

機関番号：37104

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19791178

研究課題名（和文） 卵巣癌に対する polysomal RNA vaccine の開発

研究課題名（英文） The development of the polysomal RNA vaccine to the ovarian cancer

研究代表者 津田 尚武 (TSUDA NAOTAKE)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：60341351

研究成果の概要（和文）：我々の研究は、卵巣癌由来 polysomal RNA（RNA peptide 複合体）を用いた既存の癌ワクチンと異なる、全く新しい癌ワクチン療法の開発を目的とする。さらに paclitaxel による polysomal RNA の免疫、分子修飾効果を検討し、より強力な細胞傷害性 T リンパ球(CTL), Natural Killer cell(NK cell)誘導能をもつ RNA peptide 複合体の開発を研究目的とする

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research is to develop the new cancer vaccine with polysomal RNA(the complex of RNA and peptide). Furthermore, we would like to show the induction of the CTL and Natural Killer Cell by polysomal RNA which is pre-treated with the low dose paclitaxel.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
総 計	3,300,000	600,000	3,900,000

研究分野：婦人科腫瘍、腫瘍免疫

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：RNA、癌ワクチン

1. 研究開始当初の背景

現在までに癌免疫療法において、ペプチドワクチン、もしくは mRNA, totalRNA, apoptotic tumor cell と樹状細胞の fusion を用いた研究報告はなされてきた。しかし、それぞれに種々の問題点を抱えている。ペプチドは癌細胞表面に発現する MHC-classI 分子上に結合して初めて、CD8陽性細胞が TCR を介して認識するため、あくまで MHC-classI 拘束性である。しかし癌種によ

っては、classI 分子の発現が欠損しているとの報告も多数なされている。これらの HLA が欠損している癌患者においてはペプチドワクチン療法の臨床効果は望めない。

一方、RNA ワクチンにおいては樹状細胞に取り込まれた RNA が一旦、その細胞内で蛋白に翻訳されてからペプチド断片となり、抗原提示されるため、mRNA ではその構造的脆弱性、total RNA ではその中の 5 %にしか満たない mRNA の含有量から来る不十分な CTL 誘導能が報告されている。

しかし、RNA ワクチンの利点として CD8 陽性細胞のみならず、CD4, NK cell の活性化の報告もなされている。polysomal RNA は mRNA, ribosomal RNA のみならず、polypeptide を同時に有しているため、RNA ワクチンの利点に加え、ペプチドワクチンの利点も有している。現在までに世界でこの Polysomal RNA を使用した癌ワクチンの報告はない。この点でも我々の研究は非常に独創的といえる。

2. 研究の目的

我々の研究は、卵巣癌細胞株から ribosomal RNA, mRNA, peptide の複合体である polysomal RNA を抽出後に樹状細胞を刺激し、既存の癌ペプチドワクチンと異なる抗原性を持つ、全く新しい RNA+peptide 癌ワクチン療法の開発を目的とする。また、polysomal RNA ヘユビキチン誘導効果のある paclitaxel の添加することで、その分子修飾効果により、更に強力な細胞傷害性 T リンパ球、そして Natural Killer cell が誘導可能か否かを検討する。これらにより mRNA ワクチン療法と peptide ワクチン療法の両者の抗腫瘍免疫効果を持つ新規癌ワクチン療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 卵巣癌細胞より、シヨ糖濃度勾配を用いて monosomal, disomal, polysomal RNA を超高速遠心機にて 18 分画する。その後、ribosome の結合数に応じて 4 分画に分け各分画を精製する。

(2) ウェスタンブロット法にて各分画の蛋白発現プロファイルを明らかにする。

(3) HER-2/neu ペプチド特異的 CD8 陽性 T リンパ球が monosomal, disomal, polysomal RNA 刺激群にて誘導されるか否かを HER-2/neu ペプチド + dimmer 複合体、抗 CD8 抗体、抗 IFN- γ 抗体を用いて検討する。

(4) また各分画と Tcell 共培養後の上清中の IL-12 の産生を ELISA 法を用いて検討する。

(5) 低容量 (1nM)、中濃度 (10nM) 高濃度 (100nM) の Paclitaxel と樹状細胞、リンパ球を共培養し、その細胞数と CD83, HLA-DR 等樹状細胞の成熟マーカー発現の増減を検討する。

