

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：30107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24501332

研究課題名(和文)炎症関連大腸がんの発がんに対するMIFワクチン療法の開発

研究課題名(英文)Development of MIF vaccine therapy against inflammation-related colon carcinogenesis

研究代表者

小山 芳一 (Koyama, Yoshikazu)

北海学園大学・工学部・教授

研究者番号：90186841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：MIF DNAワクチンは腸炎を含む多くの炎症モデルにおいて予防・治療効果を示す。ワクチンには抗MIF自己抗体を誘導するために破傷風毒素(TTX)型ヘルパーTエピトープを組み込んである。本研究では新たに卵白アルブミン(OVA)、卵白リゾチウム(HEL)、さらに破傷風毒素TET830をエピトープとする新規MIFワクチンを作製した。一方、炎症誘発大腸がんモデルではMIFの発現に各種サイトカイン(IL-4、IL-17a、GM-CSF)やケモカイン(CCL12、CCL20)、MMP3の発現が呼応することが確認された。初期型MIF-DNAワクチンを接種したところ、発がん抑制効果が再現良く確認できた。

研究成果の概要(英文)：MIF DNA vaccine shows a preventive and therapeutic effect in a number of models of inflammations, including enteritis. For induction of anti-MIF auto-antibody, the vaccine incorporates a helper T epitope, a peptide fragment (TTX) from the tetanus toxin. In the present study, a new series of MIF vaccine were prepared that employed epitopes from ovalbumin (OVA), egg white lysozyme (HEL), and tetanus toxin (TET830). On the other hand, it has been confirmed that, in inflammation-induced colon cancer model, the expression of various cytokines (IL-4, IL-17a, GM-CSF), chemokines (CCL12, CCL20) and MMP3 is concord with that of MIF. Upon inoculation with the initial type MIF-DNA vaccine, carcinogenesis inhibitory effect could be confirmed with good reproducibility.

研究分野：生化学

キーワード：ワクチン療法 抗自己サイトカイン IBD MIF 発がん

1. 研究開始当初の背景

(1) 潰瘍性大腸炎はクローン病と共に難治性の炎症性腸疾患 (IBD) であり、高率に大腸がんを合併する原因不明の慢性炎症疾患である。

(2) 現在抗腫瘍壊死因子 (TNF)- 抗体 (レミケード) を用いた受動的抗体療法 (抗体を患者に投与) が施行され、一定の効果が認められているが、薬剤としての抗体の半減期の短さやアナフィラキシーショック等の有害反応の問題が指摘されている。

(3) 申請者の提唱する能動的抗体療法 (ワクチン療法) は、自己サイトカインに対する中和抗体の産生をワクチン技術により生体内で誘導し、標的サイトカインの機能を抑えることで病態を制御する治療法である。

(4) マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は TNF- 同様炎症の増悪因子として働く。申請者は自己 MIF の免疫原性を著しく高めた改変 MIF タンパク質を新たにデザインし、改変 MIF タンパク質をコードする発現プラスミド DNA を用いた MIF に対するワクチン療法を考案した。この療法により IBD だけでなく他の難治性慢性・急性炎症モデル (関節リウマチ、骨粗鬆症、アトピー性皮膚炎、敗血症) においても顕著な炎症抑制が見られることを報告してきた。MIF はがんの発生と進展に積極的な役割を果たしていることがわかっており、MIF ワクチンにより MIF 中和抗体を誘導することが出来れば、IBD の治療やその後の大腸がんの予防が期待できる。

2. 研究の目的

近年増加の潰瘍性大腸炎はびらんや潰瘍を形成する原因不明の大腸のびまん性非特異性炎症であり、長期経過例では炎症を母地とした大腸がんを発症する。申請者はこれまで炎症性腸疾患を含む種々の炎症モデル動物にマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) に対する DNA ワクチンを投与し、予防のみならず治療法としての有効性を実証した。本研究では ワクチンの大腸がん発症抑制効果の実証、従来型ワクチンの改良、アジュバントの導入を行い、その研究基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大腸発がん誘導と MIF DNA ワクチン接種

