

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 31日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650231

研究課題名（和文） 機能的ペプチド配列から構成される人工蛋白質を用いた腫瘍免疫療法の開発

研究課題名（英文） Development of a novel cancer immunotherapy using the artificial proteins consisted in the functional peptide motifs.

研究代表者 伊藤 正紀 (ITO MASAKI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：80297366

## 研究成果の概要（和文）：

我々は、Ovalbumin(OVA)のMHC class IとMHC class II エピトープ配列、 $\alpha$ ヘリックス構造などのタンパク質安定化配列、無作為配列などのペプチドモチーフ配列がコンビナトリアルに、多数繰返した人工タンパク質ライブラリーを作成した。これら人工タンパク質を用いて、OVA特異的細胞性免疫の誘導能を *in vitro*、*in vivo* で評価した。その結果、クローン F182A および F37A で細胞性免疫誘導が認められ、アジュバントを用いずに、クロスプレゼンテーションを介して、細胞性免疫を誘導できる人工タンパク質の創製に成功した。本研究により、我々は、アジュバンドを用いずに、タンパク質のみで、腫瘍免疫療法の本体である細胞性免疫を誘導可能にする、概念証明実験に成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

We have constructed an artificial protein library by combinatorially assembling four peptide motifs associated with the MHC class I epitope and MHC class II epitope of OVA (Ovalbumin), alpha-helical motif and randomized peptide sequence, respectively. We have generated two artificial proteins, F37A and F182A, which have the ability to induce OVA-specific cellular immunity without using any adjuvant. These exogenous proteins presented OVA-specific MHC class I epitope through the cross-presentation pathway in the antigen presenting cells. Our studies have demonstrated that the motif-programmed artificial proteins might be able to induce cellular immunity contribute to cancer immunotherapy.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：人工タンパク質・MolCraft・細胞性免疫・OVA・樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

エピトープペプチドを用いた腫瘍免疫療法が注目されている。ピトープペプチドワクチンは、大量のエピトープペプチドが抗原提示細胞の空の MHC 分子へ結合する事によりその機能を発揮する。しかし、この方法は、樹状細胞などによる本来の抗原処理過程を経ず、効率よく抗原提示されていない可能性がある。一方、タンパク質を免疫に用いると、樹状細胞などに処理されるが、タンパク質あたりの抗原エピトープ数は少なくなる。また、外来抗原は MHC class II 分子に提示される傾向がある。樹状細胞ではクロスプレゼンテーションにより、外来抗原が class I 分子にも抗原提示される事が解っているが、その効率を規定するメカニズムは未だ不明である。

人工タンパク質を用いれば、ペプチドやタンパク質を用いる従来の免疫法の欠点を解消する事ができると考える。

## 2. 研究の目的

腫瘍抗原エピトープを多数含有し、タンパク質それ自身が免疫誘導能を有する人工タンパク質を作成し、悪性腫瘍を治療するための画期的な腫瘍免疫療法を開発する。

腫瘍抗原エピトープ配列、タンパク質安定化配列などの機能的ペプチド配列が無作為に多数繰返した人工蛋白質は、その配列に依存してナノ〜サブミクロンオーダーの大きさを持つ分子を形成することから、効率よく抗原提示細胞に認識、処理され、強い免疫原性を発揮する事が期待される。我々は、人工タンパク質ライブラリーの中から、強い免疫誘導能を持つタンパク質を探索し、免疫誘導能と人工タンパク質の物理化学的性質の関連性を調べる事により、高い細胞性免疫を誘導する人工タンパク質のデザイン指針を導き出し、新しい腫瘍免疫療法を生み出す。

## 3. 研究の方法

モデル抗原として、OVA(Ovalubumin)を用い、OVAのMHC class I、class II、 $\alpha$ ヘリックスなどのタンパク質安定化配列、無作為化配列などのペプチドモチーフ配列が、組み合わせ的に結合した人工タンパク質ライブラリーを作製した。この中から、アジュバンドを用いずに、in vitro、in vivoでOVA特異的な細胞性免疫、液性免疫を誘導できる人工タンパク質を見つけ出す事で、タンパク質のみで、クロスプレゼンテーションを介して、細胞性免疫を誘導できる人工タンパク質

を創製できるか検証した。

## 4. 研究成果

### 「実施内容」

連携研究者 芝清隆らが開発したMolCraft法を用い、OVAのMHC class I、class II エピトープ、 $\alpha$ ヘリックスなどのタンパク質安定化配列、無作為化配列などのペプチドモチーフ配列が、組み合わせ的に結合した人工タンパク質遺伝子135種類をクローニングした。60種類の遺伝子に関して、大腸菌でのタンパク質発現をチェックした。その結果、42種類の遺伝子でタンパク質の発現を確認した。得られたタンパク質を用いて、in vitro抗原提示能アッセイを行った。