(6) paclitaxel の免疫修飾能を用いたより強力な Polysomal RNA の開発を目指す。低容量 (1nM)、中濃度 (10nM) 高濃度 (100nM)

paclitaxel を用いて卵巣癌細胞株を 12 時間処理し、PI Annexin 染色で、apoptotic cell の発現を flowcytometry にて測定する。

(7) paclitaxel 処理後に、SK-OV3 細胞株から polysomal RNA を分画、抽出する。

(8) monosomal, disomal, polysomal RNA 分画の polysomal RNA を用いて樹状細胞を刺激し、多群と比べて NK cell を誘導できるか否かを flowcytometry を用いて検討する。

(8) monosomal, disomal, polysomal RNA 分画の polysomal RNA を用いて樹状細胞を刺激し、SK-OV-3 細胞株を標的として細胞障害性試験 Cr51 release assay を行う。

(9) paclitaxel 処理後に抽出した monosomal, disomal, polysomal RNA 分画を用いて樹状細胞を刺激し、SK-OV-3 細胞株を標的として細胞障害性試験 Cr51 release assay を行う。

(10) polysomal RNA の樹状細胞における抗原認識に RNA, HSP、ユビキチンが関与しているか否かを検討するためにそれぞれの阻害剤である RNase, Geldanamycin, 抗 CD91 抗体、脱ユビキチン酵素を用いて blocking assay を行い、その主要経路を明らかにする。

(11) 卵巣がん再発組織を用いた polysomal RNA 分画の採取を行い、細胞株より抽出した polysomal RNA とその RNA の quality, CTL 誘導能を検討する。

4. 研究成果

(1) 卵巣癌細胞株 SK-OV3 の cell lysate を細胞質蛋白分画、核分画、ミトコンドリア分画をそれぞれ抽出した。

(2) 細胞質蛋白分画から更に、高速遠心により ribosome 分画を抽出し、その分画を、シヨ糖濃度勾配を利用し超遠心分離を施行し、Polysomal RNA 分画を抽出した。

(3) 抽出した polysomal RNA 分画は、その比重により更に light polysomal RNA, heavy polysomal RNA に分画した。

(4) 健常人末梢血 PBMC より、GM-CSF, IL-4 を用いて、immature DC (未熟樹状細胞) を作製し、HER2/neu 特異抗原 E75 ペプチド、SK-OV3 より抽出した Free protein, light polysomal RNA, Heavy polysomal RNA 分画と共培養した。

(5)その結果、light polysomal RNA, heavy polysomal RNA 群において ELISA 法にて最も高い IL-12 の産生が認められた。

(6)一方、比重の軽い light polysomal RNA fraction においては同様に ELISA 法にて IL-12 の産生を認めたが、heavy polysomal RNA fraction と比較してその産生能は軽度であった。

(7)同様の樹状細胞の各群の刺激にて、樹状細胞の成熟化能を刺激前後の CD83, HLA-DR の発現を検討した。light polysomal RNA, heavy polysomal RNA 群において発現増強が認められ、polysomal RNA による樹状細胞の成熟化能が確認された。

(8)heavy polysomal RNA 分画が、樹状細胞に刺激することにより、ELISA 法にて高い IFN-g 誘導効果が確認され、特に強い Her2-neu peptide E75 特異的 CD8 陽性 T 細胞誘導効果を E75+dimer を使用したフローサイトメーターによる assay により確認した。

(9)HER2-neu peptide E75 特異的 CD8 陽性 Tcell の誘導効果の高かった heavy polysomal RNA fraction を用いて、その刺激群と否刺激群にて細胞障害性試験 Cr51 release assay を施行した。結果、heavy polysomal RNA fraction 刺激群において、有意な細胞障害性を確認した。

(10)リンパ球、樹状細胞にユビキチン誘導効果のあるパクリタキセルを低濃度 (0.42nM)、中濃度 (4.2nM) 高濃度 (42nM) で添加したところ、4.2nM の濃度にて variability が保たれることが確認された。

(11)SK-OV-3 にパクリタキセルを添加して (4.2nM)polysomal RNA を抽出した。この polysomal RNA の未熟樹状細胞での認識メカニズムにユビキチンが関与しているか否かを検討するために、free protein 群, light polysomal RNA 群, heavy polysomal RNA 群を抽出し western blot 法を用いて、抗ユビキチン抗体にて染色したところ、heavy polysomal RNA 群において高いユビキチン化タンパクを認めた。

