

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22791813

研究課題名(和文) 内因性アジュバントを用いた新規口腔癌治療ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of novel vaccine for oral cancer utilizing endogenous adjuvant

研究代表者

太田 里永子(Ohta, Rieko)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30452460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：膜型ムチンMUC1は、腫瘍細胞表面に存在し、癌の標的として注目されている。また、C3dは、補体第3成分の分解産物で、アジュバント様に作用する。本研究では、MUC1にC3dを繋げたMUC1-C3dワクチンを開発し、その効果を解析した。マウスモデルにおいては、MUC1-C3d投与により、MUC1に対する抗体及び、IFN- $\gamma$ 産生細胞を誘導できた。ヒトにおいても、末梢血リンパ球に添加することで腫瘍に対するCD8陽性細胞を誘導できた。これらより、MUC1-C3dは、効率の良いアジュバントとして働き、癌に寛容になっている癌患者において抗体応答のみならず細胞性免疫を誘導できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：MUC1 is a transmembrane glycoprotein normally expressed on epithelial cells. On many types of cancer cell, MUC1 is overexpressed and aberrantly glycosylated, making MUC1 a potential target for cancer immunotherapy. C3d, the final degradation product of the third complement component (C3), can function as a natural adjuvant. We investigated whether a MUC1-C3d fusion protein could enhance MUC1 immunogenicity and break tolerance to MUC1 in MUC1 transgenic mice. Immunization with MUC1-C3d elicited an IgG response and a strong T cell response. In comparison, only a very weak response was seen in mice immunized with MUC1. Furthermore, in human, the treatment of MUC1-C3d to PBMCs resulted in the induction of higher percentage of CD8+ T cells. Thus, C3d functions as an effective molecular adjuvant when linked to a cancer associated self antigen, and may help break MUC1 tolerance in cancer patients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：口腔癌 補体 ワクチン アジュバント MUC1

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は、我が国における死亡原因の約3割を占め、増加の一途を辿っており、さらに高齢化社会の進展に伴い、癌好発年齢の人口が著しい増加を示している。現在の癌治療は、外科的治療あるいは放射線治療が主であると同時に、化学療法も適応される。しかしながら、放射線療法や化学療法では、癌細胞がこれらの治療に対して耐性を獲得するということや、強い副作用が報告されている。特に、口腔癌治療においては、形態及び機能の温存が患者にとっての精神的及び身体的負担を大きく軽減するため、副作用が少ない新たな癌治療法の開発は、国民の健康の維持増進を図る上で重要な課題である。

粘液の主成分で高分子糖蛋白質ムチン MUC1 は大腸癌、前立腺癌、膵臓癌、乳癌などにおいてその過剰発現が高頻度にみられ、MUC1 発現が腫瘍の増殖性及び転移性に寄与し、悪性度と強く相関している。また、MUC1 は腫瘍細胞の細胞表面に存在し、正常組織では細胞表面での発現量が少なく、腫瘍細胞と正常組織とでは糖鎖付加パターンが異なることから癌の分子標的療法のターゲットとして注目されている。

近年、乳癌や膵臓癌患者において血中の抗 MUC1 抗体レベルが高い患者ほど生存率が有意に高いということから、MUC1 抗原断片をワクチンとして用いるなど、抗 MUC1 抗体による癌治療の可能性が示唆され、抗体免疫療法の標的として国内外で研究されている。また、癌患者の細胞性免疫応答について、腫瘍特異的な細胞障害性 T 細胞 (CTL) の頻度が低い要因の一つに、腫瘍細胞上の主要組織適合遺伝子複合体 MHC クラス I の発現が低下していることがあげられる。養子免疫療法のように、患者から摘出した自家腫瘍を抗原にして、末梢血リンパ球 (PBMC) から腫瘍特異的な CTL が誘導できたとしても、腫瘍細胞上に MHC クラス I が発現していなければ、細胞障害を起こすことはできない。ところが、MUC1 抗原の特徴として、MHC クラス I 非拘束的に CTL を誘導できることが報告されており、たとえ腫瘍細胞上の MHC クラス I の発現が低下していても、MUC1 に対する MHC class I 非拘束性 CTL を誘導できれば、MUC1 を発現している腫瘍細胞に直接、細胞障害を与えることが出来ると考えられる。そこで、癌患者の PBMC に MUC1 抗原を加えて刺激することにより、CTL を誘導しようという試みが国内外で行われている。MUC1 抗原は、腫瘍抗原として液性免疫 (抗体誘導) のみならず、細胞性免疫の有力な標的になりうると思えるが、未だ、効率の良い免疫誘導法は確立されていない。

