

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 守田 玲菜

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

【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グamma 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考えられる。