

## 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 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22780282

研究課題名（和文）：犬の腫瘍におけるペプチドワクチンを用いた免疫療法の開発

研究課題名（英文）：Development of immunotherapy using peptide vaccine in canine spontaneous tumors

研究代表者：木之下 明日香（瀬戸口明日香）(ASUKA KINOSHITA (ASUKA SETOBUCHI))

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：00396813

研究成果の概要（和文）：犬の自然発生腫瘍に対する免疫療法の開発として WT1 蛋白を標的としたペプチドワクチンによる免疫療法の可能性を探索した。ペプチドワクチン作成にあたり、犬 WT1 遺伝子を単離し、その塩基配列を決定した。2つの cDNA クローンが得られたが、いずれも人で報告のあるアイソフォームと同等の構造を有し、うち1つは腫瘍において高発現しているアイソフォームであったことから、このクローンの予測されるアミノ酸配列に基づきペプチドを作成した。一方、犬の正常組織および自然発生腫瘍組織における WT1 蛋白の発現について免疫組織化学を用いて検討したところ、正常組織では腎臓、脾臓、肺、卵巣といった限られた組織においてわずかに発現が認められるのみであったのに対し、腫瘍組織においては様々な組織で強い発現が認められた。

研究成果の概要（英文）：The possibility of peptide vaccine targeting WT1 protein has been investigated, as a novel treatment strategy for spontaneous tumors in dogs. To establish an effective peptide vaccine, we cloned and sequenced the canine WT1 cDNA. Two canine WT1 cDNA clones were isolated and seemed to correspond to isoforms reported in human WT1 gene. Based on its deduced amino acid sequences, five peptides were made and used. Moreover, expression of WT1 protein in normal and tumor tissues in dogs were investigated using immunohistochemistry. In normal tissues, only weak expression of WT1 protein were detected in kidney, spleen, lung and ovary and no positive signal were detected in other normal tissues. On the other hand, strong signals were detected ubiquitously in cytoplasm and/or nucleus of tumor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：【農学】

科研費の分科・細目：【畜産学・獣医学／臨床獣医学】

キーワード：【犬 腫瘍 免疫療法 ペプチドワクチン】

## 1. 研究開始当初の背景

近年、伴侶動物の高齢化に伴い腫瘍性疾患の発生は増加の一方であり、担癌動物の治療を行う機会が増えている。しかし外科療法、放射線療法、化学療法といった従来の治療法のみでは治癒できる症例は極めて少なく新規治療法の開発が急務である。そのような中、腫瘍細胞に対する免疫を誘導し、治療に結びつける免疫療法は、効果的に腫瘍免疫が誘導された場合に非常に高い有効性を示す点や副作用が少ない点から着目されている新規治療法である。腫瘍免疫を誘導するためには、(1)腫瘍細胞特異的抗原を同定し、(2)その抗原に反応する免疫担当細胞を活性化する必要はあるが、腫瘍特異的抗原は腫瘍細胞ごとに異なり、同定されても効果的に免疫が誘導されない場合があるなど実用化には問題が多い(図1)。これまでに犬の樹状細胞を用いた免疫療法についての基礎的研究(Tamura *et al*, *J Vet Med Sci*, 2007; Tamura *et al*, *Vet J*, 2008) や DNA ワクチンを用いた悪性黒色腫の治療(Bergman PJ *et al*, *Vaccine*, 2006) が報告されてきたが、実用化されたのは悪性黒色腫に対する DNA ワクチンのみである。

WT1 は人医領域において、小児腎癌であるウィルムス腫瘍の原因遺伝子として同定され、近年血液系腫瘍のみならず固形腫瘍にも広く発現が認められる腫瘍抗原であることが見いだされた蛋白である(Oji *et al*, *Int J Cancer*, 2002; Nakatsuka *et al*, *Cancer Sci*, 2006)。*in vitro* で強力な免疫誘導能があること(Fujiki *et al*, *J Immunol*, 2007) から、人において WT1 ペプチドをワクチンとして投与する試みが本邦で開始され、胃癌、食道癌、小腸癌、子宮肉腫といった腫瘍にお

ける臨床試験が現在実施されている。大規模研究結果はまだ報告されていないが、微小残存病変の減少や転移性腫瘍の進行抑制といった成果が少しずつあがっている(Oka *et al*, *Scientific World Journal*, 2007)。そこで、今回我々は様々な種類の腫瘍細胞に広く発現することが明らかとなった WT1 に着目し、WT1 タンパクを腫瘍特異的抗原として利用した免疫療法の開発に着目した。

## 2. 研究の目的

腫瘍治療は主に外科的摘出や放射線治療による局所治療と化学療法に全身療法が柱となる。しかし、これらの治療法では取り除くことのできない微小残存病変が再発を引き起こすため、免疫療法などの補助治療が必要である。これまでに腫瘍免疫を高める様々な方法が試みられているが、実用化に至り大きな効果をあげている治療法が未だ存在しない。有効な免疫療法を確立するためには、腫瘍に特異的に発現する抗原を同定し、その抗原を認識し活性化する免疫担当細胞を誘導する必要がある。そこで多くの腫瘍に発現し、*in vitro* で強力な腫瘍免疫を誘導しうる WT1 を腫瘍抗原としたワクチン療法と細胞障害性 T 細胞の抑制蛋白である CTLA4 を抑制するペプチド療法の併用による、より効果的な免疫療法の確立を目的とした研究を計画した。

