第44回総会ポスター受賞記念論文

総説 (推薦論文)

推薦者: 慶應義塾大学医学部先端科学研究所・細胞上法研究部門 河上 裕

がん幹細胞の単離と免疫治療に向けた標的抗原の同定

宮本 昇^{*1,2}, 金関 貴幸^{*1}, 廣橋 良彦^{*1}, 塚原 智英^{*1},
菊池 泰弘^{*1}, 佐藤 昇志^{*1}, 鳥越 俊彦^{*1}Identification of cancer-stem cell antigens
and development of CTL-mediated cancer immunotherapySho MIYAMOTO^{*1,2}, Takayuki KANASEKI^{*1}, Yoshihiko HIROHASHI^{*1}, Tomohide TSUKAHARA^{*1},
Yasuhiro KIKUCHI^{*1}, Noriyuki SATO^{*1} and Toshihiko TORIGOE^{*1}^{*1}Department of Pathology, Sapporo Medical University School of Medicine^{*2}Department of Oral Surgery, Sapporo Medical University School of Medicine

(Accepted December 19, 2016)

summary

Cancer-stem cells (or cancer-stem like cells, CSC) play an indispensable role in tumor initiation or tumor development *in vivo*. However, CSCs are resistant to conventional therapies including chemo/radiotherapy and a certain molecularly-targeted therapy, thereby are responsible for tumor relapse or metastasis in clinical settings. In this review, we focus on cytotoxic T-cell mediated immune responses against CSCs and discuss a challenge of targeting CSCs as well as the development of CSC-based cancer immunotherapy, which is an emerging and promising strategy toward a complete cure of quite a few types of cancers.

Key words—— cancer-stem cell; cancer immunotherapy; CTL; peptide vaccine

抄 録

がん幹細胞 (cancer-stem cell or cancer-stem like cell, CSC) の存在が様々な腫瘍で確認されている。がん組織における割合は極めて少ないものの、これらの細胞は生体内における腫瘍増殖の起始点となり、再発・転移の原因として注目されている。CSC はがん根治を考えるうえで欠かせない細胞成分であるが、non-CSC に比べ化学療法や放射線療法さらに分子標的薬といった治療法に耐性を示すことが問題であった。当研究室では、CSC を標的とした免疫応答解析のために、これまで抗原性に優れたがん幹細胞特異抗原を複数同定している。ペプチド誘導した細胞傷害性 T 細胞 (CTL) はいずれのケースでも *in vivo* モデルで効果的に腫瘍増殖を抑制する。即ち、CTL は CSC を識別可能であり、同時に CSC を標的とした効果的ながん免疫治療の開発が期待できる。本稿では明らかとなってきたがん幹細胞免疫応答に焦点をあて、CSC の単離法と CTL 抗原の同定について概説する。

はじめに

免疫チェックポイント阻害剤による抗腫瘍効果が多様ながん患者で確認され、患者自身が有する免疫応答の有効性がクリニカルステージにおいて明らかとなった¹⁾。免疫チェックポイント阻害剤により増強される T 細胞応答の標的抗原はまだ不明な点が残されているものの、がん細胞の遺伝子変異に由来する変異抗原 (ネオアンチゲン) が主体であると考えられている。実際に著者らの研究室でも大腸

がん細胞株から新規変異抗原を同定し、同抗原に対する強い細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 応答とがん細胞傷害性を確認した。しかしその一方で、免疫編集 (immunoediting) と呼ばれる過程を経て免疫抵抗性を獲得したがん細胞集団が増殖するプロセスが知られている²⁾。メラノーマ患者の治療例においても T 細胞標的となったネオアンチゲンが腫瘍集団から選択的に発現消失あるいは低下する例が報告された³⁾。これらの事実は、がん細胞集団に広く発現する抗原、あるいは、がんの生存・増殖に根幹をなす細胞成分を標的とした T 細胞応答の誘導が効果的かつ根本的な治療に繋がる可能性を示唆している。

