

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591143

研究課題名（和文）腫瘍—腫瘍血管を標的とした熱ショック蛋白・樹状細胞治療による白血病免疫回避の克服

研究課題名（英文）Overcome to avoidance from the anti-leukemia immunity by using combination therapy with HSP and dendritic cells targeted to both tumor and tumor angiogenesis

研究代表者

佐藤 一也 (SATO KAZUYA)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：50360988

研究成果の概要（日本語）：腫瘍—腫瘍血管を標的とした熱ショック蛋白を用いた抗白血病免疫の基礎研究を行った。血管内皮（EC）マーカーのCD31染色を用いて、A20マウスの腫瘍血管発現が見られることを確認した。MACSを用いてCD31抗体によるECの分離を試みたが十分なECが得られなかった。このためA20細胞へのGFP遺伝子導入A20細胞を作成し、A20腫瘍組織からGFP陰性分画をソーティングし、この分離細胞より腫瘍ECの分離を試みている。なお少数ECの増殖を試みるため、細胞不死化遺伝子であるteromerase reverse transcriptase（TERT：2909-6362）を含むベクターを作成した。今後A20腫瘍組織からEC分離を進め、TERT遺伝子を導入して細胞不死化・増殖を試み、腫瘍EC由来のHSP70の精製を計画している。ここで、B細胞腫瘍における有用な腫瘍血管内皮抗原の情報を得るため、ヒトのB細胞腫瘍で、腫瘍血管増生疾患であるPOEMS症候群の孤立性plasmacytomaに関して、免疫染色にて血管新生因子のVEGFやIGFの発現が亢進しているという有益な情報が得られた。さらにB細胞腫瘍の抗idiotype抗体が、CDCによる液性免疫を介してB細胞腫瘍の微小環境の血管新生抑制の可能性を示した。

以上の知見から、B細胞腫瘍EC由来のHSPや、抗idiotype抗体等のユニークなモチーフにより、腫瘍血管内皮を標的とした新規免疫療法のアプローチが可能となった。

研究成果の概要（英語）：In this study, we tried induction of the anti-leukemia immunity by using heat shock protein (HSP) targeted to both tumor and tumor angiogenesis. We demonstrated the presence of tumor angiogenesis in the A20-bearing mouse by endothelium cell (EC)-marker CD31 immunostaining. It was difficult to obtain the enough amount of EC by MACS with anti-CD31 antibody (Ab). We therefore originated GFP transduced A20-cells, and then GFP-negative fraction was sorted from A20-tumor tissue. Now we tried to separate the A20-tumor-associated EC (A20-EC) by using sorted GFP-negative fraction. To increase the number of EC, a vector containing immortalizing gene teromerase reverse transcriptase (TERT) was constructed. After successful A20-EC separation, transduction of TERT gene to A20-ESs and expansion of them will be performed, and then purification of A20-EC-derived HSP will be planed. To obtain the useful information of tumor endothelial antigen in the B-cell neoplasms, the specimen of solitary plasmacytoma in POEMS syndrome, which is known as one of the angiogenic B-cell neoplasms, was immunostained with angiogenic factors, and we demonstrated that the expression levels of VEGF and IGF were very high in the tumor. In addition, we showed the possibility that anti-idiotype Ab of mouse B-cell neoplasm may inhibit the angiogenesis in the microenvironment of the B-cell tumor through humoral immunity by the CDC. These findings enable the approach by novel immunotherapy against tumor ECs with unique motifs, such as HSPs derived from B-cell neoplasm associated ECs or anti-idiotype Ab.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 血液内科学

