

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700992

研究課題名(和文)新規抗HSP90抗体を用いた抗腫瘍免疫療法の基盤研究

研究課題名(英文) Newly vaccine strategy with mAbs against heat shock protein 90 (HSP90) on surface of antigen presenting cell (APC)

研究代表者

水上 修作 (Shusaku, Mizukami)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：00508971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：抗HSP90抗体(6H8)は既知の抗体と異なり抗原提示細胞(APC)膜表面のHSP90を検出し、速やかに細胞内に取り込まれる。本研究は6H8を抗腫瘍療法に応用するために計画された。到達目標は固形腫瘍に対する「6H8-抗原複合体による抗腫瘍効果」及び「ワクチン効果の6H8による促進効果」が得られるかをモデル抗原、続いてヒトがん抗原を用いて検討することとした。しかし期間中に、6H8がFc依存性(抗原非依存性)にAPCに強い結合を示す性質を確認し、同性質を持たない抗HSP90抗体等の準備などに時間を要した。現在抗体やヒトがん抗原モデルの準備も進み、予定していた研究を行う目は立ちつつある。

研究成果の概要(英文)：Although HSP90 is a cytosolic molecular chaperone, our originally produced mAb 6H8 could detect cell surface HSP90 on APCs. As so far we reported, injection of 6H8 chemically conjugated with Ag (6H8-Ag) induced proliferation of adoptively transferred Ag specific CD8+T cells efficiently, compared with free Ag. Importantly those proliferation was dramatically enhanced by co-administration of free 6H8.

So I planned a project to confirm this phenomenon with solid tumor and human Ag model. But we found that 6H8's affinity was affected by Fc portion, due to it was an IgG2a Ab. Then, we prepared another cell surface HSP90 detectable IgG1 mAb and modified IgG1 type 6H8. Besides, we start immunization for Abs against STIP1 and HSC70, component of cell surface HSP complex in our hypothesis. Although, we couldn't carry out our original project enough so far, already mouse model for experiments with human Ag is available, so after finish the preparation of those Abs, we can restart our project.

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：熱ショックタンパク質 抗体 ワクチン 抗原提示細胞

## 1. 研究開始当初の背景

HSP(Heat shock protein)は様々なストレスに応答して発現する分子群であり、細胞内タンパク質の立体構造構築から輸送・分解に至るまでに広く関与している。抗腫瘍ワクチンは細胞にとって外来性タンパク質にあたり、抗原提示細胞(antigen presenting cell: APC)へはエンドソームなど細胞内小胞によって取り込まれる。これらの抗原はMHCクラスIIに提示されCD4陽性T細胞を活性化させるため、腫瘍に対する細胞傷害活性を持つCD8陽性T細胞(CTL)の誘導・活性化にはつながらない。CTLの誘導には抗原タンパク質を一度小胞から細胞質に運び出しMHCクラスI抗原提示経路に乗せる必要がある。この経路はクロスプレゼンテーションと呼ばれ、我々は近年その抗原の運び出しにHSP90が必須であることを明らかにした。

またHSP90はこれまで細胞質に局在するとされてきた。近年腫瘍細胞や神経細胞で細胞膜表面でのHSP90の発現について報告がなされていたがAPCについては詳細な検討が十分にはなされていなかった。我々は今回、免疫沈降法に適したより高力価の抗体を求めて新規HSP90モノクローナル抗体を作製した際に、これまでの定説に反し細胞膜表面HSP90を検出可能な抗体クローン(6H8)を得たためこれを用いて以下のような研究計画を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は新規抗HSP90抗体を抗腫瘍免疫療法に応用するための基盤研究を行うこととした。HSP90は、通常細胞質に存在するシャペロン分子であるが、新規抗HSP90抗体(6H8)は既知の抗体と異なり抗原提示細胞膜表面のHSP90を検出し、また速やかに細胞内に取り込まれる。本抗体は細胞膜表面HSP90の構造また生理的な意義を検討可能であるということでも有益なものであるが加えてこのような特性を持つことから抗原提示細胞への抗原導入に利用可能である。我々は6H8と抗原の複合体が抗原特異的CD8陽性T細胞の増殖・活性化を強く誘導することを確認しており、マウスモデルでは腫瘍の肺転移抑制効果も認めている。また、このT細胞の増殖・活性化は、6H8単体の同時投与により更に促進される。この効果は6H8に限らずいずれの抗体と抗原の複合体に対しても認められることがわかっており、このことは6H8が抗体療法の効果を普遍的に促進する可能性を示すものと考えた。

