

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462344

研究課題名(和文) ヒト肉腫幹細胞特異抗原に対する分子免疫応答制御

研究課題名(英文) Immune response against sarcoma stem-like cell antigen.

## 研究代表者

塚原 智英 (TSUKAHARA, Tomohide)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：20404634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨悪性線維性組織球腫(MFH)より樹立した細胞株MFH2003より肉腫幹細胞(SSC)を分離してSSC特異的な自家CTLクローンTc 4c-6を誘導し、T細胞受容体(TCR) cDNAをクローニングした。そしてTCR cDNA(A5B, A7B)をTCR欠損58 - 細胞(58A5B, 58A7B)に移植した。58A7BがSSCをわずかに認識した。続いて NFAT-luciferase導入細胞株(Jrk/MA)にA7Bを導入し、より高くTCRを発現する株(J-A7B)を樹立した。現在J-A7Bの拘束HLAを決定している。これらの成果は自家CTLに認識される肉腫幹細胞抗原の同定に有用である。

研究成果の概要(英文)：We isolated sarcoma stem-like cells (SSC) from the malignant fibrous histiocytoma cell line, MFH2003. After autologous PBMC was stimulated with SSC, we established CTL clone Tc4c-6 recognizing SSC in the context of HLA class I. Next, we isolated cDNA of T cell receptor (TCR) alpha (A) & beta (B) chains. Two TCRA genes were isolated (A5 and A7). Each cDNA of TCRA5B and TCRA7B was transfected into 58a-b- cells lacking TCR (58A5B and 58A7B). 58A7B cells could specifically recognize SSCs, however, the response was weak. Next, we transfected TCRA7B into the Jurkat cell line expressing NFAT-luciferase (Jrt/MA). The resultant cell line (J-A7B) recognized autologous SSCs but not non-SSCs. Moreover, J-A7B also recognized allogeneic osteosarcoma cell line KIKU in the context of HLA class I. Now we are trying to determine the HLA class I allele that presents the CTL epitope peptide derived from SSC antigen. These findings are useful for cDNA expression cloning of autologous CTL-defined SSC antigen.

研究分野：骨軟部腫瘍学・腫瘍免疫学・癌幹細胞

キーワード：sarcoma stem cell CTL clone immunotherapy

### 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫に代表される高悪性度骨軟部悪性腫瘍は予後不良であり、新しい治療法が強く求められている。我々は骨肉腫抗原を標的としたペプチドワクチンを目指した研究を行ってきた。まず骨肉腫細胞株と自家 CTL クロウンを樹立し、cDNA ライブラリ発現クローニング法により世界で初めての骨肉腫抗原 PBF を同定した。PBF は Zn finger domain を持つ転写調節因子であり、結合蛋白 Scythe/BAT3 と共に骨肉腫細胞のアポトーシスを制御している。PBF mRNA の発現は骨軟部肉腫の 80% で見られ、上皮系癌でも 70% に発現が見られた。また骨軟部肉腫パラフィン包埋切片における PBF の発現を免疫染色で解析したところ、PBF 蛋白は約 80% で発現が見られた。また PBF 陽性の骨肉腫患者の予後は、PBF 陰性患者に比べて有意に不良であった。以上より、PBF は予後不良骨肉腫患者における治療標的分子となり得ると考えた。そこで我々は HLA-A24 及び HLA-A2 拘束性 PBF ペプチドの一次構造を設計し、これらのペプチド(PBF A24.2, PBF A2.2)に対する骨肉腫患者の免疫応答を詳細に解析した。その結果、患者末梢血における PBF A24.2 および PBF A2.2 ペプチド特異的細胞傷害性 T リンパ球(CTL)の存在頻度はそれぞれ平均  $3 \times 10^{-6}$ 、 $2 \times 10^{-6}$  であった。これは代表的なメラノーマ抗原 MAGE3.A1 特異的 CTL の存在頻度 ( $10^{-7}$  以下)と比べて同等の結果であった。そして HLA-A24/PBF A24.2 及び HLA-A2/PBF A2.2 ペプチドテトラマー特異的 CTL クロウンを作製してその機能を解析した。現在、これらのペプチドを用いた骨肉腫患者に対すペプチドワクチン療法第 1 相臨床試験を行っている。しかし、ペプチドワクチンの効果をより高めるためには、さらなる新規腫瘍抗原の探索が必要であると考えている。