キーワード：腫瘍血管内皮，熱ショック蛋白 (HSP)，VEGF，白血病特異免疫、腫瘍血管新生、細胞不死化、IGF

1. 研究開始当初の背景

造血器腫瘍に対するモノクローナル抗体 (MoAb) や分子標的薬の実用化により悪性リンパ腫 (ML) や慢性骨髄性白血病 (CML) 等一部の疾患では予後は改善したものの、既存治療に抵抗性の難治性造血器腫瘍患者は依然存在し、その克服として免疫療法が期待されている。中でもWT1、BCR/ABL等のペプチドワクチン療法や、腫瘍特異免疫を増強するアジュバンドとして樹状細胞 (dendritic cell: DC) が有望視されており、抗原ペプチドとの併用による細胞療法としても臨床応用がなされている。しかしながら十分な臨床効果とは言えず、その原因として、難治がん患者では、腫瘍細胞上のMHC class-I (class-I) 分子の発現低下・消失による免疫回避や、制御性T細胞による、腫瘍免疫に不可欠なTh1反応の抑制が挙げられる。このうちTh1反応の増強策として、我々は熱ショック蛋白 (heat shock protein: HSP) に着目してきた。HSPは、腫瘍細胞内で多種多様な抗原と結合しているのが特長で、DCに取り込まれ、抗原のT細胞への提示により腫瘍特異的細胞障害性T細胞 (CTL) を主体とするTh1反応の活性化をもたらす、腫瘍拒絶することが知られており、抗原ペプチドの同定なく免疫治療を行える利点がある (Srivastava, et al. Nat Rev Immunol. 2002)。我々は、白血病マウスに対する白血病細胞由来のHSP70 や、HSP70 とDCの併用免疫が、MHC class-I依存性に特異的CTLを誘導し、マウス白血病細胞を駆逐することを明らかにした (Sato K, et al. Blood. 2001; Iuchi Y, Sato K, et al. Int J Hematol. 2006)。class-I依存性の免疫誘導を基盤としたこれらの免疫療法は、この発現低下・消失等の免疫回避機構に対しては弱点となるため、この点の強化により難治性白血病克服の近道となるはずである。一方、癌の発育・進展における血管新生の重要性が様々な角度から検討されている。近年、血管内皮増殖因子であるVEGF-AのMoAbが、腫瘍血管新生阻害により転移性大腸癌の生存延長に寄与することが報告 (Hurvitz H et al. N Eng J Med. 2004) されている。一方、多発性骨髄腫 (MM) や各種白血病を初めとする造血器腫瘍においても、腫瘍組織における血管新生と予後との関連が報告され (Rave HD et al. Histol Histopathol. 2004)、サリドマイド等の血管新生阻害剤の臨床的有用性も実証されている。腫瘍血管内皮細胞 (EC) は遺

伝的に安定しており、class-Iを含めた抗原欠失が起こりにくい特性を有する。これらの知見より、腫瘍ECの過剰発現分子であるVEGFR1, 2等を標的とした腫瘍血管抗原ワクチンも展開されているが、一方では、腫瘍細胞自体にはCTLが誘導できない、腫瘍血管非依存性の初期の癌発育過程 (diffusion) にはCTLを得られない等の問題点も存在する。従って、この問題点を補うべく、我々が開発中のHSP70を用いた免疫療法と腫瘍血管を標的とした免疫療法の融合を提案する。すなわち腫瘍細胞由来HSPと腫瘍血管抗原ペプチドを共にパルスしたDCを用いて、新規性の高い難治性造血器腫瘍の治療法の開発を目指す。腫瘍新生血管と腫瘍細胞を共に標的とした免疫療法の報告はなく、難治性造血器腫瘍に限らず難治がんの革新的治療法になると考える。

2. 研究の目的

再発・難治性造血器腫瘍に対して、腫瘍特異抗原を標的とした樹状細胞 (DC) 療法が脚光を浴びて久しいが、その臨床効果は満足なものとは言えない。この一因として腫瘍細胞のMHC class-I分子や腫瘍抗原の消失など生体の巧みな免疫回避機構が挙げられ、この弱点の克服が急務である。一方、造血器腫瘍を初めとする各種がん組織における腫瘍血管新生の重要性が報告され、腫瘍血管特異的抗原も同定されている。申請者らは白血病マウスに対して熱ショック蛋白 (HSP) 単独やDCとの併用により白血病特異免疫を有効かつ安全に誘導する画期的な治療法を開発中である (Iuchi Y, Sato K et al. Int J Hematol, 2006) が、この基盤技術を応用、発展・拡大し、腫瘍血管抗原も標的とした免疫療法の併用により、従来の免疫療法の弱点克服を目指す。

具体的には、難治性白血病マウスに対して白血病由来 HSP と腫瘍血管抗原ペプチドを利用した、最適な抗白血病効果を導く治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

1) 動物実験

10週齢の雄性BALB/cマウス (Charles River Japan) を使用。12時間のlight/dark cycle, 22°Cで飼育。マウス背部皮下へマウスリンパ腫培養細胞であるA20を 1×10^8 投与し、

