

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592512

研究課題名(和文) 婦人科がんと周囲微小環境を標的とした複合的がん免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of immnotherapy for gynecological cancer and microenvironment

研究代表者

柴田 清住 (Shibata, Kiyosumi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90335026

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)：難治性卵巣がんの免疫療法として「卵巣明細胞腺がんに対するHLA-A24および-A2結合性Glypican-3 (GPC3)由来ペプチドワクチン療法の臨床第Ⅱ相試験」は92例まで症例集積がすすんだ。本臨床試験の結果から腹膜播種病変に対する効果が乏しく、腹膜播種の微小環境が免疫治療の効果に抑制的に作用することが予測されたため、卵巣癌と腹膜中皮細胞の相互作用が癌免疫療法に与える効果について検討した。両細胞の共培養によってVEGF、IL-6、IL-8の発現が亢進し、腹膜播種の癌局所においてCTLなどの免疫担当細胞の機能抑制に作用していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed a phase II clinical trial of HLA-A24 and A2 restrictive Glypican-3 (GPC3) peptide vaccine for 92 ovarian clear cell carcinoma patients as one of the immunotherapy for refractory ovarian carcinoma. We confirmed three partial responses in a advanced patient. However our results showed that the patients with peritoneal dissemination had slightly effectiveness of peptide vaccine. We investigated the interaction between ovarian clear cell carcinoma cells and peritoneal cells. We showed that the expressions of VEGF, IL-6 and IL-8 elevated and the functions of CD8 positive T cells (CTL) were decreased. Our results showed that peritoneal dissemination of ovarian carcinoma was immunosuppressive environment.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：癌免疫療法 癌微小環境 腹膜播種 免疫抑制 臨床試験

1. 研究開始当初の背景

婦人科癌、中でも卵巣癌患者の死亡数は年々増加している。進行・再発卵巣癌の治療は化学療法が中心であるが、再発症例の多くは抗癌剤耐性であり予後は極めて不良である。この現状を打破するには既存の治療法にとられない新規治療の開発が不可欠である。我々は卵巣癌の再発・転移部位である腹膜播種に着目し研究を推進してきた。今回の研究において進行・再発卵巣癌が主たる対象であり、癌幹細胞を治療のターゲットと考えている。図1に示すように癌幹細胞は様々な抗癌剤、放射線療法や低酸素状態に抵抗性を有し、癌再発の原因細胞である可能性が示されているが、抵抗性に関する詳細な分子機構については依然解明されていない。現在のところ癌幹細胞の治療抵抗性のメカニズムとして、1つは癌幹細胞が強力な抗癌剤排出能、DNA修復能を有していること。もう1つは癌幹細胞が正常組織幹細胞と同様に特別な癌周囲微小環境(ニッチ)内で休眠状態として存在するため、増殖細胞を標的とする従来の癌治療は無効であるからと考えられている。また、近年では癌幹細胞の自己複製をもニッチが担っている可能性が示唆されている(図2)。このように癌幹細胞を特異的に殺傷する治療の開発には癌幹細胞特異的因子とニッチとの相互作用に基づいた既存の治療法にはない柔軟かつ斬新な発想が必要である。そこで今回我々は癌免疫療法と分子標的療法による婦人科癌幹細胞の根治的治療法の開発を指向した。免疫療法は癌の第4の治療法として期待されているが、まだ標準治療としては確立されておらず、科学的根拠に基づいたがん免疫療法の開発が必要な現状である。しかし、既存の化学療法や放射線療法に抵抗性である生き残った癌幹細胞を標的とした新規治療法のひとつとして癌免疫療法は可能性を秘めている。抗原特異的能動免疫療法には、癌抗原由来のペプチド、蛋白、DNA等をアジュバントとともに投与し、体内で抗原提示細胞を感作し、エフェクター細胞である細胞傷害性T細胞(CTL)やヘルパーT細胞を活性化、増殖させるワクチン療法と、体外で患者由来の抗原提示細胞である樹状細胞を培養し、癌抗原を感作した後、体内へ戻す抗原感作樹状細胞療法がある。現在までに、様々な癌拒絶抗原およびペプチドが同定され、臨床試験が世界中で行われている。国内では、抗原特異的能動免疫療法の中でもペプチドワクチン療法が精力的に研究され、様々な施設から有効例の報告が散見される。我々も国立がんセンター東病院との共同研究において卵巣明細胞腺がん特異抗原Glypican-3(GPC3)のペプチドワクチン臨床第II相試験を行っている実績があり、新規がんワクチン療法を速やかに臨床試験に移行できる体制が整えられている。癌幹細胞を標的とした免疫療法の報告は未だに限定さ