C57BL/6 マウスに Hydrodynamic gene delivery 法を用いて MIF-DNA ワクチン (従来型破傷風毒素 (TTX) Th エピトープ: FNNFTVSFWLRVDPKVSASHLE、100 microgram) を接種した。ワクチン接種 4 週後に AOM (10 mg/kg) 腹腔内投与し、さらにその 1 週間後に、1% DSS の反復投与を開始した (1% DSS を含む飲水で 7 日間飼育し、

その後の 7 日間 DSS を含まない飲水で飼育するのを 1 サイクルとして、3 サイクル行った)。

(2) 体重測定

前述のマウスの体重を DSS 投与開始後からおこなった。

(3) リアルタイム PCR

大腸発がんを誘発したマウスの大腸の肛門から 1 cm の部分を 5 mm 四方切除し、RNA を抽出した。定法にしたがって cDNA を作成し、リアルタイム PCR 法により、種々のサイトカインの発現量を測定した。

(4) 腫瘍の検出

DSS 投与開始後 70 日にマウスを安楽死させ、大腸を回収した。腸管長方向に沿って切れ目をいれ展開し、実態顕微鏡下に腫瘍数を目視により測定した。

(5) 新規 MIF-DNA ワクチンの作製

マウス MIF cDNA を組み込んだ動物細胞発現プラスミド pCDNA3.1 を用い、表 1 に示すペプチドをコードする DNA 断片を 2 番目のループ領域へ置換・挿入した。すなわち、Th エピトープをコードする DNA は 3' 側で部分的に重複するオリゴ DNA をアニールし、Klenow 酵素で二重鎖にして pCDNA3.1/MIF (DV102) の相当する位置に置換挿入した。シーケンス解析で配列やフレームに問題がないことを確認、この変異 MIF DNA 断片を哺乳動物発現プラスミド pCAGGS にクローニングした。遺伝子導入用プラスミドはアルカリ法 CsCl 密度勾配遠心法で精製した。COS7 サル腎細胞に遺伝子導入後、細胞抽出液のウェスタンブロッティングで約 15k のバンドが抗 MIF 抗体で検出されることを確認した。さらにマウスへは試験的に TET830 型ワクチンをエレクトロポレーションで遺伝子導入、その後定期的に採血し抗 MIF 抗体価を ELISA で測定した。

表 1 Th エピトープと MHC 拘束性

Th エピトープ	アミノ酸配列	H2 拘束
TTX (現行)	FNNFTVSFWLRVDPKVSASHLE	普遍的
OVA (新規)	QAVHAAHAEINE	H2d
HEL (新規)	SALLSSDITASVNCA	H2k
TET830 (新規)	AQYIKANSKFIGITEL	普遍的

4. 研究成果

(1) 大腸癌発生に伴う MIF mRNA 発現上昇と発がん促進性サイトカインの発現上昇

大腸発がん誘導 70 日前後をピークとした大腸における MIF の発現に呼応してサイトカイン (IL-1b、IL-4、IL-17A、GM-CSF)、ケモカイン (CCL12、CCL20) や MMP3 の発現がピークに達していた。

## (2) MIF-DNA ワクチン接種による大腸発がん抑制作用

MIF-DNA ワクチン接種により、腫瘍の数は有意に減少した(図1)。一方、MIFは抗アポトーシス作用により、腸管上皮の傷害に対して抵抗していることが示唆される。しかしMIF-DNA ワクチンによるMIFの中和が、体重減少を指標にした大腸炎症を増悪しなかった。

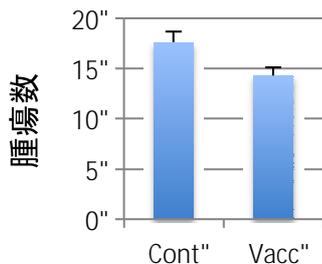


図1 MIFワクチンによる腫瘍数抑制

Cont(n=8), Vacc(n=32)  $p < 0.03$

## (3) 新規 MIF-DNA ワクチンの作製とマウスにおける抗自己抗体の誘導

従来のマウス MIF DNA ワクチンのデザインを基に新規 MIF-DNA ワクチンを新たに3種類作成した。(表1)。用いた Th エピトープは破傷風毒素(TTX)、卵白アルブミン(OVA)、卵白リゾチウム(HEL)、さらに破傷風毒素に関しては活性を増強することが知られている TET830 である。このうち、TET830 型 MIF ワクチンをマウスに投与、経時的に採血し ELISA にて測定したところ、投与後5週目に抗 MIF 活性の上昇を認めた。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計7件)

Hori, T., Kuribayashi, K., Saito, K., Wang, L., Torii, M., Uemoto, S., Kato, T. (2015) Alloantigen-specific CD4+ regulatory T cells induced in vivo by ultraviolet irradiation after alloantigen immunization require interleukin-10 for their induction and activation, and flexibly mediate bystander immunosuppression of allograft rejection. *Transplant Immunology*, in press. 査読有り、DOI:10.1016/j.trim.2015.03.004.