4 週後に腫瘍を採取した。

2) 組織学的検討

腫瘍組織は 4%パラフォルムアルデヒドまたは亜鉛固定で固定しパラフィン包埋、組織切片を作成し hematoxylin and eosin (HE) 染色を行い評価した。また、血管の量、血管への抗体の特異性をみるため、CD31 の抗体を使用し免疫組織染色を行った。すべての実験は旭川医科大学動物実験ガイドラインに従った。

2) MACS による血管内皮細胞の抽出

マウス皮下に植え付けた腫瘍を摘出し組織をシングルセルまで破碎し、フィルターを通した。免疫組織染色で使用した抗マウス CD31 ラットモノクローナル抗体を細胞に添加し、抗ラット MACS MicroBeads 抗体でラベルし、内皮細胞を分離した。MACS での分離は数回行った。分離した細胞群は微小血管内皮細胞培地キット-2 (5% FBS) (EGM[®]-2-MV BulletKit[®]) (TAKARA bio) を使用し培養した。

3) MACS による腫瘍細胞以外の分離

マウス皮下に植え付けた腫瘍を摘出しシングルセルまで破碎しフィルターを通した。A20 細胞に選択的に結合する抗 B220 抗体を使用し上記 2) と同様の方法で、腫瘍細胞をラベルし、MACS により分離した。さらに腫瘍細胞とそれ以外の細胞に分け分離培養した。腫瘍細胞は RPMI で培養し、それ以外は微小血管内皮細胞培地キット-2 (5% FBS) (EGM[®]-2-MV BulletKit[®]) (TAKARA bio) で培養した。

4) A20 細胞に GFP のラベル

GFP 遺伝子導入のためのレトロウイルスを作成。GP2-293 細胞に上記で作成した pLVX-AcGFP-N1 と pVSV-G をトランスフェクション (lipofectamine 2000) した。一過性の遺伝子発現でとってきたウイルスを A20 細胞に遺伝子導入、1-5%程度の低率であるが、遺伝子導入ができることを確認した。その後抗生剤 (puromycin) にてセレクションを行った。発現は 4%パラフォルムアルデヒドで固定後蛍光顕微鏡にて撮影した。細胞を段階希釈して single cell 由来のモノクローナルな細胞を 100 個抽出。Western blotting にて GFP 発現を検討し 5 個の高発現細胞株を選択し、マウスへの移植細胞として使用した。

5) マウス移植腫瘍の cell sorting

GFP でラベルした A20 細胞をマウス背部皮下へ投与、組織を採取し、1) に従い腫瘍組織を採取、組織をシングルセルまで破碎し、フィルターを通した。Cell sorter にて GFP 産生細胞以外を採取し培養した。

6) マウス B 細胞腫瘍におけるより有用な腫瘍血管内皮抗原の情報を得るため、腫瘍血管増生疾患として知られている POEMS 症候群患者の孤立性 plasmacytoma に関して、血管新生因子である VEGF および IGF-1 の免疫染色を試みた。腫瘍組織は 4%パラフォル

ムアルデヒドで固定しパラフィン包埋、組織切片を作成した。その後 4⁰C で overnight し VEGF 抗体 (clone JH121; 1:500 dilution; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)、もしくは IGF-1 抗体 (rabbit antiserum; 1:100 dilution; Immunological and Biochemical Testsystems GmbH, Reutlingen, Germany) を添加し免疫組織染色を行った。

7) A20-idiotype peptide を用いた抗血管新生作用の検討: A20 細胞由来の HSP70 を既報 (Sato K, et al. Blood. 2001) のごとく作成し、Balb/c マウスに 4 回免疫し 3 週後に血清を得た。A20 を標的細胞とし、A20-IP (DYWGQGTTEL) もしくは control peptide (Flu-HA: IYSTVASSL) で 30 分前処理した非動化した上記マウス血清を、ウサギ補体とともに添加し 37⁰C、45 分間混合した。その後の CDC 活性はトリパンブルーの細胞取り込みを利用して、以下の式を用いて死細胞率 (CDC 活性) を算出した。

$\% \text{ cell lysis} = 100 \times \text{dead cells} / (\text{alive cells} + \text{dead cells})$

