

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350555

研究課題名(和文) 結核菌抗原遺伝子を用いた抗腫瘍DNAワクチンの創製

研究課題名(英文) Development of Novel Antitumor DNA Vaccine Utilizing a Plasmid Expressing a Mycobacterium Tuberculosis Antigen

研究代表者

小山 義之 (Koyama, Yoshiyuki)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・客員研究員

研究者番号：00162090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗腫瘍免疫治療においては、腫瘍細胞が免疫のターゲットとなるネオアンティジェンを持っているかが重要である。我々は、腫瘍細胞に人工ネオアンティジェンとして抗原性の高い結核菌タンパク、ESAT-6、およびAg85Bの遺伝子を導入し、抗腫瘍免疫を惹起するシステムを考案した。

これらの遺伝子はいずれも明らかな腫瘍の増殖抑制を誘導し、その効果はGM-CSF、IL-12などのサイトカインの遺伝子と同等以上であった。また、各種サイトカイン遺伝子との同時投与によって抗腫瘍効果が著しく向上した。ESAT-6の遺伝子の投与は動物臨床研究において、イヌの原発性の腫瘍に対しても著しい抗腫瘍効果を示した。

研究成果の概要(英文)：For an efficient tumor immunotherapy, mutant neoantigen is required as a target of immune response. We have developed a novel strategy to enhance the antitumor immune response by transfecting the pathogenic microorganism's gene into the tumor cells. It would induce the pathogenic antigen as an "artificial neoantigen" into the tumor cell surfaces, which would be recognized by antigen-presenting cells (APCs) as a "danger signal", and the immune systems would be stimulated.

Here, we employed Mycobacterium tuberculosis antigen ESAT-6 and Ag85B, as danger signal antigens. DNA complexes with ESAT-6- or Ag85B-coding plasmid demonstrated higher anti-tumor effect than those coding cytokine genes such as GM-CSF, or IL12. Co-transfection of the cytokine-genes with the pathogenic antigen genes exhibited good synergistic effect in tumor-bearing mice. Animal clinical study on primary tumor-bearing dogs was also carried out, and a significant a significant reduction of tumor volume was observed.

研究分野：医用高分子科学

キーワード：遺伝子治療 DNAワクチン 結核菌抗原 ネオアンティジェン ネオエピトープ 抗腫瘍ワクチン 遺伝子導入 プラスミド

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の30%は癌である。抗体治療薬などの目覚ましい進歩にもかかわらず、生存率の著明な改善には至っていない。一方、癌が遺伝子異常で発生することから癌遺伝子治療の研究が広く行われてきた。当初のガン細胞の遺伝子修復法に代わって、免疫を活性化することに主目的が置かれ、GM-CSF やインターロイキンなどのサイトカイン遺伝子を導入する治療法が多く試みられている。

遺伝子の生体への導入方法は、これまで広く研究されてきた。一般にDNAをそのまま腫瘍局所内や血液中に投与しても、腫瘍細胞への遺伝子導入はできない。そこで、ウイルスを遺伝子のベクターとして利用した臨床試験がアメリカを中心に精力的に展開されて、一部の症例では効果を上げている。しかし、活きたウイルスを投与するこれらの方法はその危険性が当初から指摘され、現実には、アデノウイルスによるショック症状やレトロウイルスによる白血病の誘発などが報告された。そこでこれらに代わる安全な非ウイルス型ベクターが広く研究されている。中でもDNAと静電的に接着するカチオン性成分を用いた複合体が多く開発されてきた。しかし、これらの複合体は培養細胞では高い遺伝子発現が可能であるが、*in vivo*の実験における生体内での発現は極めて低い。その主な原因として、(1)生体成分との副作用、(2)複合体の大きすぎるサイズ、の二点が挙げられる。

我々は、天然酸性多糖であるヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸をDNA/ポリカチオン複合体に加えると、その表面を被覆し、電荷をシールドして生体成分との副作用を低減することを見出した。さらにこれら酸性多糖での被覆は、被転写活性の向上、ガン細胞ターゲティングなど、様々な効果を引き出し(J Control Release, 112, 382 (2006))、腫瘍選択的な遺伝子の高発現を導くことを確認した(J Drug Targeting, 16, 276 (2008))。