人工タンパク質を抗原提示細胞(DC2.4樹状細胞)に添加し、OVA特異的エピトープを認識するT細胞と共培養し、IL-2産生能を測定し、細胞性免疫の誘導能を評価した。(図1)

図1 A

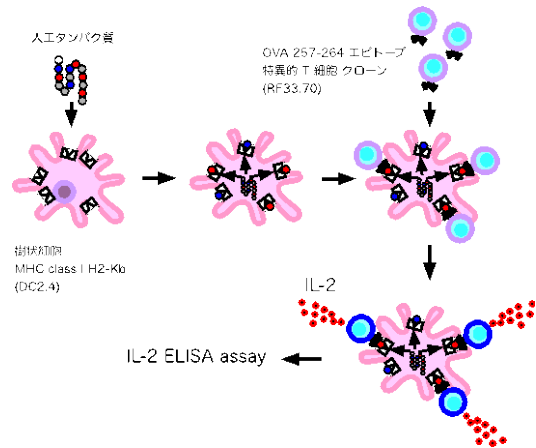


図1 B

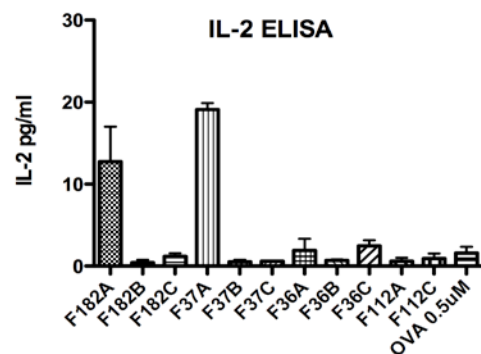


図1: 人工タンパク質の in vitro 細胞性免疫誘導能評価実験. A, 実験の模式図. B, IL-2産生能.

その結果、0.5  $\mu$ Mの濃度でクローン F182A お

よび F37A で細胞性免疫誘導が認められた。OVA では、 $50 \mu\text{M}$  以上の濃度でないと細胞性免疫誘導能は認められなかった。また、骨髓由来樹状細胞を用いた実験においても、同様な結果が得られた。この事から、人工タンパク質は、OVA よりも 100 倍低い濃度で、細胞性免疫を誘導できる能力があることがわかった。

人工タンパク質が、抗原提示細胞に取り込まれ、クロスプレゼンテーションを介して、エピトープを抗原提示している事を確認するために、クロスプレゼンテーションに関与するプロテアソームの阻害剤、Piroximicin と MG132 で処理して、細胞性免疫誘導能を評価した。その結果、F182A と F37A の細胞性免疫誘導能が抑制された。さらに、クロスプレゼンテーションを促進する効果のあるリソソーム阻害剤 (Chloroquin) を処理して、細胞性免疫誘導能を評価したところ、F182A と F37A の細胞性免疫誘導能が増強した。(図 2) これらの知見から、F182A と F37A は、抗原提示細胞に取り込まれ、クロスプレゼンテーションを介して、抗原提示している事が確認された。

図 2

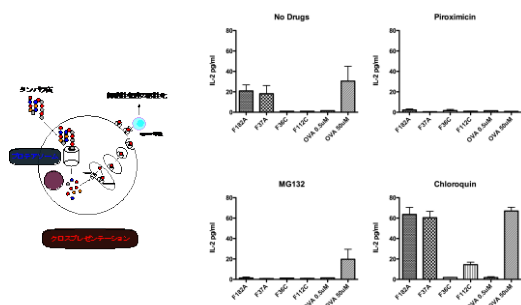


図 2: 人工タンパク質のクロスプレゼンテーションの評価. クロスプレゼンテーションの模式図. 阻害剤、促進剤の効果.

次に、人工タンパク質を C57B1/6 マウスの皮内に  $20 \mu\text{M}$  60ul (1.2nmole)、1 週間間隔で 3 回投与し、免疫した。免疫マウスの脾臓細胞を取り出し、IL-2 と 100Gy X 線照射した EG7-OVA 細胞 (OVA を発現する腫瘍細胞) と混合培養し、in vitro stimulation を行い、OVA 特異的 T 細胞を検出するための OVA-Tetramer assay と、EG7-OVA 細胞に対するクロムリリーシン細胞障害性グアッセイを行った。その結果、F182A と F37A で OVA 特異的 Tetramer 陽性・CD8 陽性 T 細胞の存在が確認された。(図 3)

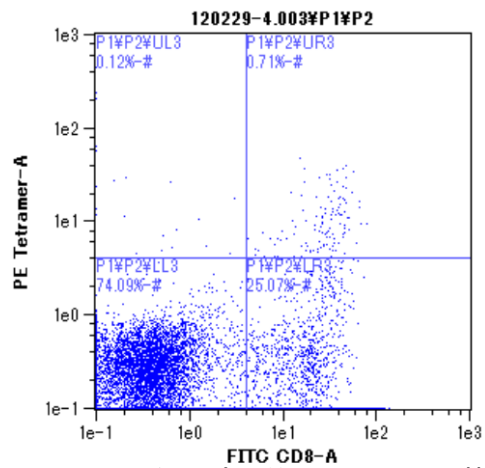


図 3: 人工タンパク質 F37A の OVA 特異的 Tetramer assay.