### 2. 研究の目的

自家 CTL クロウンに認識される肉腫幹細胞抗原の同定: 癌幹細胞は自己複製能、分化能、造腫瘍能を持つ細胞と定義されている。また癌幹細胞は化学療法および放射線療法に耐性であり、癌の再発・転移を引き起こすと考えられている。近年、白血病、乳癌や消化器癌など多くの腫瘍で癌幹細胞の存在と癌幹細胞マーカーが報告されており、癌幹細胞を標的とした治療戦略が注目されている。しかし骨軟部肉腫における癌幹細胞の解析をした報告は少なく、その免疫原性も明らかではない。今回我々は骨軟部肉腫癌幹細胞の免疫療法による制御を目指して、自家 CTL クロウンに認識される骨軟部肉腫癌幹細胞の同定を cDNA ライブラリ発現クローニング法で行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) Hoechst 染色を行った MFH2003 細胞より Side population および main population を FACS AriaII でソーティングして SP 細胞を分離した。

#### (2) SP 細胞特異的自家 CTL クロウンの樹立

MFH2003 の由来する患者より末梢血 50mL を採血し、比重遠心分離により末梢血単核球(PBMC)を得る。PBMC は MACS システムによって CD8 陽性細胞と CD8 陰性細胞に分離する。分離した SP 細胞 ( $1 \times 10^5$ ) および CD8 陰性細胞 ( $1 \times 10^6$ ) に放射線照射 (100Gy) を行い、CD8 陽性細胞 ( $5 \times 10^5$ ) と mixed lymphocyte-tumor cell culture (MLTC) を行い CO<sub>2</sub> インキュベーターで 37°C にて培養する。MLTC の 2 日後、IL-2 と 10% ヒト AB 血清を加える。1 週ごとに放射線照射 SP 細胞を用いた MLTC を計 4 回行う。そして得られた CD8 陽性細胞を限界希釈法により 96-well plate 4 枚に 1well 当たり 10, 3, 1, 0.3 個の割合で撒く。Feeder 細胞として放射線照射した他家 PBMC ( $1 \times 10^5$ /well) と LG-2 EBV 細胞 ( $2 \times 10^4$ /well) を加え、IL-2 (200U/mL)、PHA ( $5 \mu\text{g/mL}$ )、10% ヒト AB 血清含有 AIM-V にて培養した。

#### (3) SP 特異的 CTL クロウンの T 細胞受容体 $\alpha\beta$ 鎖のクローニング

Tc4c-6 より RNA を抽出して GeneRacer (Invitrogen) を用いて 5' RACE を行った。5' RACE-oligo RNA を 5' cap 構造を持つ mRNA に ligation して、oligo-dT プライマーを用いて逆転写することで full length cDNA を得た。5' RACE-oligo 配列を含むプライマーと T 細胞受容体 (TCR)  $\alpha$  鎖および  $\beta$  鎖の定常領域 (C $\alpha$ , C $\beta$ 1, C $\beta$ 2) 特異的プライマーを用いて、touch-down PCR および nested PCR を行い、PCR 産物をアガロース電気泳動で 900-1000bps のバンドとして分離し、ゲル精製することで TCR  $\alpha$  鎖 (TCRA) および  $\beta$  鎖 (TCRB) の cDNA を得た。得られた cDNA を TA クローニングベクター (pCR4) に subcloning してコンピテントセル (TOP10) を形質転換した。TCRA および TCRB より各 10 クロウンをシーケンシングして、TCRA および TCRB 可変領域の遺伝子配列を決定した。これらの配列をもとに必要な制限酵素認識部位を導入した人工遺伝子を作成し、すでに定常領域を含むベクター (pRSVhygro, pRSVneo) にクローニングした。

#### (4) 人工 CTL の樹立と反応性の検討

得られた TCRA および TCRB プラスミドを 58 $\alpha$ - $\beta$  T cell hybridoma に電気穿孔法を用いて遺伝子導入した。そしてレトロウイルスベクターを用いてヒト CD8  $\alpha\beta$  を遺伝子導入し、人工 CTL (58-A5B, 58-A7B) を得た。標的細胞に対する反応性を IL-2 ELISA で検討した。

