

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390384
 研究課題名(和文) グリオーマ・癌幹細胞共通抗原を標的とした免疫療法の開発
 研究課題名(英文) Development of immunotherapy targeting glioma and glioma stem cell antigens
 研究代表者
 戸田 正博 (TODA MASAHIRO)
 慶應義塾大学・医学部・講師
 研究者番号：20217508

研究成果の概要：

グリオーマ・脳腫瘍幹細胞 (brain cancer stem cell; BCSC) 共通抗原を標的とした免疫療法を開発するため、分離したBCSCの遺伝子解析を行った結果、新規BCSC抗原遺伝子(A)を同定した。また、転写因子SOX6がグリオーマ・BCSC共通抗原であることを明らかにして、SOX6由来のHLA-A02結合性T細胞エピトープペプチドを同定し、BCSC傷害性T細胞の誘導能を証明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科

キーワード：癌幹細胞・グリオーマ・癌抗原・免疫療法・神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

幹細胞研究の進展に伴って、さまざまな悪性腫瘍においても自己複製能、多分化能を有する少数の癌幹細胞が存在することが明らかとなり、また抗癌剤や放射線療法に抵抗性を示すことから、癌治療のための重要な標的としてその性状解析が急速に進められている。さらに癌幹細胞が抗癌剤に抵抗性を示す原因の一つとして、薬剤を排出する力を有する ATP-binding cassette(ABC)トランスポー

ターを高発現していることが明らかにされたことから、薬剤(Hoechst33342)排出能の高い Side Population (SP) 分画から癌幹細胞の分離が試みられている。実際に、これまで複数のグループにより、脳腫瘍組織(髄芽腫、グリオーマ、上皮細胞種)および脳腫瘍細胞株から脳腫瘍幹細胞(brain cancer stem cell; BCSC)が分離されている。しかし、現在の手法では癌幹細胞の濃縮はできても精製できないため、正確な性状解析はできず、

BCSC 特異分子は同定されていない。一方、これまで我々は、グリオーマと神経幹細胞との関連性に着目した解析を行っており、神経幹細胞の増殖因子のスクリーニング法を確立し、新たな神経幹細胞増殖因子を同定した（国際特許出願 PCT/JP2006/302259）。さらに最近、ヒトグリオーマ細胞株の SP 細胞分画から BCSC の分離に成功している。

細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) に認識されるヒト腫瘍抗原が同定されたことにより、癌に対する免疫応答を人為的に操作することが可能となり、T 細胞は癌ワクチン療法における中心的な役割を担っている。実際に、癌抗原ペプチドを用いたグリオーマに対する免疫療法の臨床研究が行われ、その安全性と有効性が示されている。一方、これらの臨床研究の結果、無効な症例の存在も明らかになり、その原因の一つとして、グリオーマが heterogeneous な腫瘍であり、BCSC を含む多様な細胞を標的とした抗原が同定されていないことが挙げられる。また、化学療法剤が遺伝子解析結果に基づいて選択されるように、科学的根拠に基づいた免疫療法の確立が望まれており、標的細胞に対する抗原を同定することが重要であり、その結果、患者個々の免疫応答を解析し、標的細胞特異的な CTL を誘導することが可能になる。しかし、これまで CTL に認識されるグリオーマ抗原の報告は数少なく、BCSC 抗原は同定されていない。これまで我々は、グリオーマ特異抗原の同定、解析を先駆的に行なっており、SEREX 法 (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) および CTL 発現クローニング法を用いて、10 種類以上のグリオーマ抗原を同定した。またグリオーマ抗原 SOX6 の HLA A24 拘束性の CTL エピトープペプチドの同定に成功している（国際特許出願 PCT/JP2006/300764）。

