

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 24 年 5 月 17 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591729

研究課題名（和文） Niche 理論に基づく癌幹細胞ワクチン療法の開発

研究課題名（英文） Development of cancer stem cell vaccine therapy based on the Niche theory

研究代表者

松田 健司 (MATSUDA KENJI)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30398458

研究成果の概要（和文）：癌幹細胞に対するワクチン療法を開発するために、まず WT1 蛋白に対する免疫応答を検討した。WT1 は癌細胞の悪性憩室維持に極めて重要な働きを持つ癌幹細胞としての可能性を持った蛋白であり、様々な癌腫で発現が確認されている。日本人に多い HLA-A24 の WT-1 拘束ペプチドを用いた免疫応答が確認された。また、腫瘍細胞より CD133 抗体を用いて癌幹細胞様細胞を分離して spheres 形成を試みた。一部の癌細胞株で spheres 形成様の colony を確認され最終目標である Niche 抑制による癌幹細胞制御の基礎が構築された。

研究成果の概要（英文）：We assessed immunoresponse to WT1 protein to develop cancer stem cell vaccine therapy. WT1 protein have a potential power to maintain the malignancies of its cancer cell, and it is expressed several malignancies. We confirmed HLA-A24 restricted WT1 derived peptide specific immunoresponses. Furthermore, we tried to separate cancer stem cell by using CD133 antibody. We confirmed the spheres formation in some parts of cancer cell. We believe that this may be consolidated the foundation of Niche control.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：癌幹細胞、Niche、WT1

1. 研究開始当初の背景

以前より当科では癌抗原ワクチンを用いた基礎研究・臨床応用を行ってきた。しかし従来の発想では限界があることが指摘されていて、さらに強力な戦略が求められる。最近、白血病研究より癌幹細胞の存在が提唱され始めた。固形癌においても同様な考え方が予

想されていたが、最近になり、大腸癌においてもその存在が colon cancer initiating cell として報告されてくるようになった(Nature 2007,445,111-115)。従来、癌の治癒のためには完全に手術により腫瘍組織を摘出するか、化学療法などによって total cell kill を行なうことが必要と考えられてきた。しかし、癌

幹細胞の概念では、癌を根治するためにはすべての癌を根絶する必要はなく、癌幹細胞のみを殺傷すれば残りの腫瘍細胞は自然に寿命がきて死滅する可能性が示唆されている。従って癌幹細胞の頻度は低い、強い免疫原性を有することが予想される。

2. 研究の目的

癌幹細胞の存在が明らかとなり、さらに、その維持・分化・増殖において微小環境(Niche)が巧妙に働き癌幹細胞を制御することに着目されるようになってきた。今回は新規癌ワクチン療法を開発することを目的とし、癌幹細胞に対する免疫応答が働くことを検討すると同時にNiche制御による癌幹細胞の動態の検討を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1)

癌幹細胞の分離と増殖能の検討
大腸癌細胞株より CD133 抗体を用いて分離して癌幹細胞様の colony 形成を検討する。

(2) 癌幹細胞に対する免疫応答の検討

癌幹細胞の有力な指標と考えられる WT-1 由来 HLA-A24 拘束性ペプチド (CMTWNQMNL)を用いて CTL の誘導を試みる。

(3) Niche 阻害による癌幹細胞の検討

血管 Niche 阻害剤である bevacitumab を用いて癌幹細胞の増殖抑制を検討する。

4. 研究成果

(1)いくつかの大腸癌細胞株 (HT29, Colo201, Colo320DM, WiDr, LOVO)より抗 CD133 抗体を用いて癌幹細胞様集団の分離を試みた結果、当初想定していたものよりも割合が極めて少ないが、分離は可能であった。また、分離された細胞集団の培養にて spheres 形成は認めるが、limiting dilution 解析にまでは至らず今後の改良点としての課題が残った。

(2) 日本人に多い HLA-A24 の WT1 拘束性ペプチド (CMTWNQMNL)を用いて癌患者血液より CTL の誘導を試みた。方法は in vitro で樹状細胞を用いて誘導し、ペプチド特異的応答を検討した。In vitro で誘導された subcloning 化された CTL は SW480(WT1+/A24+)に対する障害活性を認めたが、AZ521(WT1+/A24-)に対しては認めなかった。すなわち、HLA-A24/WT1 特異的な CTL の誘導が可能となり幹細胞に対する免疫応答が惹起できる可能性が示唆された。

(3)血管 Niche 抑制の効果を解析するために、CD133 抗体で分離された癌幹細胞様細胞を bevacizumab にて抑制することを計画していたが、本研究年度までには、有意な実験結

果が得られていない。その理由としては癌幹細胞様細胞を安定して使用することが困難であったことが挙げられ、今後の課題として残った。

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 2 件)

① Comparison of different classes of CpG-ODN in augmenting the generation of human epitope peptide-specific CTLs.

Katsuda M, Iwahashi M, Matsuda K, Miyazawa M, Nakamori M, Nakamura M, Ojima T, Iida T, Hayata K, Yamaue H.
Int J Oncol. 2011 39(5):1295-302.

②TLR-9 Agonist を併用した新規食道癌ペプチドワクチン療法

勝田将裕, 岩橋誠, 松田健司, 宮澤基樹, 中森幹人, 中村公紀, 中禎二, 尾島敏康, 飯田武, 山上裕機
癌と化学療法, 38 巻, 12 号 1942-1944, 2011

[学会発表] (計 2 件)

① CpG-ODN による癌ペプチドワクチン療法の効果増強とその機序の解析

勝田将裕, 岩橋誠, 中森幹人, 中村公紀, 尾島敏康, 飯田武, 辻俊明, 早田啓治, 松田健司, 宮澤基樹, 山上裕機
第 49 回日本癌治療学会総会、2011.

②TLR-9 アゴニスト併用食道癌ペプチドワクチン療法

勝田将裕, 岩橋誠, 中森幹人, 中村公紀, 松田健司, 飯田武, 宮澤基樹, 角田卓也, 中村祐輔, 山上裕機
第 65 回日本消化器外科学会総会、2010

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 健司 (MATSUDA KENJI)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：30398458

(2) 研究分担者

山上 裕機 (YAMAUE HIROKI)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：20191190

岩橋 誠 (IWAHASHI MAKOTO)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：71244738

堀田 司 (HOTTA TSUKASA)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：50244744

中村 公紀 (NAKUMURA MASAKI)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：80364090

尾島 敏康 (OJIMA TOSHIYASU)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：60448785

勝田 将裕 (KATSUDA MASAHIRO)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：50464673

(3) 連携研究者

なし