#### (5) 新たな人工 CTL の樹立と反応性の検討

TCR 遺伝子 A7B を Powerexpression vector にサブクローニングして、CD8 および NFAT-luciferase を導入した Jurkat 細胞 (Jrt/MA) に遺伝子導入した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Side population 法による癌幹細胞の分離

我々は当教室で樹立した骨原発悪性線維性組織球腫 (MFH) 細胞株 (MFH2003) に薬剤耐性形質を示す side population (SP) 細胞が約 7% 含まれることを明らかにした。そして MFH2003 の SP 細胞は他の main population (MP) 細胞より *in vitro* および *in vivo* での造腫瘍能が高く、SP 細胞は癌幹細胞の cancer-initiating cell としての性質をもつと考えた。

##### (2) SP 細胞特異的自家 CTL クローンの樹立

SP 細胞特異的 CTL クローン Tc-4c6 を得た。Tc4c-6 は MFH2003 SP 細胞を MP 細胞より高く認識傷害した。また細胞傷害活性は HLA class I 拘束性を示した。

##### (3) SP 特異的 CTL クローンの T 細胞受容体 $\alpha\beta$ 鎖のクローニング

Tc-4c6 を発現クローニングに十分な数に増殖させることは困難であった。そのため Tc-4c6 より TCR  $\alpha\beta$  鎖をクローニングして人工 CTL を樹立した。Tc4c-6 は異なる 2 つの TCRA 配列 (A5 および A7) をもつ dual TCR CTL クローンであった。なお TCRB は単一のクローンであった。

##### (4) 人工 CTL の樹立と反応性の検討

2 種のいずれかの TCRA と 1 種の TCRB を発現させた 2 つの人工 CTL クローン (58-A5B, 58-A7B) を作成した。これらの人工 CTL クローンは CD3e を細胞表面に発現していた (図 1 上段左および中央)。これは TCRA および TCRB がヘテロ二量体を形成して細胞表面に提示されていることを示している。そして CD3e 抗体を用いた TCR 刺激により人工 CTL は IL-2 を多量に産生した (図 1 下段)。

次にレトロウイルスベクターによりヒト CD8  $\alpha\beta$  遺伝子を導入した人工 CTL は CD8 を高発現していた。続いて人工 CTL の腫瘍細胞に対する反応性を自家 MFH2003 および MFH2003 SP 細胞、MP 細胞、autologous EBV 細胞と反応させ、反応特異性をオリジナルの CTL クローン Tc-4c6 と比較した。人工 CTL クローン 58- $\alpha7\beta$  は MFH2003 および MFH2003 SP 細胞を特異的に認識した (図 2)。人工 CTL クローン 58- $\alpha7\beta$  は Tc-4c6 と同様の抗原認識特異性をもっていると考えられた。

