

大腸癌における癌幹細胞と新規癌抗原の解析

学位論文内容の要旨

【背景と目的】大腸癌の治療法は新たなcombination chemotherapyや分子標的療法の出現で近年めざましく進歩してきているが、進行期の患者の予後は未だ不良であり、大腸癌の新規治療の開発は急務であると思われる。癌免疫療法は、手術療法、化学療法、放射線療法に続く第4の治療法として、近年、分子レベルでの解析が進み一部では臨床応用されるに至っている。大腸癌は、比較的抗原性が高く経過の緩徐な悪性腫瘍であることから、以前より様々な癌抗原が同定され、それに対する免疫療法が試みられてきたが、大半の症例では満足のいく結果が得られていない。その理由として、癌細胞が免疫療法の標的となる抗原分子の発現を欠落し、免疫システムから認識されなくなることが主要な原因の一つとしてあげられる。今回、癌の最も基本的な形質である、「造腫瘍能」に着目し、「造腫瘍能」に寄与する癌幹細胞関連分子を標的とする大腸癌免疫療法の可能性を検討した。

【対象と方法】本研究では、大腸癌幹細胞の分離方法としてHoechst 33342染色によるside population法を用いた。大腸癌幹細胞に高発現する分子を同定するため、cDNAマイクロアレイによる網羅的な解析を施行した。このデータから得られた癌幹細胞抗原候補について、HLA-A24拘束性抗原特異的細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte以下CTL)を誘導し、*in vitro*・*in vivo*両方で癌幹細胞が傷害されるか否かを解析した。解析の方法として、*in vitro*では癌細胞の傷害度をインターフェロンγ ELISpotおよび⁵¹Crリリースアッセイで検討した。*in vivo*では、ヒト大腸癌細胞株からの癌幹細胞を異所性に移植したマウスに、ヒト由来の癌幹細胞抗原特異的CTLを血管内投与し、adoptive transfer modelを作成して検討した。

【結果】cDNA マイクロアレイの結果から、癌幹細胞抗原候補として olfactory receptor family 7 subfamily C member 1 (以下 OR7C1) を得た。OR7C1 は癌・精巣抗原で大腸癌幹細胞には発現するが、非癌幹細胞には発現しない癌幹細胞特異抗原の一つであった。OR7C1 恒常発現細胞と siRNA を用いた遺伝子抑制細胞での実験から、OR7C1 は既知の幹細胞遺伝子である SOX2 などの上流にあり、癌幹細胞の形質維持に関わる癌幹細胞にとって機能的な分子と推測された。次に、癌幹細胞および非癌幹細胞の CTL に対する感受性を比較するために、大腸癌幹細胞・非癌幹細胞の両方で発現している共通抗原の一つで、我々のグループが CTL クローンの樹立に成功している Centrosome protein 55kd/ chromosome 10 open reading frame 3 (以下 Cep55/c10orf3) に着目した。Cep55/c10orf3 は正常細胞では中心体に局在し細胞分裂に必須な分子であるが、Cep55/c10orf3 モノクローナル抗体を用いた大腸癌免疫組織化学染色では明らかな細胞分裂状態にない癌細胞でも染色され、癌細胞では細胞分裂時以外でもある程度発現が維持されていると推

測された。この癌幹細胞・非癌幹細胞での発現の観点から見ると性質の異なるこの2種類の抗原について、抗原特異的に反応するCTLが *in vitro* および *in vivo* で癌幹細胞を傷害しうるか検討した。大腸癌免疫療法として有効な抗原エピトープ Cep55/c10orf3_193(10) および OR7C1_93(10) を同定した。*in vitro* では Cep55/C10orf3 特異的 CTL クローンは、癌幹細胞および非癌幹細胞に対して同等の細胞障害活性を示した。OR7C1 特異的 CTL クローンは非癌幹細胞と比較して、癌幹細胞に対してより高い細胞障害活性を示した。*in vivo* ではいずれの CTL クローンも抗腫瘍能を示したが、OR7C1 特異的 CTL クローンを輸注した群では、Cep55/c10orf3 特異的 CTL クローンを輸注した群と比較して有意に抗腫瘍能が高かった。

