

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462113

研究課題名(和文) 膵癌幹細胞をターゲットとしRNAアプタマーを用いた新規標識システムの構築

研究課題名(英文) The development of new recognition system for cancer stem cell-like cell using RNA aptamer

研究代表者

吉村 清 (YOSHIMURA, KIYOSHI)

国立研究開発法人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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞の培養法を確立できたため、この細胞を用いてSEREX法を用いたアプタマーのスクリーニングを行った。膵癌幹細胞の親株の膵癌細胞株で癌特異的なアプタマーの除去を行い、残ったアプタマーを回収し、誘導した膵癌幹細胞でセレクトしこれを増幅する作業をおこなった。12サイクル行った時点でとれてきたアプタマーは癌幹細胞特異的に認識していたがマウス血清内で不安定であった。この一方で膵癌細胞と膵がん幹細胞に共通して発現する膜表面分子が同定できたので(分子名を分子Nとする)この分子N特異的なアプタマーのスクリーニングに切り替えて継続している。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSCs) have been studied of their self-renewal capacity and pluripotency, as well as their resistance to anti-cancer therapy and their ability to metastasize to distant organs. CSCs are difficult to study because their population is quite low in tumor specimens. To overcome this problem, we established a culture method to induce a cancer stem-like cell (CSLC)-enriched population from human cancer cell lines. Here is the problem. The surface marker of CSLC was not purely identified. CSLC is mostly recognized by combined surface markers. To develop the immunotherapy targeting CSLC, we attempted the novel detection system using RNA aptamer.

研究分野：腫瘍免疫学、消化器外科学、腫瘍外科学

キーワード：癌幹細胞 膵癌幹細胞 免疫療法 RNAアプタマー

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞は転移や治療抵抗性を示すことに大きく関与しているため近年注目されている。これまで癌治療のターゲットは文字通り癌であったため、その後の再発、転移が防げなかった可能性があり、この癌幹細胞に対する治療法の確立は急務である。

ところが、現在行われている癌の治療は、癌幹細胞の特性から転用しがたいことから、癌幹細胞を直接ターゲットとした免疫療法の開発を行うこととした。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。

2. 研究の目的

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(特許申請中)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、この培養により誘導した膵癌幹細胞特異的に認識する短鎖 RNA つまり RNA アプタマーを同定することである。このアプタマーを用いて膵癌幹細胞だけを直接同定するシステムの構築とさらにはこのアプタマー認識細胞をターゲットとした治療を開発し、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

膵癌幹細胞の誘導及び培養法を確立できたため、この技術を基に、膵癌幹細胞を安定的に誘導し、同時に癌細胞も従来の方法で培養することでこの2種類の細胞を用いてSEREX法を用いたアプタマーのスクリーニングを行ってきた。

膵癌幹細胞の親株の膵癌細胞株で癌特異的なアプタマーの除去を行い、残ったアプタマーを回収し、誘導した膵癌幹細胞をCD44vによりさらに選択性を高めた細胞集団を用いてセレクトしこれを増幅する作業を行った。

4. 研究成果

この作業を12サイクル行った時点でとれてきたアプタマーは癌幹細胞特異的に認識していたがマウス血清内で不安定であった。現在マウス血清で失活されないものを選択的に増やす試みを行ったが失活されるものを選択することが困難であった。

これを元に現在DNAアプタマーを用いて、膵癌細胞と膵がん幹細胞に共通して発現する膜表面分子が同定できたので(分子名を分子Nとする)この分子N特異的なアプタマーのスクリーニングに切り替えて継続している。

DNAアプタマーを用いて、膵癌細胞と膵がん幹細胞に共通して発現する膜表面分子N特異的なアプタマーのスクリーニングをSEREX法を用いて行っている。この選択時に血清を用いて失活されるものは排除していき、in vivoでも用いることができるものを同定しようとしている。これを今後膵癌幹細胞集団として別のマーカーで選択した細胞集団や、膵癌特異的な新規蛋白をセレクションに用いる。

この作業を20サイクル行った時点でとれてきたアプタマーを癌幹細胞のみ認識していることをフローサイトメトリーで確認し、再度in vivoでも消化されないものをその中で選択し、最終的なアプタマーを同定する。

現時点での目標は抗体に変わる癌幹細胞特異的に標識するアプタマーを同定し免疫療法の開発に用いる予定としている。

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15件)

- (1)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.* 2015 Aug;64(8):1047-56. (査読・有)
- (2)Ishiguro S, Yoshimura K, Tsunedomi R, Oka M, Takao S, Inui M, Kawabata A, Wall T, Magafa V, Cordopatis P, Tzakos AG, Tamura M. Involvement of angiotensin II type 2 receptor (AT2R) signaling in human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): a novel AT2R agonist effectively attenuates growth of PDAC grafts in mice. *Cancer Biol Ther.* 2015;16(2):307-16 (査読・有)
- (3)Shindo Y, Yoshimura K, Kuramasu A, Watanabe Y, Ito H, Kondo T, Oga A, Ito H, Yoshino S, Hazama S, Tamada K, Yagita H, Oka M. Combination immunotherapy with 4-1BB activation and PD-1 blockade enhances antitumor efficacy in a mouse model of subcutaneous tumor. *Anticancer Res.* 2015 Jan;35(1):129-36. (査読・有)
- (4)吉村 清:免疫チェックポイント阻害剤。「がん治療」新時代; Vol.09 20-22 2016年(査読・無)
- (5)吉村 清、朝尾 哲彦 Immune checkpoint 阻害薬のバイオマーカー *Mebio*; Vol.33(6) 24-30 2016 June 107