しかしその反応性は弱く、今後の肉腫幹細胞抗原のクローニングに向けて、まず人工 CTL クローンの反応性の増強が課題と考えられた。

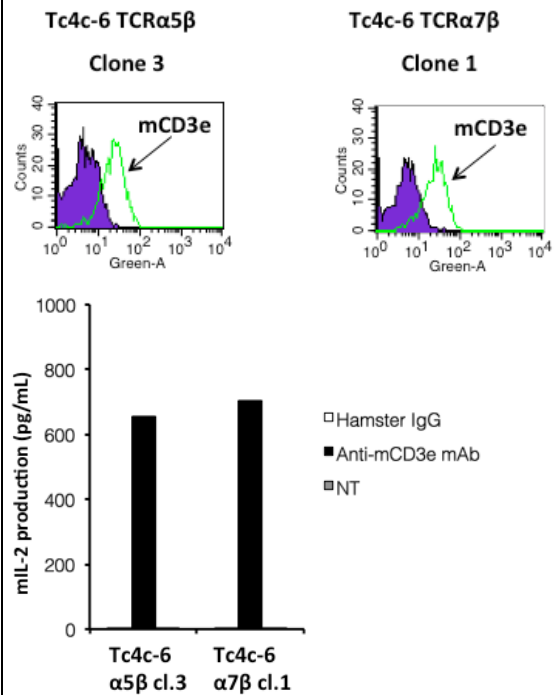


図 1. (上段)人工 CTL クローン 58-A5B および 58-A7B の樹立 (左, 右)。

人工 CTL クローンは mCD3e を表面に発現していた。(下段)人工 CTL クローンは mCD3e 抗体刺激により、特異的に IL-2 を産生した。

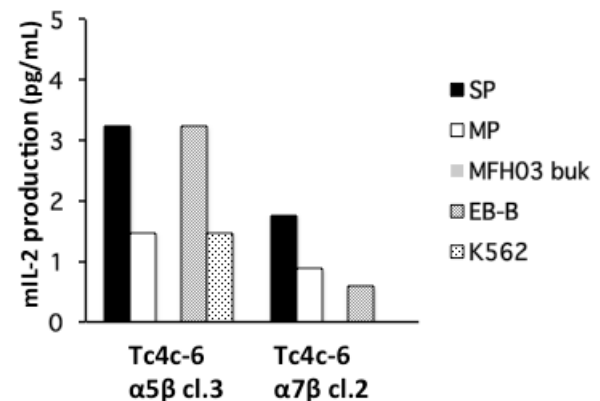


図 2. 人工 CTL クローンの自家細胞株に対する反応性。人工 CTL クローン 58-A7B は自家 SP 細胞を特異的に認識した。

(5) 新たな人工 CTL の樹立と反応性の検討  
TCR 遺伝子 A7B を Jrt/MA 細胞に遺伝子導入した J-A7B は 58-A7B より高く TCR を発現した。そして J-A7B は自家 SSC を特異的に認識した。また J-A7B は骨肉腫細胞株 KIKU を認識した。現在 HLA class I 分子の拘束性を検討している。