一方、DNA複合体は、*in vivo*で用いる高濃度条件では急速に凝集する。複合体のサイズは、効率よいデリバリーに重要であるにもかかわらず、これまで極微細な複合体を調製する手法が無かった。我々は、酸性多糖がDNA/ポリカチオン複合体に保護コロイド的に働いて分散を安定化し、凍結乾燥後も再水和すると細かな分散体が再生し、高い発現活性を維持することを見出した。そして、特殊な条件下で調製した複合体を凍結乾燥・再水和で濃縮する方法により、極微細(直径約70nm)なDNA複合体の濃厚液を得ることに初めて成功した(Biomaterials, 31, 2912 (2010)) (図1)。得られた極微細なDNA複合体は、生体内で、特に腫瘍組織内での高い遺伝子発現を達成した(図2)。

これらの技術を利用して、GM-CSF や IL-2 をコードしたプラスミドDNAの複合体を担癌モデルマウスに投与したところ、ほぼ100%のマウスが完治するという、非常に高い抗腫

瘍効果が得られた(Biomaterials, 31, 2912 (2010)、Oncol Lett, 3, 387 (2012)、The Journal of Gene Medicine, 14, 120 (2012)) (図3)。

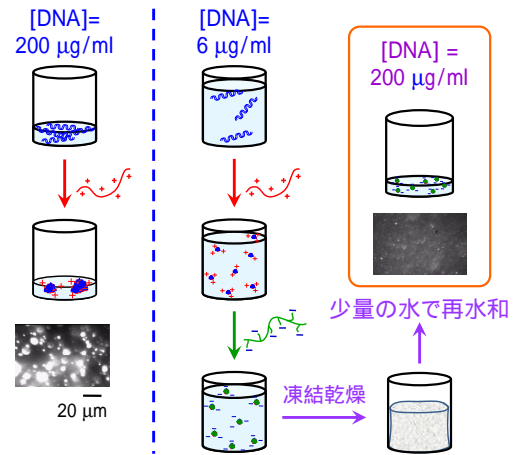


図1 微細な plasmid DNA 複合体の調製

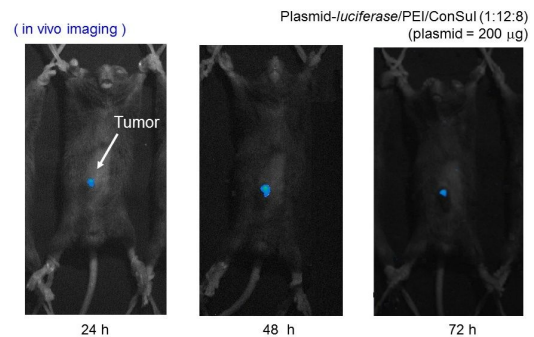


図2 生体内での高い遺伝子発現

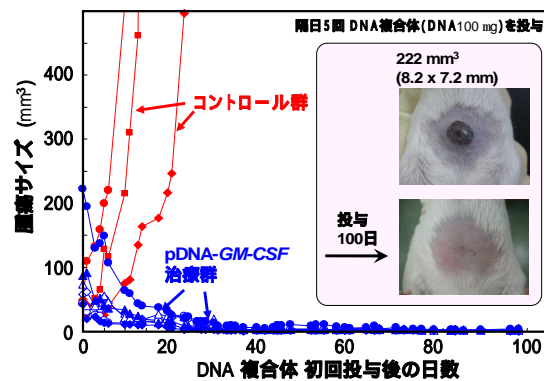


図3 サイトカイン遺伝子の抗腫瘍効果

ガン細胞を移植した担癌モデルマウスではこのように著しい治癒効果が得られたが、イヌ、ネコを対象とした動物臨床研究において、免疫回避性の高い原発性腫瘍では、必ずしも十分な効果は認められなかった。原発性の腫瘍で高い効果を導くには、サイトカイン

