様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２３年５月１０日現在

機関番号：３２６５１
研究種目：基盤研究（Ｂ）
研究期間：２００８～２０１０
課題番号：２０３９０２１４
研究課題名（和文）：プロテオーム解析による膵癌幹細胞に対するペプチドワクチンの開発
研究課題名（英文）Studies on generation of peptide vaccine against cancer stem cells of pancreatic cancer using proteomic analysis
研究代表者
本間　定（HOMMA SADAMU）
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：５０１９２３２３

研究成果の概要（和文）：

ヒト膵癌の癌幹細胞に対する癌ワクチンを開発する目的で、膵癌細胞の side population 細胞（SP 細胞）を取り込ませた樹状細胞（DC）からの MHC class I 結合ペプチドの分離を試みた。ヒト膵癌細胞 Panc-1 の SP 細胞分画（癌幹細胞分画）、non-SP 細胞分画（非癌幹細胞分画）の lysate を DC にパルスした後可溶化し、HLA-A02 抗体で作製した affinity column chromatography により MHC class I/peptide 複合体の抽出を行った。その結果、SP 細胞 lysate を取り込ませた DC に特異的に認められる複数のペプチドイオンピークを同定した。このペプチドの中に膵癌幹細胞特異的な抗原性ペプチドが含まれる可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：

We have tried to identify cancer stem cell-specific antigenic peptide from dendritic cells (DCs) loaded with side-population (SP-population) of human pancreatic cancer cells. DCs pulsed with lysate of SP-fraction or non-SP-fraction of Panc-1 cells were treated with an adequate detergent and MHC class-I/antigenic peptide complex was isolated from these DCs using anti-HLA-A02 affinity column chromatography. The several specific peptides only from DCs loaded with SP-fraction were obtained. The isolated peptide is now being analyzed for identification of a possible candidate for peptide vaccine against cancer stem cells of human pancreatic cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総　計	7,000,000	2,100,000	9,100,000

、

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学、消化器内科学
キーワード：膵癌、ペプチドワクチン、プロテオーム、癌幹細胞、樹状細胞

１．研究開始当初の背景

癌組織を構成する癌細胞には癌幹細胞と呼ばれる極少数の細胞集団と多くの非癌幹細胞の癌細胞が存在すると考えられる。癌幹細胞は自己増殖能を示し、一回の細胞分裂で癌幹細胞と非癌幹細胞を生み出す不均等分裂を繰り返すことにより、癌組織を構成する多くの癌細胞（非癌幹細胞）を産生する。癌幹細胞は癌組織の維持、進展に必須の要素であり、さらに癌の遠隔転移、再発などにも中心的な役割を果たすといわれている。従って、真の癌の根治のためには癌幹細胞の根絶が必須であると考えられている。しかし、癌幹細胞は既存の癌治療法である抗癌剤、放射線などに強い抵抗性を示し、治療後の癌幹細胞の残存が癌再発に結び付くため、癌幹細胞を標的とした新たな治療法の開発が望まれている。癌幹細胞の発現する特異抗原を標的とする癌免疫療法は癌幹細胞根絶のための治療法として期待されている。

２．研究の目的

膵癌は極めて予後不良な悪性疾患であり、有効な治療法の早急な開発が望まれる。膵癌においても癌幹細胞の根絶は治療上必須の要素であるといえる。本研究ではヒト膵癌細胞の癌幹細胞に特異的に発現し、細胞傷害性T細胞に認識される抗原蛋白を同定し、そのペプチドワクチンを開発することにより膵癌の癌幹細胞を標的とした新規治療法を開発することを目的とする。

３．研究の方法

ヒト膵癌細胞（MIAPaCa2、またはPanc-1）の癌幹細胞の精製はCD133陽性細胞のmagnetic sortingによる分離､またはHoechist-33342未染の side-population 分画の FACS sorting による分離を用いて行った。癌幹細胞としての同定は少数の分離細胞をSCID マウス皮下に移植し（100-3 x 100/mouse）､腫瘍形成を示すかを観察した。MHC class I 分子に結合した抗原ペプチドの同定は膵癌の幹細胞と非幹細胞の細胞lysate を樹状細胞（DC）に取り込ませて後可溶化し、MHC class I 分子を認識する抗体を用いて作製した affinity column による affinity chromatography で MHC class I 分子・抗原ペプチド複合体を分離・精製し、酸処理により得られた抗原ペプチドを LC/MS を用いて解析して、癌幹細胞を取り込ませた DC のみに見られる抗原ペプチドを候補ペプチドとして同定することを試みた｡Affinity column 作製に用いる抗体は HLA-A*0201 を認識する単クローン抗体を産生する hybridoma をヌードマウス腹腔内に移植し、腹水より IgG を精製した。