(12)次に、抗ユビキチン抗体 Iso-T により前処置をおこなったところ、heavy polysomal 分画におけるユビキチン化が阻害された。これにより、polysomal RNA 高比重分画における樹状細胞認識にユビキチン化が関与している可能性が示された。

(13) 卵巣がん再発組織を用いた

polysomal RNA 分画の採取を試みたが、細胞株と異なり、polysomal RNA の抽出効率が低い結果であった。組織よりの抽出過程において、RNA, protein の degradation が認められた。また polysomal RNA の凍結融解に伴っての RNA の変性の可能性も示唆された。

今後は polysomal RNA の癌組織からの抽出、保存方法に伴って、RNA 変性を防ぐ方法の開発が必要である。今後引き続いて卵巣がん再発後、化学療法前後での組織検体の polysomal RNA の組織からの再抽出を試みる。パクリタキセルによる polysomal RNA のユビキチン化、抗原性増強効果が今回確認された。卵巣がん化学療法の key drug であるパクリタキセルの少量分割投与による再発予防効果に、卵巣がん組織由来の polysomal RNA が樹状細胞により認識され E75 特異的 CTL が活性化し貢献している可能性が示唆される。今後は卵巣がん再発時に低濃度分割パクリタキセル投与を施行されている患者の投与前後の PBMC を使用して E75+dimer 法を使用して E75 特異的 CTL の頻度を測定していく予定である。

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7件)

①Matsueda S, Gao H, Efferson CL, Tsuda N, Ishiyama S, Li Y, Ioannides MG, Fisk B, Peoples GE, Ioannides CG, N-terminally LRMK-linked HER-2 peptides, AE-37 [p776(774-788)] and AE-47 [Ava-F7(776-788)], aid differentiation of E75-TCR+CD8+ cells to perforin-positive cells., Anticancer Research, 有, 29(7), 2009, 2427-2435

②Li Y, Matsueda S, Efferson CL, Tsuda N, Kawano K, Gao H, Peoples GE, Ioannides CG. Distinct patient responses to activation of T-cells by free HER-2, G89 (777-789) and protected LRMK-linked HER-2, {AE-39 [p776 (Ava-774-788)], AE-47 [(Ava-776-788)] and AE-37[p776 (774-788)]} peptides could lead to development of personalized cancer vaccines, Anticancer Research, 有, 2009, 29(1), 41-58.

③Takemoto S, Ushijima K, Kawano K, Yamaguchi T, Terada A, Fujiyoshi N, Nishio S, Tsuda N, Ijichi M, Kakuma T, Kage M, Hori D, Kamura T. Expression of

activated signal transducer and activator of transcription-3 predicts poor prognosis in cervical squamous-cell carcinoma. Br J Cancer.有, 2009, Sep 15;101(6):967-72.

④Li Y, Matsueda S, Efferson CL, Tsuda N, Kawano K, Gao H, Peoples GE, Ioannides CG. Distinct patient responses to activation of T-cells by free HER-2, G89 (777-789) and protected LRMK-linked HER-2, {AE-39 [p776 (Ava-774-788)], AE-47 [(Ava-776-788)] and AE-37[p776 (774-788)]} peptides could lead to development of personalized cancer vaccines. Anticancer Res. 有, 2009, Jan;29(1):41-58.

⑤Tsuda N, Mine T, Ioannides CG, Chang DZ. Synthetic microRNA targeting glioma-associated antigen-1 protein. Methods Mol Biol.有, 2009, 487:435-49.

⑥ Nishio S, Ushijima K, Tsuda N, Takemoto S, Kawano K, Yamaguchi T, Nishida N, Kakuma T, Tsuda H, Kasamatsu T, Sasajima Y, Kage M, Kuwano M, Kamura T. Cap43/NDRG1/Drg-1 is a molecular target for angiogenesis and a prognostic indicator in cervical adenocarcinoma. Cancer Lett. 有, 2008, Jun 8;264(1):36-43.

⑦Li Y, Ishiyama S, Matsueda S, Tsuda N, Ioannides CG, HER-2 peptides p776 and F7, N-terminal-linked with Ii-Key tetramer (LRMK) help the proliferation of E75-TCR+ cells: The dependency of help on the side chains of LRMK-extended peptide pointed towards the T cell receptor, Oncol Rep, 有, 2008,19(6),1445-52.

〔学会発表〕（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 尚武 (TSUDA NAOTAKE)
久留米大学・医学部・助教

研究者番号：60341351

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：