

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 20 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年～2011 年

課題番号：22791492

研究課題名（和文）腫瘍抗原提示と樹状細胞の機能改変を同時に行う遺伝子免疫療法の新規治療戦略

研究課題名（英文）The new treatment strategy of gene immunotherapy; survivin gene induce cytotoxic lymphocyte and modify the function of dendritic cells

研究代表者

藤井 令央奈（Reona Fujii）

和歌山県立医科大学 医学部・博士研究員

研究者番号：30326468

研究成果の概要（和文）：

IAP ファミリーの一つである、survivin を樹状細胞（dendritic cell：DC）に遺伝子導入した遺伝子免疫療法の基礎研究を行った。survivin が腫瘍細胞にのみ強く発現しており標的遺伝子として有用であることを証明した。survivin は抗癌剤抵抗性になった癌でも発現が認められ、抗癌剤耐性がん細胞にも有用である可能性を示唆した。また survivin は抗アポトーシス作用により、survivin を導入した DC がより長期にわたって生存することが可能になる。このことにより survivin を導入した DC では長期間にわたり細胞障害活性を誘導できることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Survivin is a member of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family. The present study showed that survivin-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) can be induced by dendritic cells : DCs transduced with the survivin gene by way of an adenoviral vector, and such CTLs showed cytotoxic activities against human urologic malignancies. Survivin is overexpressed in most cancer cells and chemotherapy-resistant cancer cells but is undetectable in normal tissues. This data suggested survivin is useful for chemotherapy-resistant cancer cells.

Survivin inhibits apoptosis and controls cell division. We showed the cell viability of DCs transduced with the survivin gene is longer than that of "normal" DCs. DCs transduced with the survivin gene can induce survivin-specific CTLs. The cytotoxic activity against bladder cancer cells (T-24) act long period.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腫瘍学

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

(1) ペプチド療法の欠点と DC に遺伝子導入することの利点

樹状細胞 (dendritic cell : DC) 上に提示される腫瘍抗原のペプチドを用いた、いわゆるペプチドワクチン療法が多く研究されてきたが単一のペプチドを用いた場合、免疫賦活効果が必ずしも充分ではなくそのためにペプチドワクチン療法は当初期待されたような臨床効果が得られていない。こういった問題を打破すべく、DC に腫瘍関連抗原 (Tumor Associated Antigen : TAA) の遺伝子を導入する方法を提唱してきた。DC に TAA 遺伝子を導入する利点は

- ① TAA 遺伝子が内因性に処理され DC 上に提示されるため、同定されていない未知のペプチドを提示することが可能である。
- ② 抗原提示は内因性に行われるため HLA タイプにより治療を受ける患者の制限がない。
- ③ 複数のペプチドが同時に提示されるため免疫耐性を起こしにくい。
- ④ 交叉抗原提示により MHC class I だけでなく class II も活性化させる可能性がある。

といったものがあげられ、ペプチドを用いた免疫療法の問題点を克服できる可能性がある。我々はアデノウイルスベクターを用いて前立腺特異抗原 (Prostate Specific Antigen: PSA) 遺伝子を DC に導入し、HLA タイプによる制限を受けずに、前立腺癌に対する抗腫瘍免疫反応が誘導される多価ワクチンの可能性を報告してきており (第 93 回日本泌尿器科学会総会賞、Fujii R et al : BJU Int., 104:1766-1773, 2009)、TAA 遺伝子導入 DC の妥当性、有用性については一定の結果を得ている。

(2) 導入遺伝子に survivin を使用することの利点

癌発生のメカニズムを考えた場合、細胞増殖の亢進だけでなくアポトーシスの抑制も考慮に入れなければならない。

survivin を遺伝子導入する利点は以下の 3 点があげられる。

- ① 標的遺伝子として有用である。
survivin は正常組織における発現が極めて低く、種々の癌組織での過剰発現が確認されている。泌尿器科領域では膀胱癌、前立腺癌、腎細胞癌での過剰発現が報告されており (Ku, J. H., et al.; J. Urol., 171; 631-635, 2004)、

その発現レベルが腫瘍の悪性度や進展に関与することも報告されている (Gazzaniga, P., et al.; Ann. Oncol., 14; 85-90, 2003, Parker, A. S., et al.; Cancer, 107; 37-45, 2006)。そのため癌特異的に発現する survivin は細胞障害活性の得られる癌免疫療法の標的抗原として理想的であるといえ我々は種々の泌尿器癌細胞株に対して細胞障害活性が得られることを確認している (Kikkawa, K., Fujii R., et al; Urology, 74;222-228, 2009)。