一方、補体成分 C3 は、自然免疫の中心である補体成分の一つで、その C3 の断片 C3d はアジュバント様に作用する。Ross TM らは、目的のタンパク質に内因性 C3d を繋げることで、効率よく補体レセプターを持つ細胞に認識され、目的のタンパク質に対する抗体産生

能を最大 10,000 倍に増強し、その上、抗体の結合能も上昇させる事を報告している。また、腫瘍細胞上の補体活性化は、腫瘍特異的な抗体産生の誘導のみならず、細胞性免疫の増強 (T 細胞応答の誘導) にも関与している事を我々は明らかにしている。

### 2. 研究の目的

口腔癌患者において、腫瘍組織に口腔癌特異的な腫瘍抗原が発現しているにもかかわらず、腫瘍に対する抗体価は低く、腫瘍特異的な細胞障害性 T 細胞 (CTL) の頻度は低い。そこで、内因性アジュバント C3d を用いた口腔癌特異的な MUC1 抗原の新規ワクチンを作成し、その効果を検証することを目的とした。

(1) MUC1-C3d ワクチンを作成する。

(2) MUC1-C3d ワクチンは MUC1 抗体産生を誘導できるか検討する。

(3) MUC1-C3d ワクチンにより MUC1 発現口腔癌を特異的に破壊する CTL を誘導できるか検討する。

### 3. 研究の方法

(1) MUC1-C3d 融合タンパク質の遺伝子構築  
MUC1 のタンデムリピート (TR) は、抗体のエピトープ部位であり、また、CTL により直接認識される部位でもある。この TR 部位 5 つ (一つのリピートは 20 アミノ酸) は人工遺伝子合成により作成した。マウス C3d の発現ベクターは、アメリカ University of Pittsburgh の Ted M Ross 准教授から供与された。ヒト C3d は、C3 産生細胞 (PMA 40 nM で 3 日間刺激した U937 細胞) より mRNA を抽出し、cDNA を合成後、C3d 特異的なプライマーで C3d を増幅し、ヒト C3d の cDNA をクローニングした。C3d を 3 個、人工的にリンカーで繋ぐために、C3d をリンカー配列の合成 DNA と共にライゲーションを行った。MUC1 と C3d をリンカーで繋いだ MUC1-C3d を、オーバーラップ PCR 法により発現ベクターに構築した (図 1)。

(2) MUC1-C3d 融合タンパク質の精製

作製したマウス型及びヒト型 MUC1-C3d 発現ベクターを、リポフェクトアミンを用いて、COS7 細胞に遺伝子導入し、目的のタンパク質分子が発現したどうかをウエスタンブロット法により確認した。その後、陰イオン交換クロマトグラフィーにより、HiTrap DEAE FF を用いて、目的のタンパク質を精製した。

(3) *in vivo* マウスモデルでの MUC1-C3d の効果の解析

精製した MUC1 及び MUC1-C3d を 500 pmol、MUC1 トランスジェニックマウスの皮下に投与した。4 週間後、同量を追加免疫し、その一週間後に血清を回収した。さらに 10 週目に同量の MUC1 及び MUC1-C3d を投与し、その一週間後に、採血及び脾臓細胞を採取した。血清の MUC1 に対する抗体価は、MUC1 タンパ

ク質を用いた酵素抗体法 (ELISA) で測定した。MUC1 発現腫瘍細胞に対する細胞障害活性は、脾臓細胞を用いて、IFN- $\gamma$  を産生する細胞を検出するエリスポット法 (ELISPOT) で解析した。