4. 研究成果

1) A20 細胞移植腫瘍組織での血管内皮の分布の検討

組織を亜鉛固定し免疫組織学的検討を行ったところ、腫瘍組織において腫瘍の周辺の微細な微小血管が分布していることを確認した。(Fig. 1)

2) A20 細胞移植腫瘍組織からの血管内皮細胞の分離培養

Anti mouse CD31 ラットモノクローナル抗体により MACS を使用し細胞を分離した。微小血管内皮細胞培地キット-2 (5% FBS) (EGM[®]-2-MV BulletKit[®]) (TAKARA bio) で培養後観察したところ、50%以上の割合で紡錘形の血管内皮でない細胞群が混在していることを確認した。Western blotting から B220 陽性のおそらく A20 細胞が混在していることが考えられた。この細胞群を再び MACS にかけて CD31 陽性細胞を分離したが、顕微鏡下で明らかに腫瘍細胞も混在していることを確認した。以上より CD31 により血管内皮細胞を分取することは難しいことが明らかとなった。

3) MACS による腫瘍細胞以外の分離

A20 培養細胞に特異的に結合する抗 B220 抗体を使用し、A20 細胞以外の細胞群を分離するために上記 2) と同様に腫瘍組織を採取し、MACS に数回吸着させ、吸着しない細胞のみを採取し培養した。結果、A20 細胞を十分量採取することはできなかった。

4、5) A20 細胞分離 (セルソーターを使用)

A20 細胞にレトロウイルスを使用し GFP 産生の遺伝子導入をし、GFP 強発現細胞をセレクトした。(Fig2a, 2b) 現在セルソーターを用いて、GFP 産生細胞以外を採取し培養を試行中である。

6) POEMS症候群の孤立性plasmacytomaに関して、各種血管新生因子を用いた免疫染色では、腫瘍細胞質内のVEGFやIGFの発現が極めて亢進していることを確認し (Fig3a, 3b) 報告した (Development of POEMS syndrome after an initial manifestation of solitary plasmacytoma. Shindo M, **Sato K**, **Ikuta K**, et al. Int J Hematol. 2011 May 7. [Epub ahead of print])。この知見をもとに、現在VEGFやIGF抗体等を用いてマウスB細胞腫瘍における血管内皮細胞を分離も計画している。

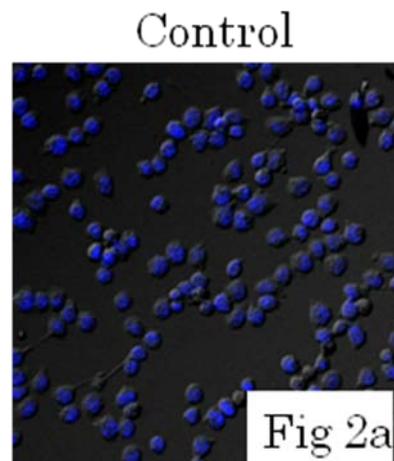
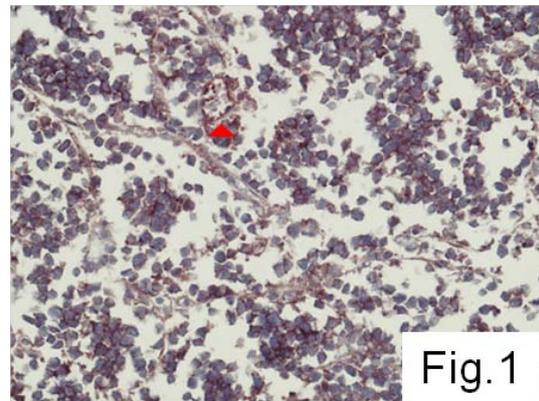
なお効率よくマウス腫瘍内皮細胞への腫瘍免疫を誘導に際し、分離したECを大量に得るために既報 (Murasawa S他5名. Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. Circulation. 2002; 106: 1133-1139.)のごとく、teromerase reverse transcriptase遺伝子 (hTERT : 2909-6362) を含むプラスミドベクターを作成し、PCRを施行し、目的のバンドを確認した (Fig 4a, 4b)。