このようなことから研究期間内に6H8を用いた免疫療法の固形腫瘍への効果を検討し、またその後抗原を実際のヒトがん抗原に変

更して検討を続けることによりヒトへの応用の道筋をつけること目指して研究を開始した。

## 3. 研究の方法

研究目的に示した内容を達成するために我々はまず、平成24年度にモデル抗原OVAとC57BL/6マウスを用いて、固形腫瘍に対して「6H8-OVAワクチンによる抗腫瘍効果」及び「抗体依存性抗腫瘍免疫の6H8投与による促進効果」の2点が認められるかの検討を行うこととした。合わせて他の免疫方法との効果の比較も行うこととした。また、翌年度の実験に備えてヒトがん精巢抗原NY-ESO-1を用いた6H8-NY-ESO-1複合体の安定的精製条件、NY-ESO-1発現腫瘍の作製とその生着条件の検討を行うこととした。平成25年度には前出の点について抗原をヒトがん精巢抗原NY-ESO-1に、レシピエントをヒトのMHCであるHLA-A2を持つ遺伝子改変マウス(HLA-A2マウス)に変更して同様の検討を行うこととした。モデル抗原と比較して実際のがん抗原であるNY-ESO-1では腫瘍拒絶に十分な抗腫瘍効果を誘導するのはより困難であると考え、そのため6H8-NY-ESO-1投与によるCTL(細胞傷害性T細胞)誘導能の検討などは予め平成24年度中に行う予定とした。以下は当初研究計画の詳細である。

<平成24年度>

1.OVA発現固形腫瘍に対する6H8-OVAの抗腫瘍効果の検討C57BL/6マウスに6H8-OVA(10 $\mu$ g)を1週間おきに合計2回経静脈的に投与する。最終投与日から7日後にM05(OVA発現メラノーマ, 2x10<sup>5</sup>)をマウス背部皮内に接種し、腫瘍の増殖をOVA投与群と比較する。(予防モデル)C57BL/6マウス背部皮内にM05(2x10<sup>5</sup>)を接種し、当日から6H8-OVA(10 $\mu$ g)を1日おきに合計4回経静脈的に投与する。腫瘍の増殖をOVA投与群、無免疫群と比較する。(治療モデル)M05、6H8-OVAの投与日・投与量に関しては実験結果を見て再検討を行う可能性もある。

2.OVA発現固形腫瘍に対する抗体依存性抗腫瘍免疫の6H8投与による促進効果の検討まずC57BL/6マウスに抗OVA抗体-OVAの複合体と6H8の投与を行い、6H8の投与が抗OVA抗体-OVA複合体による抗腫瘍効果を促進するかを検討する。抗OVA抗体-OVA複合体は、抗OVA抗体とOVAタンパク質を混合して作製する。その後、ゲルろ過で分子量ごとに分離されたフラクションから、ウエスタンブロッティング法にて抗体(IgG)とOVA両者の含まれるフラクションを選定し、これを抗OVA抗体-OVA複合体として用いる。C57BL/6マウスに作製した抗OVA抗体-OVA複合体(1 $\mu$ g)と6H8(20 $\mu$ g)を経静脈的に投与する。同日、M05(2x10<sup>5</sup>)をマウス背部皮内に接種し、腫瘍

の増殖を抗 OVA 抗体-OVA 複合体単独投与群、無免疫群と比較する。MO5、6H8、抗 OVA 抗体-OVA 複合体の投与日・投与量に関しては実験結果を見て再検討を行う可能性もある。引き続きマウス個体内で抗 OVA 抗体を誘導し、この抗体と腫瘍由来の OVA を抗体-抗原複合体の材料とする実験系に移行する。C57BL/6 マウスに IFA(incomplete freund's adjuvant) と OVA タンパク質(1 µg)のエマルジョン (IFA+OVA)を 1 週間おきに合計 2 回皮下投与する。最終投与日から 7 日後に 6H8 (20 µg) を経静脈的に投与する。同日、MO5(2x10<sup>5</sup>)をマウス背部皮内に接種し、腫瘍の増殖を IFA+OVA 単独投与群、無免疫群と比較する。本実験と同時にマウス血清中の抗 OVA 抗体価の確認も行う。MO5、6H8、IFA+OVA の投与日・投与量に関しては実験結果を見て再検討を行う可能性もある。

