

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17619

研究課題名（和文）術後肝内再発抑制法開発に向けた肝癌幹細胞特異的なHLA抗原ペプチドの同定

研究課題名（英文）Identification of HLA-binding peptides of liver cancer stem cells

研究代表者

兼清 信介（Kanekiyo, Shinsuke）

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：80555730

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：抗ヒトHLA*A24:02抗体を用いて作製したセファロースビーズカラムでの免疫沈降により濃縮したペプチドを質量分析による網羅的解析（peptidome解析）を細胞株ライセートおよび臨床サンプルを用いて行った。得られたペプチド配列とそのペプチドを含むタンパクをコードするmRNA発現との関連を検討した結果、mRNA発現が高い産物はコンセンサス配列と相同であった。条件検討を重ねた結果、陽イオン交換にSCXカラムを用いることでペプチド同定数を向上させることに成功した。これによりFDR<5%の9-merペプチドを1000近く同定でき、その大部分はHLA結合コンセンサス配列を示すものであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞上でのHLA拘束ペプチドの配列同定は、オーダーメイド癌免疫療法の実現に向けて学術的・社会的に意義がある。本研究によって、peptidome解析（がん組織と抗HLA抗体を用いた免疫沈降物の質量分析）の感度を向上させることができた。得られたペプチド配列を検討した結果、HLA拘束ペプチドはコンセンサス配列との相性を示し、元となるタンパクをコードするmRNAレベルでは高い発現を示した。これらの結果から、プロテオミクスではなく次世代シーケンサーを用いた解析データのみでも、個々の症例に応じたHLA拘束ペプチドの配列を予測できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Comprehensive analysis by mass spectrometry (peptidome analysis) of peptides enriched by immunoprecipitation on a Sepharose bead column prepared with anti-HLA*A24:02 antibody was performed. The peptide sequences obtained were correlated with the mRNA expression encoding the protein containing the peptide, and the product with high mRNA expression was homologous to the consensus sequence. As a result of repeated experimental condition examinations, we succeeded in improving the peptide identity by using SCX columns for cation exchange. This allowed us to identify nearly 1,000 9-mer peptides with FDR<5%, most of which showed HLA-binding consensus sequences.

研究分野：消化器外科

キーワード：癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌 (HCC) は多中心性発癌に加えて、肝内転移によって再発率の高い予後不良な癌種である。近年、上皮間葉系移行 (EMT) や癌幹細胞 (CSC) が転移・再発に重要と考えられている (Yang J et al., Cell, 2004, Li F et al., Cancer Res., 2007)。CSC は、抗癌剤・放射線治療に対する抵抗性を有しており、癌の根治のためには CSC を標的にした治療法が必要であり、CSC のマーカー探索や機能解析が盛んに行われている。HCC においても、細胞株から side-population (SP) 画分や、CD133 等を CSC マーカーとして分離が行われている (Chiba T et al., Hepatol., 2006)。乳癌においては、EMT を起こした癌細胞が CSC 様の表現型を示すことが報告され (Mani SA et al., Cell, 2008)、CSC 自身の不均一性 (heterogeneity) や分化した癌細胞から CSC への plasticity (可塑性) に対する認識が広まってきた。また、CSC の治療抵抗性には免疫療法に対する抵抗性も提唱されているが、詳細な解析は成されていないのが現状である。

CSC を研究するためには、細胞集団内に僅かに存在する CSC を研究材料とする必要がある。我々は、消化器癌 (膵癌、肝癌、胃癌、大腸癌) における CSLC の誘導・濃縮方法を独自に考案し (特許 6090735)、従来、細胞集団から数%しか分離できなかった CSLC を高効率に誘導・濃縮し、解析を進めてきた。その結果、肝癌 CSLC は種々の抗癌剤耐性亢進を示し、細胞周期における休眠、薬剤排出亢進、活性酸素種産生抑制による薬剤耐性機構の特徴を備えることを明らかとした (Hashimoto N, et al., BMC Cancer. 2014)。また、経門脈的肝腫瘍形成を評価し、CSLC が肝転移能亢進を示すと確認した (Nishiyama M, et al., Cancer Sci. 2018)。