2. 研究の目的

本研究では、第一に、これまで我々が確立した解析技術を基盤に複数のグリオーマ細胞株およびグリオーマ組織から BCSC を分離して、神経幹細胞、グリオーマ細胞、グリオーマ組織、および正常脳組織との比較による遺伝子・タンパク発現解析により、BCSC 特異分子の同定を試みた。

第二に、新たなグリオーマ・癌幹細胞を標的とした免疫療法の開発を目的として、T 細胞に認識される BCSC 抗原の同定、さらに治療戦略上でより理想的な標的抗原となりうるグリオーマ・BCSC 共通抗原の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) BCSC の分離および性状解析

Hoechst33324 染色による排泄能の高い SP 分画と BCSC・神経幹細胞の共通マーカーである CD133 発現を基本に、我々が確立した神経幹細胞の低密度培養法を用いて、患者腫瘍検体およびグリオーマ細胞株から BCSC の分離・精製を行った。神経幹細胞培養条件でのスフェア形成能、自己増殖能、多分化能（ニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトへの分化）を解析し、分離 BCSC を様々な細胞数で免疫不全マウス脳内に移植して、腫瘍形成能を解析した。また、分離した BCSC の表面抗原 CD133 の発現を flow cytometry により検証した。

(2) BCSC 特異分子の同定

分離 BCSC とグリオーマは基本的に遺伝子・蛋白発現でかなり共通したパターンを呈することが予測されるため、BCSC の検体数を増やして、グリオーマ、神経幹細胞との比較による Affimetrix 社製 Gene Chip を用いた網羅的遺伝子発現解析を行ない、BCSC 間で共通した発現パターンを示す新規分子の同定を試みた。また、遺伝子発現プロファイルから BCSC における高発現遺伝子群としてクラスタリングを行った。遺伝子発現解析により選出された候補分子の遺伝子発現を RT-PCR により検証し、さらに蛋白発現を Western blot、免疫細胞染色、免疫組織染色により解析し、その発現特異性を解析した。

(3) BCSC 特異分子の機能解析

同定抗原分子の BCSC における機能解析を行うため、レトロウイルスベクターに組み換えた過剰発現系と、RNAi による遺伝子ノックダウン系を構築して、スフェア形成能（幹細胞維持・自己複製能）、多分化能、および増殖能の変化を解析した。さらに、同定遺伝子を過剰発現あるいはノックダウンした BCSC を免疫不全マウス脳内に移植して、腫瘍形成能の変化を解析した。

(4) BCSC 特異分子の T 細胞エピトープ解析

免疫療法の開発を目的として、同定抗原由来の細胞傷害性 T 細胞エピトープペプチドの同定を行った。日本人の HLA class I の型は、HLA-A2 と HLA-A24 が多く、これらで日本人全体の約 80% をカバーする。はじめに Bioinformatics & Molecular Analysis Section (BIMAS) の HLA Peptide Binding predictions Program を用いて、HLA-A0201 との結合性の高い同定抗原由来の 9~10 アミノ酸残基のペプチド配列を選出した。それらのペプチドを合

成し、健常人およびグリオーマ患者末梢血から CD8 陽性 T 細胞を分離し、抗原ペプチドを提示した樹状細胞と共培養して樹立された CTL について、抗原特異性および細胞傷害活性を解析した。

4. 研究成果

本研究では、グリオーマ・BCSC 共通抗原を標的とした免疫療法を開発するため、これまで我々が確立した神経幹細胞の低密度培養法を応用して、ヒトグリオーマ細胞株、ヒトグリオーマ組織由来の培養細胞から BCSC の分離を試みた。第一に Hoechst33324 染色による排泄能の高い SP 分画と BCSC・神経幹細胞の共通マーカーである CD133 発現を基本に BCSC の分離を行った。つぎに、分離された BCSC の癌幹細胞としての基本的性質を検証するため、神経幹細胞培養条件でのスフェア形成能、自己増殖能、形成スフェアの多分化能（ニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトへの分化能）さらに免疫不全マウス（NOD-SCID マウス）脳内移植後の腫瘍形成能を解析した。その結果、ヒトグリオーマ細胞株、ヒトグリオーマ組織からそれぞれ 1 種ずつ、計 2 種類の BCSC の分離に成功した。