【考察】癌幹細胞は、正常組織で見られるような自己複製能・多分化能を有する少数の幹細胞様細胞と考えられている（癌幹細胞仮説）。癌幹細胞は化学療法や放射線療法に対して抵抗性を示すことが明らかとなっていて、癌の再発・転移といった、臨床上大きな意味を持つイベントに大きく関与していると考えられる。癌の根治を目指す上で癌幹細胞に対する有効な治療法の開発が必要となるが、これまでのところ、CTLはじめとする免疫細胞が癌幹細胞を殺傷可能かどうか不明であった。*in vitro* の結果からOR7C1 およびCep55/c10orf3を抗原としたCTLの場合、大腸癌において癌幹細胞は非癌幹細胞同様CTLに対して十分感受性を示すことが、本研究により明らかになった。

次に、より有効な免疫療法を考案する上で、癌幹細胞特異的な発現を示す抗原（癌幹細胞特異抗原）を標的とするのが良いのか、あるいは、癌幹細胞および非癌幹細胞共に発現する共通抗原を標的にするのが良いのか *in vivo* で検討したが、癌幹細胞特異抗原を用いて癌幹細胞を標的とする方が、共通抗原を用いるより有効である可能性が示唆された。共通抗原も癌幹細胞抗原であると考えられるので、癌幹細胞に対しての傷害性は理論上同等と考えられるが、この仮定に反する結果であった。この理由として、共通抗原は非癌幹細胞にも発現しているため、癌幹細胞を移植したのち *in vivo* で分化した非癌幹細胞の傷害にもCTLが分散され癌幹細胞を根絶出来なかった可能性などが考えられた。今後、*in vivo* に移植された非癌幹細胞に対するCep55/c10orf3・OR7C1特異的CTLクローンの造腫瘍能実験や化学療法剤との併用実験などを施行する必要がある。

【結論】①本研究において大腸癌新規癌抗原としてCentrosome protein 55kd/ chromosome 10 open reading frame 3および大腸癌幹細胞抗原候補としてolfactory receptor family 7 subfamily C member 1得た。

②本研究において、これらの分子のCTLエピトープを発見し、癌ワクチン療法の標的抗原となり得ることが示唆された。

③抗がん剤耐性をもつ癌幹細胞でもこの2種類の抗原特異的なCTLに対して感受性があった。

④CTLが認識する抗原ペプチドを用いて癌免疫療法を行う場合、癌幹細胞特異的な発現を示す抗原ペプチドを用いて癌幹細胞を標的とする方が、癌幹細胞および非癌幹細胞に共通して発現する抗原ペプチドを用いるより有効である可能性が示唆された。

⑤本研究で得られた知見は、有効性の高い大腸癌免疫療法を考案する上で重要なインフォメーションをもたらすものとする。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 櫻 木 範 明
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 藤 堂 省
副 査 教 授 守 内 哲 也
副 査 教 授 田 中 伸 哉

学 位 論 文 題 名

大腸癌における癌幹細胞と新規癌抗原の解析

大腸癌癌幹細胞における新規癌抗原 Centrosome protein 55kd/ chromosome 10 open reading frame 3 (Cep55/c10orf3)および olfactory receptor family 7 subfamily C member 1 (OR7C1)に対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の免疫応答を中心として検討した。大腸癌細胞株から Hoechst33342 染色により得られる SP 分画は癌幹細胞様の性質をもち、抗癌剤抵抗性であることを示し、Cep55/c10orf3 は SP 分画 (癌幹細胞) にも MP 分画 (非癌幹細胞) にも発現する抗原であり、OR7C1 は SP 分画のみに発現する抗原であることを示した。次に大腸癌患者血液から得られた Cep55/c10orf3 および OR7C1 特異的に認識する CTL が誘導されることを示し、この CTL が抗癌剤抵抗性の SP 分画を傷害されることを ^{51}Cr リリースアッセイを用いて証明した。さらに癌幹細胞のみをターゲットとすることの治療上の意義について検討するために Adoptive transfer model を用いて *in vivo* における CTL の腫瘍抑制効果を検討し、Cep55/c10orf3 特異的 CTL でも OR7C1 特異的 CTL でも腫瘍抑制効果が見られたが、OR7C1 特異的 CTLの方が腫瘍抑制効果の高い傾向にあったことを示した。以上より、抗癌剤耐性をもつ癌幹細胞でも抗原特異的な CTL に対して感受性があり、大腸癌患者における癌幹細胞を標的とした治療の可能性を示し、癌幹細胞に対する免疫療法を施行する場合、癌幹細胞に特異的な発現を示す抗原ペプチドを用いた方が有効である可能性があり、状況に応じた最適な抗原を検討する必要があると結論した。