- (6)吉村 清:次世代の immune checkpoint 阻害薬.腫瘍内科;2016;1;13-19(査読・無)
- (7)吉村 清:免疫チェックポイント抗体による免疫制御機構. Bio Clinica;2015;392:36(査読・無)
- (8)吉村 清 がん免疫療法～基礎知識から最新情報まで～ 新薬と臨床 第64巻 No.7 31(769)-35(773)2015年7月(査読・無)
- (9)吉村 清 「オミックスで加速するがんバイオマーカー研究の最新動向」 抗PD-1あるいは抗PD-L1抗体を用いた免疫療法 遺伝子医学MOOK 29号 2015年11月(査読・無)
- (10)吉村 清 免疫調整因子阻害剤の臨床開発:米国での経緯と現状.2015;3;300(査読・無)
- (11)大津 敦、赤司浩一、佐治重衡、吉村 清 抗体療法の新展開 (Round Table Meeting) がん分子標的治療 Vol.13 No.2、28(224)-65(231) 2015年6月(査読・無)
- (12)吉村 清 免疫チェックポイント阻害剤の最新の動向.腫瘍内科;2015;5;479(査読・無)
- (13)吉村 清 免疫チェックポイント阻害剤の最新の動向 腫瘍内科、15(5):479-484, 2015年5月(査読・無)
- (14)吉村 清 免疫チェックポイント抗体による免疫制御機構 Bio Clinica 30(3),36(238)-40(242)2015年3月(査読・無)
- (15)吉村 清 免疫調整因子阻害剤の臨床開発:米国での経緯と現状:Overview 腫瘍内科、15(3):3000-304, 2015年3月(査読・無)

[学会発表](計12件)

最新の腫瘍免疫療法に関する知見 吉村清 Taiwan Joint Cancer Conference(腫瘍免疫セッション)(台湾) 2016年5月14日

Emerging immunotherapy - 免疫チェックポイント阻害剤の開発とその先にあるもの - 第37回がん免疫外科研究会特別講演2、(埼玉)2016年5月13日

シンポジウム肺癌免疫治療 Update 吉村清 第56回日本呼吸器学会学術講演会(京都府) 2016年4月8日~10日

新しいがん免疫療法開発の現状、吉村清、特別講演、第5回免疫細胞治療研究会(東京都) 2015年11月29日(口頭)

キメラ抗原受容体(CAR)遺伝子導入T細胞によるがん免疫療法、吉村清、シンポジウム10「ここまで来た免疫療法 肺がん治療を変えられるか? -、第56回日本肺癌学会学術集会(神奈川県) 2015年11月26日~28日(口頭)

The development of Immunotherapy

blocking PD-L1/PD-1 interaction in combination with an immune stimulator、YOSHIMURA Kiyoshi、2-D-W22-2-O/P、第44回日本免疫学会学術集会(札幌) 2015年11月18日~20日

抗PD-1/PD-L1抗体療法と免疫賦活剤のコンビネーションによる免疫療法の開発、吉村清、ワークショップ(WS)26 胃2「胃がんのPDL-1発現と免疫療法」、第53回日本癌治療学会学術集会(京都) 2015年10月29日~31日(口頭)

抗PD-1/PD-L1抗体療法とのコンビネーションを考慮した免疫療法の開発、吉村清、布施雅規、北野滋久、石崎秀信、Oral session E12-2「抗体療法」、第74回日本癌学会学術総会(名古屋) 2015年10月8日~10日(口頭)

ヒト大腸癌幹細胞様細胞における免疫療法の標的分子の検索、布施雅規、北野滋久、石崎秀信、吉村清、「がん細胞の特性(5)」、第74回日本癌学会学術総会(名古屋) 2015年10月8日~10日

肝細胞癌幹細胞様 Sphere 細胞における酸化能亢進及びHIF1制御下遺伝子発現亢進、恒富亮一、吉村清、裕彰一、岡正朗、永野浩昭、Oral session J11-2「がん幹細胞(2)」第74回日本癌学会学術総会(名古屋) 2015年10月8日~10日

Calreticulin は膵癌幹細胞に高発現し、膵癌患者の予後と相関する、松隈聡、吉村清、渡邊裕策、恒富亮一、井上萌子、近藤(古屋)智子、古賀厚徳、上野富雄、吉野茂文、裕彰一、伊藤浩史、永野浩昭、Oral session J11-2「がん幹細胞(2)」第74回日本癌学会学術総会(名古屋) 2015年10月8日~10日

TLR2とSTINGのアンタゴニストによる免疫療法、吉村清、シンポジウム2「樹状細胞および関連細胞の研究の現状と将来への展望」、第25回日本樹状細胞研究会(岡山) 2015年7月10日(口頭)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称:がん幹細胞の培養による誘導に関する特許

発明者:吉村 清、恒富 亮一、渡邊 裕策、岡 正朗

権利者:山口大学

種類:特願

番号:2012-181102

出願年月日:24年8月17日

国内外の別:内

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

倉増 敦朗 (KUREAMASU ATSUO)
山口大学・医学(系)研究科(研究院) 准
教授
研究者番号：90302091