

令和元年6月10日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10606

研究課題名(和文) 癌幹細胞を標的とした樹状細胞による免疫療法の開発

研究課題名(英文) Immunotherapy using dendritic cell targeting cancer stem cell

研究代表者

原 勲 (Hara, Isao)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10263378

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)：癌幹細胞は癌の増殖にとって重要な役割を果たす細胞集団である。我々は癌幹細胞の機能維持に必要なDNAJB8分子が腫瘍免疫療法の標的となりうることを示してきた。今回我々はDNAJB8分子を認識する細胞障害性クローンの誘導(CTL)を試みた。DNAJB8分子からペプチド結合アッセイにより候補ペプチドを作成し健常者の末梢血単核球からCTLを誘導することに成功した。このCTLは標的細胞と接触することでインターフェロンを産生し細胞障害活性を有することがわかった。またこのペプチドはその配列がヒトおよびマウスで共通することがわかったため、マウスを用いた動物モデルにおいても同様なCTLを誘導することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎細胞癌は従来の抗癌化学療法に対して抵抗性であり、近年では分子標的薬が施行されるがその成績は満足すべきものではない。免疫チェックポイント阻害剤が一部の腎癌患者に対して優れた抗腫瘍効果を示すことが明らかになってきたが、治療成績の向上のためには腫瘍免疫をさらに賦活化させる方策が考えられる。腎癌の癌幹細胞を標的とした腫瘍免疫療法はこうした観点から従来の腎癌治療の突破口となる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cell plays an important role for cancer progression. We have been studying possibility if DNAJB8 which is essential for function of cancer stem cell, can be a target for tumor immunotherapy. In this study, we tried to establish cytotoxic T cell (CTL) clone recognizing DNAJB8. We selected candidate peptide by peptide binding assay, and succeeded to establish CTL clone recognizing DNAJB8 derived from mononuclear cell of healthy volunteer. This established CTL clone produced interferon by contacting with target cell and showed cytotoxicity against target cell. Since the peptide sequence was identical in both human and mouse, we also could introduce CTL recognizing DNAJB8 in mouse model.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腫瘍免疫 癌幹細胞 樹状細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎癌は放射線療法および化学療法に抵抗性の癌の一つであり、分子標的薬を用いても完全寛解が得られることはまれであるためさらなる治療の開発が求められている。今回、癌幹細胞を標的とした腫瘍免疫療法に着目した。癌幹細胞は化学療法や放射線療法への抵抗性と関連し、治療後の再発・転移の原因と考えられている。癌幹細胞のような数としては少ないが造腫瘍性の高い population に対して特異的に作用するような細胞障害性 T cell (CTL) を effector とする治療戦略は理にかなっているものと思われる。

2. 研究の目的

腎細胞癌は治療抵抗性であり癌幹細胞がこうした治療抵抗性の一因になっていることが示唆されている。我々は癌幹細胞集団において DNAJB8 抗原が特異的に発現しその機能維持に深く関わっていることを明らかにしてきた (Nishizawa et al. *Cancer Res*, 72(11): 2844-54, 2012)。一方、癌抗原の遺伝子を導入した樹状細胞(DC)を用いた腫瘍免疫療法の有用性に関しても研究を続けてきた (Fuji et al. *BJU Int* 104:1766-1773, 2009)。最近では iPS 細胞由来から樹立された DC が末梢血由来 DC と同等の抗原提示能を有していることも報告している (Iwamoto, *Int J Cancer* 2014;134:332)。今回、癌幹細胞の機能維持に重要な DNAJB8 抗原を樹状細胞に発現させ CTL を誘導することで腎細胞癌に対する強力な免疫療法を確立するのが目的である。

3. 研究の方法

1. DNAJB8 を DC に効率よく発現させるためのベクターの開発

(1) アデノウイルスベクターの開発

アデノウイルスベクターの作成は完全長 DNA 導入法で行う。ヒト DNAJB8 の cDNA を cosmid vector pAxCawit2 (TaKaRa) に挿入し組み替え cosmid を作成する。組換えコスミドより目的遺伝子を含む組換えアデノウイルスゲノムを切り出し、293 細胞へ導入する。ウイルスが感染し変成した 293 細胞より 1 次ウイルス液を調整する。さらにこのウイルス液を 293 細胞に感染させることを繰り返し最終的に DC へ使用するウイルス液を調整する。