(4) MUC1 に対する抗体価の測定 (ELISA) 96 穴プレートに、精製した MUC1 を添加し、4 度で一晩、固相化した。PBS で洗浄後、BSA 入りの PBS でブロッキングを行い、洗浄した。調べるマウスの血清を添加し、洗浄後、ペルオキシダーゼ酵素標識した抗マウス IgG 又は IgM 抗体を添加した。SIGMA FAST OPD tablet により発色させ、OD492 を測定した。

(5) MUC1 に対する CTL 活性の測定 (ELISPOT) マウスの脾臓を採取し、赤血球溶血処理後、脾臓細胞  $1 \times 10^6$  個を、抗 IFN- $\gamma$  抗体をコートした ELISPOT 用の 96 穴プレートに加えた。標的細胞として、E0771 細胞又は、E0771/MUC1 細胞を  $1 \times 10^4$  個加えた。20 時間、37 度、5%CO<sub>2</sub> でインキュベート後、biotinylated anti-mouse IFN- $\gamma$  を 2 時間反応させた。Streptavidin-HRP を加え、一時間反応させた後、AEC substrate で発色させた。プレートは乾燥後、スポットの数を計算した。

(6) MUC1-C3d がヒト末梢血リンパ球に与える効果の検討

健康人より採血後、比重遠心分離法により末梢血リンパ球 (PBMC) を分離し、精製した MUC1-C3d を添加した CTL 培養用培地で培養した。2 週間後、どのような細胞が増えてきたか解析した。コントロールとして、MUC1 のみを添加した培地で培養した細胞を用いた。また、MUC1-C3d 添加により増殖してきた CD8 陽性細胞を分取し、MUC1 発現細胞を認識するかどうかを ELISPOT 法により解析した。

#### 4. 研究成果

MUC1-C3d ワクチンは、MUC1 タンデムリピート (TR) と、C3d を 3 つ、(リンカーで繋げた形で設計した。C3d は、血清中の補体成分 C3 の分解産物であり、アジュバント様に作用するため、MUC1 抗原と C3d を 3 つ繋げることで、さらに MUC1 の免疫原性を増強できると考えられる。遺伝子工学技術により、マウス型とヒト型の両タイプの MUC1-C3d 発現ベクターを構築した (図 1)。対照として MUC1 のみ発現する発現するベクターも作成した。

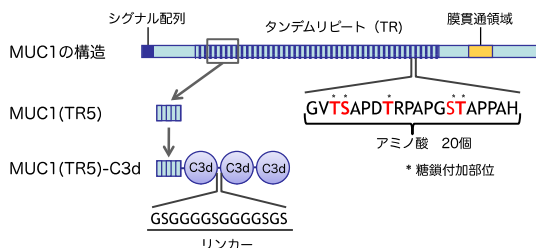


図 1 MUC1 と MUC1-C3d ワクチン

それぞれのベクターを COS7 細胞へ遺伝子導入を行い、培養上清から、DEAE FF カラムを用いて、それぞれのタンパク質を精製した。MUC1 に対する抗体 BCP8 を用いて、ウエスタンブロッティングを行ったところ、MUC1 (TR5) を遺伝子導入した場合、約 20kDa のバンドが検出された。また、MUC1 (TR5)-hC3d と MUC1 (TR5)-mC3d については、どちらも約 120kDa のバンドが検出された (図 2)。

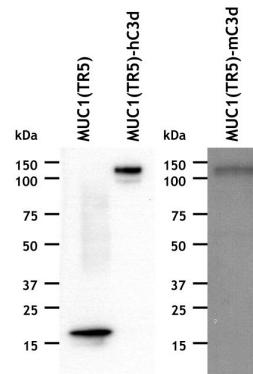


図 2 精製後 MUC1-C3d 融合タンパク質

次に、MUC1-C3d の免疫増強効果を調べるために、ヒト MUC1 トランスジェニックマウス (C57BL/6 系統) に、精製した MUC1-C3d を皮下に投与し、免疫応答を解析した。初回免疫より 4 週間後に 2 回目の免疫を行い、その一週間後の血清中の MUC1 に対する抗体を、ELISA 法により検出した (図 3)。

