養細胞株 IsCC 及び NaCC とヒト胆嚢癌培養細胞株 AG を用いて本研究を実施した。対象疾患の培養癌細胞として、ヒト肺癌細胞株 A549 及び 11-18、ヒト肝癌細胞株 huH7 及び huH2 を使用した。

(2)培養癌細胞における癌幹細胞特異分子の発現解析：ヒト癌幹細胞に特異的に発現する分子としてすでに報告されている CD13, CD24, CD44, CD90, CD133, CD166, CD326 分子の発現を解析した。また、新規癌幹細胞特異分子として最近報告された LGR5, ABCG2, ALDH1A1, TIM-3, Galectin3, CD109, CD274 分子の発現解析も検討した。それぞれの培養癌細胞における癌幹細胞特異分子の発現は各分子に特異的なモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー検査によりフローサイトメーター (BD FACSCalibur; BD Biosciences)にて解析し

た。

(3)培養癌細胞からの癌幹細胞分画の選択的分離採取：それぞれの培養癌細胞全体から癌幹細胞特異分子に対するモノクローナル抗体結合マイクロビーズ (MACS MicroBeads Kit; Miltenyi Biotec)を利用して、各癌幹細胞特異分子を発現する細胞分画の分離採取を行った。マイクロビーズ結合抗体と結合した癌細胞を磁気を利用した細胞分離装置にて分離し (MACS Separation Unit; Miltenyi Biotec)、癌幹細胞特異分子陽性細胞分画及び癌幹細胞特異分子陰性細胞分画をそれぞれ採取した。

(4)癌幹細胞特異分子陽性細胞分画及び癌幹細胞特異分子陰性細胞分画におけるヒト胆道癌抗原の発現解析：培養癌細胞中の癌幹細胞特異分子陽性細胞分画における胆道癌抗原の発現を解析するために、ヒト胆道癌の癌抗原として報告されている Nuf2 (CDCA1), CDH3, KIF20A, KIF20B (MPHOSPH1), IGF2BP3 (KOC1), HJURP, MELK, FOXM1, LY6K (URLC10), DEPDC1, WDR16, GPC3, MUC1, WT1 の 14 種類を選択し、それぞれの抗原遺伝子に対する realtime PCR 用のプライマーを作成した (TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems)。準備した各種培養癌細胞において、分離前の全細胞分画 各癌幹細胞特異分子陽性細胞分画 各癌幹細胞特異分子陰性細胞分画のそれぞれの分画の細胞から total RNA を抽出し (RNeasy Kit, QIAGEN)、cDNA を作成して (High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix)、realtime PCR にて上記 14 種類の胆道癌抗原遺伝子の発現を解析した。Housekeeping gene として Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene を使用し、mRNA の発現量を比較解析した。

(5)ヒト胆道癌切除組織における癌幹細胞特異抗原の発現解析：外科的に切除されたヒト胆道癌組織標本における胆道癌幹細胞特異抗原の発現を検討するために、倫理委員会にて承認を得たプロトコールに沿って個人情報と連結不可能匿名化した肝内胆管癌 11 切除組織を酵素処理にて単細胞に分離した後 total RNA を抽出し、cDNA を作成して realtime PCR を施行して胆道癌特異抗原遺伝子、胆道癌幹細胞特異抗原遺伝子の発現を比較解析した。

(6)ストレス負荷におけるヒト胆道癌特異抗原、胆道癌幹細胞特異抗原の発現増強解析：癌特異抗原を標的とした癌ワクチンなどの免疫治療では癌細胞における癌特異抗原の発現の強さが免疫応答の強さに関連することが推測されている。胆道癌、胆道癌幹細胞における癌特異抗原の発現増強効果を検討

するために、各培養癌細胞に heat shock を加えて経時的に癌特異抗原遺伝子の発現強度を解析した。37、5%CO₂ 条件下にて培養した各培養癌細胞を 加温前、42、5%CO₂ 条件下にて 1 時間加温培養した直後、加温後に 37、5%CO₂ 条件下にて 1 日培養後、に採取して各癌細胞の total RNA を抽出し、cDNA を作成して realtime PCR にて癌特異抗原遺伝子の発現を比較解析した。