(2) 末梢血由来樹状細胞 (DC) の確立および CTL 誘導能の検討

ヒト末梢血より Ficoll-Hypaque 法にて単核球を分離。AIM- 培養液に浮遊し、T-75 フラスコ内で 1.5 時間培養し非付着細胞を除去する。翌日から、付着細胞を IL-4、GM-CSF の存在下で 7 日間培養し浮遊細胞を回収する。こうして得られた未熟樹状細胞をさらに 2 日間、GM-CSF を含む AIM- で培養する。2 日後細胞は 4 で 10mM EDTA を含む PBS 中で回収する。成熟化の評価は細胞表面マーカーを計測することにより行う。こうして得られた DC に上記 (1) で得られた DNAJB8 抗原をコードするアデノウイルスベクターを感染させることにより DNAJB8 を発現する DC を調整する。さらに健常者から得られた末梢血単核球に DNAJB8 を発現する DC を IL2 および IL7 存在下に作用させ CTL を得る。採血した健常者と同じ HLA を有する腎癌細胞株をターゲットとして細胞障害活性を測定する。

(3) iPS 細胞由来 DC の確立

健常人皮膚を用いて iPS 細胞由来 DC を誘導する。京都大学 iPS 細胞研究センター CiRA protocol に準じる (Cell 2007;131,861)。健常人皮膚を採取し線維芽細胞を樹立しライン化する。PLAT-E パッケージ細胞への pMXs レトロウイルスベクター (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC 発現ベクター, TaKaRa) を用いて線維芽細胞へ感染させる。感染線維芽細胞を SNL 細胞を feeder とした培地へまきなおす。培地は ES 細胞用 primate ES 培地 (+bFGF) を使用する。iPS 細胞コロニーをピックアップし、幹細胞未分化マーカー (Nanog, Oct3/4, E-cadherin, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81) の確認を行う。継代は Gelatin coated dish に SNL 細胞を feeder cell とし、培地を primate ES+bFGF とした CiRA protocol で行う。DC への分化誘導は 4 step 培養法を用いて行う (Gene Therapy 2011;18:874)。最初に Feeder である OP9 細胞とともに coated-dish で 17 日間培養する。次に Feeder cell なしの条件下で rhGM-CSF 存在下で 7 日間培養を行う。petri-dish にまきなおし rhGM-CSF 存在下 RPMI で 5 日間培養し、最終的に rhIL-4, rhTNF 存在下で 48 hr maturation させたものを用いる。こうして得られた iPS 細胞由来 DC に上記 (1) で得られた DNAJB8 抗原をコードするアデノウイルスベクターを感染させることにより DNAJB8 を発現する iPS 細胞由来 DC を調整する。その後の CTL の誘導および細胞障害活性の測定は (2) と同様である。

4. 研究成果

(1) ウイルスベクターの開発

アデノウイルスベクターの開発に取り組んだが、組み替え体の作成がうまくいかなかったためレトロウイルスベクターに DNAJB8 抗原を組み込んだものを作成した。また iPS 細胞の樹立を試みたが長期にわたり生存する株を樹立することが難しく DC に誘導することができなかった。このため当初の予定を若干変更し、DNAJB8 由来のペプチドを作成することにより DNAJB8 抗原に特異的な CTL の誘導を試みた。

(2) DNAJB8 抗原ペプチドによるヒト cytotoxic T lymphocyte (CTL) の誘導

2-1 候補ペプチドの同定

ペプチド結合アッセイにより以下の候補ペプチドを同定した。候補ペプチド：DNAJB8(22-30) AYRKLALRW、DNAJB8(99-107) IFREFFGGL、DNAJB8(143-151) AFMEAFSSF)の3つの候補ペプチドを作成した。

2-2 HLA-A2402 由来健康者からの抗原特異的 CTL の誘導の確認

上記 3 種のペプチドのカクテルにより健康者由来 PBMC を刺激し、CTL を誘導した。

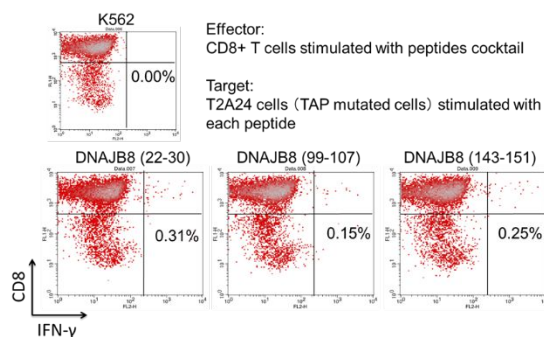
2-2-1 IFN- γ アッセイ

K562 は MHC class I が低発現のため CTL の標的にされにくいとされ、標的細胞の陰性コントロールとして用いた。K562 に対しては effector 細胞による IFN- γ の産生を認めず、候補ペプチドで刺激した T2A24 細胞に対しては、それぞれ特異的による CTL の誘導が示された。(図 1)