で免疫を賦活化するだけでなく、ガン細胞自体を免疫のターゲットとなりうるように改変することが必要と考え、以下の「デンジャー・シグナル」戦略を考案した。

微生物抗原タンパクの遺伝子を腫瘍細胞に導入する。すると、腫瘍細胞内で異種抗原タンパクが生産され、これが内因性の異物として消化されて、そのエピトープが腫瘍細胞表面に提示される。人工的にネオエピトープを腫瘍細胞に発現させた状態になる。その細胞の断片を捕食した樹状細胞が、この微生物抗原エピトープ(人工ネオエピトープ)を外來デンジャーシグナルとして認識し、成熟して細胞性免疫を強く惹起するというシステムである(図4)。

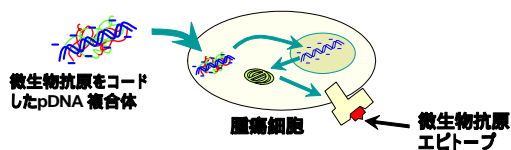


図4 人工ネオエピトープの提示

この仮説を検証するために、抗原性の高い結核菌タンパク、ESAT-6 遺伝子を合成し、上述した DNA 複合体を用いて腫瘍内に投与した。すると期待した通り、結核菌遺伝子は、サイトカイン遺伝子同等以上の高い治療効果を示した。

2. 研究の目的

結核菌タンパク、ESAT-6 遺伝子の導入は、明確な抗腫瘍活性を示した。しかし、正確な作用機序は未だ確認できていない。本研究では、様々な結核菌抗原タンパク遺伝子を合成し、その免疫惹起効果を詳しく比較検討して治療に最適な遺伝子の選択・構築を行うとともに、このような「デンジャー・シグナル」治療法の作用機序を解明することでシステムの最適化を図り、最終的にはヒトの臨床応用可能な高い抗腫瘍効果を持つ DNA ワクチンを創製することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 始めに標的細胞で高い発現効率を示す DNA 複合体の調製条件を確立した。我々は前述の様に、プラスミド DNA を用いて、特殊な条件下でポリカチオンなどと混合、濃縮し、標的癌細胞で高い発現効率を示す、DNA 超微粒子の濃厚懸濁液を調製する手法をすでに開発した。本研究では、抗原性の高い結核菌タンパクである ESAT-6、Ag85B、および比較対照としてアデノウィルスタンパクの ADP の遺伝子をコードしたプラスミド DNA を調製し、上記のシステムを用いて腫瘍細胞で効率よく発現させる条件を確立した。

(2) 次に、これらのプラスミド複合体を担癌モデルマウスに投与して、治癒効果、免疫

惹起の挙動を詳しく調べた。

(3) 抗腫瘍免疫活性が知られているサイトカイン、GMCSF、IL-2、IL-12 の遺伝子との併用効果を検討した。

(4) さらに、遺伝子投与後の各組織内、および血清中のサイトカイン濃度、局所への免疫細胞の集積を詳細に調べ、腫瘍消失のメカニズムを検討した。

(5) 効果の高かった ESAT-6 タンパクの遺伝子について、安全性を確認後、動物臨床の現場で中型動物の原発性腫瘍への効果を検証し、ヒトを対象とした臨床研究への適応が可能な DNA ワクチン癌治療システムの可能性を総合的に検討した。

4. 研究成果

本研究では、抗原性の高い結核菌抗原の遺伝子を用いて腫瘍細胞に人工的にネオアンティジェンを導入し、抗腫瘍免疫を惹起するシステムを考案し、その抗腫瘍効果を調べた。

(1) 結核菌抗原タンパク遺伝子導入による腫瘍増殖抑制効果

始めに結核菌抗原タンパクとして ESAT-6、Ag85B、および比較対照としてアデノウィルスタンパクの ADP を選び、その遺伝子をコードしたプラスミドを作成して、担癌モデルマウスを用いてその抗腫瘍効果を調べた。これらはいずれも明らかな腫瘍の増殖抑制を示した。特に結核菌抗原である ESAT-6、Ag85B の抗腫瘍効果は著しく、GM-CSF、IL-12 などのサイトカイン遺伝子と同等以上であった(図5)。また、各種サイトカイン遺伝子との同時投与によって抗腫瘍効果が著しく向上した(図6)。