## 3. 研究の方法

(1) 犬の自然発生腫瘍における WT1 蛋白発現の解析

まず、初めに犬の自然発生腫瘍における WT1 蛋白の発現を抗ヒト WT1 ポリクローナル

抗体を用いた免疫組織化学により解析し、WT1 蛋白が犬においても腫瘍特異的抗原となりうるか検討する。

その際に抗ヒト WT1 ポリクローナル抗体を用いて検討を行うため、あらかじめイヌの WT1 蛋白との交叉性を Western blotting により確認する。

#### (2) イヌ WT1 ペプチドワクチンの作成および有効性の検討

ヒト WT1 ペプチドワクチンの研究成果(May RJ *et al*, *Clin Cancer Res*, 2007) を参考に、複数種のイヌ WT1 ペプチドを Boc 基と Fmoc 基を用いた固相法により作成する。抗原提示細胞での拘束性を高めるために WT1 ペプチドに犬白血球抗原 DLA ペプチドを融合させた WT1-DLA ペプチドも同時に作成し、効果の増強を試みる。作成したペプチドを正常犬末梢血単核球 (PBMC) に添加して培養し、ペプチドの添加により CTL が活性化して IFN- $\gamma$  産生が増加するかどうか培養上清中の IFN- $\gamma$  を ELISA で測定し、有効なワクチンペプチドの選別を行う。

#### (3) 抗ヒト CTLA4 抗体の犬における有効性の検討

抗ヒト CTLA4 モノクローナル抗体を用い、イヌ PBMC を用いて Western blotting を行い、抗体がイヌ CTLA4 を認識するか確認する。その際にイヌ CTLA4 のアミノ酸配列を参考に Boc 基と Fmoc 基を用いた固相法により作成したイヌ CTLA4 ペプチドを添加し、反応の阻害を確認することで、抗ヒト CTLA4 抗体がイヌ CTLA4 を認識していることを確認する。

## 4. 研究成果

### (1) 犬の *wt1* 遺伝子のクローニングおよび自

然発生腫瘍における WT1 蛋白発現の解析  
健常犬の腎臓より得られた cDNA を鋳型とし RT-PCR 法によりイヌ *WT1* cDNA を単離し、その塩基配列を決定したところ、1353bp および 1344bp からなる 2 つの異なるクローンが単離された。これら 2 つのクローンはいずれも *WT1* 遺伝子の全翻訳領域を含んでおり、人およびマウスにおいて報告のある機能ドメインも保存されていたことから、犬 WT1 も他の種と同様の機能を有する可能性が示唆された。今回得られた 2 つのクローンのうち、クローン 2 はクローン 1 の nt1227-1236 が欠損したものであり、この欠損部は人において報告のあるアイソフォームの欠損部位 (KTS 部位) と同様であったことから、犬においても人と同様のアイソフォームが存在することが示された。次に抗人 WT1 抗体の犬に対する交叉性をウェスタンブロッディングにより検討したところ、陽性コントロールのマウスと同様の位置にバンドが確認され、犬に対する交叉性が確認された。そこで本抗体を用いて、免疫組織化学的手法により犬の正常組織および腫瘍組織における WT1 蛋白の発現を解析した。健常犬より採取した腎臓、卵巣、精巣、脾臓、乳腺、肺、消化管、肝臓、膵臓、横紋筋を用いて検討したところ、WT1 蛋白は尿細管上皮、卵巣顆粒膜細胞層、精管微絨毛、脾臓、乳腺上皮細胞、気管腺上皮細胞において発現していた。一方、胃、肝臓、膵臓、横紋筋、小腸、大腸では WT1 蛋白の発現は認められなかった。人の正常組織において WT1 蛋白は腎臓、卵巣、精巣、脾臓で発現が認められることが報告されており、一方、乳腺や肺における発現についての報告はない。WT1 蛋白が細胞内における転写・翻訳に関与することから、蛋白合成の盛んな乳腺や気管の腺上皮細胞における発現が認められたと考えられる。続いて 2007~2011 年に鹿児島大学附

属動物病院に来院し、病理組織学的検査で口腔内の悪性黒色腫、線維肉腫および扁平上皮癌と診断された犬 18 例の腫瘍組織における WT1 蛋白の発現について同様に解析したところ、全てにおいて WT1 蛋白の発現が確認された。検討に用いた 18 例中 17 例では陽性細胞率が 50%を越えており、腫瘍組織において高率に WT1 蛋白発現していることが示唆された。今回検討に用いた腫瘍の種類は少ないものの、いずれの腫瘍においても WT1 蛋白の発現が確認されたことから、犬における免疫治療の標的として WT1 蛋白が有用である可能性が示唆された。

#### (2) 犬の WT1 ペプチドワクチンの構築

得られた犬 *WT1*cDNA の塩基配列から予測されるアミノ酸配列をもとに人で用いられているペプチドワクチンに相当する部位の 8~12 個のアミノ酸からなるペプチドを 5 種類作成した。健常犬より分離した末梢血単核細胞 (PBMC) の培養上清にこれらのペプチドをそれぞれ添加し、CTL を活性化して培養上清中の IFN- $\gamma$  濃度の上昇が認められるペプチドを同定中である

#### 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 1 件)

Sakuma M, Nishio T, Nakanishi N, Izawa M, Asari Y, Okamura M, Shimokawa Miyama T, Setoguchi A, Endo Y. A case of Iriomote cat (*Prionailurus bengalensis iriomotensis*) with *Hepatozoon felis* parasitemia. J Vet Med Sci. 2011 Oct;73(10):1381-4. (査読有)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

木之下明日香 (瀬戸口明日香)

(KINOSHITA ASUKA (SETOGUCHI ASUKA))

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：00396813