これらの知見は自家 CTL クローンに認識される肉腫幹細胞抗原の同定に有用と考える。

#### 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18件)

1. Kameshima H, Tsuruma T, Kutomi G, Shima H, Iwayama Y, Kimura Y, Imamura M, Torigoe T, Takahashi A, Hirohashi Y, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Sato N, Hirata K. Immunotherapeutic benefit of IFN $\alpha$  in survivin2B-derived peptide vaccination for advanced pancreatic cancer patients. *Cancer Sci* 2013; 104: 124-129. 査読有
2. Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, Morita R, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Watarai K, Kondo T, Hirohashi Y, Sato N. Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens*. 2013; 81: 428-434. 査読有
3. Michifuri Y, Hirohashi Y, Torigoe T, Miyazaki A, Fujino J, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kobayashi J, Sasaki T, Takahashi A, Nakamori K, Yamaguchi A, Hiratsuka H, Sato N. Small proline-rich protein-1B is overexpressed in human oral squamous cell cancer stem-like cells and is related to their growth through activation of MAP kinase signal. *Biochem Biophys Res Commun*; 2013; 13:96-102.doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.021. 査読有
4. Emori M, Tsukahara T (corresponding author), Murase M, Kano M, Murata K, Takahashi A, Kubo T, Asanuma H, Yasuda K, Kochin V, Kaya M, Nagoya S, Nishio J, Iwasaki H, Sonoda T, Hasegawa T, Torigoe T, Wada T, Yamashita T, Sato N. High expression of CD109 antigen regulates the phenotype of cancer stem-like cells/ cancer-initiating cells in the novel epithelioid sarcoma cell line ESX and is related to poor prognosis of soft tissue sarcoma. *Plos One*; 2013, 8:e84187.doi:10.1371/journal.pone.0084187 査読有
5. Takahashi A, Hirohashi Y, Torigoe T, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kochin V, Saijo H, Kubo T, Nakatsugawa M, Asanuma H, Hasegawa T, Kondo T, Sato N. Ectopically expressed variant form of sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein augments tumorigenicity of the stem cell population of lung adenocarcinoma cells. *PLoS One*. 2013; 8: e69095. doi: 10.1371/journal.pone.0069095. 査読有
6. Morita R, Nishizawa S, Torigoe T, Takahashi A, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Sokolovskaya A, Kochin V, Kondo T, Hashino S, Asaka M, Hara I, Hirohashi Y, Sato N. Heat shock protein DNAJB8 is a novel target for immunotherapy of colon cancer-initiating cells. *Cancer Sci*. 2014; 105: 389-395. 査読有
7. Sugita S, Aoyama T, Kondo K, Keira Y, Ogino J, Nakanishi K, Kaya M, Emori M, Tsukahara T, Nakajima H, Takagi M, Hasegawa T. Diagnostic utility of NCOA2 fluorescence in situ hybridization and Stat6 immunohistochemistry staining for soft tissue angiofibroma and morphologically similar fibrovascular tumors. *Hum Pathol*. 2014; 45:1588-1596. 査読有
8. Tsukahara T (corresponding author), Emori M, Murata K, Hirano T, Muroi N, Kyono M, Toji S, Watanabe K, Torigoe T, Kochin V, Asanuma H, Matsumiya H, Yamashita K, Himi T, Ichimiya S, Wada T, Yamashita T, Hasegawa T, Sato N. Specific targeting of a naturally presented osteosarcoma antigen PBF peptide using an artificial monoclonal antibody. *J Biol Chem*. 2014; 289: 22035-22046. 査読有
9. Sugita S, Arai Y, Tonooka A, Hama N, Totoki Y, Fujii T, Aoyama T, Asanuma H, Tsukahara T, Kaya M, Shibata T, Hasegawa T. A Novel CIC-FOXO4 Gene Fusion in Undifferentiated Small Round Cell Sarcoma: A Genetically Distinct Variant of Ewing-like Sarcoma. *Am J Surg Pathol*. 2014; 38: 1571-1576. 査読有
10. Tanaka T, Okuya K, Kutomi G, Takaya A, Kajiwara T, Kanaseki T, Tsukahara T, Hirohashi Y, Torigoe T, Hirata K, Okamoto Y, Sato N, Tamura Y. Heat shock protein 90 targets a chaperoned peptide to the static early endosome for efficient cross-presentation by human dendritic cells. *Cancer Sci*. 2015;106:18-24. doi: 10.1111/cas.12570. 査読有
11. Kukita K, Tamura Y, Tanaka T, Kajiwara T, Kutomi G, Saito K, Okuya K, Takaya A, Kanaseki T, Tsukahara T, Hirohashi Y, Torigoe T, Furuhashi T, Hirata K, Sato N. Cancer-Associated Oxidase ERO1- $\alpha$  Regulates the Expression of MHC Class I Molecule via Oxidative Folding. *J Immunol*. 2015; 194: 4988-96. doi: 10.4049/jimmunol.1303228. 査読有
12. Emori M, Tsukahara T, Murata K, Sugita S, Sonoda T, Kaya M, Soma T, Sasaki M, Nagoya S, Hasegawa T, Wada T, Sato N, Yamashita T. Prognostic impact of CD109 expression in myxofibrosarcoma. *J Surg Oncol*. 2015 May 28. doi: 10.1002/jso.23934. [Epub ahead of print] 査読有
13. Tanaka T, Kajiwara T, Kutomi G, Kurotaki

- T, Saito K, Kanaseki T, Tsukahara T, Hirohashi Y, Torigoe T, Hirata K, Okamoto Y, Sato N, Tamura Y. CpG-A stimulates Hsp72 secretion from plasmacytoid dendritic cells, facilitating cross-presentation. *Immunol Lett.* 2015; 167: 34-40. doi: 10.1016/j.imlet.2015.06.014. 査読有
14. 嘉野真允, 塚原智英, 村瀬正樹, 江森誠人, 和田卓郎, 山下敏彦, 佐藤昇志. 骨悪性線維性組織球腫癌幹細胞に対する自家細胞傷害性 T リンパ球反応の基礎的研究. *北海道整災外* 2013, 55: 12-15. 査読無
15. Torigoe T, Hirohashi Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kochin V, Sato N. [The path to innovative drug development of cancer vaccine: from discovery of tumor antigens to clinical trials]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* 2014;37(2):90-5. 査読有
16. 鳥越俊彦, 廣橋良彦, 塚原智英, 金関貴幸, Vitaly Kochin, 佐藤昇志. がんワクチン創薬への道程 -がん抗原の同定から臨床試験まで-. *日本臨床免疫学会会誌*, 37: 90-95, 2014. 査読無
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; 107: 12-17. doi: 10.1111/cas.12830. 査読有
18. 村田憲治, 塚原智英, 鳥越俊彦. がん免疫療法と免疫記憶. *日本臨床免疫学会会誌*, 2016; 39:18-22. 査読無