^{*1} 札幌医科大学医学部病理学第一講座^{*2} 札幌医科大学医学部口腔外科学講座

がん幹細胞による既存治療抵抗性の獲得と再発・転移

腫瘍を形成する細胞集団は必ずしも均一ではなくヘテロな集団であり、そのなかで、自己再生能と造腫瘍能および分化能を有するごく一部の細胞集団はがん幹細胞 (cancer stem cell あるいは cancer-stem like cell, CSC) と呼ばれる (図 1)⁴⁻⁶⁾。CSC は最初に血液腫瘍で証明され、続いて、乳がん、脳腫瘍、子宮内膜がん、膀胱がん、前立腺がん、大腸がん、頭頸部がん、といった固形腫瘍で報告されている⁷⁻¹⁴⁾。がん治療を考えるうえで念頭に置かなければならないのは、CSC の既存治療に対する抵抗性である。CSC は増殖サイクルが緩徐であり、細胞分裂の休止、さらには ABC 薬物トランスポーターの発現、抗アポトーシス分子の発現、DNA 損傷に対する耐性といった形質を有することで化学療法や放射線治療に対し抵抗性を獲得することが知られている¹⁵⁾。CSC マーカーのひとつである CD133 陽性グリオーマ陽性細胞は陰性細胞に比較して放射線耐性を示し、また CD44^{high}/CD24^{low} 乳がん細胞は、化学療法および放射線療法に対してそれぞれ耐性を示した¹⁶⁻¹⁸⁾。さらに、チロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブは慢性骨髄性白血病 (CML) に対し臨床的に著効するが、モデルマウスを用いた実験ではイマチニブ抵抗性を有する CSC が残存し再発に寄与するとされている¹⁹⁾。

このような CSC の治療抵抗性形質は結果的に再発あるいは転移へとつながる可能性が高い。膀胱がん浸潤部にみられる CD133⁺/CXCR4⁺ の CSC 細胞集団を除去することで膀胱がんの転移能は失われた²⁰⁾。また、乳がんでは CD44^{high}/CD24^{low} 細胞が高頻度に転移性胸水中および骨髄中に検出された²¹⁾。以上から、CSC は長期的な患者予後を左右しうる細胞成分で

あり、同時に優先すべき治療標的と考えられる。前述した免疫チェックポイント阻害剤臨床試験では複数の奏功例で治療効果の持続が認められた。CSC を免疫応答の標的へと導くことで、既存治療の効果を補い再発・転移の防止へとつながる治療法の確立が期待できる。

CSC の単離と同定

がん幹細胞を標的とする治療開発には CSC の単離が重要である。がん細胞集団中に占める CSC 割合は本来ごくわずかであり、これらを同定するためのマーカー開発が多角的に行われている (表 1)。すべてのがん細胞に共通した方法はなく、がん腫やケースに応じて CSC 成分を単離し、そのがん幹細胞性を評価しバリデーションするかたちが一般的である。以下に知られている代表的な手法を紹介する。

1. 細胞表面マーカー

CSC は Lapidot らによりはじめてその存在が示された。この際に急性骨髄性白血病細胞の単離に用いられた細胞表面マーカーが CD34⁺/CD38⁻ である⁷⁾。

表 1 がん幹細胞表面マーカー

	細胞表面マーカー	文献
白血病	CD34 ⁺ , CD38 ⁻	57, 58
乳がん	CD44 ⁺ , CD24 ⁻ , Lin ⁻ , ALDH1 ⁺	8, 34
脳腫瘍	CD133 ⁺	59, 60
悪性黒色腫	CD20 ⁺ , ABCB5 ⁺	61, 62
大腸がん	CD133 ⁺ , EpCAM ⁺ , CD44 ⁺ , CD166 ⁺ , ALDH1 ⁺	13, 22, 35, 63
肺がん	CD24 ⁺ , CD44 ⁺ , CD133 ⁺	64, 65
骨肉腫	CD105 ⁺ , CD44 ⁺ , Stro1 ⁺	66
頭頸部がん	CD44 ⁺	14
肝がん	CD133 ⁺ , CD90 ⁺ , CD44 ⁺	67, 68
膀胱がん	CD44 ⁺ , CD24 ⁺ , ESA ⁺ , CD133 ⁺	11, 20

