

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14584

研究課題名(和文) イヌSurvivin抗原を利用したペプチドワクチン療法に関する基礎的研究

研究課題名(英文) a basic study of peptide vaccine treatment using canine Survivin antigen

研究代表者

山下 真路 (YAMASHITA, Masamichi)

鳥取大学・農学部・特命助教

研究者番号：60813409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：イヌの癌細胞株及び自然発症癌の腫瘍組織におけるSurvivinの遺伝子発現を確認した。また、イヌのペプチドワクチン開発に向けて、遺伝子のサブクローニング及びDNAシーケンス技術を用いて、イヌのMHCclass のDLA-88遺伝子ハプロタイプを判別する手技を確立した。さらに、DLA-88novel41において提示されるSurvivinのペプチド領域を断定するためのELISpot assay手技の確立のためにポジティブコントロールとなりえる狂犬病タンパクに対するTリンパ球活性を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで犬の癌免疫の基礎研究はあまり行われておらず、特にMHCclass に関連する遺伝子解析、提示されるペプチドエピトープ解析は進んでいない。人の癌免疫治療で近年注目されているオプジーボなどの薬剤は、免疫暴走を防ぐ機能である免疫寛容機構を一時的にブロックすることにより癌に対する免疫効果を高めるためのものである。一方で、そもそもの癌に対する免疫獲得機構は重要であり、本研究における各種実験手技の確立は今後の獣医学分野における癌免疫研究の発展に重要である。

研究成果の概要(英文)：The gene expression of Survivin was confirmed in canine cancer cell lines and tumor tissues of spontaneous cancers. In addition, a technique to identify the haplotype of DLA-88 (MHC class) was established using gene subcloning and DNA sequencing techniques for canine peptide vaccines. Furthermore, it was confirmed that T lymphocyte activity against rabies protein, which can serve as a positive control for the establishment of the ELISpot assay technique to determine the peptide region of Survivin presented in DLA-88novel41.

研究分野：癌免疫学

キーワード：犬 Survivn 癌ワクチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小動物の腫瘍疾患に対しては一般的に外科的治療、薬物療法、放射線療法による治療が行われている。各癌腫によって、これらの治療の有効性がそれぞれ示されているが、一部の癌腫において一般的な治療の効果がない難治性の癌腫も存在する。そのため、難治性の癌に対して有効的な新規治療法の開発が求められている。癌免疫療法は腫瘍関連抗原 (Tumor associated antigen: TAA) に対する免疫を誘導させ、癌細胞への生体免疫力を高める治療法である。免疫療法において生体に感作させた抗原は、樹状細胞などの免疫提示細胞に取り込まれ、プロテアソームにより分解される。分解されたペプチドは小胞体内に移行した後、さらに短く切断されて MHC class II と共に細胞膜上に提示され、適合するリンパ球を活性化させる。このように、取り込まれたタンパク質が MHC class II と共に提示されるには、複数の機構におけるアミノ酸配列の切断を必要とする。この過程を省略し、抗原が効率的に提示されるために、MHC class II と共に提示されるアミノ酸配列のペプチドを免疫に使用しているのがペプチドワクチン療法である。これまでにヒトの腫瘍研究においてペプチドワクチンを利用した治験が行われ、一定の効果が認められており、小動物分野においてもペプチドワクチン療法の臨床応用が期待される。

Survivin 抗原は人の多種類の腫瘍疾患において高発現が認められる遺伝子である一方で、正常な細胞では発現の乏しい遺伝子である (Cancer Cell Int 16:49 2016)。これまでにヒトとイヌの自然発症悪性腫瘍において Survivin の高発現が報告されており、癌治療の標的遺伝子として注目されている (J Vet Med Sci 76(11):1505-12 2014, Asian Pac J Cancer Prev 16(15):6187-91 2015)。これまでに複数のグループが Survivin ペプチドワクチンを用いた臨床治験を行っており、成果を報告している (Clin Dev Immunol 262967 2013, Cancer Immunol Immunother 65(11): 1339-52 2016)。

