

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390317

研究課題名(和文) 膵癌に対する癌幹細胞を標的とした免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of immune therapy which targets pancreatic cancer stem cells

研究代表者

岡 正朗 (OKA, Masaaki)

山口大学・その他部局等・学長

研究者番号：70144946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌患者癌細胞から樹立した細胞株を用いて、独自培養法により癌幹細胞様細胞を誘導することに成功した。これらの癌幹細胞様細胞は、癌幹細胞マーカー発現が親株と比較して亢進し、腫瘍形成能の亢進も見られた。

さらに、親株と誘導膵癌幹細胞様細胞とについて、網羅的発現解析から誘導膵癌幹細胞様細胞における発現亢進タンパクを同定した。上記の発現亢進は、CD44 variantの発現とも関連し、ヒト膵癌臨床サンプルを用いての免疫組織染色解析から、膵癌幹細胞特異的タンパク候補の発現強度が、腫瘍径とともに膵癌患者の独立した予後規定因子であることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSCs) have been studied for their resistance to anticancer therapy and their ability to metastasize to distant organs. CSCs are difficult to study because their population is quite low in tumor specimens. We established a culture method to induce a pancreatic cancer stem-like cell (P-CSLC)-enriched population from human pancreatic cancer cell lines. Cells were cultured in our CSC-inducing medium. Obtained sphere cells showed the enriched population of CD24^{high}, CD44^{high}, epithelial ESA^{high}, and CD44variant (CD44v)^{high}. The induced cells had high tumorigenic potential. Thus, we established a culture method to induce a P-CSLC-enriched population from human pancreatic cancer cell lines.

Moreover, we identified specific molecules, which highly expressed in P-CSLC by proteome analysis. One of those molecules was co-expressed with CD44v and its high expression in pancreatic cancer specimens and tumor size>20mm were independent prognostic factors for pancreatic cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌 癌免疫療法 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

膵癌の予後は極めて不良であり、手術症例での5年生存率は10%台と、消化器癌の中で大きく立ち上がる壁であり、新たな治療法が待たれている。研究代表者の教室では、膵癌に発現する MUC1 分子に着目し、先進医療として切除例には MUC1 認識するキラー細胞 (MUC1-CTL) を用いた細胞療法、さらには切除不能・再発膵癌には MUC1-CTL に加え、MUC1 mRNA 導入樹状細胞を用いた細胞療法を行い、予後の改善を報告した (Kawaoka T, Oka M, et al. *Oncol Rep.*, 2008, Kondo H, Oka M, et al. *Anticancer Res.*, 2008)。しかし、切除例での5年生存率は23%とやや改善したが、未だ十分とは言えない。

近年、癌幹細胞は転移や再発に大きくかわる可能性があることが報告されるに至り、治療ターゲットとして注目されている。癌幹細胞をターゲットとした治療法として、免疫担当細胞に学習・記憶させ、癌幹細胞特異的治療法を確立させることができれば、これまでの癌に対する治療法が大きく変わる可能性がある。一方、この癌幹細胞の研究が抱える大きな問題点として、癌組織における癌幹細胞の割合が少なく、一度に多くの癌幹細胞を入手し研究することが難しいことがある。教室では組織や癌細胞株からの癌幹細胞の誘導や長期培養が可能なテクニックを開発 (特許申請中) したため、この分野での研究に対して大きなアドバンテージを有していると言える。

さらに癌抗原の検索として、我々はレーザーマイクロダイセクションによる癌の部分からの total RNA の単離や、組織アレイを用いた多数の病理標本に対する組織学的検索など多彩なアプローチを展開してきた。我々は、データのハイスループット時代で多くの研究者が混乱する中、多くのデータの中から有用な情報だけを抽出する方法、また、これを他の重要なデータと関連付けることができるシステムを開発してきた。この技術を用いることで、効率的に膵癌幹細胞抗原の候補を検索する。最終的には、最も難治癌である膵癌に対し転移制御にも有効な次世代型免疫療法の開発を行う。

