

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2020
課題番号：17K11285
研究課題名(和文) 子宮頸癌幹細胞をターゲットとした新規ペプチドワクチンの開発

研究課題名(英文) Novel vaccination targeting stem cells of cervical cancer

研究代表者
斉藤 豪 (Saito, Tsuyoshi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90145566
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では3次元培養から得られたSphere細胞よりRNAを回収し、がん幹細胞関連遺伝子を定量的RT-PCRにて解析した。得られた候補cDNAより子宮頸癌により特異的に発現しているcDNAをピックアップして以後の実験に用いた。さらにcDNA産物をターゲットとして研究を進め、これらの蛋白の塩基配列からHLA-A24結合モチーフを持つペプチドを合成した。これらを用いて特異的な細胞障害性T細胞による癌免疫を誘導しうるエピトープを検索しこの一部が末梢血単核球のうちCD8-細胞をPHA刺激により抗原提示細胞であるPHA blastに誘導し、特異的なCTLの誘導することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸癌は比較的若い女性に好発する腫瘍で、これらの若年女性達の子宮頸癌での喪失は、家族の幸福を奪うばかりではなく社会的・経済的な損失も大きい。化学療法や放射線療法に抵抗性の腫瘍も少なくなく新しい治療が望まれるところである。今回の研究はがん幹細胞に対する免疫療法の確立をめざし、子宮がん細胞株から幹細胞を選別しこれに対する特異抗原を同定し免疫療法へ応用への可能性を検討し、蛋白の一部が免疫療法に使うことが出来ることを証明した。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem-like cells (CSCs)/cancer-initiating cells (CICs) are a small subpopulation of cancer cells that are tumorigenic and are resistant to treatments, thus they are focused as treatment targets. We have established sphere-cultured CSCs/CICs from primary human uterine cervical carcinoma, and we isolated several clones from CSCs/CICs in this study. Thus, BORIS sf6 is a cervical CSC/CIC-specific subfamily and has a role in the maintenance of cervical CSCs/CICs. A BORIS C34_24(9)-specific cytotoxic T cell (CTL) clone showed cytotoxicity for BORIS sf6-overexpressing cervical cancer cells. Taken together, the results indicate that the CT antigen BORIS sf6 is specifically expressed in cervical CSCs/CICs, that BORIS sf6 has a role in the maintenance of CSCs/CICs, and that BORIS C34_24(9) peptide is a promising candidate for cervical CSC/CIC-targeting immunotherapy.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮頸癌 がん幹細胞 免疫療法

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌は若年者において増加傾向であり新しい治療法が必要である。

子宮頸癌は女性では4番目に発症頻度の多い癌で、世界では年間約50万人の女性が新たに子宮頸癌に罹患し、毎年27万人が死亡していると推計されている。日本では毎年1万人以上が子宮頸癌に罹患し、約3500人が死亡していると推計されている。これは、日本では1日に約7人の女性が子宮頸癌によって命を落としていることになる。国立がんセンターが公表しているデータでは、子宮頸癌の罹患率は20代後半から上昇し始め、30代に罹患率の大きなピークがあるのが特徴的である。日本産科婦人科学会の調査でも子宮頸癌の発症年齢の若年化が顕著で、早期発見のための取り組みと同時に、放射線や化学療法他に新しい治療法の開発による予後の改善が望まれる。

子宮頸癌治療ワクチンの開発

近年、HPV感染を予防するワクチンが認可され、ウイルス中和抗体が産生されることにより90-100%の確率でHPV感染を予防できると報告されている。しかし、このワクチンの作用はviral capsidを抗原とする中和抗体に基づくため、未感染のヒトには予防効果があるが、既にHPVに感染している癌患者または前癌病変を持つ患者には効果がない。これまで我々のグループは、既感染患者の癌予防と治療に有効なHPVワクチンを開発することを目的とした。扁平上皮細胞に感染したHPVは、細胞内で種々のウイルス蛋白を産生し、ウイルスの増殖と細胞の癌化に関与するが、そのうち、E6、E7という2種類のウイルス蛋白が癌化に必須の働きをしている。これらウイルス蛋白は細胞内で分解され、その分解産物の一部はHLA class I分子によって細胞表面へ提示され、細胞傷害性T細胞(CTL)によって認識される。そこで日本人に最も頻度が高いHLA-A24によって提示されるE6、E7蛋白由来の抗原ペプチドを同定し、このペプチドをCTL-based HPVワクチンを作成した。(Mizuuchi M, Novel oligomannose liposome-DNA complex DNA vaccination efficiently evokes anti-HPV E6 and E7 CTL responses. Exp Mol Pathol. 2012)