我々は、転移抑制に癌免疫療法の適用を考えているが、CSC は免疫監視も逃れていると考えられている。実際、我々の CSLC においても PD-L1 発現亢進だけでなく NK 細胞からの免疫逃避を示唆するデータを得ている。つまり、我々の CSLC は獲得免疫系だけでなく自然免疫に対しても免疫監視を逃れていると示唆される。癌免疫逃避に対しては、免疫チェックポイント阻害剤や免疫アジュバントの開発が成果を挙げてきている。癌抗原については、癌組織の中でほとんどの癌細胞が発現する肝癌での GPC3 や HSP70 等が挙げられ、我々も GPC3 等に対するペプチドを用いて免疫療法の臨床試験を行ってきている。癌組織における網羅性の高い GPC3 等に加えて、rare population だが治療標的とすべき CSLC に特異的な抗原を標的とすることで、免疫療法の向上が期待される。近年の proteomics、特に質量分析の向上により、細胞表面の HLA 拘束ペプチドの網羅的同定 (peptidome 解析) が可能となってきた。しかしながら、癌組織は極めて不均一性が高く、CSLC の存在割合も極少数であることから、患者臨床検体そのものからのオーダーメイドでの癌特異的ペプチドの同定は困難なのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は、「予後不良な HCC に対して有望な治療標的 (転移・再発機構) は何か」との問いに対して、転移抑制に有用な CSLC 特異的 HLA 拘束ペプチドを同定し、癌転移抑制免疫療法へつなげることを目的とする。

3. 研究の方法

細胞株及びヒト臨床サンプル

ヒト肝がん細胞株 Hep G2, SK-HEP-1 および、IRB 承認・書面による同意を得た外科切除凍結保存サンプルを用いた。各サンプルは、液体窒素により冷却された破砕用金属ケースに入れ、Retsch MM400 を用いて破砕した後に、Lysis buffer にて溶解し、cell lysate とした。cell lysate は超遠心分離 (150,000 x g, 70 min) によりさらに分画し、さらにフィルターにより残渣を除去した。

抗体精製

免疫沈降に用いる抗 HLA*24:02 抗体は、CELLline Disposable Bioreactor と Hybridoma-SFM 培地を用いて培養したハイブリドーマ (C7709A2.6) の培養上清から Protein G カラムを用いて精製した。精製した抗体は CNBr-activated Sepharose 4B 担体に結合させ、抗体結合ゲルとした。

免疫沈降法

抗体結合ゲルをカラムに充填し、PBS による洗浄を行った後に、cell lysate を一晚、4℃にて循環させた。PBS および H₂O による洗浄を繰り返したのちに、0.2% トリフルオロ酢酸により溶出した。

質量分析法

免疫沈降法からの溶出液を固相抽出、脱塩・濃縮した後に Q Exactive Plus 質量分析計に供し、Mascot 解析を行った。

4. 研究成果

HLA 拘束ペプチドの単離同定を試みた。細胞数 1×10^9 個を用いた予備試験において、 1×10^7 個相当の細胞からペプチド同定可能と示唆された。そこで、日本人に多い HLA*A24:02 を標的として、ハイブリドーマから精製した抗ヒト HLA*A24:02 抗体を用いて作製したセファロースビーズカラムでの免疫沈降により濃縮したペプチドを質量分析による網羅的解析 (peptidome 解析) を HepG2 細胞株ライセートおよび、CSLC の誘導効率が高く HLA*A24:02 を有する SK-HEP-1 株と誘導した CSLC について 1×10^7 細胞からのライセートを用いて同様に解析を行った。また、臨床サンプルについても解析を行った。

それぞれから >500 個の 9-mer ペプチド配列を得たが、 1×10^9 細胞からの HepG2 ライセートからの免疫沈降物を希釈しての解析と比較して、HLA 結合コンセンサス配列から外れた配列が多く見られた (図 1)。また、得られたペプチド配列とそのペプチドを含むタンパクをコードする mRNA 発現との関連を検討した結果、mRNA 発現が高い産物はコンセンサス配列と相同であった。

Identification of HLA presenting peptides

Hepatocellular carcinoma frozen tissue: 0.3 g

Immune precipitation with 1 mg anti-HLA-A24 monoclonal antibody (C7709A2.6)
bound to CNBr-activated Sepharose 4B

Mass spectrometer: Q Exactive Plus → Mascot search

504 peptide (IonsScore; >=10)

>=11-mer: 178
10-mer: 81
9-mer: 185
8-mer: 24
7-mer: 36

185 peptide (9-mer, IonsScore; >=10)

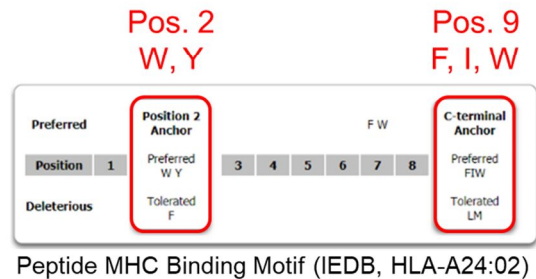
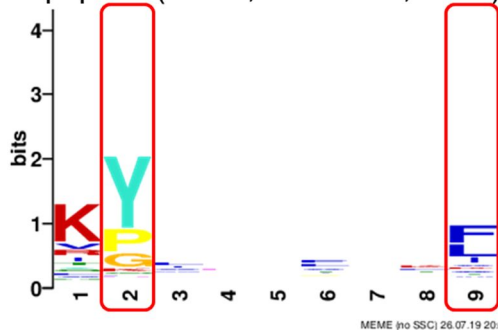