分離した BCSC、神経幹細胞、グリオーマ細胞における遺伝子発現比較解析を行った結果、新規の BCSC 抗原遺伝子（A）を同定し、さらに転写因子 SOX6 がグリオーマおよび BCSC において高発現していることを明らかにした。つぎに同定された BCSC 抗原分子（A）の機能解析を行うため、siRNA を用いて BCSC の細胞増殖の変化を解析したところ、BCSC 抗原分子（A）は BCSC の増殖に関与することが明らかになった。現在、BCSC を標的とした新たな治療法を開発するため、免疫不全マウスに BCSC を移植したモデルマウスを作製し、in vivo で BCSC 抗原分子（A）の siRNA を投与後の増殖抑制効果を検証中である。

次に同定したグリオーマ・BCSC 共通抗原分子である SOX6 由来の新たな T 細胞エピトープを解析するため、抗原分子のアミノ酸配列から、HLA-A02 に結合するペプチドを選出し、さらにプロテアソームによる切断予測部位を解析することにより、エピトープ候補のペプチドを絞り込んだ。HLA-A02 由来の末梢血リンパ球を合成した候補ペプチド存在下で培養し、グリオーマ反応性 CTL の誘導能を解析した。その結果、T 細胞に抗原特異的かつ HLA 拘束性に認識される SOX6 抗原因由来ペプチドを 2 種類同定した。さらにこれら同定したペプチドを用いて、末梢血から誘導した樹状細胞と共培養した T 細胞が、

SOX6 を発現するグリオーマ細胞を特異的かつ HLA 拘束性に障害することを明らかにした。

以上、グリオーマ・BCSC 共通抗原 SOX6 由来 HLA-A02 結合性の T 細胞エピトープペプチドを同定し、抗原特異性、HLA 結合性、T 細胞誘導能を証明した。今後は SOX6 由来の T 細胞エピトープペプチドを用いた BCSC に対する免疫療法の臨床研究を行う予定である。

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 14 件)

Hayashi K, Ohta S, Kawakami Y, Toda M
Activation of dendritic-like cells and neural stem/progenitor cells in injured spinal cord by GM-CSF.

J Neurosci Res 2009 (in press) 査読:有

Ichimura S, Yoshida K, Kawase T
Surgical approach for hypoglossal schwannomas to prevent deformity of the atlanto-occipital joint.

Acta Neurochir (Wien). 2009 Apr 1 査読:有

Ohba S, Yoshida K, Hirose Y, Ikeda E, Nakazato Y, Kawase T.
Cerebral tumor with extensive rhabdoid features and a favorable prognosis.

J Neurosurg. 2009 Feb 20 査読:有

Adachi K, Kawase T, Yoshida K, Yazaki T, Onozuka S.

ABC Surgical Risk Scale for skull base meningioma: a new scoring system for predicting the extent of tumor removal and neurological outcome.

J Neurosurg. 2009 Jan 2. 査読:有

Toda M

Intraoperative navigation and fluorescence imagings in malignant glioma surgery.

Keio J Med 57(3), 155-161, 2008 査読:有

Toda M

Analysis of dendritic cells from common marmosets for the treatment of CNS injury.

Inflammation and Regeneration 28(3), 174-180,

2008 査読:有

Ueda R, Kinoshita E, Ito R, Kawase T, Kawakami Y, Toda M

Induction of protective and therapeutic antitumor immunity by a DNA vaccine with a glioma antigen, SOX6.

Int J Cancer 122(10), 2274-2279, 2008

査読:有

Yaguchi M, Ohta S, Toyama Y, Kawakami Y, Toda M

Functional recovery after spinal cord injury in mice through activation of microglia and dendritic cells following IL-12 administration.