2. 研究の目的

子宮頸癌幹細胞をターゲットとした子宮頸癌治療ワクチンの開発

がん細胞は、正常な体細胞と比較すると、高い増殖力、細胞の不死化(細胞分裂の回数に制限がない)、周辺組織への浸潤や体内の離れた部位への転移、という3つの大きな特徴を持っている。また一般的な抗がん剤による治療では、固形腫瘍の縮小が治療の指針とされており、腫瘍の大部分を占める、がん幹細胞としての機能を持たない、分化したがん細胞だけを標的としている可能性がある。また一部のがん幹細胞には、薬剤耐性を獲得しているものがあることも指摘されている。がん幹細胞仮説によると、治療によって大部分のがん細胞を除いても、ごく少数のがん幹細胞が生き残っていれば再発が起こりうることになり、これが、がんにおいてしばしば再発が起きる理由だと考えられている。がん幹細胞を標的として除去することができれば、がんの転移や再発の防止にも有用な治療法の開発につながる事が期待されている。

3. 研究の方法

先にも述べたが、これまで我々のグループではサバイビン、Aurora-A、HPVなどを抗原としたペプチドワクチンを作成してきたが、このシステムを利用し本研究では子宮頸癌細胞株より子宮頸癌幹細胞分画を同定し、ここから頸癌幹細胞に特異的に発現する分子を特定し、そこからペプチドワクチンを作成することが本研究の目標である。さらに、臨床応用を目指すものである。

子宮頸癌幹細胞分画の同定

子宮頸癌の癌幹細胞分画の分離方法は報告が少ないが、本研究では3次元培養から得られるSphereを利用する。

子宮頸癌幹細胞抗原の検索

a. cDNA アレイ：得られた癌幹細胞様分画のSphere優位に発現する癌幹細胞抗原の候補についてcDNAアレイを用いて網羅的にスクリーニング。得られた候補cDNAより子宮頸癌により特異的に発現しているcDNAをピックアップして以後の実験に用いる。

b. 子宮頸癌での発現：また、ピックアップされた遺伝子あるいは遺伝子産物が実際に子宮頸癌で発現しているかについて調べるために、当科で治療を行った進行子宮頸癌症例において免疫染色あるいは定量的RT-PCRを用いて発現を確認する。さらにこれらの発現と病理学的・臨床的因子と組み合わせるとの比較を行う。

(3) 特異的抗原ペプチドの同定

日本人ではHLAのA LocusではA24を有している割合が56%と最も高く、ペプチドワクチンを作成するうえで最も効率が良いと考えられる。そこで本研究ではこの得られたcDNA産物をター

ゲットとして研究を進める。これらの蛋白の塩基配列から HLA-A24 結合モチーフを持つペプチドを合成する。特異的な細胞障害性 T 細胞による癌免疫を誘導しうるエピトープを検索する。

4 . 研究成果

本研究では 3 次元培養から得られる Sphere を利用し、得られた Sphere 細胞より RNA を回収し、SOX2, NANOG, POU5F1, KLF4 といった幹細胞関連遺伝子を定量的 RT-PCR にて解析した。得られた癌幹細胞様分画の Sphere 優位に発現する癌幹細胞抗原の候補について cDNA アレイを用いて網羅的にスクリーニングを行い、得られた候補 cDNA より子宮頸癌により特異的に発現している cDNA をピックアップして以後の実験に用いた。子宮頸癌での発現：また、ピックアップされた遺伝子あるいは遺伝子産物が実際に子宮頸癌で発現しているかについて調べるために、当科で治療を行った進行子宮頸癌症例において免疫染色あるいは定量的 RT-PCR を用いて発現を確認した。さらにこれらの発現と病理学的・臨床的因子と組み合わせることで癌の悪性度との比較を行い、得られたがん幹細胞が抗がん剤耐性、高浸潤能を有していることが明らかになった。