2. 研究の目的

近年、幹細胞の性質を持つ癌の根本ともいえる癌幹細胞の存在が報告され、癌幹細胞をターゲットとする新たな癌治療の概念が報告されている。一方、癌幹細胞の研究の困難な点は、癌組織中の癌幹細胞の割合が少ないため、多くの癌幹細胞を研究することが難しいことにある。我々は組織や癌細胞株からの癌幹細胞の誘導や長期培養が可能な独自のテクニックを開発 (特願 2012-47433) しており、この分野での研究に対して大きなアドバンテージを有している。本研究の目的は、これまで培ってきた新規タンパクの同定 (プロテオミクス解析) や cDNA マイクロアレイに

よる遺伝子検索の豊富な経験を生かし、難治性の膵癌治療成績向上を目的に、膵癌幹細胞に対する免疫療法のターゲットを見出し、次世代型免疫療法を開発することである。

3. 研究の方法

膵癌細胞株、及び膵癌組織より癌幹細胞の我々の開発した特殊な培養法で癌幹細胞の誘導・培養を行う。培養に成功した細胞をフローサイトメトリーによる表面マーカーの検索で癌幹細胞の割合が多くなっていることを確認し、ソーティングにより癌幹細胞を分離同定する。新規遺伝子、蛋白的検索を行い、免疫学的主要癌抗原 (immunodominant antigen) の検索を行う。これまで我々が得意としてきた cDNA マイクロアレイ (*Cancer Res.*, 2002 年: *Oncogene*, 2003 年: *LANCET*, 2003 年: *LANCET*, 2004 年: *LANCET*, 2005 年) と新規蛋白同定 (Proteomics, 2005: *Proteomics*, 2006) の技術と蓄積した知識を駆使し癌との共通抗原や癌幹細胞特異的抗原の候補は検索する。これを元に免疫療法の開発の基盤的研究を行う。

4. 研究成果

これまでに、膵癌患者の癌細胞から当科にて樹立した細胞株 (YPK2 及び YPK5) から、独自培養法により癌幹細胞様細胞 (YPK2-Lm 及び YPK5-Lm) を誘導することに成功している。また、膵癌患者腹水より癌幹細胞様細胞を誘導することにも成功した。これにより、培養細胞集団から膵癌幹細胞集団について約 100 倍の濃縮が可能となった。これらの癌幹細胞様細胞は、癌幹細胞マーカーの一つである CD44 variant, CD24, CD44, and ESA の発現及び ALDH 活性がそれぞれの親株と比較して亢進していた。さらに、上記癌幹細胞様細胞において免疫不全マウスへの皮下移植実験から腫瘍形成能の亢進も見られた。これらの成果は論文 (Watanabe Y, Oka M, et al. *Int J Oncol.* 2014) として発表した。

続いて、上述の親株と誘導膵癌幹細胞様細胞とについて、網羅的発現解析結果 (cDNA マイクロアレイ、二次元電気泳動、及び MALDI TOF/TOF MS) から誘導膵癌幹細胞様細胞における発現亢進 (タンパクレベル) が認められた 2 つの候補分子 (タンパク) に絞って解析を進めた。これらの誘導膵癌幹細胞様細胞における発現亢進は、フローサイトメトリー解析においても再確認され、また、それらの発現は CD44 variant の発現と関連していた。

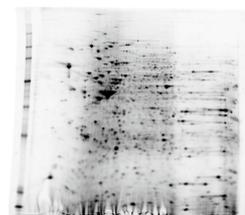


図 1. 誘導膵癌幹細胞様細胞からの二次元電気泳動像

さらに、ヒト膵癌臨床サンプルを用いての免疫組織染色 (IHC) 解析から、発現強度 High 群の方が Low 群よりも予後不良であった (Log Rank, $P < 0.05$)。さらに、上記膵癌幹細胞特異的タンパク候補の発現強度は、腫瘍径とともに膵癌患者の独立した予後規定因子であることを明らかとした。以上の結果から、上記のタンパクは、膵癌免疫療法のターゲットとなりうる膵癌幹細胞特異的タンパクであることが示唆された。