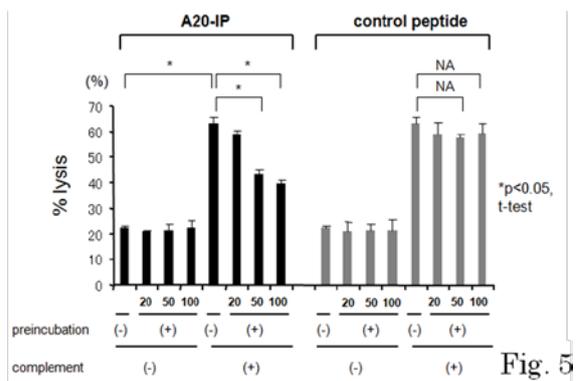
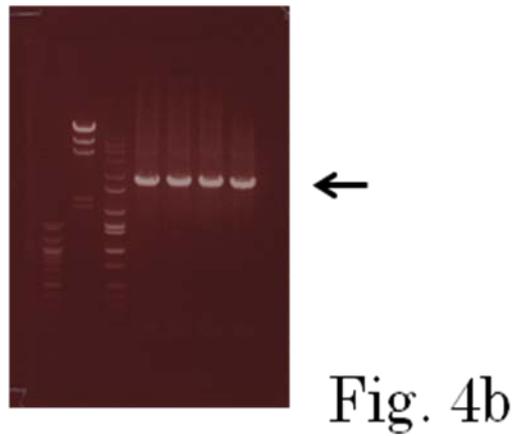
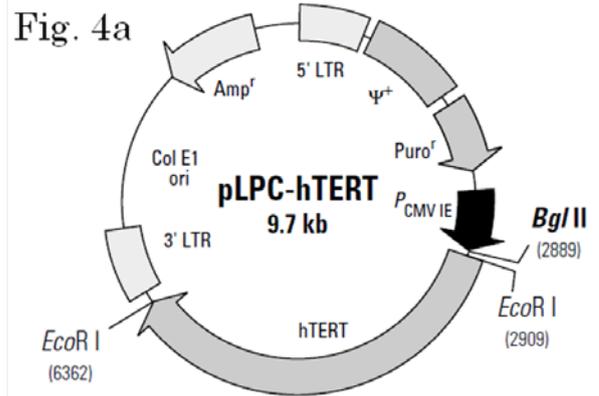
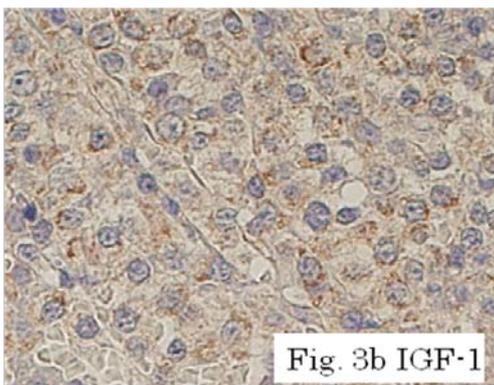
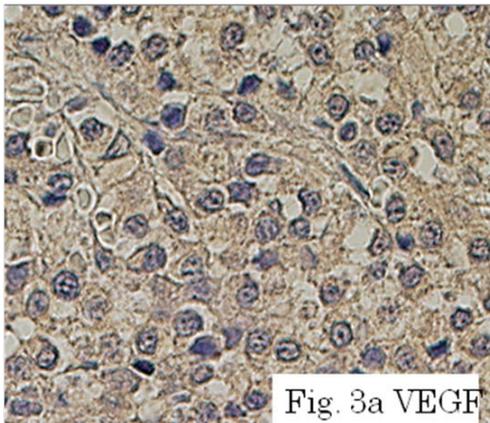
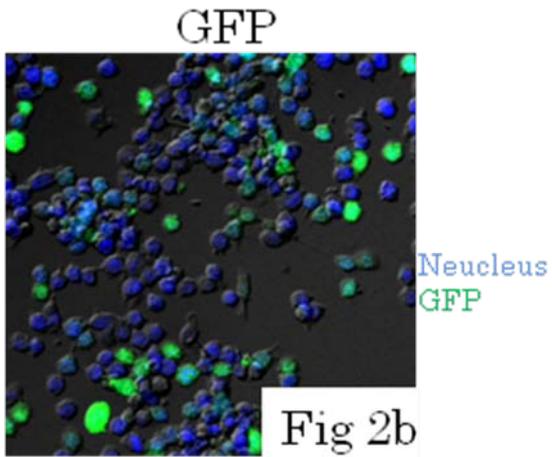
A20腫瘍組織からECであるが、現時点では、MACSを用いての、CD31抗体を用いたpositive selection, もしくは、B220抗体を用いたnegative selectionとともに、ECの十分な採取ができず、GFP遺伝子導入のA20細胞を用いてcell sorterにてnegative selectionによるECの分離を試みている。この分離が成功すれば、hTERTを遺伝子導入して細胞不死化・増殖を試み、腫瘍EC由来のHSP70を精製することを計画しており、現在標的細胞等への導入を試みている。