② 抗癌剤耐性癌に有用な survivin

survivin はアポトーシスを抑制するだけでなく、細胞周期 G2/M 期に高発現し微小管を安定させ細胞分裂を促進する。このことが抗癌剤の耐性に関与しているものと考えられる (Li F., et al: Nature, 36: 580-584, 1998)。抗癌剤耐性を獲得した癌細胞株では、親株と比較して survivin の発現が増加しており、それらの発現や機能の抑制による抗癌剤感受性が増加するとされている (Olie, R. A., et al.; Cancer Res., 60; 2805-2809, 2000)。

したがって、これら survivin を標的とした免疫療法は抗癌剤耐性癌に対してより強い抗腫瘍免疫応答が得られる可能性がある。

③ 抗アポトーシス作用により、survivin を導入した DC がより長期にわたって生存することが可能になる。

癌細胞株に survivin 遺伝子を導入すると”survivin 遺伝子導入細胞では細胞の survival が延長する。” (Asanuma K., et al : J Immunol. , 172 : 3922-3929, 2004) との報告があり、DC に遺伝導入を行えば、標的遺伝子としての作用以外に DC 自体の機能改変をもたらす可能性がある。

2. 研究の目的

survivin を遺伝子導入した DC を用いて

(1) 癌抗原として優れている survivin を細胞障害活性の標的として使用する。

(2) 抗癌剤耐性癌細胞に応用する。

(3) survivin の抗アポトーシス作用により DC 自身の機能改変も行う。

以上より泌尿器癌に対する効率的で革新的な遺伝子免疫療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 各種膀胱癌細胞株における survivin の発現の確認、抗癌剤耐性株の作製と survivin 発現増強の検証

(2) survivin 遺伝子導入による膀胱癌細胞株の抗癌剤耐性化についての検討

(3) アデノウイルスベクターによる DC への survivin 遺伝子の導入と発現についての検討

(4) survivin 遺伝子導入で DC の生存期間、生存率の延長が得られるかについての検討
(5) 膀胱癌細胞株（母細胞と抗癌剤耐性株の双方）に対する CTL 誘導能の検討

(1) 各種膀胱癌細胞株における survivin の発現の確認。抗癌剤耐性株の作製と survivin 発現増強の検証

① 各種膀胱癌細胞株より total RNA を抽出し、RT-PCR 法で survivin の mRNA 発現を確認する。また、western blot によりタンパク発現を確認する。

② survivin の発現を確認した膀胱癌細胞株で低濃度の抗癌剤 (cisplatin、Paclitaxel) 存在下で培養し、徐々に抗癌剤の濃度を上げ、高濃度の抗癌剤存在下で継代培養可能な耐性株を作成する。(この抗癌剤耐性膀胱癌細胞株の作成には各論文から類推して約 1 年間の期間を要するものと考える。) 抗癌剤耐性能を MTT assay で確認後、survivin の mRNA、タンパク発現レベルをそれぞれ real-time PCR、western blot analysis で確認し、耐性獲得前の細胞株の発現レベルと比較検討し、survivin 発現が増加するか検討する。

(2) survivin 遺伝子導入による膀胱癌細胞株の抗癌剤耐性化についての検討
既存の膀胱癌細胞株にアデノウイルスベクター AxCA-survivin を用いて survivin を強制発現させ、抗癌剤耐性能が上昇するかについての検討を行う。

① survivin 発現アデノウイルスベクターの作製および調整 (作成済み)
survivin cDNA (札幌医科大学第 1 病理学教室より供与) を cosmid vector pAxCAwt に ligation し、COS-TPC 法を用いて survivin 発現アデノウイルスベクター AxCA-survivin を作製する。

② survivin 遺伝子導入膀胱癌細胞株の作製
survivin の発現を確認した膀胱癌細胞株のうち survivin 発現が少ない細胞株にアデノウイルスベクター AxCA-survivin を遠心法を用いて感染させ、survivin 遺伝子導入膀胱癌細胞株を作製する。導入効率を RT-PCR による mRNA 発現、western blot analysis によるタンパク発現で確認する。また、同時に細胞株の viability を trypan blue staining で確認し、最適な導入効率 MOI を算出する。

③ 抗癌剤耐性能の確認
作成した survivin 遺伝子導入膀胱癌細胞株の抗癌剤耐性能を MTT assay で確認する。作成した survivin 強制発現抗癌剤耐性株は

以下の実験に使用する。

(3) アデノウイルスベクターによる DC への survivin 遺伝子の導入と発現についての検討

① 健康人末梢血より DC の誘導

ヒト末梢血より Ficoll-Hypaque 法にて単核球を分離。AIM-V に浮遊し、T-75 フラスコ内で 1.5 時間培養。翌日、付着細胞を IL-4、GM-CSF の存在下で 7 日間培養後、浮遊細胞を回収して iDC を誘導する。

