

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18日現在

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591644
 研究課題名（和文） ガンマデルタ T 細胞と樹状細胞を用いた癌幹細胞特異的免疫療法の開発
 研究課題名（英文） Development of cancer stem cell specific therapy using gamma-delta T cells and dendritic cells
 研究代表者
 田中文明（TANAKA FUMIAKI）
 九州大学・大学病院・講師
 研究者番号：30332836

研究成果の概要（和文）：消化器癌において自己複製能と多分化能を有する癌細胞、すなわち癌幹細胞様細胞が存在することを初めて明らかにした。癌治療において、癌幹細胞を治療することができれば、難治性癌をコントロールできる可能性がある。新規癌幹細胞マーカーとして CD13 を同定し報告した。MH129 細胞(C3H マウス由来、肝細胞株)を用いて、投与したマウスに対する抗腫瘍効果解析を行った。癌細胞投与前にワクチンとして投与する予防モデルにて、腫瘍抑制効果を発揮した。

研究成果の概要（英文）： We reported the presence of cancer stem cells (CSS), showing the characters of self-renew and multi-potential deviation, in gastrointestinal cancer. Toward the cancer therapy, complete control of cancer cells would be obtained targeting cancer stem cells. We reported in this study that CD13 as cancer stem cell marker. Using MH129 cells (C3H derived HCC), we achieved that antitumor effect. A prevention method, such as injection of CSS before inoculation of MH129 cells, antitumor effect was observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：(1)癌幹細胞 (2) 細胞周期 (3) 肝細胞 (4) 癌特異的免疫療法 (5) ガンマデルタ T 細胞

1. 研究開始当初の背景

われわれの実験によって世界で初めて消化器癌幹細胞の存在およびその生物学的特徴を捉えることに成功した(*Stem Cells, 2006*)。ヒト大腸癌臨床検体において、CD133 が癌幹細胞同定の強力な表面マーカーであるという報告が多数なされたが、われわれはさらに CD44/CD133 がさらに有効であることを発表した(*Ann Surg Oncol, 2008*)。

また、標的とする癌細胞を特異的に破壊する方法として、われわれはこれまでに癌抗原（癌細胞のみに発現し正常細胞に発現しないタンパク質）を発現する癌細胞を特異的に破壊する癌特異的免疫療法を開発し、2005年2月より高度先進医療に認可された。

癌幹細胞に対する特異的免疫療法の報

告はほとんどない

2. 研究の目的

血液腫瘍細胞における幹細胞を同定する手法として、癌細胞集団から癌幹細胞が多く含まれる Side Population(SP)成分を抽出する方法があるが、われわれは本法を消化器癌に応用した。肝細胞癌細胞株 HuH7 を用いて SP 細胞を抽出したところ、SP 細胞は全体の 0.2-2.2% を占め、肝細胞および胆管細胞に特徴的な蛋白を合成する 2 種類の細胞に分化すること、SP 以外の細胞成分に比較し、抗癌剤（アドリアマイシン、5FU、ジェムシタビン）に抵抗性を示し、腫瘍造成能の亢進を示すことが明らかとなった。（*Stem Cells*, 2006）。また、ヒト大腸癌幹細胞の表面マーカーとして CD133 の報告が多数なされたが、われわれの教室では CD133/CD44 がさらに有用な癌幹細胞マーカーであることを報告した（*Ann Surg Oncol*, 2008）。

他方、われわれは、癌組織にのみ発現を認め正常組織には発現を認めない癌抗原の同定を積極的に実施し、**3ステップマイクロアレイ法**を用いた**新しい癌精巢抗原 STK31 を同定**した（*Cancer Res*, 2008）。さらに同定した癌抗原を特異的に破壊させるために、樹状細胞を利用した癌特異的免疫療法の開発に従事し、その成果は新規癌抗原の同定、**癌抗原ペプチドの同定（世界特許獲得）**、さらには臨床応用として結実した。この治療法は 2005 年 2 月に高度先進利用に採用され、現在も積極的に施行中である。