免疫前の血清において、MUC1 に対する IgG は検出されなかったが、IgM 抗体は、わずかに検出された。2 回免疫後 (5 週目) には、IgG 抗体と IgM 抗体共に検出されたが、MUC1-C3d を投与した群では、MUC1 を投与した群と比べて、有意に IgG 抗体価が上昇した ( $P=0.026$ )。一方、IgM 抗体価は、MUC1-C3d と、MUC1 を投与した群と比べて、有意な差はなかった。また、初回免疫より 10 週後にも追加免疫を行い、その一週間後 (11 週目) に採血をし、抗体価を測定した。IgM 抗体価

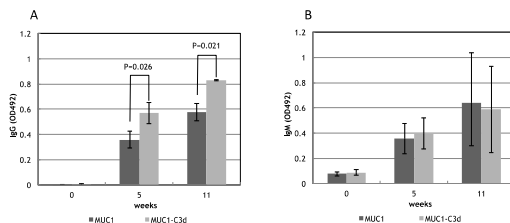


図 3 MUC1-C3d の液性免疫応答に与える影響

は、5 週目の血清と同様、MUC1-C3d と、MUC1 を投与した群と比べて、有意な差はなかったが、IgG 抗体価は、MUC1-C3d を投与した群では、MUC1 を投与した群と比べて、有意に IgG 抗体価が上昇した ( $P=0.021$ )。

次に、作成したワクチンが、T 細胞応答を誘導できるかどうかを検討した。最終免疫よ

り一週間後(11週目)に、脾臓細胞を取り出し、細胞障害活性を測定した。標的細胞には、MUC1又はベクターのみを遺伝子導入したE0771を用い、脾臓細胞と混合培養することで、IFN- $\gamma$ を産生する細胞をELISPOT法で検出した(図4)。MUC1で免疫した群に比べ、MUC1-C3dで免疫した群では、MUC1/E0771に対し、非常に強い応答が認められた( $p=0.003$ )。しかし、その応答は、E0771/mockに対しても確認されたため、MUC1-C3dは、MUC1に対してだけでなく、宿主の細胞性免疫を増強させる効果があると考えられた。

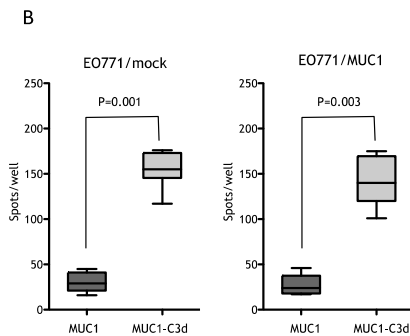


図4 MUC1-C3dの細胞性免疫応答に与える影響

ヒトにおいても細胞性免疫応答を誘導できるかどうか検討した。MUC1-C3dを添加して培養したPBMCは、フローサイトメトリー法により解析したところ、39.6%のCD8陽性細胞が認められたのに対し、MUC1のみを添加した培地では、26.2%と、何も添加しない培地で培養した場合(27.4%)と同等であった。また、全体の細胞数は、MUC1-C3dを添加して培養したPBMCでは、MUC1のみ添加して培養したPBMCに対して、1.78倍と増加していた。次に、MUC1-C3dを添加して培養したPBMCよりCD8陽性細胞を分取した。検体とHLAが適合した口腔癌細胞がなかったため、ヒト乳癌細胞株であるMCF7と共培養し、IFN- $\gamma$ の産生をELISPOT法により解析した。MUC1-C3dで刺激したPBMC由来のCD8陽性細胞は、MUC1で刺激したPBMC由来のCD8陽性細胞より、1.7倍のIFN- $\gamma$ の産生細胞が認められた(図5-A)。

これらIFN- $\gamma$ の産生細胞が、MUC1に対して特異的な細胞かどうかを確認するために、MUC1を発現したLCL(Epstein-Barr virus transformed B lymphoblastoid cell line)を作成した。作成したMUC1発現LCL(LCL-MUC1)を標的細胞に、分取したCD8陽性細胞をエフェクター細胞にして、IFN- $\gamma$ の産生をELISPOT法により解析したところ、MUC1を発現していないLCLに対して、LCL-MUC1を標的細胞にした場合は、1.7倍のIFN- $\gamma$ の産生細胞が認められた(図5-B)。