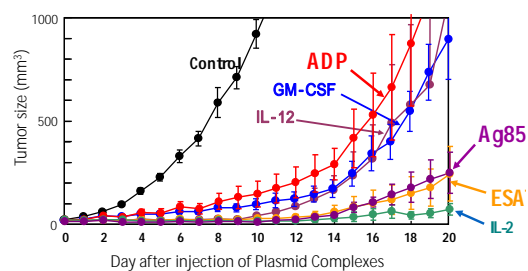


図5 微生物抗原遺伝子の抗腫瘍効果

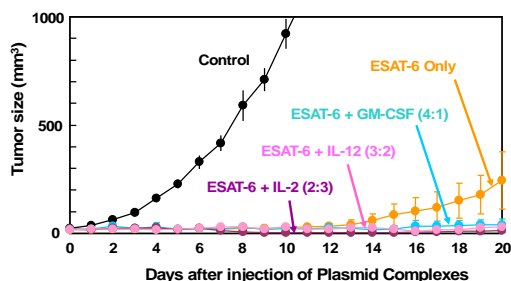


図6 サイトカイン遺伝子との併用効果

治癒後の腫瘍周辺組織の免疫染色を行ったところ、T細胞、単球系の細胞の高い集積が見られた。また、血清を ESAT-6 タンパクとインキュベートしたところ、IFN-gamma の優位に高い分泌が見られた。

これらの結果から、以下のメカニズムを推測した。

結核菌抗原遺伝子を取り込んだ腫瘍細胞が結核菌抗原タンパクを細胞内で産生する。抗原が異種タンパクとして消化され、そのエピトープが表面に提示される。微生物抗原エピトープを担持したエクソソームが分泌される。エクソソームを捕食した樹状細胞が微生物抗原エピトープをデンジャーシグナルと認識し、成熟して、同時に捕食した腫瘍抗原とともに T細胞に提示し、抗腫瘍免疫を活性化する(図7)。

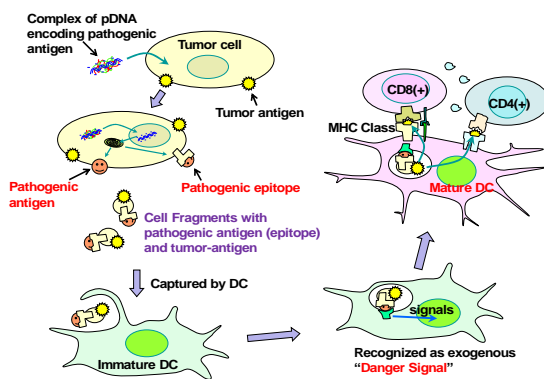


図7 微生物抗原遺伝子の抗腫瘍メカニズム

(2) 動物臨床研究における原発性腫瘍に対する効果

動物臨床研究において、肛門周囲腺腫に罹患したイヌに ESAT-6 遺伝子をコードしたプラスミド複合体を腫瘍局所内投与したところ、腫瘍の退縮が認められた(図8)。

また、DC 治療と併用することで、著しい腫瘍の縮小が見られた(図9)。

肛門周囲腺腫(イヌ:♂、8才)

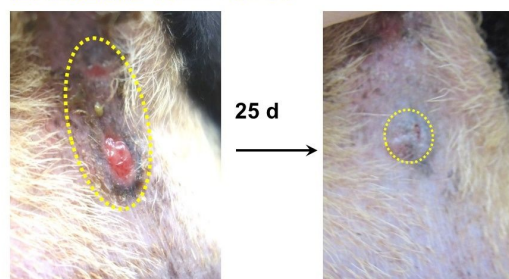


図8 ESAT-6 遺伝子によるイヌの腫瘍治療

鼻腔内腺癌リンパ節転移(イヌ; ♀、8才)