Hori, T., Kuribayashi, K., Saito, K., Wang, L., Torii, M., Uemoto, S., Iida, T., Yagi, S., Kato, T. (2015) Ultraviolet-induced alloantigen-specific immunosuppression in transplant immunity. *World journal of*

*transplantation* 5, 11-8. 査読有り、DOI: 10.5500/wjt.v5.i1.11.

Nishikawa, K., Seo, N., Torii, M., Ma, N., Muraoka, D., Tawara, I., Masuya, M., Tanaka, K., Takei, Y., Shiku, H., Katayama, N., Kato, T. (2014) Interleukin-17 Induces an Atypical M2-Like Macrophage Subpopulation That Regulates Intestinal Inflammation. *PLoS one* 9, e108494. 査読有り、DOI: 10.1371/journal.pone.0108494.

Hori, T., Kuribayashi, K., Saito, K., Wang, L., Torii, M., Uemoto, S., Kato, T. (2014) Induction of alloantigen-specific CD4+ T regulatory Type 1 cells by alloantigen immunization and ultraviolet-B irradiation: a pilot study in murine transplantation models with skin and cardiac allografts. *Ann Transplant* 19, 519-536. 査読有り、DOI:10.12659/AOT.890890.

Muraoka, D., Nishikawa, H., Noguchi, T., Wang, L., Harada, N., Sato, E., Luescher, I., Nakayama, E., Kato, T., Shiku, H. (2013) Establishment of animal models to analyze the kinetics and distribution of human tumor antigen-specific CD8(+) T cells. *Vaccine* 31, 2110-2118. 査読有り、DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.02.056.

Kato, T., Tada-Oikawa, S., Wang, L., Murata, M., Kuribayashi, K. (2013) Endocrine disruptors found in food contaminants enhance allergic sensitization through an oxidative stress that promotes the development of allergic airway inflammation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 273, 10-18. 査読有り、DOI:10.1016/j.taap.2013.08.029.

Hirayama, M., Nishikawa, H., Nagata, Y., Tsuji, T., Kato, T., Kageyama, S., Ueda, S., Sugiyama, D., Hori, S., Sakaguchi, S., Ritter, G., Old, L. J., Gnjatic, S., Shiku, H. (2013) Overcoming regulatory T-cell suppression by a lyophilized preparation of *Streptococcus pyogenes*. *European Journal of Immunology* 43, 989-1000. 査読有り、DOI: 10.1002/eji.201242800.

〔学会発表〕(計 15 件)

Linan Wang, Takuma Kato, Naohiro Seo, Sachiko Okamoto, Yasunori Amaishi, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, and Hiroshi Shiku. Efficacy and safety of T cells with CEA-specific chimeric antigen receptor for cancer immunotherapy. Cell Symposia, 2015/6/14~2015/6/16. Sitges, Spain.

Nishikawa K, Seo N, Torii M, Ma N, Muraoka D, Tawara I, Masuya M, Tanaka K, Takei Y, Shiku H, Katayama N, Kato T. Interleukin-17 Induces an Atypical M2-Like Macrophage Subpopulation That Regulates Intestinal Inflammation. World Immune Regulation Meeting IX, 2015/3/18~2015/3/21, Davos, Switzerland.