れている。これらの背景を受けて、本研究での第一義の目的は婦人科悪性腫瘍において癌幹細胞の研究から特異抗原を同定し、それを標的とするペプチドワクチン療法を中心とした癌免疫療法構築のための基礎的評価、研究を行うことである。一方、癌周囲微小環境(ニッチ)の研究に関して、これまでに白血球細胞のニッチとして骨芽細胞、血管内皮細胞が、脳腫瘍のニッチとして血管内皮細胞が報告されている。我々は卵巣癌の再発、転移部位である腹膜に着目し、腹膜中皮細胞が卵巣癌幹細胞のニッチであるとの仮説を立て、基礎データの集積を行っている。

2. 研究の目的

具体的な研究目的は以下の三項目に焦点を置く。

(1) 癌幹細胞をターゲットとした新規免疫療法の構築

(2) 腹膜播種に着目した、癌幹細胞と周囲微小環境(ニッチ)の相互作用の解明

(3) 癌幹細胞とニッチをターゲットとした複合的癌免疫療法の開発

上記の三項目の課題を並行して研究することにより、婦人科癌幹細胞とニッチの双方を標的とした根治的治療法の開発を目指す。具体的上記(1)については様々な婦人科癌について癌幹細胞を分離・同定を行い、癌幹細胞特異的CTLクローンの樹立を行い、cDNAライブラリーを用いた発現スクリーニング法により、CTLクローンが認識する抗原およびエピートペプチドの同定とペプチド特異的CTLの誘導と抗腫瘍効果を評価し、がん幹細胞抗原由来ペプチドワクチン療法の可能性を探求する。さらには腫瘍特異性を増すことで副作用の少ない、より優れた癌幹細胞抗原由来の癌免疫療法について探求する。以上の研究内容は癌幹細胞と癌免疫療法に対して双方向的な内容を含む。つまり、抗癌剤や放射線療法などさまざまな治療に抵抗性を有する癌幹細胞に対してがん免疫療法が有用となりえるかという側面と、ターゲットを癌幹細胞にしぼることで癌免疫療法の効果を高めることができるかという側面を持つ。本研究によって癌幹細胞と癌免疫療法を結びつける根拠を証明し、さらに婦人科癌に特徴的な腹膜播種に着目した腫瘍局所での癌幹細胞の微小環境(ニッチ)の関係まで考慮した新規かつ根元的な包括的癌免疫療法を目指す。その目的から我々は(2)癌幹細胞ニッチの同定および免疫回避機構に関する検討を計画した。近年、癌幹細胞に対しても生態的適所であるニッチが存在し癌の維持および転移に重要な役割をもつことが示唆されている。我々は卵巣癌の転移部位として最も重要な腹膜中皮細胞に着目し、すでに以前の研究においてCD133陽性卵巣癌細胞と腹膜中皮細胞の共培養によってCD133発現細胞が長期間にわたって維持され、コロニー形成能が亢進する結果をえている。今後の研究に

において腹膜中皮細胞が卵巣癌幹細胞ニッチとしての機能実験とさらに幹細胞とニッチにおける相互作用のメカニズムを検討する。そして本研究の最終目的は(3)である。(1)によって癌幹細胞に対する免疫療法を確立し、(2)によってニッチとの相互作用に対する分子標的治療の基礎的研究成果を融合し、免疫療法と分子標的治療を併用した複合的癌免疫療法の臨床試験を計画している。