(7) 培養胆道癌細胞の初期化と癌幹細胞特異抗原の発現解析：癌特異抗原は細胞の初期化段階で発現が亢進している遺伝子群の一部とも考えられている。今回、同定された胆道癌幹細胞特異抗原候補が癌細胞の初期化と関連しているのかを検討するために、培養胆道癌細胞を初期化して癌幹細胞特異抗原の発現を解析した。ヒトの成熟分化した体細胞から iPS 細胞を作成可能な因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28)の発現用プラスミドを培養胆道癌細胞にエレクトロポレーションにて遺伝子導入し(Nucleofector, LONZA)、胆道癌幹細胞特異抗原の発現の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト培養癌細胞における癌幹細胞特異分子の発現解析：ヒト胆管癌 IsCC では検索した癌幹細胞特異分子のうち、CD24, CD44, CD166, CD326 分子が多く癌細胞で陽性であったが、CD13, CD90, CD133 分子は一部の癌細胞のみで発現が陽性であった。ヒト胆管癌 NaCC では CD13, CD44, CD166 分子の発現をほとんどの癌細胞に認め、CD24, CD90, CD133, CD326 分子の発現はほとんど認めなかった。ヒト肺癌 A549 では CD44, CD326 分子がほとんどの癌細胞で発現を認め、CD13 分子の発現が一部で認められた。ヒト肝癌 huH2 では CD13, CD326 分子がほとんどの癌細胞に、CD44, CD133 分子が一部の癌細胞に発現を認めた。huH7 では CD24, CD133, CD166, CD326 分子の発現がほとんどの細胞で認められ、CD13, CD44 分子の発現はほとんど認められなかった。以上のようにそれぞれの培養癌細胞において癌幹細胞特異分子の発現が確認され、それらの分子陽性細胞分画に癌幹細胞が存在する可能性が推測された。しかし、各培養癌細胞で癌幹細胞特異分子の発現には差異を認め、個々の培養癌細胞ごとにはばらつきが認められた。

(2) 培養癌細胞からの癌幹細胞分画の選択的分離採取：マイクロビーズを結合させた癌幹細胞特異分子に対するモノクローナル抗体を培養癌細胞に添加した後に磁気細胞分離ユニットを使用して、それぞれの癌幹細胞特異分子が陽性である細胞分画と陰性の細胞分画を分離採取することが可能であった。分離採取した細胞分画ではそれぞれが 80% 以

上の純度にて分離採取することが可能であった。

(3) 癌幹細胞特異分子陽性細胞分画及び癌幹細胞特異分子陰性細胞分画におけるヒト胆道癌抗原の発現解析：ヒト胆管癌 IsCC を使用した解析では CD90 分子陽性細胞分画では CD90 陰性細胞分画と比較して WDR16, LY6K, WT1, GPC3 の癌抗原遺伝子発現の増強が認められた。CD44 分子陽性細胞分画では LY6K と GPC3 の遺伝子発現増強が、CD326 分子陽性細胞分画では WDR16, CDH3, MUC1, GPC3 遺伝子発現の増強がそれぞれの分子陰性細胞分画と比較して著明であった。ヒト胆管癌 NaCC の CD44, CD133, CD326 分子陽性分画ではいずれも MUC1, WT1, GPC3, CDH3 の遺伝子発現が増強していた。以上の結果より、胆道癌特異抗原として報告のある癌抗原の中で、WDR16, LY6K, WT1, GPC3, CDH3, MUC1 の 6 つの癌特異抗原が癌幹細胞で特に増強を認める癌幹細胞特異抗原候補として同定された。これに対してヒト肺癌 A549 の CD133 分子陽性分画では KIF20B, IGF2B3(KOC1), CDH3, MUC1 の抗原遺伝子発現が顕著であり、ヒト肝癌 huH2 の CD133 分子陽性分画では WDR16, MUC1, WT1 の発現増強が、CD44 分子陽性分画では CDH3, LY6K, WDR16 が、ヒト肝癌 huH7 の CD44 分子陽性分画では WDR16, CDH3, MUC1, GPC3 の遺伝子発現増強が認められた。以上のように、癌幹細胞特異抗原は癌の原発臓器の差異によって癌幹細胞特異抗原発現も異なることが示唆された。