文献 69 より改変。

図 1 がん幹細胞 (cancer-stem cells or cancer-stem like cells, CSC) モデル

いずれも正常血液幹細胞のマーカーとして用いられていたものであり、この応用が CSC 同定につながった。乳がんでは CD44 と CD24 の組み合わせが用いられており、CD44^{high}/CD24^{low} 細胞は 100 個以下の少数から免疫不全マウスに生着し腫瘍を形成する⁸⁾。また大腸がんおよび脳腫瘍では CD133 が用いられており、大腸がん個体のわずか 3% 以下を占める CD133⁺ 細胞は CD133⁻ 細胞に比べ有意に少ない数で *in vivo* 腫瘍を形成し、がん幹細胞成分を高率に含んだ集団と考えられる^{13, 22)}。さらに Quintana らは NOD/SCID より免疫不全性の高い NSG マウスを用いることで、メラノーマでは単細胞から腫瘍生着が可能であることを示したが、その一方で表面マーカーの不均一性が CSC 成分内でもみられると指摘している^{23, 24)}。

2. Side Population

CSC は多剤耐性遺伝子 (MDR1)、多剤耐性タンパク質 (MRP)、ABCG2 といった様々な ABC トランスポーターを発現し薬剤排出能および薬物耐性能を獲得している。とくに ABCG2 は蛍光色素排出能とリンクしており、細胞を Hoechst33342 染色することで、非標識集団 (side population, SP) と標識集団 (main population, MP) に分離し、前者を CSC として単離が可能である^{25, 26)}。この手法では、脳腫瘍、消化器がん、肝がん、甲状腺がん、頭頸部がん、肺がん、および骨軟部腫瘍で CSC 形質を有する細胞集団の単離が報告されており、機能的側面に基づいた検出法であるため比較的がん種に依存しない CSC 同定が可能と考えられる²⁷⁻³³⁾。

3. ALDEFLUOR

乳腺の正常上皮および CSC では ALDH1 酵素活性の上昇がみられ、Ginestier らは乳がん CSC が ALDH1 酵素陽性細胞として単離できることを報告した³⁴⁾。また既存の乳がん CSC マーカーによる CD44^{high}/CD24^{low} 細胞集団のうち ALDH1⁺ 群が高い造腫瘍能を示した。これは上記手法を組み合わせた効率的な CSC 単離の可能性を示唆している。この手法の有効性は、大腸がん、前立腺がん、頭頸部がん、膵がんでも報告されている³⁵⁻³⁷⁾。

4. Sphere Formation

1996 年に Reynolds らは EGF と bFGF を添加した無血清培地と低接着プレートによる培養で、正常神

経幹細胞の単離が可能であると報告した³⁸⁾。分化細胞と比較すると、幹細胞は足場となる細胞外マトリックス接着に依存せずに細胞恒常性と生存・増殖を維持できる。そのため培養過程で幹細胞成分のみが球状 (sphere) のコロニーを形成し残っていく。この手法を用いた乳がん細胞の CSC 分離とマイクロチャンバーを用いたハイスループット手法が報告されている^{39, 40)}。

5. CSC と non-CSC 細胞株の樹立

CSC と non-CSC 間で比較可能な細胞株モデルの作成が可能である。著者らはヒト大腸がん細胞株 SW480 を side population 法で解析し、SP および MP 分画それぞれをセルソーターで単細胞分離することで SW480-SP および SW480-MP クローン株を樹立した⁴¹⁾。SW480-SP 株は通常培地で継代すると non-CSC 成分への分化が認められるが、常に一定の割合で CSC 成分が含まれている。一方で SW480-MP 株には継代後も CSC 成分が認められない。SW480-SP は化学療法剤に抵抗性を示し、さらには免疫不全マウスへの移植で高い造腫瘍能が認められた (図 2)。このモデルを用いて後述の ASB4 がん幹細胞抗原が同定されている。