3. 研究の方法

(1)卵巣癌の幹細胞表面マーカーに関して我々は CD133 に着目し研究を継続しており CD133 陽性細胞が癌幹細胞の特徴を維持することから癌幹細胞特異抗原としての可能性にも着目し、CD133 由来のがん拒絶抗原ペプチドを同定する。それに平行して分離した癌幹細胞を抗原提示細胞とした癌幹細胞特異抗原の同定を行う。具体的には分離した癌幹細胞に HLA-class I 遺伝子を標的とする short interfering RNA (siRNA) を遺伝子導入し、内因性 HLA 発現をノックダウンし、siRNA の標的遺伝子の塩基配列を変異した siRNA 抵抗性 HLA-A24 をレンチウイルスベクターにて遺伝子導入する。この細胞を人工抗原提示細胞として、HLA-A24 陽性ボランティア健康人のナイーブ CD8 陽性 T 細胞を刺激して、細胞障害性 T リンパ球 (CTL) を樹立する。限界希釈法にて CTL クローンを樹立し、ターゲット細胞特異性をエリスポットアッセイにて検討する。その際、線維芽細胞、脂肪細胞など正常細胞をコントロールとしこれらの細胞を認識しないクローンを選択する。⁵¹Cr 細胞障害試験を行い、その他の婦人科癌細胞株に対する細胞障害性について検討し、最良の CTL クローンを識別する。得られた CTL クローンの cDNA ライブラリーを用いた発現スクリーニング法により CTL クローンが認識する抗原の同定を行う。次いで CD133 および上記の検討にて得られた新規抗原に対する HLA-A24 結合性ペプチドを 5 種類ずつ決定し、BALB/c マウスに免疫して解析し、CTL エピトープを決定する。このようにして決定した抗原ペプチドを健康人ならびにがん患者の PBMC から誘導した樹状細胞にパルスして、CD8 陽性細胞を刺激し抗原特異的 CTL を誘導できるか評価する。誘導されたこれらの CTL が癌幹細胞を傷害し、免疫不全マウスの xenograft tumor の増殖を抑制するかどうかなどを評価する。我々は以前の研究において癌幹細胞の免疫不全マウスへの移植実験を行っており、本検討は計画どおり可能であると考えている。この実験計画によって抗原同定ができない場合に際しては、がん幹細胞と非がん幹細胞の遺伝子発現プロファイルにつき microarray を用いて解析する。

(2)婦人科癌腹膜播種過程における癌幹細胞と周囲微小環境間相互作用の解明においては、In vitro において CD133 の発現が確認さ

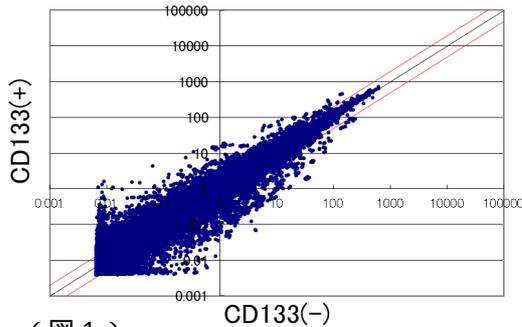
れている卵巣癌細胞株 OVCA3 細胞を幹細胞分離マーカー CD133 の陽性および陰性細胞に分離し、腹膜中皮細胞との共培養下にて、CD133 の発現維持能、コロニー形成能、マトリゲル浸潤能を検討し、腹膜中皮細胞との相互作用により癌幹細胞の機能が維持されるか否かの検討を行う。また、in vivo においても腹膜中皮細胞との共培養後の移植により移植率が增加するかの検討を行う。(腹膜中皮細胞ニッチ存在の証明)