日本人では HLA の A Locus では A24 を有している割合が 56% と最も高く、ペプチドワクチンを作成するうえで最も効率が良いと考えられ得られた cDNA 産物をターゲットとして研究を進め、これらの蛋白の塩基配列から HLA-A24 結合モチーフを持つペプチドを合成した。これらを用いて特異的な細胞障害性 T 細胞による癌免疫を誘導しうるエピトープを検索しこの一部が末梢血単核球のうち CD8-細胞を PHA 刺激により抗原提示細胞である PHAblast に誘導し、ペプチドパルスしたうえで CD8+細胞を激し、特異的な CTL の誘導することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tabuchi Yuta, Hirohashi Yoshihiko, Hashimoto Shinichi, Mariya Tasuku, Asano Takuya, Ikeo Kazuho, Kuroda Takafumi, Mizuuchi Masahito, Murai Aiko, Uno Sei, Kawai Noriko, Kubo Terufumi, Nakatsugawa Munehide, Kanaseki Takayuki, Tsukahara Tomohide, Saito Tsuyoshi, Torigoe Toshihiko	4. 巻 106
2. 論文標題 Clonal analysis revealed functional heterogeneity in cancer stem-like cell phenotypes in uterine endometrioid adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental and Molecular Pathology	6. 最初と最後の頁 78 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexmp.2018.11.013	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 Kawai Noriko, Hirohashi Yoshihiko, Ebihara Yuma, Saito Takuma, Murai Aiko, Saito Takahiro, Shirosaki Tomohide, Kubo Terufumi, Nakatsugawa Munehide, Kanaseki Takayuki, Tsukahara Tomohide, Shichinohe Toshiaki, Li Liming, Hirano Satoshi, Torigoe Toshihiko	4. 巻 14
2. 論文標題 ABCG2 expression is related to low 5-ALA photodynamic diagnosis (PDD) efficacy and cancer stem cell phenotype, and suppression of ABCG2 improves the efficacy of PDD	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0216503 ~ 0216503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0216503	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 Konno Takumi, Kohno Takayuki, Kikuchi Shin, Shimada Hiroshi, Satohisa Seiro, Takano Kenichi, Saito Tsuyoshi, Kojima Takashi	4. 巻 68
2. 論文標題 Localization of Tricellular Tight Junction Molecule LSR at Midbody and Centrosome During Cytokinesis in Human Epithelial Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 59 ~ 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/0022155419886263	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 Konno Takumi, Kohno Takayuki, Kikuchi Shin, Shimada Hiroshi, Satohisa Seiro, Saito Tsuyoshi, Kondoh Masuo, Kojima Takashi	4. 巻 8
2. 論文標題 Epithelial barrier dysfunction and cell migration induction via JNK/cofilin/actin by angubindin-1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tissue Barriers	6. 最初と最後の頁 1695475 ~ 1695475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21688370.2019.1695475	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 Tabuchi Y, Hirohashi Y, Hashimoto S, Mariya T, Asano T, Ikeo K, Kuroda T, Mizuuchi M, Murai A, Uno S, Kawai N, Kubo T, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Saito T, Torigoe T.	4. 巻 106
2. 論文標題 Clonal analysis revealed functional heterogeneity in cancer stem-like cell phenotypes in uterine endometrioid adenocarcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Exp Mol Pathol	6. 最初と最後の頁 78-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexmp.2018.11.013.	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 Ishioka Shinichi, Kim Miseon, Mizugaki Yuko, Kon Saori, Isoyama Kyoko, Mizuuchi Masahito, Morishita Miyuki, Baba Tsuyoshi, Sekiya Takao, Saito Tsuyoshi	4. 巻 44
2. 論文標題 Transabdominal cerclage (TAC) for patients with ultra-short uterine cervix after uterine cervix surgery and its impact on pregnancy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res	6. 最初と最後の頁 61 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.13487	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 Shimada Hiroshi, Abe Shyuetsu, Kohno Takayuki, Satohisa Seiro, Konno Takumi, Takahashi Syunta, Hatakeyama Tsubasa, Arimoto Chihiro, Kakuki Takuya, Kaneko Yakuto, Takano Ken-ichi, Saito Tsuyoshi, Kojima Takashi	4. 巻 7
2. 論文標題 Loss of tricellular tight junction protein LSR promotes cell invasion and migration via upregulation of TEAD1/AREG in human endometrial cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 37049 ~ 37049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep37049	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 Azumaguchi Atsushi, Henmi Hirofumi, Ohnishi Hirofumi, Endo Toshiaki, Saito Tsuyoshi	4. 巻 43
2. 論文標題 Role of dilatation and curettage performed for spontaneous or induced abortion in the etiology of endometrial thinning	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res	6. 最初と最後の頁 523 ~ 529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.13254	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 Tamate Masato, Tanaka Ryoichi, Osogami Hiroyuki, Matsuura Motoki, Satohisa Seiro, Iwasaki Masahiro, Saito Tsuyoshi	4. 巻 485
2. 論文標題 Rap1GAP inhibits tumor progression in endometrial cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 476 ~ 483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.02.044	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 Kikuchi Noriaki, Sugita Shintaro, Nakanishi Katsuya, Sugawara Taro, Segawa Keiko, Ito Yumika, Kubo Terufumi, Fujita Hiromi, Hirano Hiroshi, Tanaka Ryoichi, Saito Tsuyoshi, Hasegawa Tadashi	4. 巻 67
2. 論文標題 Ovarian high-grade endometrioid stromal sarcoma with YWHAЕ and NUTM2B rearrangements	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pathol Int	6. 最初と最後の頁 327 ~ 329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12542	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