がん幹細胞抗原の同定

著者らの研究室ではこれまで 30 年以上に渡り一貫して臨床応用への橋渡しとなるがん抗原の同定に注力してきた。近年ではがん幹細胞に着目し、すでに CTL 免疫治療標的となり得るがん幹細胞抗原を見いだしている (表 2)⁴²⁻⁴⁴⁾。以下に挙げる抗原はいずれも前述の CSC 単離法を駆使して同定した、CSC を狙い撃ちするがん幹細胞特異抗原である。これらは日本人に多い HLA-A24 または HLA-A2 結合型の抗原ペプチドであり、ペプチドワクチンとして低コストで幅広く普及可能な投与形態での臨床応用を目指している。いずれも精巣以外の正常組織には発現がみられず、また免疫原性が高くヒト末梢血より腫瘍傷害性を有する CTL が誘導可能である。

1. DNAJB8

DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 8 (DNAJB8) は著者らの研究室で同定したがん精巣 (cancer-testis, CT) 抗原タイプのがん幹細胞抗原である。DNAJB8 遺伝子は精巣以外の正常組織では発現せず、その一方で腎がん、大腸がん、肺がん、乳

図2 ヒト大腸がん細胞株 SW480-SP クローン (SP-H, SP-A, SP-B) および MP クローン (MP-B, MP-D, MP-K) の幹細胞性 (A) 造腫瘍能. それぞれのクローン 1×10^3 個を NOD/SCID マウスに皮下注射し腫瘍径を測定した. (B) 化学療法耐性. それぞれのクローンを cisplatin または docetaxel 存在下で 3 日間培養し, 生存する細胞数割合を WST-8 試薬で計測した. SD 値と t 検定による p 値 (* $p < 0.05$) を示す.

文献 40 より改変.

表2 札幌医大病理学第一講座で同定したがん幹細胞抗原

抗原	HLA 拘束性	主な対象	抗原同定法	特異的 CTL による腫瘍傷害		幹細胞性機能		文献
				in vitro (cytotoxicity)	in vivo (xenograft model)	Sphere 形成能	造腫瘍能	
DNAJB8	HLA-A24	大腸がん	reverse immunology	+	+	+	+	45, 46
OR7C1	HLA-A24	大腸がん	reverse immunology	+	+	+	+	47
BORIS	HLA-A02	子宮頸がん	reverse immunology	+	+	+	+	49
ASB4	HLA-A24	大腸がん	HLA リガンドーム解析	+	+	ND	ND	未

がんなど幅広いがん組織に発現する. ヒト腎がん細胞株 ACHN を side population 法により分離したところ, SP 細胞は MP と比べて高い DNAJB8 タンパクを発現していた. さらに DNAJB8 を過剰発現させると SP 割合が増加し, in vivo での造腫瘍能が高まるが, 逆に遺伝子発現を抑えると造腫瘍能が低下する. 即ち, DNAJB8 分子はがん幹細胞性と機能的にリンクしている⁴⁵⁾. 同様の結果は大腸がん細胞株でも観察され, さらにはリバーシムノロジー法により HLA-A24 に提示される CTL エピトープが同定された⁴⁶⁾. NetMHC などのアルゴリズムを用い任意分子のアミノ酸配列における HLA 結合部位を in silico で予測し, 続いてその抗原性を合成ペプチドなどで検証する一連の手法がリバーシムノロジーである. この DNAJB8 エピトープで誘導した CTL は in vitro で大腸がん細胞株 HT29 の SP 成分を優先的に傷害し, かつ in vivo モデルマウスに移植した HT29 の増殖を抑制した.

2. OR7C1

ヒト大腸がん細胞株 SW480 の SP および MP 細胞を cDNA マイクロアレイで遺伝子発現比較し, SP

細胞に特異発現する遺伝子 olfactory receptor family 7 subfamily C member 1 (OR7C1) を同定した⁴⁷⁾. OR7C1 は精巣以外の正常組織で発現がみられないが, SW480 に加えて HT29, HCT15 といった複数の大腸がん細胞株 SP 成分に発現がみられる. SW480 細胞における OR7C1 遺伝子過剰発現および発現抑制は in vivo での腫瘍増殖能をそれぞれ増強および低下する. さらに大腸がん患者がん組織での OR7C1 タンパク発現は患者予後と負に相関した. OR7C1 分子はがん幹細胞性を維持するために必要と考えられ, 同時に大腸がん幹細胞のマーカーとなりうる.