(4) ヒト胆道癌切除組織における癌幹細胞特異抗原の発現解析：ヒト胆道癌切除組織から得られた癌細胞における癌幹細胞特異抗原解析の結果より、WDR16 が 4 例に、LY6K が 4 例に、WT1 が 2 例に、GPC3 が 1 例に、CDH3 が 3 例に、MUC1 が 4 例に癌幹細胞特異抗原遺伝子の強発現が確認された。なお、全 11 例における癌特異抗原の発現解析では平均的に今回の検討で癌幹細胞特異抗原候補とならなかった DEPDC1 の発現が最も顕著であった。以上の 11 例における癌幹細胞特異抗原遺伝子の発現には個体差が認められたことより、個々の癌細胞における癌幹細胞特異抗原を検索して使用するワクチンの個別化が可能であり、重要であることが考えられた。なお今回、資料を非連結匿名化としたため、癌幹細胞特異抗原遺伝子の発現と予後や転移、病態との関連は不明である。

(5) ストレス負荷におけるヒト胆道癌特異抗原、胆道癌幹細胞特異抗原の発現増強解析：ヒト胆管癌 IsCC に 42 で 1 時間の heat shock を加えた場合、heat shock 直後 WDR16 遺伝子発現の増強が確認され、さらに heat shock の 1 日後では HJURP,

DEPDC1, KIF20A, CDH3 の遺伝子発現の増強が確認された。これより、WDR16 や CDH3 などの癌幹細胞特異分子を標的とした癌治療ワクチンの投与時に hyperthermia 等を併用して癌細胞に heat shock を与えることで、癌幹細胞特異抗原の発現を増強させ、免疫応答及び治療効果を強めることが期待されることが考えられた。

(6)培養胆道癌細胞の初期化と癌幹細胞特異抗原の発現解析：

ヒト胆管癌 IsCC に細胞初期化遺伝子 ((OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28) の発現用プラスミドをエレクトロポレーションにて遺伝子導入した場合、癌幹細胞特異抗原候補の LY6K, GPC3, WT1 が著明に増強した一方で、WDR16, CDH3, IGF2BP3 の遺伝子発現は減弱が認められた。以上のように半数の癌幹細胞特異抗原の遺伝子発現は癌細胞の初期化誘導により増強することが確認されたが、反対に遺伝子発現が減弱する抗原も存在することも確認された。

(7)今後の展望：今回、解析が可能であった癌幹細胞特異分子の CD13, CD24, CD44, CD90, CD133, CD166, CD326 分子以外に、最近、LGR5, ABCG2, ALDH1A1, TIM-3, Galectin3, CD109, CD274 などが新たな癌幹細胞マーカーとして報告されているため、今後、これらの新規分子を発現する胆道癌細胞分画における癌幹細胞特異抗原の発現解析を進めていく予定である。また、癌幹細胞特異抗原として最近他施設より報告された Or7c1, SMCP, BORIS, ASB4, FAM83B などの胆道癌幹細胞における発現解析も興味深い。

今回の研究結果より、培養胆道癌の癌幹細胞特異分子陽性細胞分画に高率に高度に発現する癌抗原として LY6K, GPC3, WT1, WDR16, CDH3, MUC1 の 6 抗原が同定され、胆道癌幹細胞特異抗原の候補として考えられた。このうち、WDR16 と CDH3 は heat shock などのストレス負荷で遺伝子発現が増強することがわかり、また LY6K, GPC3, WT1 は癌細胞の初期化誘導にて遺伝子発現が増強することがわかった。これらの癌幹細胞特異抗原遺伝子のアミノ酸配列をもとに HLA に結合可能なペプチドワクチンの合成が可能であり、胆道癌幹細胞を標的とした癌ペプチドワクチンの開発が可能と考えられる。また抗原タンパクを取り込ませた樹状細胞ワクチンの開発も考えられる。

本研究結果をもとに、新たに胆道癌幹細胞特異分子を標的とした癌治療ワクチンの開発研究がさらなる進展を遂げることが強く期待される。

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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

有賀 淳 (ARUGA, Atsushi)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：40221056

(4)研究協力者

軽部 裕代 (KARUBE, Hiroyo)
小林 肇 (KOBAYASHI, Hajime)
高源 ゆみ (KOGEN, Yumi)