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Tsuyoshi Saito
2. 発表標題 ・ An Education System for Board-Certified Fellows of the Japan Society of Clinical Cytology
3. 学会等名 ICC 2019 20th International Congress of Cytology (May.5-9, 2019, Sydney, Australia) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部 秀悦、岩崎 雅宏、西村 庸子、玉手 雅人、磯山 響子、秋元 太志、幅田 周太郎、寺田 倫子、小川 万梨絵、松浦 基樹、郷久 晴朗、齋藤 豪
2. 発表標題 ・ 子宮体癌細胞株におけるER とBAG3発現の関連
3. 学会等名 第61回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 (新潟・2019年7月4日 ~ 6日)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiro Satohisa, Hiroshi Shimada, Takayuki Kohno1), Takumi Konno1), Taishi Akimoto, Masahiro Iwasaki, Masato Tamate, Motoki Matsuura, Takashi Kojima1), Tsuyoshi Saito1
2. 発表標題 ・ The regulation of claudin-2 in endometriosis and endometrioid carcinoma cells
3. 学会等名 ICC 2019 20th International Congress of Cytology (May.5-9, 2019, Sydney, Australia) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Mariya, Y. Hirohashi1), J. Yanakawa1), T. Akimoto, M. Matsuura, S. Satohisa, M. Teramoto, M. Iwasaki, T. Kubo1), T. Torigoe1), T. Saito
2. 発表標題 Local progression of endometrial cancer depends on microsatellite instability and HLA class I expression
3. 学会等名 IGCS 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Seiro Satohisa, Tsuyoshi Saito
2. 発表標題 The role of claudin-2 on the malignancy of human endometrioid carcinoma.
3. 学会等名 European Society of Gynaecological Oncology State of the Art Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuyoshi Saito, Ryoichi Tanaka1), Seiro Satohisa, Shuetsu Abe, Masahiro Iwasaki, Mizue Teramoto, Motoki Matsuura, Masato Tamate
2. 発表標題 Treatment and prognosis of recurrent uterine leiomyosarcomas in last 5 years.
3. 学会等名 European Society of Gynaecological Oncology State of the Art Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋元太志
2. 発表標題 子宮頸部腺癌でのチロシンキナーゼ型受容体の発現と分子標的治療への可能性
3. 学会等名 第59回公益社団法人日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 郷久晴朗
2. 発表標題 3細胞間タイト結合分子LSRIはAMOTに活性化されたHippo pathwayを介し子宮内膜癌の悪性化に 関与する
3. 学会等名 第59回公益社団法人日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 嶋田浩志
2. 発表標題 子宮内膜癌(endometrioid adenocarcinoma)におけるタイト結合分子claudin-2の役割
3. 学会等名 第49回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akira Nishikawa
2. 発表標題 ・Types and multiple infection of HPV are related to viral persistence and CIN recurrence after laser surgery
3. 学会等名 European Gynecological Oncology Congress (November.4-7, 2017, Vienna, Austria) (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究 分担 者	鳥越 俊彦 (TORIGOE Toshihiko) (20301400)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------