Linan Wang, Takuma Kato, Naohiro Seo, Sachiko Okamoto, Yasunori Amaishi, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, and Hiroshi Shiku. EFFICACY AND SAFETY OF T CELLS WITH CEA-SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR FOR CANCER IMMUNOTHERAPY. Keystone Symposia, 2015/2/18~2015/2/13, Banff, Canada

王立楠、加藤琢磨、瀬尾尚宏、岡本幸子、天石泰典、峰野純一、竹迫一任、珠玖洋。ヒトと同様の発現様式を示す癌胎児性抗原 (CEA) トランスジェニックマウスを用いた CEA 特異的キメラ抗原受容体導入 T 細胞輸注療法の有効性と安全性の検討。日本がん免疫学会、2014/7/30~2014/8/1、ひめぎんホール、松山。

Linan Wang, Takuma Kato, Naohiro Seo, Sachiko Okamoto, Yasunori Amaishi, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, and Hiroshi Shiku. EFFICACY AND SAFETY OF T CELLS WITH CEA-SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR FOR CANCER IMMUNOTHERAPY. 日本癌学会、2014/9/25~2014/9/27、パシフィコ横浜、横浜。

Linan Wang, Takuma Kato, Naohiro Seo, Sachiko Okamoto, Yasunori Amaishi, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, and Hiroshi Shiku. EFFICACY AND SAFETY OF T CELLS WITH CEA-SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR FOR CANCER IMMUNOTHERAPY. 日本遺伝子治療学会、2014/7/6~2014/7/8、慈恵医科大学、東京。

王立楠、加藤琢磨、岡本幸子、天石泰典、峰野純一、竹迫一任、珠玖洋、癌胎児性抗原 (CEA) を標的としたキメラ抗原受容体導入 T 細胞の有効性と安全性の検討、日本がん免疫学会、2013/7/3~2013/7/5、ANA クラウンプラザ宇部、宇部。

天池千咲、池田裕明、王立楠、加藤琢磨、岡本幸子、天石泰典、峰野純一、竹迫一任、珠玖洋、機能制御性キメラ抗原レセプター (CAR) 導入 T 細胞輸注療法の開発、日本癌学会、2013/10/3~2013/10/5、パシフィコ横浜、横浜。

王立楠、加藤琢磨、岡本幸子、天石泰典、峰野純一、竹迫一任、珠玖洋、癌胎児性抗原を標的としたキメラ抗原受容体導入 T 細胞輸注療法の有効性と安全性の検討、日本癌学会、2013/10/3~2013/10/5、パシフィコ横浜、横浜。

齋藤佳奈子、西川健一郎、榎屋正浩、伊野和子、馬寧、片山直之、珠玖洋、加藤琢磨、IL-17 involvement in shaping the tumor microenvironment that promotes early step of tumor metastas. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日 札幌

王立楠、加藤琢磨、岡本幸子、峰野純一、竹迫一任、珠玖洋、G1TR 副刺激伝達ドメインを有する抗癌胎児性抗原 (CEA) 特異的キメラ抗原受容体を発現する T 細胞の機能解析. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日 札幌

齋藤佳奈子、西川健一郎、榎屋正浩、伊野和子、馬寧、片山直之、珠玖洋、加藤琢磨、IL-17 involvement in shaping the tumor microenvironment that promotes early step of tumor metastasis. Keystone symposia 2012 年 5 月 23 日 Dublin, Ireland.

鳥井美江、西川健一郎、齋藤佳奈子、王立楠、珠玖洋、加藤琢磨、Anti-colitogenic but pro-tumorigenic function of IL-17A in colitis associated cancer. Keystone symposia 2012 年 5 月 23 日 Dublin, Ireland

渡部 淳、小山芳一、秦 英司、内田郁夫、近山之雄、菊 佳男、林 智人。Distribution of accessory gene regulator groups in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk in Japan. The World Congress on

Controversies, Debates & Consensus in  
Veterinary Medicine (CoVet). チェコ  
(プラハ). 2014年10月

Tomohito Hayashi, Yoshio Kiku, Fuyuko  
Tanabe, Kazue Sugawara, Eiji Hata,  
Kazuhiro Kawai and Yoshikazu Koyama,  
“ Establishment of a new ELISA system  
for detection of total Staphylococcus  
aureus-specific antibodies in bovine  
milk”, 31st World Veterinary  
Congress, September 2013, Prague,  
Czech Republic

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小山 芳一 (KOYAMA, Yoshikazu)  
北海学園大学・工学部・教授  
研究者番号：90186841

### (2) 研究分担者

加藤 琢磨 (KATO, Takuma)  
三重大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：60224515

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：