3. 抗原として NY-ESO-1 を用いて 1. 2. の両実験を行うための準備 a. 6H8-NY-ESO-1 複合体作製方法の確立現在 6H8-OVA は 6H8 と既に製品化されているマレイミド化 OVA を用いて複合体を作製し、ゲルろ過により精製を行っている。抗原を NY-ESO-1 に変更した際にはこのような製品は無いため複合体の作製方法を変更しなければならない。そこで我々は、6H8-NY-ESO-1 の作製にはピオチン アビジンシステムを使用する。1 つのピオチンに 4 つのアビジンが結合するという特性から市販の試薬を用いて 6H8 をピオチン化 NY-ESO-1 をアビジン化する。その後両者を混合し複合体の作製を試みる。複合体はゲルろ過によって分子量毎に分離し、ウエスタンブロッティング法によって 6H8 と NY-ESO-1 両者の含まれるフラクションを選定し、これを 6H8-NY-ESO-1 として用いる。b. NY-ESO-1 発現腫瘍の樹立 6H8-NY-ESO-1 の抗腫瘍免疫効果の検討には NY-ESO-1 発現腫瘍が必要である。我々は既に NY-ESO-1 の CTL エピトープを提示可能な MHC クラス I であるヒト HLA-A2 を持つ HLA-A2 マウスから発がん物質メチルコラントレンを用いて腫瘍細胞 (HLA-A2 腫瘍) を樹立している。ここに NY-ESO-1 発現遺伝子をエレクトロポレーション法により移入し NY-ESO-1 発現腫瘍を作製する。作製後、同腫瘍細胞が NY-ESO-1 を発現していること、並びに *in vivo* において HLA-A2 マウスに生着し腫瘍塊を形成可能であることを確認する。c. 6H8-NY-ESO-1 による特異的 CTL 誘導能の検討 6H8-NY-ESO-1 を HLA-A2 マウスに投与し、特異的 CTL を誘導できるかの検討を行う。6H8-NY-ESO-1 (1, 10, 100 µg) を 1 週間おきに合計 2 回経静脈的に投与する。最終投与日から 7 日後にマウス脾臓を回収し、脾臓細胞を NY-ESO-1 の CTL エピトープペプチド存在下で 5 日間培養を行う。培養後の脾臓細胞を HLA-A2 と NY-ESO-1 の CTL エピトープペ

プチドの複合体特異的なテトラマー抗体及び抗 CD8 抗体で染色し、NY-ESO-1 特異的 CTL の誘導を確認する。コントロール群としては無免疫群と IFA と NY-ESO-1 の CTL エピトープペプチドのエマルジョン投与群を用いる。

<平成 25 年度>

1. NY-ESO-1 発現固形腫瘍に対する 6H8-NY-ESO-1 の抗腫瘍効果の検討 HLA-A2 マウスに 6H8-NY-ESO-1 を 1 週間おきに合計 2 回経静脈的に投与する。最終投与日から 7 日後に NY-ESO-1 発現腫瘍をマウス背部皮内に接種し、腫瘍の増殖を NY-ESO-1 投与群、無免疫群と比較する。(予防モデル) HLA-A2 マウス背部皮内に NY-ESO-1 発現腫瘍を接種し、当日から 6H8-NY-ESO-1 を 1 日おきに合計 4 回経静脈的に投与する。腫瘍の増殖を NY-ESO-1 投与群、無免疫群と比較する。(治療モデル) NY-ESO-1 発現腫瘍、6H8-NY-ESO-1 の投与量はそれまでの実験結果から決定する。NY-ESO-1 発現腫瘍、6H8-NY-ESO-1 の投与日に関しては実験結果を見て再検討を行う可能性もある。