４．研究成果

ヒト膵癌細胞 MIAPaCa2 から得られた CD133 陽性細胞と陰性細胞をそれぞれ SCID マウスに移植すると、当初CD133陽性細胞の方が良好な腫瘍形成を示すが、３カ月以上の長期観察の後は両者の腫瘍形成頻度に差はなく、CD133 発現の有無による癌幹細胞の分離は不適切と判断された。

次にヒト膵癌細胞 Panc-1 を用いて Hoechist-33342 未染の SP-population を FACS sorting を用いて分離した｡この細胞の lysate を HLA-*A0201 を発現する健康ボランテイア由来の DC に取り込ませ、detergent で可溶化した後、HLA-A*0201 抗体を用いて作製した affinity column に通過させ、酸処理により結合した MHC class I/抗原ペプチド複合体を溶出させた。コントロール DC、SP-fraction を取り込ませた DC、non-SP fraction を取り込ませた DC から由来した MHC class I 結合性ペプチド群を LC/MS により解析したところ、SP-fraction を取り込ませた DC にのみ特異的に認められる数種類のペプチドイオンピークが認められた。これらのペプチドの中に目的とする抗原ペプチドが含まれる可能性がある。

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８件）

1) Nagasaki E, Takahara A, Koido S, Sagawa Y, Aiba K, Tajiri H, Yagita H, Homma S. Combined treatment with dendritic cells and 5-fluorouracil elicits augmented NK-cell –mediated antitumor activity via tumor necrosis factor-alpha pathway. J Immunother. 2010; 33: 467-474.

2) Saeki C, Nakano M, Takahashi H, Saito S, Homma S, et al. Accumulation of functional regulatory T cells in a actively inflamed liver in mouse dendritic cell-based autoimmune hepatic inflammation. Clin Immunol. 2010; 135:156-166.

3) Koido S, Homma S, Hara E,, et al. Antigen–specific polyclonal cytotoxic T lymphocytes induced by fusions of dendritic cells and tumor cells. J Biomed Biotech. Volume 2010 (2010), Article ID 752381, 12 pages doi:10.1155/2010/752381

4) Koido S, Hara E, Homma S, et al. Dendritic/pancreatic carcinoma fusions for clinical use: comparative functional analysis of

healthy- versus patient-derived fusions. Clin Immunol. 2010; 135: 384-400.

5) Koido S, Homma S, Hara E, et al. Regulation of Tumor Immunity by Tumor/Dendritic Cell Fusions. Clin Dev Immunol. Volume 2010 (2010), Article ID 516768, 14 pages

6) Ito M, Suzuki H, Sagawa Y, Homma S. The identification of a novel Paneth cell-associated antigen in a familial adenomatous polyposis mouse model. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 400: 548-553.

7) Homma S, Koido S, Sagawa Y, et al. Antigenic stimulation with cytochrome P450 2J expressed in mouse hepatocellular carcinoma cells regulates host anti-tumour immunity. Clin Exp Immunol. 2009; 156(2): 344-52.

8) Koido S, Homma S, Hara E, et al. In vitro generation of cytotoxic and regulatory T cells by fusions of human dendritic cells and hepatocellular carcinoma cells. J Transl Med. 2008; 6: 51-70.