[学会発表] (計 6 件)

1. Yabe H, Tsukahara T Kawaguchi S, Torigoe T, Sato N, Morioka H, Yabe H. Co-existence of HLA class I expression and CD8+ T cell infiltration is associated with favorable clinical outcomes in Ewing's sarcoma family of tumors (ESFT). In: 15th International Congress of Immunology: 2013 Aug 22-27: Milan, Italy.
2. Tsukahara T, Emori M, Takahashi A, Torigoe T, Wada T, Sato N. Osteosarcoma antigen PBF-derived peptides could elicit immunological response in patients with refractory osteosarcoma. In: 15th International Congress of Immunology: 2013 Aug 22-27: Milan, Italy.
3. 塚原智英, 江森誠人, 村田憲治, 和田卓郎, 鳥越俊彦, 佐藤昇志, 山下敏彦. 骨軟部肉腫に対するペプチドワクチン療法の現状と展望(パネルディスカッション 8. 骨・軟部腫瘍—希少疾患に光明をもたらす夢の実現へ—). 第 87 回日本整形外科学会学術総会: 2014 年 5 月 22-25 日: 神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

4. 塚原智英. ビギナーズセミナー 7 : わかる! がん免疫とがん抗原. 第 42 回日本臨床免疫学会総会: 2014 年 9 月 25-27 日: 京王プラザホテル (東京都新宿区)
5. 塚原智英, 村田憲治, 江森誠人, 渡邊一絵, 鳥越俊彦. 骨軟部肉腫のペプチドワクチン療法 (ワークショップ 1. 免疫疾患治療と免疫療法). 第 43 回日本臨床免疫学会: 2015 年 10 月 22-24 日: 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
6. 塚原智英. ヒト骨肉腫の分子病理と免疫応答. 学術研究賞演説 (A 演説). 第 61 回日本病理学会秋季特別総会: 2015 年 11 月 5-6 日: 東京大学安田講堂 (東京都文京区)

[図書] (計 3 件)

1. 塚原智英, 佐藤昇志. HLA class I/骨肉腫抗原 PBF ペプチド複合体を特異的に認識するナチュラルエпитープ人工抗体の開発. 平澤泰介, 三浪明男, 戸山芳昭編. 先端医療シリーズ 44. 臨床医のための最新整形外科. 東京: 先端医療技術研究所; 2013. pp155-157.
2. 塚原智英, 鳥越俊彦, 廣橋良彦, 金関貴幸, Kochin Vitaly, 佐藤昇志. 第 20 章 次世代ペプチドワクチンの開発. 坂口志文, 西川博嘉編. *The Frontiers in Life Sciences 『がんと免疫』*. 東京: 南山堂; 2015. pp175-184
3. Sato N, Hirohashi Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kochin V, Tamura Y, Torigoe T. Immunological regulation of human cancer stem cells/cancer-initiating cells. In: Seya T, Matsumoto M, Udaka K, Sato N, editors. *Inflammation and immunity in cancer*. Tokyo: Springer Japan KK; 2015. pp243-254.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 骨肉腫特異抗原 PBF 由来 A11 拘束性 CTL エピトープ.

発明者: 李棟梁, 中野一絵, 田路真悟, 塚原智英, 鳥越俊彦, 佐藤昇志.

権利者: 同上

種類: 特許

出願年月日: 2015 年 11 月 20 日

国内外の別: 国内

名称: T 細胞レセプターとその利用.

発明者: 鳥越俊彦, 田路真悟, 中野一絵, 齊藤尚吾, 塚原智英, 廣橋良彦.

権利者: 同上

種類: 特許

出願年月日: 2016 年 3 月 18 日

国内外の別: 国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚原智英 (TSUKAHARA, Tomohide)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：20404634

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし