

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 7 年 6 月 1 1 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590449

研究課題名(和文) 治療抵抗性ヒトがん幹細胞特異的免疫応答機構の基礎的検討

研究課題名(英文) Immunological analysis of treatment resistant cancer stem cells

研究代表者

廣橋 良彦 (HIROHASHI, Yoshihiko)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：30516901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究において、肺がん、大腸がん、腎がん細胞株から造腫瘍能の高いがん幹細胞を分離した。がん幹細胞のトランスクリプトーム解析を行った結果、がん幹細胞には多くのがん精巢抗原分子が発現することを見出した。それらはOR7C1, DNAJB8, SMCP 等である。また、OR7C1およびDNAJB8にコードされるHLA-A24拘束性抗原ペプチドを同定した。同抗原ペプチド特異的細胞傷害性T細胞(CTL)は、がん幹細胞分画を有意に傷害できることを見出した。これらの結果は、治療抵抗性がん幹細胞に対して、がん幹細胞に発現するがん精巢抗原標的免疫療法を施すことにより治療可能となる可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In this research period, we isolated cancer stem-like cells(CSCs)/cancer-initiating cells(CICs) from human lung, colon and kidney cancer line cells. To identify CSC/CIC-specific genes, we performed cDNA microarray analysis and found that numbers of cancer-testis (CT) antigens including OR7C1, DNAJB8 and SMCP were preferentially expressed in CSCs/CICs. Furthermore, we identified HLA-A24 restricted antigenic peptides encoded by amino acid sequences of OR7C1 and DNAJB8. Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) specific for OR7C1 peptide and DNAJB8 peptide showed preferential cytotoxicity for CSCs/CICs compared with that of non-CSCs/CICs. These observations indicate that CT antigens-specific cancer immunotherapy might be promising approach for targeting treatment resistant CSCs/CICs.

研究分野：実験病理

キーワード：がん幹細胞 免疫療法 がん抗原 がん精巢抗原

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は、(1)高い造腫瘍能、(2)自己複製能、(3)多分化能を有する細胞群と定義される。また、がん幹細胞は 休止期にある、トランスポーター分子の発現が高い、抗アポトーシス分子 (IAP) の発現が高い、活性酸素が低い等の機序により、化学療法や、放射線療法、あるいは分子標的治療に対して抵抗性を示す事が示されている。これらの性質を有する為、がん幹細胞は治療後の再発や、遠隔転移といったがん患者の予後を直接左右するイベントに関わると考えられている。がん幹細胞研究においては、「どのようにして治療に抵抗性を示すがん幹細胞を有効に排除するか」、が大きなテーマとなっている。

がん幹細胞を標的とする免疫治療に関する研究発表は主に海外の研究機関であり、 γ δ T 細胞や、ナチュラルキラー (NK) 細胞が、がん幹細胞を認識し得ることが明らかとなっている。しかしながら、がん免疫療法の主役となる細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に関しては、がん幹細胞を認識し得るか不明であった。

申請者らは、ヒト肺がんやヒト大腸がん細胞株から Hoechst33342 色素を用いて Side population (SP) 細胞として、あるいは、ALDEFLUOR 法を用いてがん幹細胞の分離 (Inoda et al. Am J Pathol 2011, Nakatsugawa et al. Lab Invest 2011)、これらのがん幹細胞を用いて、主要組織適合分子 (MHC) 分子 (ヒトの場合は HLA 分子) および抗原分子の発現を調べた。また腫瘍抗原分子の一つである CEP55 由来 HLA-A24 拘束性ペプチドを認識する特異的 CTL (Inoda et al. J Immunother 2009, Inoda et al. Exp Mol Pathol 2011) を用いて検討した結果

1、がん幹細胞は非がん幹細胞と同レベルの HLA 分子を発現する。

2、腫瘍抗原はがん幹細胞および非がん幹細胞との発現様式から 3 グループに分類出来る。

a, **がん幹細胞抗原 (がん幹細胞にのみ発現する)**

b, **共通抗原 (がん幹細胞および非がん幹細胞に発現する)**

c, **非がん幹細胞抗原 (非がん幹細胞にのみ発現する)**

3、がん幹細胞は非がん幹細胞と同じく CTL に感受性を示す。

ことを明らかとした (Inoda et al. Am J

Pathol 2011, Hirohashi et al, Oncoimmunology 2012 in press)。

さらに、同じくがん幹細胞に発現する抗原分子でも、**がん幹細胞抗原を標的とする方が、共通抗原を標的とするより高い抗腫瘍効果を得られる可能性を示唆する**実験結果を、マウスの遺伝子ワクチンの系で得る事が出来た (未発表データ)。

2. 研究の目的

造腫瘍能が高いがん幹細胞は、化学療法や放射線療法といった既存のがん治療に対して抵抗性を示す事が明らかとなっている。申請者らはこれまでに、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) ががん幹細胞を認識する事をこれまでに明らかにした。申請期間中に、このような治療抵抗性がん幹細胞を標的の特異的免疫応答を明らかとし、その臨床応用への橋渡しを目的とする。

3. 研究の方法

(1) がん幹細胞の分離

がん幹細胞の分離法として、CD44, CD133 等の細胞表面マーカーによる分離、Side Population (SP) 法、Aldefluor 法、Sphere 培養法などが知られている。本研究において、SP 法および Aldefluor 法を用いて、ヒト大腸癌細胞株 (SW480, HT29, HCT15)、腎細胞癌株 (ACHN)、肺癌細胞株 (LHK2) よりがん幹細胞を分離した。

(2) がん幹細胞特異抗原分子の同定

分離したがん幹細胞を用いて、CTL の標的となりえる様ながん幹細胞特異抗原分子の検索を行った。すなわち、がん幹細胞のトランスクリプトームを、非がん幹細胞を比較対象として cDNA マイクロアレイによりスクリーニングした。

トランスクリプトーム解析によりがん幹細胞特異的発現を示す候補分子群に関しては、正常臓器および他のがん細胞における発現を RT-PCR にて確認し、正常臓器における発現が無い、もしくは限定されており、がん幹細胞特異的発現を示す分子を選択した。

(3) がん幹細胞抗原由来抗原ペプチドの同定

候補分子アミノ酸配列を参照し、HLA-A24 結合モチーフを有する配列をスクリーニングした。HLA-A24 結合候補ペプチドは、合成ペプチドを作製し、T2-A24 細胞を用いた HLA 安定化による HLA-A24 結合試験を行い、候補ペプチドの絞り込みを行った。

(4) 抗原ペプチド特異的 CTL 誘導

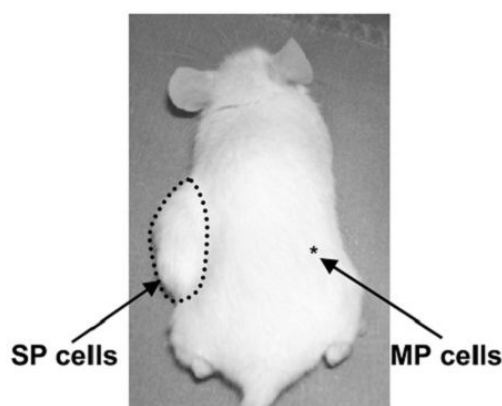
健常者ヒト末梢血単核球 (PBMC) および HLA-A24 陽性がん患者 PBMC を用いて CTL 誘導を試みた。すなわち、PBMC より分離した CD8⁺ 細胞を PHA にて刺激・増殖し、PHA-blast

を作製した。PHA-blast を抗原提示細胞として、合成ペプチドをパルスし、同抗原提示細胞を用いて CD8⁺細胞を3 - 4 回刺激し、培養した。

4. 研究成果

(1)がん幹細胞の分離

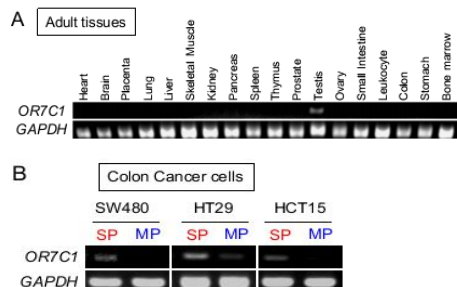
ヒト大腸癌細胞株 (SW480)より SP 法にて SP 細胞を分離した。SP 細胞は MP 細胞と比較して免疫不全マウスにおいて高い造腫瘍能を示した (下図 1)。



また、ヒト腎細胞癌株 (ACHN)、肺癌細胞株 (LHK2)からも同様の高い造腫瘍能を示す SP 細胞を分離した。これらの高い造腫瘍能を示す SP 細胞をがん幹細胞とした。

(2)がん幹細胞特異抗原分子の同定

SW480, LHK2 および ACHN から分離した SP 細胞を用いて、cDNA マイクロアレイ法を行った。その結果、がん幹細胞に発現する複数のがん精巢抗原分子を発見した。すなわち、OR7C1 (olfactory receptor, family 7, subfamily C, member 1), DNAJB8 (DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 8), SMCP (Sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein)などである。これらのがん精巢抗原は、正常臓器では精巢にのみ発現し、がん細胞においてはがん幹細胞優位な発現を示した (下図 2)。これらのがん幹細胞特異分子は CTL の有望な標的と考えられた。



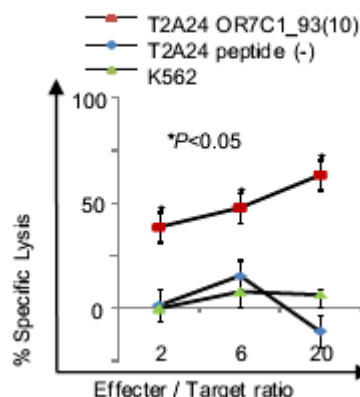
(3)がん幹細胞抗原因来抗原ペプチドの同定

OR7C1 および DNAJB8 より HLA-A24 結合モチーフを持つアミノ酸配列を検索し、候補抗原ペプチドを検討した。さらに T2-A24 細胞を用いた HLA-A24 結合アッセイを行った結果、OR7C1 からは、OR7C1_34(10), OR7C1_93(10), OR7C1_131(10), OR7C1_251(10), OR7C1_277(9) の 5 個の HLA-A24 結合ペプチドを同定した。DNAJB8 からは DNAJB8_22(9), DNAJB8_99(9), DNAJB8_143(9) の 3 個の HLA-A24 結合ペプチドを同定した。

(4)抗原ペプチド特異的 CTL 誘導

OR7C1 および DNAJB8 由来 HLA-A24 結合ペプチドを用いて、HLA-A24 陽性健常者およびがん患者から CTL 誘導を試みた。その結果、OR7C1_93(10), OR7C1_34(10), OR7C1_277(9), DNAJB8_143(9) の 4 個のペプチドにおいて CTL の反応を観察した (下図 3)。

OR7C1 peptide 93 (10) specific CTL clone#23



また、OR7C1_93(10) および DNAJB8_143(9) ペプチド特異的 CTL クローンを樹立し、細胞傷害性試験を検討した結果、これらの OR7C1 または DNAJB8 特異的 CTL クローンは MP 細胞と比較して SP 細胞に対して有意に高い細胞傷害性を示すことを確認した。

当該結果は、化学療法、放射線療法、分子標的治療等の治療に対して抵抗性を示すがん幹細胞は、OR7C1 などのがん幹細胞特異的に発現する標的抗原に対する免疫療法により有効に治療できる可能性を示唆するものである。

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 39 件)

うち主要なもの

1: Nishida S, Hirohashi Y, Torigoe T, Nojima M, Inoue R, Kitamura H, Tanaka T, Asanuma H, Sato N, Masumori N. Expression of hepatocyte growth factor in prostate cancer may indicate a biochemical recurrence after radical prostatectomy. Anticancer Res. 2015 Jan;35(1):413-8.

Doi 無し,

URL: <http://ar.iiarjournals.org/content/35/1/413.long> (査読あり),

2: Yasuda K, Torigoe T, Mariya T, Asano T, Kuroda T, Matsuzaki J, Ikeda K, Yamauchi M, Emori M, Asanuma H, Hasegawa T, Saito T, Hirohashi Y, Sato N. Fibroblasts induce expression of FGF4 in ovarian cancer stem-like cells/cancer-initiating cells and upregulate their tumor initiation capacity. *Lab Invest*. 2014

Dec;94(12):1355-69.

doi: 10.1038/labinvest.2014.122. (査読あり)

3: Mariya T, Hirohashi Y, Torigoe T, Asano T, Kuroda T, Yasuda K, Mizuuchi M, Sonoda T, Saito T, Sato N. Prognostic impact of human leukocyte antigen class I expression and association of platinum resistance with immunologic profiles in epithelial ovarian cancer. *Cancer Immunol Res*. 2014

Dec;2(12):1220-9. doi:

10.1158/2326-6066.CIR-14-0101. (査読あり)

4: Morita R, Hirohashi Y, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Torigoe T, Sato N. Production of multiple CTL epitopes from multiple tumor-associated antigens. *Methods Mol Biol*. 2014;1139:345-55.

doi: 10.1007/978-1-4939-0345-0_28. (査読なし)

5: Morita R, Nishizawa S, Torigoe T, Takahashi A, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Sokolovskaya A, Kochin V, Kondo T, Hashino S, Asaka M, Hara I, Hirohashi Y, Sato N. Heat shock protein DNAJB8 is a novel target for immunotherapy of colon cancer-initiating cells. *Cancer Sci*. 2014

Apr;105(4):389-95.

doi: 10.1111/cas.12362. (査読あり)

6: Takahashi A, Hirohashi Y, Torigoe T, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kochin V, Saijo H, Kubo T, Nakatsugawa M, Asanuma H, Hasegawa T, Kondo T, Sato N. Ectopically expressed variant form of sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein augments tumorigenicity of the stem cell population of lung adenocarcinoma cells. *PLoS One*. 2013 Nov 11;8(11):e69095.

doi: 10.1371/journal.pone.0069095. (査読あり)

7: Michifuri Y, Hirohashi Y, Torigoe T, Miyazaki A, Fujino J, Tamura Y, Tsukahara

T, Kanaseki T, Kobayashi J, Sasaki T, Takahashi A, Nakamori K, Yamaguchi A, Hiratsuka H, Sato N. Small proline-rich protein-1B is overexpressed in human oral squamous cell cancer stem-like cells and is related to their growth through activation of MAP kinase signal. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Sep

13;439(1):96-102.

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.021. (査読あり)

8: Yasuda K, Torigoe T, Morita R, Kuroda T, Takahashi A, Matsuzaki J, Kochin V, Asanuma H, Hasegawa T, Saito T, Hirohashi Y, Sato N. Ovarian cancer stem cells are enriched in side population and aldehyde dehydrogenase bright overlapping population. *PLoS One*. 2013 Aug

13;8(8):e68187.

doi: 10.1371/journal.pone.0068187. (査読あり)

9: Kuroda T, Hirohashi Y, Torigoe T, Yasuda K, Takahashi A, Asanuma H, Morita R, Mariya T, Asano T, Mizuuchi M, Saito T, Sato N. ALDH1-high ovarian cancer stem-like cells can be isolated from serous and clear cell adenocarcinoma cells, and ALDH1 high expression is associated with poor prognosis. *PLoS One*. 2013 Jun

6;8(6):e65158.

doi: 10.1371/journal.pone.0065158. (査読あり)

10: Saijo H, Hirohashi Y, Torigoe T, Kochin V, Takahashi H, Sato N. Cytotoxic T lymphocytes: the future of cancer stem cell eradication? *Immunotherapy*. 2013

Jun;5(6):549-51. doi: 10.2217/imt.13.44.

(査読あり)

11: Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, Morita R, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Watarai K, Kondo T, Hirohashi Y, Sato N. Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens*. 2013 Jun;81(6):428-34.

doi: 10.1111/tan.12113. (査読あり)

12: Nishida S, Hirohashi Y, Torigoe T, Inoue R, Kitamura H, Tanaka T, Takahashi A, Asanuma H, Masumori N, Tsukamoto T, Sato N. Prostate cancer stem-like cells/cancer-initiating cells have an autocrine system of hepatocyte growth factor. *Cancer Sci*. 2013 Apr;104(4):431-6.

doi: 10.1111/cas.12104. (査読あり)

13: Morita R, Hirohashi Y, Suzuki H, Takahashi A, Tamura Y, Kanaseki T, Asanuma H, Inoda S, Kondo T, Hashino S, Hasegawa T, Tokino T, Toyota M, Asaka M, Torigoe T, Sato N. DNA methyltransferase 1 is essential for initiation of the colon cancers. *Exp Mol Pathol*. 2013 Apr;94(2):322-9.

doi: 10.1016/j.yexmp.2012.10.004. (査読あり)

14: Kiriya K, Hirohashi Y, Torigoe T, Kubo T, Tamura Y, Kanaseki T, Takahashi A, Nakazawa E, Saka E, Ragnarsson C, Nakatsugawa M, Inoda S, Asanuma H, Takasu H, Hasegawa T, Yasoshima T, Hirata K, Sato N. Expression and function of FERMT genes in colon carcinoma cells. *Anticancer Res*. 2013 Jan;33(1):167-73. Doi 無し、URL: <http://ar.iiarjournals.org/content/33/1/167.long> (査読あり)

15: Takahashi A, Torigoe T, Tamura Y, Kanaseki T, Tsukahara T, Sasaki Y, Kameshima H, Tsuruma T, Hirata K, Tokino T, Hirohashi Y, Sato N. Heat shock enhances the expression of cytotoxic granule proteins and augments the activities of tumor-associated antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cell Stress Chaperones*. 2012 Nov;17(6):757-63. doi: 10.1007/s12192-012-0348-0. (査読あり)

16: Michifuri Y, Hirohashi Y, Torigoe T, Miyazaki A, Kobayashi J, Sasaki T, Fujino J, Asanuma H, Tamura Y, Nakamori K, Hasegawa T, Hiratsuka H, Sato N. High expression of ALDH1 and SOX2 diffuse staining pattern of oral squamous cell carcinomas correlates to lymph node metastasis. *Pathol Int*. 2012 Oct;62(10):684-9. doi: 10.1111/j.1440-1827.2012.02851.x. (査読あり)

17: Nishida S, Hirohashi Y, Torigoe T, Kitamura H, Takahashi A, Masumori N, Tsukamoto T, Sato N. Gene expression profiles of prostate cancer stem cells isolated by aldehyde dehydrogenase activity assay. *J Urol*. 2012 Jul;188(1):294-9. doi: 10.1016/j.juro.2012.02.2555. (査読あり)

18: Nishizawa S, Hirohashi Y, Torigoe T, Takahashi A, Tamura Y, Mori T, Kanaseki T, Kamiguchi K, Asanuma H, Morita R,

Sokolovskaya A, Matsuzaki J, Yamada R, Fujii R, Kampinga HH, Kondo T, Hasegawa T, Hara I, Sato N. HSP DNAJB8 controls tumor-initiating ability in renal cancer stem-like cells. *Cancer Res*. 2012 Jun 1;72(11):2844-54.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3062. (査読あり)

19: Hirohashi Y, Torigoe T, Inoda S, Morita R, Kochin V, Sato N. Cytotoxic T lymphocytes: Sniping cancer stem cells. *Oncoimmunology*. 2012 Jan 1;1(1):123-125. Doi 無し、URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3376951/> (査読あり)

〔学会発表〕(計 16件)

うち主要なもの

廣橋良彦：ヒトがん幹細胞免疫制御の分子病理学的基盤（学術研究賞A演説）第60回日本病理学会秋期特別総会、2014年11月20日、国立劇場沖縄、沖縄県浦添市。

廣橋良彦：新規大腸がん幹細胞マーカーOR7C1は免疫の標的となる、第103回日本病理学会総会、2014年4月26日、広島国際会議場、広島県広島市。

廣橋良彦：A novel cancer-initiating cell marker, OR7C1 can be a target of immunotherapy、第42回日本免疫学会総会・学術集会、2013年12月11日、幕張メッセ、千葉県千葉市。

廣橋良彦：熱ショックによりがん抗原特異的細胞傷害活性T細胞機能が亢進する、第29回ストレス学会学術総会、2013年11月9日、徳島大学大塚講堂、徳島県徳島市。

廣橋良彦：新規がん起始細胞マーカーOR7C1は免疫療法の標的となりうる、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市。

廣橋良彦：新規HSP40ファミリーDNAJB8はがん幹細胞の維持に関わり、免疫療法の標的となりうる、ハイパーサーミア学会第30回大会、2013年8月31日、横浜シンポジア、神奈川県横浜市。

廣橋良彦：がん幹細胞を標的とする免疫療法の基礎的検討、第17回日本がん免疫学会総会、2013年7月5日、ANAクラウンプラザホテル、山口県宇部市。

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 6 件）

うち主要なもの

名称：BORIS 由来腫瘍抗原ペプチド

発明者：浅野拓也、鳥越俊彦、廣橋良彦、佐藤昇志、渡邊一絵、厚山恵理、田路真悟

権利者：札幌医科大学、株式会社医学生物学研究所

種類：特許

番号：特願 2014-194391

出願年月日：2014 年 9 月 24 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

廣橋 良彦（HIROHASHI, Yoshihiko）

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：3 0 5 1 6 9 0 1