図 1. ヒト臨床サンプルからの HLA 結合ペプチド配列
右に示すヒト MHC 結合コンセンサス配列と相同な配列が左に示されるように得られた。

Relationship between peptides and RNAs

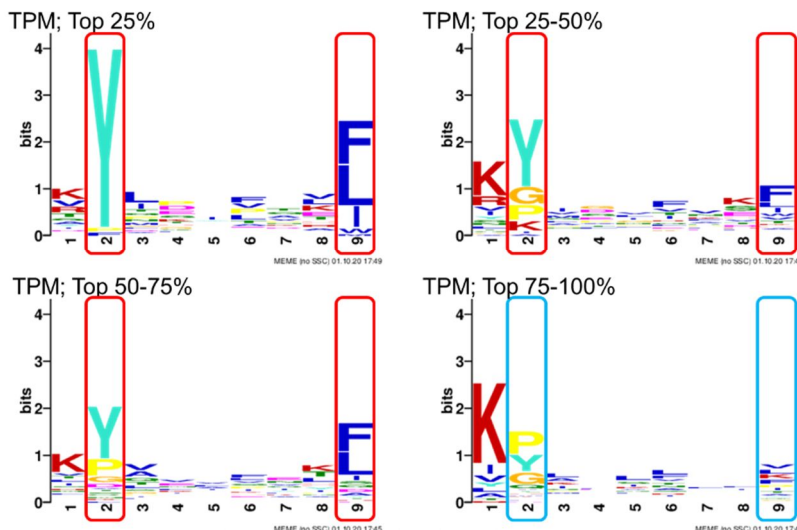


図 2. ペプチドの元タンパクをコードする mRNA 発現におけるペプチド配列

しかしながら、得られた総ペプチド数は想定よりも少なかったことから、peptidome 解析の条件検討を改めて行った。サンプルの前処理において限外ろ過による分子量分画はロスが多かったが、陽イオン交換に SCX カラムを用いることでペプチド同定数を向上させることに成功した。これにより FDR<5%の 9-mer ペプチドを 1000 近く同定でき、その大部分は HLA 結合コンセンサス配列を示すものであった。