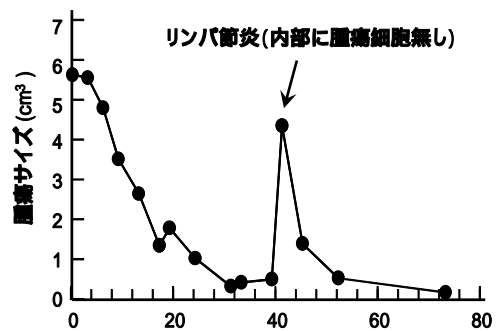


図9 ESAT-6 遺伝子と DC 治療の併用によるイヌのガン治療

(3) 結論

このような微生物タンパク遺伝子を用いた DNA ワクチンは、腫瘍のタイプによらず様々な腫瘍に有効な、抗腫瘍 DNA ワクチンの新しい考え方として期待される。

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 2件)

1. Y. Koyama, C. Yoshihara, T. Ito, Novel Antitumor Strategy Utilizing a Plasmid Expressing a Mycobacterium tuberculosis Antigen as a "Danger Signal" to Block Immune Escape of Tumor Cells, *Pharmaceutics*, 7, 165-174, 2015, 査読有

2. Y. Koyama, K. Sugiura, C. Yoshihara, T. Inaba, T. Ito, Highly Effective Non-Viral Antitumor Gene Therapy System Comprised of Biocompatible Small Plasmid Complex Particles Consisting of pDNA, Anionic Polysaccharide, and Fully Deprotected Linear Polyethylenimine, *Pharmaceutics*, 7, 152-164, 2015, 査読有

[学会発表](計 6件)

1. 伊藤智子、牛草貴博、杉浦 喜久弥、稲葉俊夫、江里口正純、小山義之、結核菌抗原遺伝子を用いた新規抗腫瘍 DNA ワクチンの創製、日本バイオマテリアル学会、2015年11月9日~10日、京都テルサ、京都市

2. Yoshiyuki Koyama, Takahiro Ushigusa, Toshio Inaba, Kikuya Sugiura, Masazumi Eriguchi, Tomoko Ito, Oncolytic Plasmid System; a Novel Antitumor Strategy by Plasmids Encoding Pathogenic Antigens Blocking the Immune Escape of Tumor, European Society for Gene and Cell Therapy, 2014年10月23日~26日、The Hague, The Netherlands

3. Tomoko Ito, Yoshiyuki Koyama, Development and Therapeutic Efficacy of the DNA Complex-Releasing Systems Comprising Injectable Auto-Forming Alginate Gel, European Society for Gene and Cell Therapy, 2014年10月23日～26日, The Hague, The Netherlands

4. 芳原智恵子、伊藤智子、牛草貴博、小山義之、抗原性の強い微生物タンパクをコードしたプラスミド複合体による新しいガン免疫遺伝子治療戦略、日本癌学会、2013年10月3日～5日、パシフィコ横浜、横浜市

5. Katsuyuki Hamada, Kazuko Takagi, Chieko Yoshihara, Tomoko Ito, Yoshiyuki Koyama, Hiroshi Ito, Akihiro Nawa, Gene transfer of chondroitin sulfate-coated granulocyte macrophage-colony-stimulating factor in mouse ovarian tumor model, American Society of Gene and Cell Therapy, 2013年5月15日～18日, Salt Lake City, Utah, USA

6. 芳原智恵子、伊藤智子、牛草貴博、小山義之、微生物抗原遺伝子導入による抗腫瘍免疫の亢進、遺伝子・デリバリー研究会、2013年5月11日、帝京大学板橋キャンパス、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 義之 (Koyama Yoshiyuki)
大阪府立大学 生命環境科学研究科
客員研究員
研究者番号：00162090

(2) 連携研究者

芳原 智恵子 (Yoshihara Chieko)
大妻女子大学 家政学部 助手
研究者番号：40597093