研究発表に対して以下の質疑およびコメントが出された。全ての審査員から OR7C1 が細胞膜表面蛋白であることからモノクローナル抗体療法が可能でありペプチドワクチン療法よりも有効である可能性を指摘された。これに対し申請者は、モノクローナル抗体を現在作成中であり抗体療法の可能性に対する検討も今後施行する予定であると回答した。

副査の守内教授から、近年、癌幹細胞が血管新生に関与し血管内皮への分化も推測されている旨のコメントがあった。申請者は、Adoptive transfer model の腫瘍標本において 1cm^3 程度のごく小さい腫瘍でも 3/4 が necrosis を起こしており、癌幹細胞を傷害すると腫瘍の血管新生にも影響す

る可能性があり現在検討中であると回答した。

副査の田中教授から、OR7C1が癌幹細胞の形質維持に関与する点について複数の癌細胞株を用いて検討するべきである旨を指摘された。申請者は、今回用いたSw480細胞株のほかにHCT15、HT29細胞株でもOR7C1過剰発現細胞とノックダウン細胞でのXenograft modelや幹細胞マーカーのRT-PCRでの検討を行い同様の結果を得られているが、今後sphere形成実験などにも検索の範囲を拡げて検討したいと回答した。また、OR7C1と現在臨床研究を行っているSurvivin 2Bとの抗原としての優劣の検討が必要ではないかとの指摘を受けたが、Survivin 2Bでは*in vitro*で大腸癌細胞を傷害するCTLクローンが得られていないので今回用いたAdoptive transfer modelの系では客観的な検討は困難であると回答した。

副査の藤堂教授から、癌ペプチドワクチン療法単独での限界とRegulatory T cell などCTL以外の免疫系との関わりなど克服しなければならない課題について示唆があり、OR7C1の癌細胞での陽性率について質問があった。申請者は、現在作成中のモノクローナル抗体を用いたフローサイトによる解析では約5%であると回答した。

副査の浅香教授から、OR7C1の機能について質問を受けた。申請者は同じ嗅神経受容体ファミリーで、精子の運動能に関与しているとの報告があるが、現在までに全く報告が無く今後解析する予定であると回答した。また、癌ペプチドワクチン、モノクローナル抗体療法、分子標的療法の位置づけについていくつかの指摘を受け、さらに、Adoptive transfer modelの腫瘍標本による癌幹細胞の傷害と血管新生の検討から、現在大腸癌に使用されている血管内皮細胞増殖因子ヒト化モノクローナル抗体との併用効果やOR7C1の臨床応用を目指す場合の山積する課題、ELISAを用いたバイオマーカーとしてのOR7C1の可能性についてコメントがあった。

主査の櫻木教授から、OR7C1を標的とした場合、その下流にあると推測しているLGR5を発現する正常大腸幹細胞への影響や嗅神経への影響について質問を受けた。申請者は、現在のところOR7C1は正常大腸幹細胞には発現せず大腸癌幹細胞にのみ発現する抗原であり正常組織への影響は少ないと推測している旨、嗅神経に発現して影響が出る可能性はあるが、嗅覚のみの変化であれば副作用として容認出来るのではないかと回答した。また、ペプチドワクチン療法単独と、少量の抗癌剤を併用したペプチドワクチン療法の優劣についての質問があった。申請者は、少量の抗癌剤を用いたときの腫瘍抑制効果のみならず、Regulatory T cellが抑制されることによる抗原特異的なCTL効果の増強も期待できると回答した。

この論文は、Experimental and Molecular Pathology誌で掲載され、今後、大腸癌患者における癌幹細胞を標的とした癌ペプチドワクチン療法やモノクローナル抗体療法につながるものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。