7) さらに、A20 細胞のidiotypeに含まれる特異抗原が、腫瘍免疫を誘導し、A20 担癌マウスの腫瘍を縮小するだけでなく、VEGFの発現を低下させ腫瘍微小環境のangiogenesisを抑制するという報告がなされた (Palmieri C, et al. Blood. 2010; 116: 226-38.)。我々は、すでにA20 由来HSP70 (A20-HSP) のマウスへの免疫により、抗A20-idiotype peptide (A20-IP) 抗体が産生され、その抗体はCDCによるA20 細胞障害活性を導くことを報告 (Jimbo J, **Sato K**, **Ikuta K** et al. Cancer Sci. 2008; 99: 1427-34.) した。このA20-IPによるA20-HSP免疫マウス血清の前処理によりCDC活性が影響をおけるかどうか調べたと

ころ、control peptideでは全く影響を受けなかったが、A20-IPの前処置では濃度依存性にCDC活性が優位に低下した。(Fig. 5) このことは、B細胞腫瘍由来の抗体idiotype抗体が、CDCによる液性免疫を介して、B細胞腫瘍の微小環境の血管新生を抑制できる可能性を示しており、興味深い知見である。

以上のように、腫瘍EC由来のHSPや、B細胞腫瘍由来の抗idiotype抗体などのユニークなモチーフを用いることにより、腫瘍血管内皮を標的とした革新的治療法へのアプローチが可能となっただけでなく、有効な治療法が確立されていない難治性疾患のPOEMS症候群の有用な治療法の開発につながるものと考えられる。





5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2件)

- 1) Development of POEMS syndrome after an initial manifestation of solitary plasmacytoma. Shindo M, **Sato K**, Yamamoto M, Toki Y, Hatayama M, Ito S, Ichiki K, Okamura N, Hosoki T, **Ikuta K**, Inamura J, Watanabe S, Torimoto Y, Kohgo Y. Int J Hematol. 2011 May 7. [Epub ahead of print]
- 2) Induction of leukemia-specific antibodies by immunotherapy with leukemia-cell-derived heat shock protein 70. Jimbo J, **Sato K**, Hosoki T, Shindo M, **Ikuta K**, Torimoto Y, Kohgo Y. Cancer Sci. 2008 Jul;99(7):1427-34.

[学会発表] (計 2件)

- 1) **Kazuya Sato**, Junko Jimbo, Naoka Okamura, Takaaki Hosoki, Motohiro Shindo, **Katsuya Ikuta**, **Yusuke Mizukami**, Yoshihiro Torimoto, Yutaka Kohgo. A crucial cytotoxic role of anti-idiotypic antibody in immunotherapy for B-cell neoplasms with tumor cell-derived heat shock protein 70. (2009) Abstract for the 48th Annual Meeting, The American Society of Hematology (New Orleans)
- 2) 神保絢子、**佐藤一也**、細木卓明、進藤基博、**生田克哉**、鳥本悦宏、高後 裕。マウス白血病細胞に対する熱ショック蛋白70を用いた免疫療法における液性免疫応答の誘導 Humoral immune responses in immunotherapy with HSP70 against leukemia in mice. 第70回日本血液学会は学術集会(京都)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 一也(SATO KAZUYA)
旭川医科大学医学部内科学講座
消化器・血液腫瘍制御内科学分野
講師 研究者番号：50360988

(2)研究分担者

水上 裕輔 (MIZUKAMI YUUSUKE)
旭川医科大学・医学部・講師
講師 研究者番号：30400089

大竹 孝明 (OHTAKE TAKAAKI)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：10359490

生田 克哉 (IKUTA KATSUYA)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：00396376

(3)連携研究者 無し