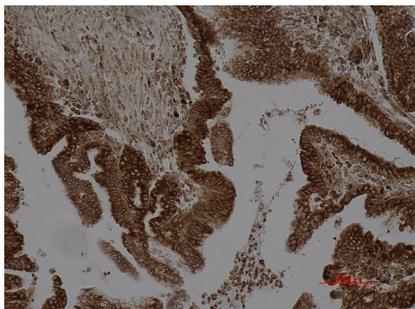


図 2. 膵癌幹細胞特異的タンパク候補の膵癌臨床サンプルにおける IHC

この標的タンパクについて、免疫学的に反応性が高いペプチドの同定を膵癌患者 PBMC を用いての ELISPOT アッセイにより検討を試みたが、膵癌患者 PBMC は他癌腫患者 PBMC と比較して免疫学的反応性が低く、実験条件の改良が必要であった。抗原刺激回数を増やすことで実験条件の改善が見られたことから、今後、免疫療法に適した抗原ペプチドの同定を進めていく。

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9件)

Maeda Y, Yoshimura K, Matsui H, Shindo Y, Tamesa T, Tokumitsu Y, Hashimoto N, Tokuhisa Y, Sakamoto K, Sakai K, Suehiro Y, Hinoda Y, Tamada K, Yoshino S, Hazama S, Oka M. Dendritic cells transfected with heat-shock protein 70 messenger RNA for patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: a phase 1 dose escalation clinical trial. *Cancer Immunol Immunother.* 査読有, 2015 May 16. 印刷中

Wang Y, Kuramitsu Y, Kitagawa T, Baron B, Yoshino S, Maehara S, Maehara Y, Oka M, Nakamura K. Cofilin-phosphatase slingshot-1L (SSH1L) is over-expressed in pancreatic cancer (PC) and contributes to tumor cell migration. *Cancer Lett.* 査読有, 2015 年, 360 巻, 171-6
DOI: 10.1016/j.canlet.2015.02.015.

Watanabe Y, Yoshimura K, Yoshikawa K, Tsunedomi R, Shindo Y, Matsukuma S, Maeda N, Kanekiyo S, Suzuki N, Kuramasu A, Sonoda

K, Tamada K, Kobayashi S, Saya H, Hazama S, Oka M. A stem cell medium containing neural stimulating factor induces a pancreatic cancer stem-like cell-enriched population. *Int J Oncol.* 査読有, 2014 年 45 巻, 1857-66

DOI: 10.3892/ijo.2014.2603.

Hashimoto N, Tsunedomi R, Yoshimura K, Watanabe Y, Hazama S, Oka M. Cancer stem-like sphere cells induced from de-differentiated hepatocellular carcinoma-derived cell lines possess the resistance to anti-cancer drugs. *BMC Cancer.* 査読有, 2014 年, 14 巻, 722

DOI: 10.1186/1471-2407-14-722.

Shindo Y, Hazama S, Maeda Y, Matsui H, Iida M, Suzuki N, Yoshimura K, Ueno T, Yoshino S, Sakai K, Suehiro Y, Yamasaki T, Hinoda Y, Oka M. Adoptive immunotherapy with MUC1-mRNA transfected dendritic cells and cytotoxic lymphocytes plus gemcitabine for unresectable pancreatic cancer. *J Transl Med.* 査読有, 2014 年, 12 巻, 175

DOI: 10.1186/1479-5876-12-175.

Suzuki N, Hazama S, Ueno T, Matsui H, Shindo Y, Iida M, Yoshimura K, Yoshino S, Takeda K, Oka M. A phase I clinical trial of vaccination with KIF20A-derived peptide in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. *J Immunother.* 査読有, 2014 年, 37 巻, 36-42

DOI: 10.1097/CJI.000000000000012.