著者らはリバーシムノロジー法を用いて OR7C1 にコードされる HLA-A24 ペプチド群を予測し, 大腸がん患者末梢血で最も免疫原性の高かった CTL エピトープ配列を同定した. このペプチドで誘導した CTL は複数的大腸がん細胞株で SP 成分を優先的に認識しかつ傷害する (図 3 A).

3. BORIS

Brother of the regulator of the imprinted site (BORIS) は正常組織では精巣にのみ発現する CT 抗原とし

て知られており、食道がん患者血清中の IgG 反応が報告されている⁴⁸⁾。著者らが子宮頸がん細胞株 CaSki を sphere 培養し cDNA マイクロアレイ解析比較を行ったところ、sphere 形成した細胞集団から BORIS 遺伝子が検出できた。さらに 23 種類存在する BORIS mRNA isoform のなかから BORIS sf6 が sphere 形成能および CSC 機能と関連することを見いだした。続いてリバースイムノロジー法により BORIS sf6 に特異的な HLA-A2 拘束性ペプチド配列を予測し、その抗原性を確認した。誘導した CTL は BORIS sf6 過剰発現した CaSki 細胞を傷害し、さらに CaSki 細胞の sphere 形成を阻害する⁴⁹⁾。

4. ASB4

マスマスプロトメトリー技術進歩に伴い、近年では抗原ペプチド同定法として HLA リガンドーム解析が用いられる。解析には大量の細胞数を必要とするが、がん細胞 HLA に提示されたナチュラルペプチド群をダイレクトに検出でき、網羅的な解析が可能という大きなアドバンテージがある。同法は従来型エピトープだけではなくとくにネオアンチゲン探索に威力を発揮すると見込まれる⁵⁰⁾。著者らは HLA-A24 リガンドーム解析により、前述の CSC 細胞株 SW480-SP および non-CSC 細胞株 SW480-MP 間の比較から、SW480-SP にのみ提示されるペプチド IV9 を同定した。同ペプチドをコードする Ankyrin Repeat And SOCS Box Containing 4 (ASB4) 遺伝子はやはり SW480-SP に特異発現し、大腸がん患者組織においても約 40% に発現が検出される。その一方で正常臓器では胎児組織も含めて発現がみられない。IV9 ペプチドで誘導した CTL は SW480-SP を特異的に傷害し、また (SP および MP に分離していない) SW480 を移植した in vivo モデルマウスの腫瘍増殖を強く抑制する。HLA リガンドーム解析から得られたペプチドはがん細胞表面に一定量提示されるナチュラルプロダクトであり、ASB4 は魅力的ながん幹細胞の CTL 治療標的抗原と考えられる (論文準備中)。

5. 正常組織に共発現するがん幹細胞抗原

上記以外にも T 細胞標的となるがん幹細胞抗原が複数同定されている。iPS 細胞誘導転写因子のひとつ OCT3/4 は胚細胞腫瘍での発現が知られているが、患者血液から OCT3/4 反応性 T 細胞の誘導が可能である⁵¹⁾。また同様に、転写因子 SOX2 は非小細胞肺

癌および食道癌で増幅する癌原遺伝子としても知られるが、非小細胞肺癌患者血液から SOX2 特異的な CD8⁺ および CD4⁺T 細胞反応が検出された^{52, 53)}。さらに ALDH1A1 特異的な CTL が誘導可能であり、これらはヒト頭頸部がん細胞株の ALDH⁺ 濃縮成分を認識する。同がん細胞株を移植した in vivo マウスモデルに CTL 輸注すると腫瘍増殖が抑制された³⁷⁾。以上はいずれもがん幹細胞に対する抗腫瘍 T 細胞免疫監視の存在を強く裏付けている。しかしながら、これらのがん幹細胞抗原は正常組織の一部、とくに正常幹細胞に共発現することが知られており、治療標的としての課題は残る。