2. 研究の目的

ヒトの癌免疫療法では難治性の癌において、TAA を標的とした特異的な治療を行うことで、良好な結果が得られると報告されている (Curr Opin Immunol 47: 57-63 2017)。一方で、これまでの小動物分野における免疫療法は NK 細胞の活性化や抗原的特異性のない癌組織による生体への免疫や樹状細胞への感作であり、その治療効果は限定的である (Vet J 207: 20-28 2016)。TAA 特異的な癌免疫療法は難治性のイヌの癌に対する有効な治療法となる可能性が高いと考えられる。本研究では Survivin ペプチドワクチン療法の臨床応用のために、DLA と共に提示される Survivin 抗原ペプチドのアミノ酸配列を決定する。さらに、決定されたアミノ酸配列ペプチドによって感作されたイヌの CTL に癌細胞への傷害性が存在するかを確認することを目的とする。決定されたペプチドによって感作された CTL に癌細胞への傷害性が存在することが確認されることで、これまでの非特異的な免疫治療や免疫チェックポイント阻害薬などの作用を In vitro や ex-vivo の実験系で確認することが可能となり、免疫賦活療法の基礎実験や、実際に臨床研究に応用した際の生体内の免疫状態を確認することが可能となり、イヌの癌免疫療法の研究へ大きく貢献することが予想される。

3. 研究の方法

(1) イヌ MHC class II ハプロタイプの同定手技の確立

候補となるビーグル犬 9 匹から全血を採取し、Lymphoprep (コスモバイオ) を使用して PBMC を分離採取した。採取した PBMC から TRIzol (Invitrogen) を用いて RNA を抽出した。RNA を PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ) を用いて逆転写し cDNA を作製した。cDNA をテンプレートとし、DLA-88 を含むシングルストランド DNA を特定のプライマーと TaKaRa Taq™ (タカラバイオ) を用いた PCR にて作製した (Immunogenetics 70: 237-255 2018)。作製したシングルストランド DNA を TOPO® TA Cloning® Kit for Subcloning (Invitrogen) を用いてサブクローニングし、再び PCR にて DNA を増幅したテンプレートを DNA シークエンスにて DNA 配列の特定を行った。

(2) イヌリンパ球を使用した ELISpot assay 手技の確立

陽性コントロールの検討 1 (薬剤によるリンパ球の活性化)

ビーグル犬から末梢血を 10ml 採取した。Lymphoprep (コスモバイオ) を使用して PBMC を分離し、FBS 10%、PSN 1% を添加した AIM-V 培地で培養した。培地に対して PMA 及び Ionomycin を添加し、4 時間インキュベートした。インキュベートした細胞を 5×10^5 /ml に調整し、100 μ l/well を Canine INF- γ ELISpot kit にアプライした。Overnight 後に ELISpot assay を実施し、スポットを定量した。

樹状細胞の誘導

ビーグル犬から末梢血を 10ml 採取した。Lymphoprep (コスモバイオ) を使用して PBMC を分離し、FBS 10%、PSN 1%、GM-CSF、IL-4 を添加した RPMI 培地で培養した。3 日に 1 回ハーフメディアウムチェンジを行った。3 日、5 日、7 日後に CD11c、IgG1、human HLA-DR、human CD14 の抗体を用い樹状細胞分画の割合を確認した。

陽性コントロール2（狂犬病タンパクによるリンパ球の活性化）

1年に1回狂犬病タンパクによるワクチネーションを受けているビーグル犬から末梢血を50ml採取した。Lymphoprep（コスモバイオ）を使用してPBMCを分離し、FBS 10%、PSN 1%を添加したAIM-V培地で培養した。培養液へ狂犬病タンパクと同じ犬から採取し樹状細胞へ誘導した細胞を添加し、48時間後にIL-2を添加した。その後、3日に1回ハーフメディウムチェンジを行った。培養12日にIL-2を添加していない培地でハーフメディウムチェンジを行い、IL-2濃度を低下させた。培養14日に再び狂犬病タンパク及び誘導した樹状細胞を添加し、2時間インキュベートを行った。インキュベート後PBSで細胞をwashし、ELISpot kitへアプライし、overnightを行った。その後、ELISpot assayを実施し、スポットを定量した。