Kan S, Hazama S, Maeda K, Inoue Y, Homma S, Koido S, Okamoto M, Oka M. Suppressive effects of cyclophosphamide and gemcitabine on regulatory T-cell induction in vitro. *Anticancer Res.* 査読有, 2012 年, 32 巻, 5363-9

Wang Y, Kuramitsu Y, Ueno T, Suzuki N, Yoshino S, Iizuka N, Zhang X, Akada J, Oka M, Nakamura K. Proteomic differential display identifies upregulated vinculin as a possible biomarker of pancreatic cancer. *Oncol Rep.* 査読有, 2012 年, 28 巻, 1845-50

DOI: 10.3892/or.2012.2004.

Wang Y, Kuramitsu Y, Ueno T, Suzuki N, Yoshino S, Iizuka N, Akada J, Kitagawa T, Oka M, Nakamura K. Glyoxalase I (GL01) is up-regulated in pancreatic cancerous tissues compared with related non-cancerous tissues. *Anticancer Res.* 査読有, 2012 年, 32 巻, 3219-22

[学会発表](計10件)

裕 彰一: がんペプチドワクチン療法が効果的な症例を選択するバイオマーカーの探索; 第 27 回日本バイオセラピー学会学術集

会、2014/12/5、ナレッジキャピタル コン
グレコンベンションセンター(大阪府・大阪
市)

鈴木伸明：膵癌ワクチン医師主導治験
(VENUS-PC study)の試験デザインと当施設
の症例検討；第 27 回日本バイオセラピー学
会学術集会、2014/12/4、ナレッジキャピ
タル コングレコンベンションセンター (大
阪府・大阪市)

碓 彰一：癌ペプチドワクチン療法におけ
る免疫逃避機構回避の工夫と今後の展望；第
52 回日本癌治療学会学術集会、2014/8/29、
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

前田祥成：膵癌に対する MUC1 を標的とし
た細胞療法；第 26 回日本肝胆膵外科学会学
術集会、2014/6/12、和歌山県民文化会館、
ホテルアパローム紀の国 (和歌山県・和歌山
市)

前田祥成：切除不能・再発膵癌に対する
Gemcitabine 併用 MUC1-DC+CTL 療法 の
Myeloid-Derived Suppressor Cells
(MDSC) に与える影響；第 114 回日本外科学
会定期学術集会、2014/4/4、国立京都国際会
館、グランドプリンスホテル京都 (京都府・京都市)

渡邊裕策：ヒト膵癌細胞株からの癌幹細胞
の誘導には上皮間葉転換が関連している；第
72 回日本癌学会学術総会、2013/10/3、パシ
フィコ横浜(神奈川県・横浜市)

渡邊裕策：ヒト膵癌細胞株からの癌幹細胞
豊富な細胞集団誘導法の確立；第 113 回日本
外科学会定期学術集会、2013/4/13、福岡国
際会議場 (福岡県・福岡市)

吉村 清：ヒト膵癌幹細胞における微小周
辺環境の探索；第 113 回日本外科学会定期学
術集会、2013/4/11、福岡国際会議場 (福岡)

吉村 清：培養による膵癌幹細胞 Rich ポ
ピュレーションの誘導時の微小周辺環境の
探索；第 71 回日本癌学会学術総会、2012/9/19、
ロイトン札幌 (北海道・札幌市)

渡邊裕策：ヒト膵癌細胞株からの Cancer
Stem Cells 誘導の試み；第 112 回日本外科学
会定期学術集会、2012/4/14、幕張メッセ (千
葉県・千葉市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡 正朗 (OKA, Masaaki)

山口大学・学長

研究者番号：70144946

(2)研究分担者

恒富 亮一 (TSUNEDOMI, Ryouichi)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10420514

吉村 清 (YOSHIMURA, Kiyoshi)

国立がん研究センター・先端医療開発セン
ター・分野長

研究者番号：30346564

藏満 保宏 (KURAMITSU, Yasuhiro)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50281811

浜本 義彦 (HAMAMOTO, Yoshihiko)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90198820