さらに、F182A と F37A で細胞障害性が認められた。(図 4)

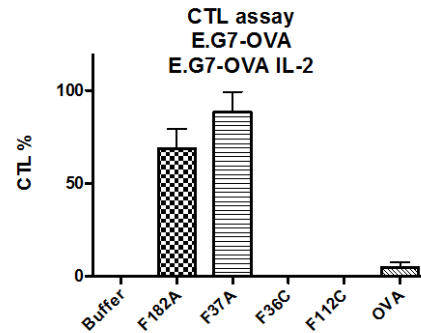


図 4: 人工タンパク質の in vivo 細胞障害アッセイ.

免疫マウスの血清を採取し、ELISA 法にて抗 OVA 抗体の誘導能について評価した。(図 5)

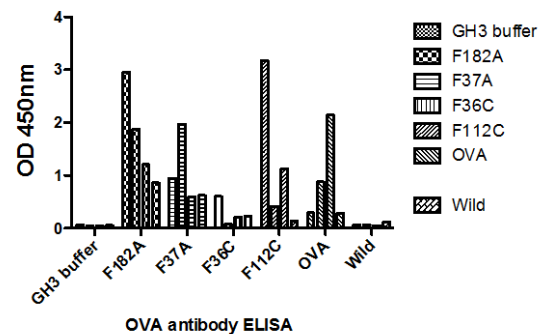


図 5: 人工タンパク質の液性免疫誘導能の評価.

その結果、F182A および F37A 人工タンパク質の投与により、抗 OVA 抗体の誘導が認められた。OVA MHC class II エピトープを含有しない人工タンパク質 (F36C) では、抗 OVA 抗体は誘導されなかった。従って、人工タンパク質

F182AおよびF37Aは、抗原提示細胞に取り込まれ、OVA MHC class I エピトープを、MHC class I分子上に提示できるだけでなく、MHC class II エピトープをMHC class II分子上に提示させる能力がある事が明らかとなった。

### 「得られた成果のインパクト」

通常、OVAなどの水溶性タンパク質は、抗原提示細胞にとりこまれにくいことから、抗原を細胞に効率よく導入するためには、リポソームなどの蛋白質導入試薬や、膜透過性ペプチド（HIV TATなど）の利用が必須である。

i) 我々は、膜透過性ペプチドやリポソームを用いずに、全く新しい機構で抗原提示細胞に抗原を導入できる方法を開発した。

外来抗原は一般に液性免疫を誘導し、細胞性免疫を誘導につながらない。しかしながら、我々の開発した人工タンパク質は、外来抗原でありながら、タンパク質のみでクロスプレゼンテーションを介して、細胞性免疫を誘導できる事が、in vitro、in vivoの実験で明らかとなった。

ii) 我々は、外来抗原を用いて細胞性免疫を強く誘導する方法を開発した。

現在進められているがん免疫療法では、がん抗原エピトープペプチドとオイル性アジュバンドを混合し、患者に注射している。現在、臨床で用いられているアジュバンドは高価で、またアジュバンドによる皮膚の炎症反応（しこり）が問題となっている。また、効果的なアジュバンドが開発されていないのが現状である。我々の開発した人工タンパク質は、オイル性アジュバンドの使用を必要とせず、アジュバンドによる副作用を回避できる。

iii) 我々は、従来臨床で使用されているオイル性アジュバンドを用いずに細胞性免疫と液性免疫を誘導する方法を開発した。

### 「今後の展開」

#### 1) 内在性抗原への応用

今回、免疫実験で広く用いられているOVAをモデル抗原として、アジュバンドを必要としない細胞性免疫誘導法の開発に成功した。腫瘍免疫療法では、内在性抗原であるがん抗

原が標的となる。従って、がん抗原エピトープにおいても、本成果が利用できる事を確認する必要がある。

今後、腫瘍免疫療法の標的抗原として期待されているがん抗原を標的とした研究を進める予定である。

#### 2) 抗原提示細胞の免疫刺激経路の活性化

強力な細胞性免疫を誘導するためには、抗原提示細胞の免疫刺激経路の活性化が重要である。そこで、我々は、抗原提示細胞の免疫刺激経路の本体であるToll like receptor (TLR)を刺激するペプチド配列を人工タンパク質に導入し、よりインテリジェントなアジュバンド誘導人工タンパク質の開発を進める予定である。