2-2-2 細胞傷害活性の検討 (LDH release アッセイ)

DNAJB8(22-30)、DNAJB8(99-107)で刺激した T2A24 細胞に対して、ペプチド刺激により誘導した CTL による抗原特異的細胞傷害活性を認めた。陰性コントロールの K562、DNAJB8(143-151)で刺激した T2A24 細胞に対する細胞傷害活性は認めなかった。

図 1



3. DNAJB8 抗原ペプチドによるマウス免疫療法モデルの確立

3-1 同定したペプチドとヒト由来 DNAJB8 とマウス由来 DNAJB8 の配列の比較

DNAJB8(22-30)、DNAJB8(99-107)についてヒト、マウスで配列が一致した。

3-2 in vivo ペプチド免疫によるマウス CTL の誘導の確認 (IFN- γ アッセイ)

マウスの in vivo の免疫実験系においても採取したリンパ節より得られた CD8 陽性細胞より、抗原特異的な IFN- γ の産生を認めた。(図 2)

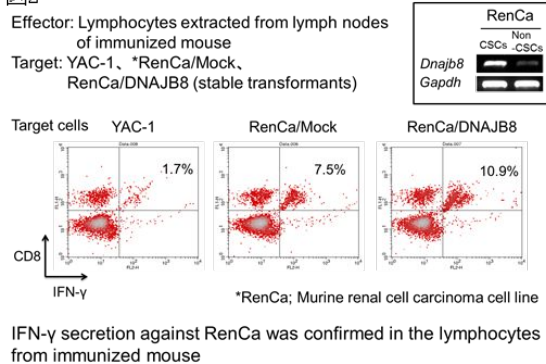
3-3 誘導した CTL の細胞傷害活性の検討 (LDH release アッセイ)

免疫マウスより採取したリンパ節より得られた CD8 陽性細胞から、抗原特異的な細胞傷害活性を認めた。

3-4 in vivo 免疫における抗腫瘍効果の検討

DNAJB8 由来ペプチドを免疫したマウスにおいて腫瘍増大抑制効果を認めた。

図 2



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kusumoto H, Hirohashi Y, Nishizawa S, Yamashita M, Yasuda K, Murai A, Takaya A, Mori T, Kubo T, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Kondo T, Sato N, Hara I, Torigoe T: Cellular stress induces cancer stem-like cells through expression of DNAJB8 by activation of heat shock factor 1. *Cancer Sci.* 2018 Mar;109(3):741-750.

Nishizawa S, Hirohashi Y, Kusumoto H, Wakamiya T, Iguchi T, Yamashita S, Iba A, Kikkawa K, Kohjimoto Y, Torigoe T, Hara I: Identification of antigenic peptides from novel renal cancer stem-like cell antigen, DNAJB8. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Dec 16;494(3-4):693-699.

〔学会発表〕(計 3 件)

Nishizawa S, Iwahashi Y, Miyai H, Ueda Y, Wakamiya T, Iguchi T, Yamashita S, Iba A, Kohjimoto Y, Hara I: DNAJB8 expression is associated with recurrence of renal cell carcinoma. 113th Annual Meeting of American Urological Association, 2018.5. San Francisco

西澤 哲, ほか: 癌幹細胞抗原 DNAJB8 由来抗原ペプチドの同定. 第 31 回日本バイオセラピー学会, 2018.11. 東京

Nishizawa S, et al: DNAJB8 is associated with recurrence of renal cell carcinoma. 第 76 回日本癌学会, 2017.9. 横浜

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山上 裕機

ローマ字氏名：Yamaue Hiroki

所属研究機関名：和歌山県立医科大学・医学部

部局名：第 2 外科

職名：教授

研究者番号（8 桁）：20191190

研究分担者氏名：尾島 敏康

ローマ字氏名：Ojima Toshiyasu

所属研究機関名：和歌山県立医科大学・医学部

部局名：第 2 外科

職名：講師

研究者番号（8 桁）：60448785

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。