がん幹細胞を特異標的とした CTL 免疫治療

がん幹細胞抗原はその発現パターンにより、(1) CSC 優位に発現が見られるもの (特異抗原)、(2) CSC および non-CSC の両者に発現がみられるもの (共通抗原)、の 2 群に分類できる。これまで数多くのがん抗原が同定されてきたが、そのなかには後者の共通抗原カテゴリーに分類可能なものが少なからず存在すると見込まれる。例えば既知のがん抗原 MUC1 はその後の解析で MCF7 乳がん細胞株の MP 成分だけではなく SP 成分にも発現する共通抗原タイプのがん幹細胞抗原であることがわかった⁵⁴⁾。一方で著者らは前者の特異抗原の同定を目指してきた。はたして、特異抗原と共通抗原、どちらが免疫標的として優れているのだろうか？

SW480 の SP 成分を移植した in vivo モデルマウスに OR7C1 と CEP55 抗原それぞれ特異的な CTL を輸注し、腫瘍退縮効果を比較したところ、いずれも腫瘍増殖を抑制したが、とくに OR7C1 特異的 CTL で強い効果が確認された (図 3 B)。OR7C1 が SP 細胞優位な特異抗原であるのに対し、CEP55 は SP/MP 両成分に等しく発現する共通抗原である^{47, 55)}。また、マウス腎がん細胞株 Renca 移植した同系マウスに DNAJB8 または Survivin をコードする DNA ワクチンで免疫したところ、前者でより強い腫瘍増殖抑制がみられた。Renca 株において DNAJB8 は SP 特異抗原であり、survivin は共通抗原である^{45, 56)}。これら実験モデルの結果はいずれもがん幹細胞特異抗原に向けた強い抗腫瘍 CTL 効果を示している。クリニカルステージにおいて患者 T 細胞の誘導を想定すると、特異 CTL クローンの誘導可能範囲は最大でも 10⁷ オーダーと見込まれるため、CTL 標的を分散せず CSC 成分に絞り込むことで高い E/T 比が

図3 OR7C1 特異的 CTL によるがん幹細胞傷害性

(A) 3 種類の大腸がん細胞株を SP および MP 成分に分離し、 ^{51}Cr 放出アッセイにて CTL 傷害性を測定した。(B) SW480-SP 成分を NOD/SCID マウスに皮下注射した後、OR7C1 および CEP55 特異的 CTL を輸注し腫瘍径を計測した。SD 値と t 検定による p 値 (* $p < 0.05$) を示す。

文献 46 より改変。

担保できるメリットがある。また、CSC 特異抗原は何らかのかたちでがん幹細胞性機能とリンクしている可能性が高く、immunoediting の対象となりにくいことから、抗原のロス、即ちがんの免疫エスケープが生じにくいと考えられる。

おわりに

がん幹細胞抗原同定と CTL 応答検証を通して以下の知見が得られた。1) がん幹細胞に特異的な抗原が存在し、がん幹細胞を特異標的とした CTL が誘導可能である。2) がん細胞中に占める割合がごくわずかながん幹細胞成分を標的とすることにより、in vivo モデル腫瘍の効果的な増殖抑制がおこる。

即ち、がん幹細胞抗原を標的とした免疫治療は腫瘍特異性や抗原性といった従来型ペプチドワクチンの性質を備え持ち、かつ腫瘍の根幹部を標的とする次世代型ワクチンとして期待できる。ここでは正常成人組織のみならず胎児組織および正常幹細胞に発現のないがん幹細胞抗原の選択も副作用回避の観点から重要である。同定したがん幹細胞抗原はペプチドワクチンとして間もなく臨床試験ステージを迎えるが、安全性をはじめ、患者再発あるいは転移の予防効果が実際にみられるであろうか。同時にアジュバントの選択や免疫チェックポイント阻害剤との併用など投与法の最適化も今後の重要な課題である。基礎研究結果が臨床試験でどのように反映されるか、今後の進捗が待たれる。