〔学会発表〕（計 32 件）

1) 本間　定、小井戸薫雄、込田英夫、ほか. 膵癌に対するWT1 ペプチド免疫療法. 第 48 回日本癌治療学会学術集会、京都、10 月 29 日、2010 年

2) 本間　定、佐川由紀子、高原映崇、永崎栄次郎、込田英夫、伊藤正紀、小井戸薫雄. 抗腫瘍免疫反応により産生されるインターフェロンガンマはゲムシタビン活性化酵素の発現を上昇させる. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、9 月 24 日、2010 年

3) 小井戸薫雄、本間　定、込田英夫、ほか. 臨床応用に向けた樹状細胞と膵癌細胞との融合膵癌ワクチン. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、9 月 24 日、2010 年

4) 西田純幸、武田　裕、小井戸薫雄、岡　芳弘、込田英夫、本間　定、ほか. 切除不能・再発進行膵臓癌に対するゲムシタビン併用WT1 ペプチドワクチン療法　第 1 相臨床試験. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、9 月 24 日、2010 年

5) 本間　定、高原映崇、小井戸薫雄. 進行膵癌に対するWT1 ペプチドワクチンと塩酸ゲムシタビンの併用効果のメカニズム. 第19回日本癌病態治療研究会、東京、7 月 1 日、2010 年

6) 本間　定、高原映崇、小井戸薫雄. 進行膵癌に対するWT1 ペプチドワクチンと塩酸ゲムシタビンの併用効果のメカニズム.日本消第 96 回化器病学会総会、新潟、 4 月 22 日、2010 年

7) 高原映崇, 永崎栄次郎, 小井戸薫雄, 佐川由紀子, 伊藤正紀, 越智俊元, 藤原弘, 安川正貴, 田尻久雄, 本間　定. 膵癌に対するWT1 ペプチドワクチンと塩酸ゲムシタビン併用療法の相乗効果のメカニズム. 第 22 回 日本バイオセラピィ学会学術集会総会.　大阪, 11 月 27 日、2009 年

8) Chisato Saeki, Masanori Nakano, Tsunegazu oikawa, Hiroki Takahashi, Sadamu Homma, et al. Accumulation of functional regulatory T cells in actively inflamed liver in mouse dendritic cell-based autoimmune hepatic inflammation. The 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. Boston, October 21, 2009.

9) 小井戸薫雄, 本間　定, 込田英夫, ほか. 進行肝細胞癌における樹状細胞ワクチンの免疫回避機構の解明. 第 51 回日本消化器病学会大会. 京都, 10 月 15 日、2009 年

10) 込田英夫, 小井戸薫雄, 本間　定, ほか. Conditional IL-12 Gene Therapy Promotes Safe amd effective Anti-Tumor Immunity.
第 51 回日本消化器病学会大会. 京都, 10 月 15 日、2009 年

11) 永崎栄次郎, 小井戸薫雄, 田尻久雄, 相羽恵介, 本間　定. 樹状細胞と 5-FUの併用療法はTNF-αを介した抗腫瘍効果. 第68回日本癌学会学術総会. 横浜, 10 月 3 日、2009 年

12) 小井戸薫雄, 本間　定, 原栄一, 込田英夫, 佐川由紀子, 高原映崇, 永崎栄二郎, 伊藤正紀, ほか. 肝細胞癌産生物質はヒト樹状細胞と癌細胞との融合細胞を未成熟化し抑制性T細胞を誘導する. 第 68 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10 月 3 日、2009 年

13) 込田英夫, Xi Zhao, 小井戸薫雄, 本間　定, ほか. On/offシステムによるIL-12 遺伝子治療により安全で効率的な抗腫瘍効果の誘導. 第68回日本癌学会学術総会. 横浜, 10 月 3 日、2009 年

14) 西田純幸，武田裕，岡芳弘，小井戸薫雄，込田英夫，伊藤壽記，本間　定，ほか．進行膵臓癌に対するゲムシタビン併用WT1 ペプチドワクチン療法．第 68 回日本癌学会学術総会．横浜，10 月 1 日、2009 年

15) 高原映崇, 永崎栄二郎, 小井戸薫雄, 佐川由紀子, 伊藤正紀, 田尻久雄, 本間　定. 膵癌に対するWT1 ペプチドワクチンと塩酸ゲムシタビン併用療法の相乗効果のメカニズム. 第68回日本癌学会学術総会. 横浜, 10 月 1 日、2009 年

16) 西田純幸, 武田裕, 岡芳弘, 小井戸薫雄, 本間定, ほか. WT1 ペプチドワクチンと塩酸ゲムシタビンを併用した進行膵臓癌に対する新たな治療戦略. 第 13 回日本がん免疫学会総会. 北九州, 6 月 25 日、2009 年