#### 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 10 件)

1) Koido S., Homma S., Ito M., et al. 10 人 7 番目. Gemcitabine enhances Wilms' tumor gene Immunotherapy synergizes with chemotherapy targeting pancreatic cancer. *Immunotherapy*. 査読有 4, 2012, 5-7. 10.2217/imt.11.150

2) Koido S., Homma S., Ito M., et al. 18 人 13 番目 Current immunotherapeutic approaches in pancreatic cancer. *Clin Dev Immunol*. 査読有 267539. 2011, 1-15. 10.1155/2011/267539

3) Koido S., Homma S., Ito M., et al. 13 人 7 番目 Immunologic monitoring of cellular responses by Dendritic/Tumor cell fusion vaccines. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 査読有 910836, 2011, 1-14. 10.1155/2011/910836

4) Takahara A, Koido S, Ito M., Nagasaki E, Sagawa Y, Iwamoto T, Komita H, Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M, Mineno J, Shiku H, Nishida S, Sugiyama H, Tajiri H, Homma S. Gemcitabine enhances Wilms' tumor gene WT1 expression and sensitizes human pancreatic cancer cells with WT1-specific T-cell-mediated antitumor immune response. *Cancer Immunol Immunother*. 査読有 60(9), 2011, 1289-1297. 10.1007/s00262-011-1033-3

5) Ito M., Suzuki H, Sagawa Y, Homma S. The identification of a novel Paneth cell-associated antigen in a familial adenomatous polyposis mouse model.

**Biochemical and Biophysical Research Communications**, 査読有 400, 2010, 548-553.  
10.1016/j.bbrc.2010.06.096

6) Koido S, Homma S, Hara E, Namiki Y, Takahara A, Komita H, Nagasaki E, Ito M, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. Regulation of tumor immunity by tumor/dendritic cell fusions. **Clin Dev Immunol.** 査読有 51678, 2010.

7) Koido S, Hara E, Homma S, Namiki Y, Komita H. Dendritic/pancreatic carcinoma fusions for clinical use:Comparative functional analysis of healthy-versus patient-derived fusions. **Clin Immunol.**, 査読有 135(3), 2010, 384-400.

8) Saeki C, Homma S, et al. 7人 2番目  
Accumulation of functional regulatory T cells in actively inflamed liver in mouse dendritic cell-based autoimmune hepatic inflammation. **Clin Immunol.**, 査読有 135, 2010, 156-166.

9) Gong J, Koido S, et al. 6人 2番目.  
A heat shock protein 70-based vaccine with enhanced immunogenicity for clinical use. **J Immunol.**, 査読有 184, 2010, 488-496.

10) Nagasaki E, Takahara A, Koido S, Sagawa Y, Aiba K, Tajiri H, Yagita H, Homma S. Combined treatment with dendritic cells and 5-fluorouracil elicits augmented NK cell-mediated antitumor activity through the tumor necrosis factor-alpha pathway. **J Immunother.**, 査読有 33(5) 2010, 467-74.

[学会発表] (計 4件)

1) Komoike A, Homma S, Ito M, et al.  
Study of photodynamic diagnosis of colon cancer generated in DSS (Dextran sulfate sodium) utilizing Apc (Adenomatous polyposis Coli) knockout mice by visualization following oral 5-aminolevulinic acid sensitization. **DDW Digestive Disease Weeks**, 2012. May 20, San Diego, CA USA.

2) 本間 定、佐川由紀子、伊藤正紀、永崎栄次郎、高原映崇、込田英夫、小井戸薫雄. iPS細胞から腫瘍血管を標的とした癌ワクチンの開発. 第70回日本癌学会学術総会. 2011年10月3日、名古屋

3) 本間 定、佐川由紀子、伊藤正紀、永崎栄次郎、高原映崇、込田英夫、小井戸薫雄. iPS細胞から腫瘍血管を標的とした癌ワクチンの作製. 第15回日本がん免疫学会総会. 2011

年7月1日.大阪

4) 本間 定、佐川由紀子、高原映崇、永崎栄次郎、込田英夫、伊藤正紀、小井戸薫雄. 抗腫瘍免疫反応により産生されるインターフェロンガンマはゲムシタピン活性化酵素の発現を上昇させる. 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月24日、大阪

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

[http://www.jikei.ac.jp/academic/course/17\\_akuseisyuyo.html](http://www.jikei.ac.jp/academic/course/17_akuseisyuyo.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 正紀 (ITO MASAKI)  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80297366

(2) 研究分担者

本間 定 (HOMMA SADAMU)  
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：50192323

(3) 研究分担者

小井戸 薫雄 (KOIDO SHIGEO)  
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：70266617

(4) 連携研究者

芝 清隆 (SHIBA KIYOTAKA)  
がん研究所・蛋白創製研究部・部長  
研究者番号：40196415