J Neurosci Res 86(9), 1972-1980, 2008

査読:有

Takahashi S, Yoshida K, Mikami S, Oya M, Kawase T.

Development of testicular alpha-fetoprotein-secreting germ cell tumor 3 years after treatment of intracranial lesion identified as non-secreting germ cell tumor on the basis of clinical data--case report.

Neurol Med Chir (Tokyo). 2008;48(11):522-525.

査読:有

Miwa T, Hirose Y, Sasaki H, Ikeda E, Yoshida K, Kawase T

Genetic characterization of adult infratentorial gliomas.

J Neurooncol. 2009 Feb;91(3):251-255.

Epub 2008 Oct 22. 査読:有

Mikami S, Kameyama K, Takahashi S, Yoshida K, Kawase T, Sano T, Mukai M.

Combined gangliocytoma and prolactinoma of the pituitary gland.

Endocr Pathol. 2008 Summer;19(2):117-121.

査読:有

Kobayashi M, Akaji K, Tanizaki Y, Mihara B, Ohira T, Kawase T

Posterior inferior cerebellar artery aneurysm associated with persistent primitive hypoglossal artery.

Neurol Med Chir (Tokyo).

2008 Jun;48(6):259-261. 査読:有

Ichimura S, Kawase T, Onozuka S, Yoshida K, Ohira T

Four subtypes of petroclival meningiomas: differences in symptoms and operative findings using the anterior transpetrosal approach.

Acta Neurochir (Wien). 2008 Jul;150(7):637-645.

Epub 2008 Jun 12. 査読:有

Ichimura S, Hayashi T, Yazaki T, Yoshida K, Kawase T

Dumbbell-shaped intradiploic epidermoid cyst involving the dura mater and cerebellum.

Neurol Med Chir (Tokyo).

2008 Feb;48(2):83-85. 査読:有

〔学会発表〕(計6件)

戸田正博

腫瘍幹細胞はここまで解析されている
第29回日本脳神経外科コンgres総会
2009/05/16

Toda M

Brain tumor stem cells and immunotherapy.
SuZhou and Keio Friendship Joint
Conference 2009
2009/02/21, 中国・蘇州

深谷雷太、大多茂樹、河上 裕、松崎有
未、岡野栄之、戸田正博、河瀬 斌
Glioma cancer stem cell をターゲットとし
た新規治療法の開発
第26回日本脳腫瘍学会
2008/11/30, 愛媛

戸田正博、大多茂樹、深谷雷太、河瀬 斌

脳腫瘍幹細胞の新たな分離法の開発
第26回日本脳腫瘍学会
2008/11/30, 愛媛

戸田正博

脳腫瘍特異抗原の解析と脳腫瘍幹細胞に対
する免疫療法への応用
第67回日本癌学会学術総会
2008/10/30, 名古屋

戸田正博

悪性脳腫瘍に対する新しい治療戦略
第12回 Water Front Neurosurgical
Conference
2008/06/15, 東京

〔図書〕(計1件)

戸田正博

腫瘍抗原とマーカー
グリオーマ - その最新知見 - ,
メジカルビュー社 130 ページ 32-35, 2009

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 癌ワクチン

発明者: 戸田正博、植田良、塚田晃三

権利者: 慶應義塾大学

種類: PCT/JP2008/072046

出願年月日: 2007/12/04

国内外の別: 外国

取得状況(計1件)

名称: HSVを用いた抗腫瘍剤

発明者: 戸田正博、河上裕、飯塚幸彦、
上田陽子、岩堀禎廣

権利者: 慶應義塾大学

種類: 10/513, 193

出願年月日: 2008/06/10

国内外の別: 外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸田 正博 (TODA MASAHIRO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 20217508

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

河瀬 斌 (KAWASE TAKESHI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 40095592

大多 茂樹 (OHTA SHIGEKI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 20365406