我々は CD133 陽性細胞に対するケモカインの関与に着目している。膵臓がんでは CD133 陽性細胞中の特に CXCR4 陽性細胞は、CXCR4 陰性細胞と比較して転移する能力が優位に亢進していたという報告がある。我々の予備実験においても CD133 陽性細胞において Western blotting で CXCR4 の高発現を認め、動物実験では wild type と比べ CD133 陽性細胞群で腹腔内播種の程度が強い傾向であった。CD133 陽性 CXCR4 陽性細胞がより純度の高いがん幹細胞である可能性がある。腹膜中皮細胞からは CXCR4 の基質である SDF-1 が高濃度に分泌されていることも確認しており SDF-1-CXCR4 シグナルが卵巣がん幹細胞ニッチに結びつく際に働いているといことを証明するために CXCR4 中和抗体による CD133 の発現維持能、コロニー形成能、マトリゲル浸潤能の抑制効果についても検討を予定している。臨床応用を視野に入れる際、免疫療法の今後の課題である負の制御としての免疫寛容機構に対する治療が必要になるが、その点に関し、腹膜中皮細胞性ニッチ-がん幹細胞間のサイトカイン、増殖因子 (TGF-beta, VEGF, stem cell factor, FGF など)、ケモカイン (SDF-1 など)、接着分子 (カドヘリン, beta -カテニンなど)、細胞外マトリックス (フィブロネクチン、ヒアルロン酸など) などのシグナルを各種中和抗体、siRNA などの抑制系の併用により各種抗がん剤耐性の変化とアポトーシス関連蛋白の発現を検討する。免疫抑制性細胞 (制御性 T 細胞 (Treg, CD4+CD25+FOXP3+)、抑制性ミエロイド細胞 (MDSC)、寛容性 DC など) の誘導に対するがん幹細胞と腹膜中皮細胞の interaction の検討として、Transwell の下層にまずヒト腹膜中皮細胞をコートした後、下層に 3 群の各がん細胞、上層にヒト末梢血単核球 (PBMC) を播種し、共培養にて免疫に参与する血球細胞の生細胞数および免疫抑制性細胞の頻度など FACS を用い確認する。(3)癌幹細胞をターゲットとした分子標的療法と免疫療法併用療法の確立の研究においては我々は卵巣癌患者腹水検体を用いた腹腔内腫瘍環境の免疫学的解析を予定している。有意な免疫学的因子が同定された場合は、同因子をターゲットとした宿主免疫の活性化もしくは免疫抑制機構の解除を併用することで化学療法抵抗性の克服が可能か検討する。免疫抑制因子の 1 つとして IL-6、IL-8、VEGF などのサイトカインを候補として検討

する。

4. 研究成果

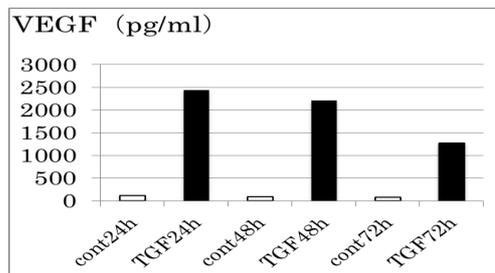
(1)の研究において我々は CD133 に対するペプチドを作成し、卵巣癌患者より採取した PBMC にパルスを行い、抗原特異的 CTL の誘導の評価を行ったが、抗原特異的 CTL を誘導するペプチドの同定には至らず、CD133 をターゲットとするのは困難と考え、新たな抗原同定を目的としてがん幹細胞と非がん幹細胞の遺伝子発現プロファイルにつき microarray 解析を行い、図 1 に示すような発現プロファイルを示した。



(図 1)

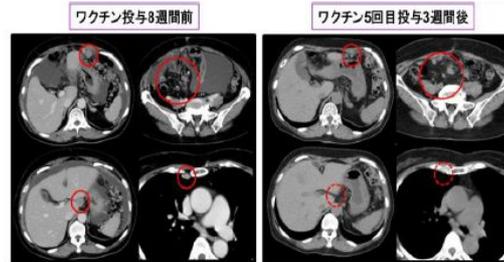
本データより癌幹細胞に高発現の因子として、IGF-1、WNT、PDGFB、SNAIL が卵巣がん幹細胞の新規特異抗原の候補であると考え、今後ペプチド同定を計画している。