近年、ガンマデルタ T 細胞を介した樹状細胞の分化のメカニズムが明らかになりつつある（Casetti R, Martino A, *Cell Mol Immunol*. 2008）。これまでの分化誘導法と比較して強力な抗原獲得・提示能力を有する樹状細胞の作製が示唆される。

上記の研究を介して本研究を着想するに至った。すなわち、個々臓器の癌における、癌幹細胞を同定し、その生物学的特徴を明らかにすることができれば癌幹細胞を特異的に破壊する新規治療が可能となることが示唆される。

3. 研究の方法

多種の組織由来の癌細胞株を用いて、癌幹細胞を同定する。足がかりとして、すでにこれまでの研究で明らかとなったヒト肝臓癌幹細胞、ヒト大腸癌幹細胞を用いた *in vitro* 解析、またマウス肝臓癌幹細胞を用いた *in vitro* 解析をすすめる。

樹状細胞解析は、古典的手法(GM-CSF、IL-4 による分化、OK432 による成熟化)によって作製された樹状細胞と、ガンマデルタ T 細胞刺激による樹状細胞の *in vitro* による抗原獲得・提示能力の解析、またマウスを用いた *in vivo* での抗腫瘍効果の解析を行う

4. 研究成果

消化器癌において自己複製能と多分化能を有する癌細胞、すなわち癌幹細胞様細胞が存在することを初めて明らかにした。癌は癌幹細胞とそれから分化した癌細胞によって構成され、そのため治療による感受性が同一患者の癌細胞内でも異なる。癌幹細胞が遠隔転移をすれば同様に治療抵抗性な腫瘍を形成する。すなわち、癌治療において、癌幹細胞を治療することができれば、再発・転移を含めて難治性癌をコントロールできる可能性がある。

〈臨床検体を用いた癌幹細胞の同定〉

昨年度研究成果により、新規癌幹細胞マーカーとして CD13 を同定し報告した。細胞株細胞を用いた研究は終了した。そこで、臨床検体を用いた、癌幹細胞の同定を行った。十分なインフォームドコンセントを得た後に、患者手術検体を用いた解析を行った。患者癌摘出部より薄切切片を作製し、上記実験で明らかとなった候補分子の免疫染色を行った結果、大腸癌クリプト底部に CD13 の発現陽性細胞を認めた。また、摘出標本をコラゲナーゼ処理し、細胞成分を FACS を用いてソーティングを行い、標的とする細胞成分を単離を試みたが、抗体の性質が本解析に不適合だったため、抽出はなされなかった。〈癌幹細胞を特異的に破壊する抗腫瘍免疫能の誘導〉

FACSでの精密な分離ができなかったために、より精密な解析は困難であった。しかしながら bulky に分離した癌幹細胞を高濃度の抗癌剤処理を行い、平成22年度に実施したガンマデルタ T 細胞刺激樹状細胞と、古典的樹状細胞による抗原獲得・提示能力の検討を *in vivo* で実施した。MH129細胞(C3Hマウス由来、肝細胞株)を用いて、癌幹細胞のみ、非癌幹細胞のみ、また同時投与したマウスに対する抗腫瘍効果解析を行った。癌細胞投与前にワクチンとして投与する予防モデルにて、腫瘍抑制効果を発揮した。