今回の我々の結果は、C3dが癌抗原MUC1と融合させることで効率の良いアジュバントとして働き、癌に免疫寛容になっている癌患者において、抗体応答及び細胞性免疫の両方を誘導できる可能性を示した。特に抗MUC1

抗体レベルが生存率に大きく関わるので、

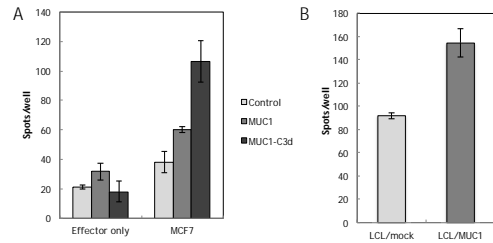


図5 MUC1-C3dの細胞性免疫応答に与える影響  
C3dを付加することで抗体産生が8倍上昇した我々の結果は、将来、癌治療に貢献できる可能性が示唆されたと考える。

## 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5件)

Ohta R, Imai M, Kawada J, Kimura H, Ito Y. Interleukin-17A-producing T lymphocytes in chronic active Epstein-Barr virus infection. *Microbiol Immunol* 2013,57:139-144. 査読有 DOI:10.1111/1348-0421.12010

Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A. Human herpesvirus 6-associated encephalopathy in a child with dravet syndrome. *Neuropediatrics* 2013,44:155-158. 査読有 DOI: 10.1055/s-0032-1327772

Murakami Y, Inoue N, Shichishima T, Ohta R, Noji H, Maeda Y, et al. Deregulated expression of HMGA2 is implicated in clonal expansion of PIGA deficient cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2012,156:383-387. 査読有 DOI:10.1111/j.1365-2141.2011.08914.x

Ohta R, Torii Y, Imai M, Kimura H, Okada N, Ito Y. Serum concentrations of complement anaphylatoxins and proinflammatory mediators in patients with 2009 H1N1 influenza. *Microbiol Immunol* 2011,55:191-198. 査読有 DOI: 10.1111/j.1348-0421.2011.00309.x

Ito Y, Torii Y, Ohta R, Imai M, Hara S, Kawano Y, et al. Increased levels of cytokines and high-mobility group box 1 are associated with the development of severe pneumonia, but not acute encephalopathy, in 2009 H1N1 influenza-infected children. *Cytokine* 2011,56:180-187. 査読有 DOI:10.1016/j.cyto.2011.07.016

[学会発表](計6件)  
Ohta R, Ando F and Imai M. Enhancement

of anti-tumor immunity by MUC1-C3d fusion protein. 第 42 回日本免疫学会 学術集会 2013 年 12 月 11 日～13 日 幕張メッセ(千葉県)

太田里永子, 神田輝, 安藤史代, 今井優樹. ヒトにおける MUC1-C3d ワクチンのアジュバント効果の解析. 第 50 回補体シンポジウム 2013 年 7 月 5 日～6 日 国立大学法人旭川医科大学(北海道)

Imai M, Ohta R and Okada N. Enhancing antibody immunotherapy by orally administered herbal medicine Juzen-taiho-to. 第 41 回日本免疫学会 学術集会 2012 年 12 月 5 日～7 日 神戸国際会議場(兵庫県)

今井優樹, 太田里永子, 岡田則子. 口腔癌に対する抗 MUC1 モノクローナル抗体の抗腫瘍活性と補体制御膜因子の影響. 第 49 回補体シンポジウム 2012 年 8 月 24 日～25 日 大阪府立成人病センター(大阪府)

太田里永子, 伊藤嘉規, 鳥居ゆか, 木村宏, 岡田則子, 今井優樹. H1N1 インフルエンザの重症化における補体アナフィラトキシン及び HMGB1 の関与. 第 48 回補体シンポジウム 2011 年 9 月 2 日～3 日 名古屋市立大学医学部(愛知県)

Imai M, Ohta R, Okada N. Serum concentrations of complement anaphylatoxins and proinflammatory mediators in patients with 2009 H1N1 influenza. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 27 日～29 日 幕張メッセ(千葉県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

太田 里永子 (OHTA RIEKO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：30452460