② DC の maturation と maturation の評価
上記の方法で用意した未熟樹状細胞をさらに 2 日間、GM-CSF を含む AIM-V で培養し BCG-CWS を添加する。2 日後細胞は 4°C で 10mM EDTA を含む PBS 中で回収する。成熟化の評価は細胞表面マーカーを計測することにより行う。

③ DC への survivin 遺伝子の導入とその発現
アデノウイルスベクター AxCA-survivin を上記方法で得た DC に遠心法を用いて感染させ、survivin 遺伝子導入 DC (DC-survivin) を作製する。同様に導入効率を RT-PCR による mRNA 発現、western blot analysis によるタンパク発現で確認する。最適な導入効率 MOI を算出する。

(4) survivin 遺伝子導入で DC の生存期間、生存率の延長が得られるかについての検討
下記グループに分けた上で、経時的に検討を行う。viability を trypan blue stain で、apoptosis 抑制効果を Annexin V を用いた flow cytometry、TUNEL 染色で検討を行い、survivin 遺伝子導入により DC の生存期間延長効果があるか検討する。

Group 1 : DC-survivin

Group 2 : DC-LacZ (β -galactosidase 遺伝子を導入 DC、negative control)

Group 3 : i-DC (非感染 DC)

(5) 膀胱癌細胞株（母細胞と抗癌剤耐性株の双方）に対する CTL 誘導能の検討。

① 膀胱癌細胞株（母細胞および抗癌剤耐性株）に対する細胞傷害活性の検討
健康者の採血を用いて in vitro で responder を自己 PBMC、stimulator を DC-survivin、DC-LacZ、naiveDC とし IL-2、IL-7 存在下に刺激し CTL を得る。survivin 発現膀胱癌細胞株（実験 I の抗癌剤により作製したものと実験 II で遺伝子導入により作製した母細胞および抗癌剤耐性株）を target とする。4 時間 ^{51}Cr -release assay で細胞傷害活性を測定し、下記グループ間での細胞傷害活性を比較検討する。抗癌剤耐性株にも細胞傷害活性が得られることを確認する。

Group 1 PBS のみ Group 2 DC-LacZ

Group 3 DC-survivin

②誘導された細胞傷害活性の解析

誘導した CTL の表面抗原を flow cytometry で検討する。また、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 MHC class I、抗 MHC class II 抗体を用いた antibody blocking assay にて MHC 拘束性および CTL の phenotype を解析する。また、Natural Killer 細胞 (NK) に感受性の高い K562 細胞を用いて NK 活性の影響を検討する。

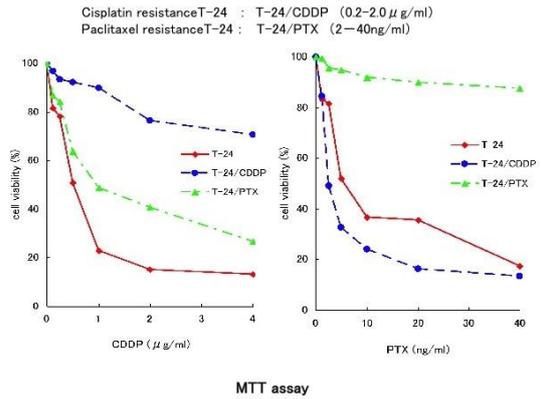
誘導した CTL から CTL クローンを樹立し、survivin 発現膀胱癌細胞株を対象として、IFN- γ release assay (ELISPOT)、IFN- $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ 、IL-12 の intracellular cytokine production assay (flowcytometry)、cytotoxic assay (^{51}Cr -release assay) 等を行い、survivin 特異的 CTL 応答を確認する。この細胞障害活性とクローンでない CTL の細胞障害活性を比較検討することにより、CD8 陽性細胞だけでなく CD4 陽性細胞も含めた細胞障害活性の相関につき検討する。

③DC への survivin 導入時期についての検討 survivin の DC への遺伝子導入により DC の生存期間延長効果が得られた場合、CTL を誘導する時期を survivin の遺伝子導入時期からずらしても、即時で CTL 誘導を行った時と同様の細胞障害活性が得られることを検討する

4. 研究成果

TAA 遺伝子導入を行うだけでなく、導入される DC の機能改変も行うというアプローチは新しい取り組みであると考えている。survivin 遺伝子は TAA であり、障害活性が得られると同時に DC の機能改変が同時に行えるという観点から有意なツールであることが今回の研究で示された。いかに具体的な結果を示す。