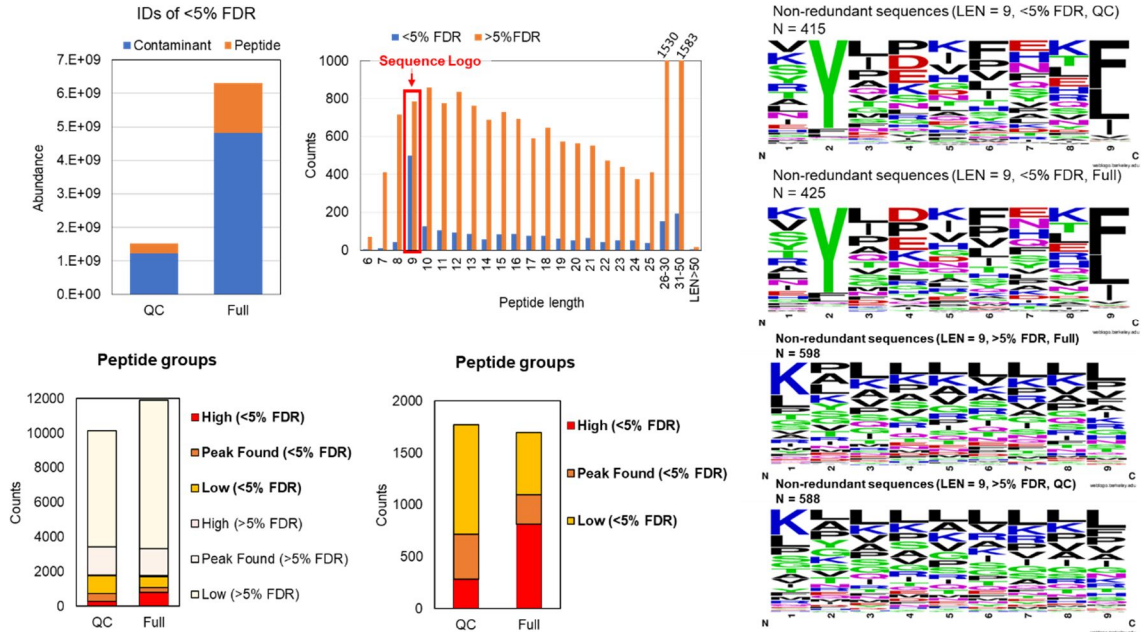


図 3. 条件検討後に得られたペプチド配列

当初の見込みと異なり、十分な数のペプチド配列を同定するためには、多くの条件検討が必要であった。条件検討を重ねたことで、少量の臨床サンプルからでも十分なペプチド配列の同定が可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsunedomi Ryouichi, Yoshimura Kiyoshi, Kimura Yuta, Nishiyama Mitsuo, Fujiwara Nobuyuki, Matsukuma Satoshi, Kanekiyo Shinsuke, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Watanabe Yusaku, Tokumitsu Yukio, Yoshida Shin, Iida Michihisa, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Ioka Tatsuya, Hazama Shoichi, Nagano Hiroaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Elevated expression of RAB3B plays important roles in chemoresistance and metastatic potential of hepatoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-022-09370-1	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 Fujiwara Yasuhiro, Tsunedomi Ryouichi, Yoshimura Kiyoshi, Matsukuma Satoshi, Fujiwara Nobuyuki, Nishiyama Mitsuo, Kanekiyo Shinsuke, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Tokumitsu Yukio, Yoshida Shin, Iida Michihisa, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Ioka Tatsuya, Hazama Shoichi, Nagano Hiroaki	4. 巻 50
2. 論文標題 Pancreatic Cancer Stem-Like Cells With High Calreticulin Expression Associated With Immune Surveillance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 405 ~ 413
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPA.0000000000001772	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 Yamada Kensuke, Hazama Shoichi, Suzuki Nobuaki, Xu Ming, Nakagami Yuki, Fujiwara Nobuyuki, Tsunedomi Ryouichi, Yoshida Shin, Tomochika Shinobu, Matsukuma Satoshi, Matsui Hiroto, Tokumitsu Yukio, Kanekiyo Shinsuke, Shindo Yoshitaro, Watanabe Yusaku, Iida Michihisa, Takeda Shigeru, Ioka Tatsuya, Ueno Tomio, et al.	4. 巻 21
2. 論文標題 Siglec-7 is a predictive biomarker for the efficacy of cancer vaccination against metastatic colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1 ~ 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.12271	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 Nakashima-Nakasuga Chiyo, Hazama Shoichi, Suzuki Nobuaki, Nakagami Yuki, Xu Ming, Yoshida Shin, Tomochika Shinobu, Fujiwara Nobuyuki, Matsukuma Satoshi, Matsui Hiroto, Tokumitsu Yukio, Kanekiyo Shinsuke, Shindo Yoshitaro, Maeda Noriko, Tsunedomi Ryouichi, Iida Michihisa, Takeda Shigeru, et al.	4. 巻 25
2. 論文標題 Serum LOX-1 is a novel prognostic biomarker of colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1308 ~ 1317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-020-01673-2	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 Nakajima Masao, Hazama Shoichi, Tamada Koji, Udaka Keiko, Kouki Yasunobu, Uematsu Toshinari, Arima Hideki, Saito Akira, Doi Shun, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Matsukuma Satoshi, Kanekiyo Shinsuke, Tokumitsu Yukio, Tomochika Shinobu, Iida Michihisa, Yoshida Shin, Nakagami Yuki, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, et al.	4. 巻 69
2. 論文標題 A phase I study of multi-HLA-binding peptides derived from heat shock protein 70/glypican-3 and a novel combination adjuvant of hLAG-3lg and Poly-ICLC for patients with metastatic gastrointestinal cancers: YNP01 trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 1651 ~ 1662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-020-02518-7	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤原康弘、兼清信介、他
2. 発表標題 膵癌幹細胞様細胞の細胞表面における免疫関連分子の検討
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 恒富亮一、兼清信介、他
2. 発表標題 治療抵抗性肝癌幹細胞様 Sphere 細胞における RAB3B の役割
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木伸明、兼清信介、他
2. 発表標題 切除可能肝細胞癌に対する微小環境をターゲットにした新規ペプチドワクチン療法
3. 学会等名 第42回日本癌局所療法研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新藤芳太郎、兼清信介、他
2. 発表標題 切除可能肝細胞癌に対する新規ペプチドワクチンを用いた周術期補助療法の開発
3. 学会等名 第41回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松井洋人、兼清信介、他
2. 発表標題 樹状細胞ワクチンによる肝細胞癌術後補助療法（第 / 相臨床試験） 最終報告と今後の展望
3. 学会等名 第41回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木伸明、兼清信介、他
2. 発表標題 消化器癌における抑制性免疫解除と革新的新規免疫療法の開発
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 恒富亮一、兼清信介、他
2. 発表標題 治療抵抗性肝癌幹細胞様 Sphere 細胞における RAB3B 遺伝子
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 恒富亮一、兼清信介、他
2. 発表標題 誘導癌幹細胞における免疫逃避機構の検討
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------