(2)の研究結果として CD133 陽性卵巣癌細胞は CD133 陰性卵巣癌細胞にくらべ腹膜中皮細胞との共培養により種々のサイトカイン、ケモカインの産生が亢進していた。さらに CD133 陽性細胞において CXCR4 発現亢進を確認し、CXCR4 中和抗体投与したところ腹膜中皮細胞によって促進した、コロニー形成能、腹膜浸潤能は抑制され、ヌードマウスを用いた腹膜播種モデルにおいても腹膜播種を抑制した。臨床検体の免疫染色の結果腹、膜播種病巣における alpha-SMA の発現の亢進を認めた。alpha-SMA 陽性中皮細胞は CAM として癌幹細胞の維持に参与することが示唆された。また、腹膜中皮細胞との共培養によって CD133 陽性卵巣癌細胞では TGF-beta の発現が亢進して、これが癌微小環境における免疫抑制環境の維持に参与していることが示唆された。さらに癌細胞の産生する TGF-beta により腹膜中皮細胞の EMT が誘導されこの EMT が誘導された腹膜中皮細胞は図 2 に示すように VEGF の分泌が亢進しており、癌微小環境の血管新生が亢進するメカニズムを見出した。



(図 2)

(3)の研究成果として現在我々がやっている卵巣明細胞腺癌に対する GPC3 ペプチドワクチン療法の臨床第 II 相試験は現在までに 89 例に治療を行い、進行・再発症例に対するペプチドワクチン単独治療群 29 例中 3 例において腫瘍縮小効果を認めた。再発形式の中で腹水を伴った腹膜播種が 15 例と最も症例数が多かったが、15 例中 1 例のみ図 3 に示すよ



(図 3)

うな腫瘍縮小効果を認めたが、その他の症例では無効であり、腹膜播種の微小環境の免疫抑制が効果の減弱につながっていると考えた。今後、腹水減少効果に対しても有効と報告されている、アバスタチンと GPC3 ペプチドワクチンの併用の臨床試験が必要であると考えられた。

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 2 件)

1) Suzuki S, Shibata K, Kikkawa F, Nakatsura T. Significant clinical response of progressive recurrent ovarian clear cell carcinoma to glypican-3-derived peptide vaccine therapy: Two case reports. Hum Vaccin Immunother 10(2): 338-43 2014. 査読有

2) Luo C, Shibata K, Suzuki S, Kajiyama H, Senga T, Koya Y, Daimon M, Yamashita M, Kikkawa F. GPC3 expression in mouse ovarian cancer induces GPC3-specific T cell-mediated immune response through M1 macrophages and suppresses tumor growth. Oncol Rep 32(3): 913-21, 2014. 査読有

[学会発表](計 5 件)

1) Shibata K, Mizuno M, Zuzuki S, Kikkawa F. Effectiveness and immunological analysis in a phase II clinical trial of GPC3 derived peptide vaccine for ovarian clear cell adenocarcinoma patients. International Gynecologic Cancer Society November 8, 2014. Melbourne, Australia
2) Shibata K. Immunological analysis in a phase II clinical trial of GPC3 derived peptide vaccine for ovarian clear cell adenocarcinoma patients. The joint symposium of the University of Adelaide and Nagoya, May 27, 2013, Adelaide, Australia

3) Shibata K, Mitui H, Sekiya R, Kikkawa F. Immunological analysis in a phase II clinical trial of the GPC3 derived peptide vaccine for

ovarian clear cell adenocarcinoma patients Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference. February 22, 2013, Maui, Hawaii

4) 柴田清住 卵巣明細胞腺癌をターゲットとした GPC3 ペプチドワクチン療法 第10回日本免疫学研究会 2013年2月9日 東京ガーデンパレス 東京都 文京区

5) 三井寛子、柴田清住、芳川修久、関谷龍一郎、鈴木史朗、梅津朋和、水野美香、梶山広明、吉川史隆 卵巣癌腹膜播種過程における癌関連中皮細胞の作用 第54回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 2013年7月20日 ホテルグランパシフィック LEDAIBA 東京都港区

〔図書〕(計2件)

1) 柴田清住、吉川史隆 ゲノム時代の婦人科がん診療を展望する 臨床婦人科産科医学書院 168(22-27) 2015

2) 柴田清住、吉川史隆 特集 癌免疫療法の最前線 診断と治療社 280(178-186) 2014

6. 研究組織

(1)研究代表者

柴田 清住 (Shibata Kiyosumi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90335026

(2)研究分担者

梶山 広明 (Kajiyama Hiroaki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00345886