文 献

- 1) Wolchok, J.D.: PD-1 Blockers. *Cell*. **162**: 937, 2015.
- 2) Schreiber, R.D., et al.: Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. **331**: 1565–1570, 2011.
- 3) Verdegaal, E.M., et al.: Neoantigen landscape dynamics during human melanoma-T cell interactions. *Nature*. **536**: 91–95, 2016.
- 4) Hanahan, D., Weinberg, R.A.: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. **144**: 646–674, 2011.
- 5) Visvader, J.E., Lindeman, G.J.: Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. **8**: 755–768, 2008.
- 6) Lobo, N.A., et al.: The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **23**: 675–699, 2007.
- 7) Lapidot, T., et al.: A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. **367**: 645–648, 1994.
- 8) Al-Hajj, M., et al.: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**: 3983–3988, 2003.
- 9) Singh, S.K., et al.: Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. **63**: 5821–5828, 2003.
- 10) Hubbard, S.A., et al.: Evidence for cancer stem cells in human endometrial carcinoma. *Cancer Res*. **69**: 8241–8248, 2009.
- 11) Li, C., et al.: Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*. **67**: 1030–1037, 2007.

- 12) Richardson, G.D., et al.: CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci.* **117**: 3539–3545, 2004.
- 13) Ricci-Vitiani, L., et al.: Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* **445**: 111–115, 2007.
- 14) Prince, M.E., et al.: Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**: 973–978, 2007.
- 15) Clevers, H.: The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med.* **17**: 313–319, 2011.
- 16) Bao, S., et al.: Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* **444**: 756–760, 2006.
- 17) Li, X., et al.: Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* **100**: 672–679, 2008.
- 18) Diehn, M., et al.: Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature.* **458**: 780–783, 2009.
- 19) Oravec-Wilson, K.I., et al.: Persistence of leukemia-initiating cells in a conditional knockin model of an imatinib-responsive myeloproliferative disorder. *Cancer Cell.* **16**: 137–148, 2009.
- 20) Hermann, P.C., et al.: Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell.* **1**: 313–323, 2007.
- 21) Balic, M., et al.: Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res.* **12**: 5615–5621, 2006.
- 22) O'Brien, C.A., et al.: A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* **445**: 106–110, 2007.
- 23) Quintana, E., et al.: Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature.* **456**: 593–598, 2008.
- 24) Quintana, E., et al.: Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell.* **18**: 510–523, 2010.
- 25) Goodell, M.A., et al.: Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med.* **183**: 1797–1806, 1996.
- 26) Zhou, S., et al.: The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med.* **7**: 1028–1034, 2001.
- 27) Kondo, T., et al.: Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 781–786, 2004.
- 28) Haraguchi, N., et al.: Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells.* **24**: 506–513, 2006.
- 29) Chiba, T., et al.: Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology.* **44**: 240–251, 2006.
- 30) Mitsutake, N., et al.: Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively. *Endocrinology.* **148**: 1797–1803, 2007.
- 31) Wang, J., et al.: Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Cancer Res.* **67**: 3716–3724, 2007.
- 32) Ho, M.M., et al.: Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res.* **67**: 4827–4833, 2007.
- 33) Murase, M., et al.: Side population cells have the characteristics of cancer stem-like cells/cancer-initiating cells in bone sarcomas. *Br J Cancer.* **101**: 1425–1432, 2009.
- 34) Ginestier, C., et al.: ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* **1**: 555–567, 2007.
- 35) Huang, E.H., et al.: Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res.* **69**: 3382–3389, 2009.
- 36) Burger, P.E., et al.: High aldehyde dehydrogenase activity: a novel functional marker of murine prostate stem/progenitor cells. *Stem Cells.* **27**: 2220–2228, 2009.
- 37) Visus, C., et al.: Targeting ALDH (bright) human carcinoma-initiating cells with ALDH1A1-specific CD8(+) T cells. *Clin Cancer Res.* **17**: 6174–6184, 2011.
- 38) Reynolds, B.A., Weiss, S.: Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol.* **175**: 1–13, 1996.
- 39) Dontu, G., Wicha, M.S.: Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* **10**: 75–86, 2005.
- 40) Chen, Y.C., et al.: High-Throughput Single-Cell Derived Sphere Formation for Cancer Stem-Like Cell Identification and Analysis. *Sci Rep.* **6**: 27301,