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 24 件）

1. Miyoshi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Hitora T, Tei M, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. TGM2 Is a Novel Marker for Prognosis and Therapeutic Target in Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2010 Apr;17(4):967-72. DOI: 10.1245/s10434-009-0865-y
2. Miyoshi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Nagai K, Uemura M, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. ATP11A is a novel predictive marker for metachronous metastasis of colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2010 Feb;23(2):505-10. Doi: 10.3892/or_00000662
3. Iwatsuki M, Mimori K, Sato T, Toh H, Yokobori T, Tanaka F, Ishikawa K, Baba H, Mori M. Overexpression of SUGT1 in human colorectal cancer and its clinicopathological significance. *Int J Oncol*. 2010 Mar;36(3):569-75. Doi: 10.3892/ijo_00000531
4. Motoyama K, Inoue H, Mimori K, Tanaka F, Kojima K, Uetake H, Sugihara K, Mori M. Clinicopathological and prognostic significance of PDCD4 and microRNA-21 in human gastric cancer. *Int J Oncol*. 2010 May;36(5):1089-95. Doi: 10.3892/ijo_00000590
5. Tanaka F, Mimori K, Tahara K, Inoue H, Mori M. Saline replacement after local resection of the breast: a simple technique with good control and improved patient satisfaction. *Breast Cancer*. 2010 Oct;17(4):261-4. DOI: 10.1007/s12282-009-0145-5
6. Yokobori T, Mimori K, Ishii H, Iwatsuki M, Tanaka F, Kamohara Y, Ieta K, Kita Y, Doki Y, Kuwano H, Mori M. Clinical Significance of Stanniocalcin 2 as a Prognostic Marker in Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2010 Oct;17(10):2601-7. DOI: 10.1245/s10434-010-1086-0
7. Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Ohkuma M, Kim HM, Akita H, Takiuchi D, Hatano H, Nagano H, Barnard GF, Doki Y, Mori M. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest*. 2010 Sep;120(9):3326-39. doi: 10.1172/JCI42550.
8. Nagahara M, Mimori K, Kataoka A, Ishii H, Tanaka F, Nakagawa T, Sato T, Ono S, Sugihara K, Mori M. Correlated expression of CD47 and SIRPA in bone marrow and in peripheral blood predicts recurrence in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2010 Sep 15;16(18):4625-35. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0349
9. Kita Y, Mimori K, Iwatsuki M, Yokobori T, Ieta K, Tanaka F, Ishii H, Okumura H, Natsugoe S, Mori M. STC2: A Predictive Marker for Lymph Node Metastasis in Esophageal Squamous-Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2011 Jan;18(1):261-72. DOI: 10.1245/s10434-010-1271-1
10. Nishida N, Mimori K, Yokobori T, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Doki Y, Mori M. FOXC2 is a Novel Prognostic Factor in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2011 Feb;18(2):535-42. DOI: 10.1245/s10434-010-1274-y
11. Nishida N, Yokobori T, Mimori K, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Doki Y, Kuwano H, Mori M. MicroRNA miR-125b is a prognostic marker in human colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2011 May;38(5):1437-43. doi: 10.3892/ijo.2011.969.
12. Nishida N, Mimori K, Fabbri M, Yokobori T, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Doki Y, Mori M. MicroRNA-125a-5p is an independent prognostic factor in gastric cancer, and inhibits the proliferation of human gastric cancer cells in combination with trastuzumab. *Clin Cancer Res*. 2011 May 1;17(9):2725-33. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2132
13. Nagahara M, Nishida N, Iwatsuki M, Ishimaru S, Mimori K, Tanaka F, Nakagawa T, Sato T, Sugihara K, Hoon DS, Mori M. Kinesin 18A expression clinical relevance to colorectal cancer progression. *Int J Cancer*. 2011 Dec 1;129(11):2543-52. doi: 10.1002/ijc.25916.
14. Kawamoto M, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Kamohara Y, Mori M. Identification of HLA-A*0201/-A*2402-restricted CTL epitope-peptides derived from a novel cancer/testis antigen, MCAK, and induction of a specific antitumor immune response. *Oncol Rep*. 2011 Feb;25(2):469-76. doi: 10.3892/or.2010.1101.
15. Tokuoka M, Miyoshi N, Hitora T, Mimori K, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. Clinical significance of ASB9 in human colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2010 Nov;37(5):1105-11. Doi: 10.3892/ijo_00000762
16. Tanaka F, Yamamoto K, Suzuki S, Inoue H, Tsurumaru M, Kajiyama Y, Kato H, Igaki H, Furuta K, Fujita H, Tanaka T, Tanaka Y, Kawashima Y, Natsugoe S, Setoyama T, Tokudome S, Mimori K, Haraguchi N, Ishii H, Mori M. Strong interaction between the effects of alcohol consumption and smoking on oesophageal squamous cell carcinoma among individuals with ADH1B and/or ALDH2 risk alleles. *Gut*. 2010 Nov;59(11):1457-64. Epub 2010 Sep 9. doi:10.1136/gut.2009.205724
17. Nagahara M, Mimori K, Kataoka A, Ishii H, Tanaka F, Nakagawa T, Sato T, Ono S, Sugihara K, Mori M. Clinicopathological and prognostic significance of PDCD4 and microRNA-21 in human gastric cancer. *Int J Oncol*. 2010 May;36(5):1089-95. Doi: 10.3892/ijo_00000590
18. Miyoshi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Nagai K, Uemura M, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. ATP11A is a novel predictive marker for metachronous metastasis of colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2010 Feb;23(2):505-10.