(1) 各種膀胱癌細胞株における survivin の発現の確認、抗癌剤耐性株の作製と survivin 発現増強の検証①膀胱癌だけでなく各種泌尿器癌細胞株から RT-PCR で mRNA、western blot でタンパク発現を確認した。どの細胞株でも survivin の発現を認めた。しかしその発現強度においては有意差を認めなかった。②T-24 を用いて低濃度の抗癌剤 (cisplatin、Paclitaxel) 存在下で培養しそれぞれの抗癌剤耐性 T-24 (T-24-CDDPR、T-24-PTXR) を作製した。抗癌剤耐性能を MTT assay で確認し、薬剤耐性であることを確認した。survivin の mRNA、タンパク発現レベルを確認したが、耐性獲得前の細胞株の発現レベルと有意差はなく、survivin によらない耐性獲得が類推された。この耐性株は最近樹立されたものであり、今後詳細に検討を加える予定である。



(2) survivin 遺伝子導入による膀胱癌細胞株の抗癌剤耐性化についての検討

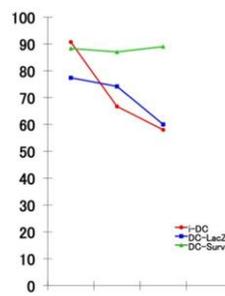
① survivin 発現アデノウイルスベクターの作製をおこなった。これを T-24 に遺伝子導入を行ったが、十分なウイルス濃度が得られないためか、survivin の発現増強を認めなかった。また、遺伝子導入による細胞の生存率が低くなった。また、癌細胞のためか survivin の導入効率が悪く、抗癌剤の耐性の獲得にまで至っていない。今後ウイルス濃度含めベクターと至適導入 MOI を調整中である。

(3) アデノウイルスベクターによる DC への survivin 遺伝子の導入と発現についての検討を行った。

遺伝子導入により survivin の発現を RT-PCR、western blot で確認した。発現効率と生存率の高さから DC への遺伝子導入の至適導入 MOI を 100 とした。

(4) survivin 遺伝子導入で DC の生存期間、生存率の延長が得られるかについての検討

β -galactosidase 遺伝子を導入 DC : DC-LacZ、非感染 DC (i-DC)、に比して survivin 遺伝子導入 DC の生存率の改善を trypan blue staining で確認した。Annexin V を用いた flow cytometry、TUNEL 染色でも同様の結果であった。



(5) 膀胱癌細胞株 (母細胞と抗癌剤耐性株の双方) に対する CTL 誘導能の検討

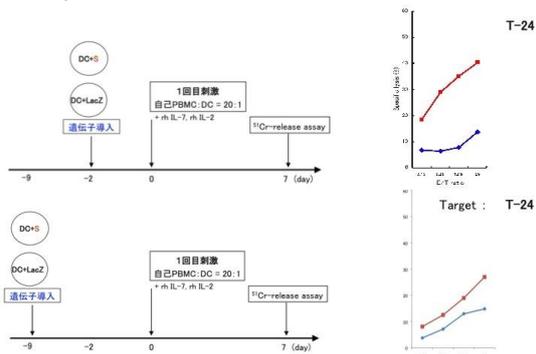
①膀胱癌細胞株 (母細胞および抗癌剤耐性株) に対する細胞傷害活性の検討

膀胱癌細胞株 T-24 に対してコントロールに

比して高い障害活性 (E/T 比 25 で 40%) を認めた。

抗がん剤耐性株に対しては、現在検討中である。②誘導された細胞傷害活性の解析 誘導された障害活性については抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 MHC class I、抗 MHC class II 抗体を用いた antibody blocking assay を行い、MHC class I 拘束性、CD 8 優位な障害であることを認めた。

③DC への survivin 導入時期についての検討 CTL を誘導する時期を survivin の遺伝子導入時期から 1 週間ずらしても行ったが、即時で CTL 誘導を行った時に比べて強度は落ちるものの高い細胞障害活性が得られることを認めた。



今後の展望 survivin 遺伝子導入による癌細胞株の抗がん剤耐性化の検討と作製した細胞に対する細胞障害活性の検討を行う。さらに将来的には臨床応用に向けた研究を追加研究で行う予定にしている。

5. 主な発表論文等

学会発表

①藤井 令央奈 第 32 回癌免疫外科研究会 泌尿器科領域における遺伝子免疫治療の基礎的研究 平成 23 年 5 月 20 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 令央奈 (Reona Fujii)
和歌山県立医科大学 医学部 博士研究員
研究者番号 : 30326468

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号 :