17) 込田英夫, 本間 定, 小井戸薫雄, ほか.肝血管肉腫に対する抗腫瘍免疫の誘導. 第 45 回肝臓病学、会. 神戸, 6 月 5 日、2009 年

18) 本間　定, 込田英夫, 小井戸薫雄, ほか.肝癌細胞に発現するチトクロームP450 分子の抗腫瘍免疫誘導における意義. 第 45 回日本肝臓学会. 神戸, 6 月 4 日、2009 年

19) 佐伯千里、中野真範、及川恒一、高橋宏樹、本間　定、ほか. 自己免疫性肝炎マウスモデルにおける制御性T細胞の動態と病態との関連の解析. 第 45 回日本肝臓学会総会. 神戸、6 月 4 日、2009

年
20) 込田英夫, 小井戸薫雄, 本間 定, ほか. 肝血管肉腫に対する抗腫瘍免疫の誘導. 第 95 回日本消化器病学会総会. 札幌, 5 月 9 日、2009 年
21) Shigeo Koido, Sadamu Homma, Eiichi Hara, et al. Fusions of human dendritic cells and hepatocellular carcinoma cells induce cytotoxic and regulatory T cells in vitro. Keystone Symposia, Dendritic Cells (Z2) 2009, May 18, Banff, Canada.
22) Shigeo Koido, Eiichi Hara, Sadamu Homma, et al. Fusions of human dendritic cells and pancreatic carcinoma cells induce antigen-specific antitumor immune responses. Digestive Disease Week 2009, May 15, CHICAGO, ILINOIS.
23) 高原映崇、本間 定、田尻久雄. 膵臓癌に対する塩酸ゲムシタビンとWT1 ペプチドワクチン併用療法の有効性に関する基礎的検討. 第95回日本消化器病学会総会、札幌、5 月 8 日、2009 年
24) 小井戸薫雄, 込田英夫, 本間 定, ほか. トール様受容体を刺激した樹状細胞と熱処理した大腸癌細胞の融合細胞は効果的な細胞傷害性T細胞を誘導する. 第 95 回日本消化器病学会総会, 札幌, 5 月 8 日、2009 年
25) 永崎栄次郎、高原映崇、小井戸薫雄、相羽恵介、本間 定. DCワクチンと 5-FU併用のNK細胞を介する抗腫瘍増強効果. 第21回日本バイオセラピィ学会、東京、11 月 18 日、2008 年
26) 込田英夫, 本間 定, 小井戸薫雄, ほか. 固形腫瘍拒絶抗原としてのHemoglobin-β の効果 Short Title: DC-IL12 gene therapy of cancer 第２１回日本バイオセラピィ学会、東京、11 月 18 日、2008 年
27) 込田英夫、小井戸薫雄、田尻久雄、本間 定、ほか. IL-12 遺伝子導入樹状細胞の腫瘍内投与は腫瘍血管を標的とした抗腫瘍抗果を示す 第 67 回 日本癌学会学術総会、名古屋、10 月 30 日、2008 年
28) 小井戸薫雄、原栄一、本間 定、ほか. トール様受容体を刺激した樹状細胞と熱処理した癌細胞との融合細胞による細胞傷害性T細胞の誘導 第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、10 月 29 日、2008 年
29) 原栄一、坂本裕彦、小川匡市、渡部道章、田中俊英、本間 定、小井戸薫雄 初代がん細胞株の樹立：大腸がん、膵臓がん、メラノーマ、脳転移性腫瘍 第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、10 月 29 日、2008 年
30) 小井戸薫雄、本間 定、光永眞人、ほか. 樹状細胞と肝細胞癌との融合細胞ワクチンによる免疫応答の誘導、第 50 回日本消化器病学会大会 JDDW、 東京、10 月 2 日、2008 年
31) 込田英夫, 小井戸薫雄, 田尻久雄, 本間 定, ほか. 第 12 回基盤的癌免疫研究会総会、東京、７月 2 日、2008 年
32) 小井戸薫雄, 本間 定、高原映崇、ほか. アロ癌細胞株と自己樹状細胞との融合細胞にて誘導されたMUC1 特異的細胞障害性Ｔ細胞の特徴 第 94 会日本消化器病学会総会、福岡、5 月 9 日、2008 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）
○取得状況（計 0 件）

６．研究組織
(1)研究代表者
本間 定
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50192323

(2)研究分担者
小井戸 薫雄
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70266617

伊藤 正紀
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：80297366