- Doi:** 10.3892/or_00000662
19. Miyoshi N, Ishii H, Nagai KI, Hoshino H, Mimori K, Tanaka F, Nagano H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 5;107(1):40-5.
doi: 10.1073/pnas.0912407107
 20. Miyoshi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Hitora T, Tei M, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. TGM2 Is a Novel Marker for Prognosis and Therapeutic Target in Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2010 Apr;17(4):967-72.
DOI: 10.1245/s10434-009-0865-y
 21. Ieta K, Tanaka F, Yokobori T, Kita Y, Haraguchi N, Mimori K, Kato H, Asao T, Inoue H, Kuwano H, Mori M. Clinicopathological significance of stanniocalcin 2 gene expression in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2009 Aug 15;125(4):926-31.
DOI: 10.1002/ijc.24453
 22. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Tanaka F, Tahara K, Inoue H, Baba H, Mori M. A platinum agent resistance gene, POLB, is a prognostic indicator in colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2009 Sep 1;100(3):261-6.
DOI: 10.1002/jso.21275
 23. Motoyama K, Inoue H, Takatsuno Y, Tanaka F, Mimori K, Uetake H, Sugihara K, Mori M. Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2009 Apr;34(4):1069-75.
Doi: 10.3892/ijo_00000233
 24. Kita Y, Mimori K, Tanaka F, Matsumoto T, Haraguchi N, Ishikawa K, Matsuzaki S, Fukuyoshi Y, Inoue H, Natsugoe S, Aikou T, Mori M. Clinical significance of LAMB3 and COL7A1 mRNA in esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2009 Jan;35(1):52-8.
Doi: 10.3892/ijo_00000233

[学会発表] (計 18 件)