4. 研究成果

(1) イヌ MHCclass ハプロタイプの同定手技の確立

上記方法により、ビーグル犬のDLAはプロタイプの同定が可能となり、候補となるビーグル犬のうち5頭が novel41 のホモであることが確認された（表1）。このことから本研究での標的DLAをDLA-88 novel41と定めることができた。

表1. 候補犬のDLA-88ハプロタイプ

Dog	DLA-88-1	DLA-88-2
1	novel41	012:02
2	novel41	novel41
3	novel41	novel41
4	novel41	012:01
5	novel41	novel41
6	novel41	novel41
7	novel41	012:02
8	novel41	novel41
9	novel2	novel19

(2) イヌリンパ球を使用したELISpot assay手技の確立

陽性コントロールの検討1（薬剤によるリンパ球の活性化）

上記方法により、培養PBMCからINF- γ が放出されたことが感知された（図1）。また、検出されたスポットは定量不可能なレベルで強く認められ、陽性コントロールとして適切であることが確認された。

樹状細胞の誘導

上記方法で培養することによって、樹状細胞分画の増加を確認することができた（図2）。また、培養後5日、7日で最も樹状細胞分画の細胞が増加することが確認された。このことから、ELISpot assay前の細胞処理では樹状細胞誘導7日目の細胞を使用することが適切と考えられた。

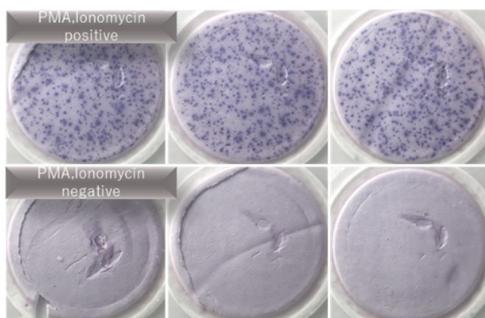


図1. PMA, Ionomycin 添加 PBMC の ELISpot assay

陽性コントロール2（狂犬病タンパクによるリンパ球の活性化）

上記方法により、狂犬病タンパクで免疫賦活を行った犬のPBMCがINF γ を放出し、活性化したことを確認した。本実験手技の確率は癌に対するペプチドワクチン作製のためのものであるが、これまでに犬の狂犬病に対する特異的な細胞性免疫を確認した報告はなく、癌免疫のみならず、狂犬病の免疫学的な研究への発展にもつながるものと考えられる。

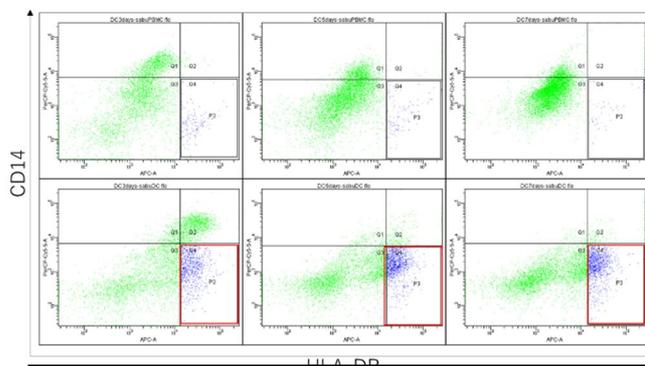


図2. 誘導樹状細胞をフローサイトメトリーにて確認

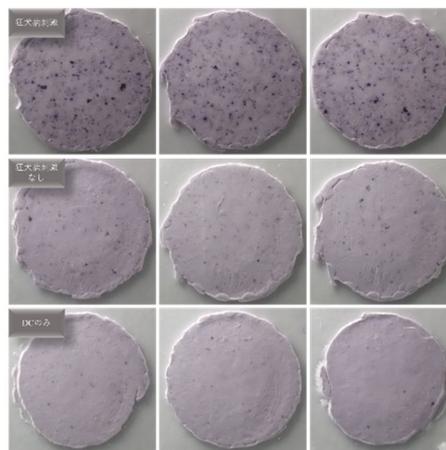


図3. 狂犬病タンパク刺激による ELISpot assay

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山下真路
2. 発表標題 クロスプレゼンテーションによる癌ワクチンのメカニズムとペプチドワクチン
3. 学会等名 第3回獣医がん分子生物学研究会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------