- 2016.
- 41) Takaya, A., et al.: Establishment and Analysis of Cancer Stem-Like and Non-Cancer Stem-Like Clone Cells from the Human Colon Cancer Cell Line SW480. *PLoS One*. **11**: e0158903, 2016.
- 42) 鳥越俊彦, 他: がんワクチン創薬への道程—がん抗原の同定から臨床試験まで—. 日本臨床免疫学会会誌. **37**: 90–95, 2014.
- 43) Hirohashi, Y., et al.: Immune responses to human cancer stem-like cells/cancer-initiating cells. *Cancer Sci*. **107**: 12–17, 2016.
- 44) Hirohashi, Y., et al.: Cytotoxic T lymphocytes: Sniping cancer stem cells. *Oncoimmunology*. **1**: 123–125, 2012.
- 45) Nishizawa, S., et al.: HSP DNAJB8 Controls Tumor-Initiating Ability in Renal Cancer Stem-like Cells. *Cancer Res*. 2012.
- 46) Morita, R., et al.: Heat shock protein DNAJB8 is a novel target for immunotherapy of colon cancer-initiating cells. *Cancer Sci*. **105**: 389–395, 2014.
- 47) Morita, R., et al.: Olfactory Receptor Family 7 Subfamily C Member 1 Is a Novel Marker of Colon Cancer-Initiating Cells and Is a Potent Target of Immunotherapy. *Clin Cancer Res*. **22**: 3298–3309, 2016.
- 48) Okabayashi, K., et al.: Cancer-testis antigen BORIS is a novel prognostic marker for patients with esophageal cancer. *Cancer Sci*. **103**: 1617–1624, 2012.
- 49) Asano, T., et al.: Brother of the regulator of the imprinted site (BORIS) variant subfamily 6 is involved in cervical cancer stemness and can be a target of immunotherapy. *Oncotarget*. **7**: 11223–11237, 2016.
- 50) Yadav, M., et al.: Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature*. **515**: 572–576, 2014.
- 51) Dhodapkar, K.M., et al.: Natural immunity to pluripotency antigen OCT4 in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**: 8718–8723, 2010.
- 52) Bass, A.J., et al.: SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat Genet*. **41**: 1238–1242, 2009.
- 53) Dhodapkar, K.M., et al.: SOX2-specific adaptive immunity and response to immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*. **2**: e25205, 2013.
- 54) Engelmann, K., et al.: MCF7 side population cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the tumor antigen MUC1. *Cancer Res*. **68**: 2419–2426, 2008.
- 55) Inoda, S., et al.: Cytotoxic T lymphocytes efficiently recognize human colon cancer stem-like cells. *Am J Pathol*. **178**: 1805–1813, 2011.
- 56) Hirohashi, Y., et al.: An HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope of a tumor-associated protein, survivin. *Clin Cancer Res*. **8**: 1731–1739, 2002.
- 57) Bonnet, D., Dick, J.E.: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. **3**: 730–737, 1997.
- 58) Hope, K.J., et al.: Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol*. **5**: 738–743, 2004.
- 59) Singh, S.K., et al.: Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. **432**: 396–401, 2004.
- 60) Hemmati, H.D., et al.: Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**: 15178–15183, 2003.
- 61) Fang, D., et al.: A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer research*. **65**: 9328–9337, 2005.
- 62) Schatton, T., et al.: Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*. **451**: 345–349, 2008.
- 63) Dalerba, P., et al.: Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**: 10158–10163, 2007.
- 64) Ho, M.M., et al.: Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res*. **67**: 4827–4833, 2007.
- 65) Eramo, A., et al.: Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell death and differentiation*. **15**: 504–514, 2008.
- 66) Gibbs, C.P., et al.: Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia*. **7**: 967–976, 2005.
- 67) Ma, S., et al.: Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology*. **132**: 2542–2556, 2007.
- 68) Yang, Z.F., et al.: Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell*. **13**: 153–166, 2008.
- 69) Ebben, J.D., et al.: The cancer stem cell paradigm: a new understanding of tumor development and treatment. *Expert Opin Ther Targets*. **14**: 621–632, 2010.