1. 田中文明、川本恵、主藤朝也、柴田浩平、三森功士、森正樹. 新規癌特異遺伝子 MCAK 癌抗原ペプチド同定と癌特異的免疫治療への応用. 2011. 5. 19. 和歌山
2. 田中文明、井上裕、石丸神矢、西田尚弘、岩谷岳、古後龍之介、主藤朝也、柴田浩平、三森功士、石井秀始、森正樹. ゲノム解析から選択された ADH1B または ALDH2 遺伝子多型は、飲酒と喫煙により食道扁平上皮癌罹患に強く相関する. 第 111 回日本外科学会. 2011. 5. 26. 紙上開催
3. 田中文明、井上裕、石丸神矢、西田尚弘、岩谷岳、主藤朝也、柴田浩平、三森功士、石井秀始、森正樹. ゲノム解析から選択された ADH1B または ALDH2 遺伝子多型と食道扁平上皮癌罹患: 飲酒と喫煙との相互関係. 第 66 回日本消化器外科学会. 2011. 7. 名古屋
4. 田中文明、川本恵、主藤朝也、柴田浩平、三森功士、森正樹. 新規癌精巢抗原 MCAK からの CTL エピトープの同定とヒト抗腫瘍効果の誘導. 第 70 回日本癌学会. 2011. 10. 4. 名古屋
5. 田中文明、古後竜之介、石川健二、主藤朝也、三森功士、柴田浩平、森正樹. 樹状細胞と癌抗原を用いた消化器癌ワクチン治療: 癌幹細胞を標的として. 65 回日本消化器外科学会総会. 2010. 7. 14. 下関
6. 田中文明、山本健、鈴木貞夫、井上裕、主藤朝也、三森功士、柴田浩平、石井秀始、森正樹. *ADH1B* または *ALDH2* 遺伝子多型を有すると、飲酒と喫煙が食道扁平上皮癌罹患により強く相関する. 第 64 回日本食道学会学術総会. 2010. 9. 1. 久留米
7. Tanaka F, Yamamoto K, Suzuki S, Inoue H, Koshi Mimori, Ishii H, Mori M. Strong interaction between alcohol drinking and smoking habits on esophageal squamous cell carcinoma was observed among only individuals having *ADH1B* and/or *ALDH2* variants. 第 69 回日本癌学会総会. 2010. 9. 24. 大阪
8. 田中文明、石川健二、主藤朝也、三森功士、柴田浩平、森正樹. 癌幹細胞を標的とした癌治療開発: 癌ワクチン治療への応用. 第 110 回日本外科学会定期学術集会、ワークショップ 1. 2010. 4. 8. 名古屋
9. 田中文明、古後龍之介、主藤朝也、三森功士、柴田浩平、森正樹. 固形癌に対する樹状細胞を用いた癌特異的免疫治療の現状と今後の工夫. 第 31 回癌免疫外科研究会、シンポジウム. 2010. 5. 21. 大阪
10. 田中文明、古後竜之介、石川健二、主藤朝也、三森功士、柴田浩平、森正樹. 樹状細胞と癌抗原を用いた消化器癌ワクチン治療: 癌幹細胞を標的として. 第 65 回日本消化器外科学会総会、シンポジウム. 2010. 7. 14. 下関
11. 田中文明、石川健二、主藤朝也、三森功士、石川浩一、森正樹. 固形癌に対する樹状細胞を用いた癌特異的免

- 疫治療. 30 回癌免疫外科研究会、シンポジウム. 2009. 5. 21. 久留米
12. 田中文明、横江 毅、石川健二、三森功士、石川浩一、森 正樹. 3 ステップ・マイクロアレイ法を用いた新規癌抗原遺伝子の同定. 第 13 回日本がん免疫学会. 2009. 6. 24. 北九州
 13. 田中文明、石川健二、主藤朝也、三森功士、石川浩一、森 正樹. 樹状細胞と癌抗原を用いた消化器癌ワクチン治療：未来への展望. 第 64 回日本消化器外科学会総会. 2009. 7. 16. 大阪
 14. 田中文明、石川健二、主藤朝也、三森功士、柴田浩平、森 正樹. 樹状細胞と癌抗原を用いた進行癌に対する癌ワクチン治療～これまでとこれから～. 第 7 回日本免疫治療学会学術集会. 2010. 2. 20. 東京
 15. 田中文明、石川健二、三森功士、田原光一郎、井上裕、森正樹. 癌肝細胞を標的とした癌治療開発：癌ワクチン治療への応用. 第 109 回日本外科学会. 2009. 4. 4. 福岡
 16. 田中文明、石川健二、主藤朝也、三森功士、石川浩一、森正樹. 固形癌に対する樹状細胞を用いた癌特異的免疫治療. 第 30 回癌免疫外科研究会. 2009. 5. 21. 久留米
 17. 田中文明、横江毅、石川健二、三森功士、石川浩一、森正樹. Cell therapy の新たなアプローチ-3 ステップ・マイクロアレイ法を用いた新規癌抗原遺伝子の同定-. 第 13 回日本がん免疫学会. 2009. 6. 24. 小倉
 18. 田中文明、石川健二、主藤朝也、三森功士、石川浩一、森正樹. 樹状細胞と癌抗原を用いた消化器癌ワクチン治療：未来への展望. 第 64 回日本消化器外科学会. 2009. 7. 16. 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 文明 (TANAKA FUMIAKI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：30332836

(2) 研究分担者

主藤 朝也 (SUDO TOMOYA)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：50309803

(3) 連携研究者：なし