2. NY-ESO-1 発現固形腫瘍に対する抗体依存性抗腫瘍免疫の 6H8 投与による促進効果の検討 HLA-A2 マウスに IFA と NY-ESO-1 タンパク質のエマルジョン (IFA+NY-ESO-1) を 1 週間おきに合計 2 回皮下投与する。最終投与日から 7 日後に 6H8 (20 µg) を経静脈的に投与する。同日、NY-ESO-1 発現腫瘍をマウス背部皮内に接種し、腫瘍の増殖を IFA+NY-ESO-1 単独投与群、無免疫群と比較する。本実験と同時にマウス血清中の抗 NY-ESO-1 抗体価の確認も行う。NY-ESO-1 発現腫瘍、IFA+NY-ESO-1 の投与量はそれまでの実験結果から検討する。NY-ESO-1 発現腫瘍、6H8、IFA+NY-ESO-1 の投与日に関しては実験結果を見て再検討を行う可能性もある。

#### 4. 研究成果

当該年度において予期せぬ抗体の性質を確認したため大幅に計画を変更せざるを得なかった。その性質とは 6H8 が IgG2a というサブクラス故に Fc 依存的に APC に強く結合していたというものである。そのため我々は 6H8 の代わりに IgG1 サブクラスでありまた APC 細胞膜表面 HSP90 を認識可能な 5H12 抗体を用いてこれまで 6H8 で行ってきた抗体及び細胞膜表面 HSP90 の性質の再確認を開始した。この 5H12 を用いた実験ではまず 5H12 が 6H8 同様に抗原提示細胞膜表面 HSP90 に結合することを確認した。また細胞膜表面 HSP90 の発現が CD64 (Fc レセプター I) に依存することなどこれまで 6H8 抗体を用いて確認してきた細胞膜表面 HSP90 の特性などについても検証を行った。5H12 は細胞膜表面 HSP90 を認識するものの 6H8 とは認識する HSP90 の部位が異なるため、6H8 とは異なる性質を持つことも予

測された。そのため IgG1 型の組換え 6H8 抗体の作製を試みた。同抗体については産生細胞の作製には成功した。現在十分な特異性を持つ抗体を効率よく産生する産生細胞の選択には至っていないため、このような細胞を得ることが今後の課題となっている。更に両者が奏功しなかった時に備えるため、先行して行われた免疫沈降等の実験で APC 細胞膜表面にて HSP90 に結合すると考えられた STIP1, HSC70 という両分子に対するモノクローナル抗体の作製も試みた。これらに関してはリコンビナントタンパク質と IFA を用いた免疫を既に終了し、免疫マウス脾臓細胞と骨髄腫細胞 (NS-1) の融合により得られた細胞 (ハイブリドーマ) の中からより抗力価で特異性が高い抗体を産生する細胞を選択する段階にある。

上記の理由のため、固形腫瘍に対する「6H8-OVA ワクチンによる抗腫瘍効果」「抗体依存性抗腫瘍免疫の 6H8 投与による促進効果」等本計画で予定していた検討課題に対して十分な検討を行うことはできなかった。しかしながら、現在上記抗体の準備が進んでおり、また並行して準備を行っていた NY-ESO-1 発現腫瘍の作製や生着条件の検討、HLA-A2 マウスの準備は完了している。そのため抗体の準備が完了すれば当初の目的にある検討課題を検討可能であると考え。なお研究代表者は平成 26 年 3 月をもって所属を変更したため、本研究は旧所属先において他研究者に引き継がれることとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

水上修作、他、抗原提示細胞膜表面 hsp90 を標的とした mAb を用いたワクチン開発の基盤的研究、第 16 回日本がん免疫学会学術集会・総会、2012 年 7 月、札幌

水上修作、他、抗原提示細胞膜表面 hsp90 を標的とした mAb を用いたワクチン開発の基盤的研究、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月、札幌

水上修作、他、抗原提示細胞膜表面 hsp90 を標的とした mAb を用いたワクチン開発の基盤的研究、第 17 回日本がん免疫学会学術集会・総会、2013 年 7 月、山口

水上修作、他、Newly vaccine strategy with mAbs against heat shock protein 90 (HSP90) on surface of antigen presenting cell (APC)、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月、横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水上 修作 (MIZUKAMI SHUSAKU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：00508971