

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430156

研究課題名(和文) 抗原表面結合リポソームを用いた新しい抗腫瘍ワクチンの開発研究

研究課題名(英文) Development of novel cancer vaccine using antigens chemically coupled to the surface of liposome

研究代表者

堀内 大 (HORIUCHI, Yutaka)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：30608906

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)：新しいがん治療用ワクチンを開発するために、テロメア逆転写酵素(TERT)由来エピトープを脂質膜表面に結合したリポソームワクチンを作製した。この抗原表面結合リポソームとヘテロクリティック改変エピトープを用いると、従来の方法では免疫誘導が引き起こせない低免疫原性抗原に対してCTL反応を誘導できた。またこのリポソームワクチンで免疫後、マウスに腫瘍を移植すると、腫瘍の増殖は有意に抑制された。以上の結果より、ヘテロクリティック改変抗原表面結合リポソームは抗腫瘍ワクチンとして大変有望であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used antigens chemically coupled to the surface of liposomes to target telomerase reverse transcriptase (TERT). Using the heteroclitical peptide-modifying approach with antigen-coupled liposomes, we identified a novel cryptic epitope with low affinity for HLA molecules derived from TERT. It induced only weak CD8 T-cell immune responses in mice when emulsified in IFA. By contrast, when coupled to the surface of the liposomes, it induced powerful CD8 T-cell immune responses which cross-reacted against the original cryptic epitope. The induced CD8 T-cells also recognized endogenously TERT expressing tumor cells and inhibited their growth in mice. These data suggest that heteroclitical antigen derived from low affinity epitope of tumor antigens coupled to the surface of liposome may have a role as an effective cancer vaccine candidate.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：がんワクチン 免疫療法 リポソーム 細胞傷害性T細胞 リンパ球 TERT ヘテロクリティック

## 1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍抗原に対して細胞傷害性 T リンパ球(CTL)反応を誘導し、活性化した CTL が腫瘍細胞を排除することを期待したがんワクチン療法の開発研究が盛んに行われている。現在、開発の中心は腫瘍抗原ペプチドによる CTL 誘導型ワクチンだが、現時点では、その CTL 誘導効率は十分ではない。この一つの理由として、多くのがん抗原は自己抗原由来であり、MHC と高いアフィニティをもち宿主免疫系に認識されやすいエピトープは、腫瘍の生育過程で免疫寛容が誘導され、その結果十分な抗腫瘍効果を発揮する CTL 誘導が難しいことが予想される。

われわれは、リポソーム表面に抗原を化学結合させた新規リポソームワクチンを開発し、本ワクチンが感染症モデルマウスにおいて強力に CTL を誘導することを見いだした。この研究において、リポソーム表面結合により抗原ペプチドの免疫原性が変化し、ペプチド免疫では免疫原性が非常に低い抗原ペプチドでもリポソーム表面に結合することで十分な CTL 反応を誘導できることがわかった。この抗原表面結合リポソームワクチンの特徴は、免疫寛容未成立な低抗原性がん抗原に対して免疫反応を誘導できる可能性があり、抗原表面結合リポソームワクチンが新しいがんワクチンのプラットフォームとなりうると考えられた。

## 2. 研究の目的

我々は、抗原ペプチド表面結合リポソームが、免疫原性の非常に低い抗原に対しても細胞性免疫を賦活化できることを証明してきた。本研究では抗原ペプチド表面結合リポソームを利用して、生体内では免疫系に認識されていないため免疫寛容に陥っておらず、リポソーム表面に結合することによって初めて免疫原性を発揮する低抗原性のがん抗原ペプチドを探索/同定し、この抗原ペプチドを表面結合した新しい抗腫瘍リポソームワクチンを開発することを目指した。また、ペプチド表面結合リポソームは、それ単独では免疫活性化能はなく、アジュバントとして CpG を併用する必要がある。しかし、CpG は人体への毒性が懸念される。我々は、感染症ワクチンの研究において、エピトープ配列を多数含むタンパク質をリポソームに結合することで、CpG を併用しなくても免疫反応の誘導が可能であることを示唆するデータを得ている。しかし、タンパク質を抗原に用いることはコスト面、品質管理面で非常にハードルが高い。そこで、今回の研究では、ワクチン抗原としてロングペプチドの可能性を検討した。また、自然免疫細胞の一つである NKT 細胞を刺激することでアジュバント効果を発揮する  $\alpha$

ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -GC) を表面に結合したりポソームの免疫活性化能についても検討を行った。

## 3. 研究の方法

- 1) エピトープアミノ酸配列の選定  
Telomere Reverse Transcriptase (TERT) を標的腫瘍抗原として免疫実験を行った。ヒト TERT とマウス TERT のアミノ酸配列を、コンピュータプログラム「BIMAS」を用いて HLA-A2 および HLA-A24 結合ペプチドモチーフを解析し、9 個のアミノ酸からなる CTL エピトープを予測し、ヒト TERT とマウス TERT で共通のアミノ酸配列を持つエピトープから、BIMAS score の高い順に HLA-A2 に結合するもの 10 種類、HLA-A2 に結合するもの 7 種類を選定した。これらのエピトープに相当するペプチドは、ユーロフィン社に外注し人工合成した。
- 2) 改変エピトープ配列の作製  
1) の各エピトープのアミノ酸配列の MHC 結合部位のアミノ酸を tyrosine (Y)、leucine (L)、valine (V) に置換した配列を BIMAS に入力し、最もスコアの低いアミノ酸配列を、1) の各エピトープ 1 つにつきそれぞれ 1 種類選定し、人工合成した。
- 3) 選定エピトープペプチド結合リポソームの CTL 誘導能の検討  
人工合成したエピトープペプチドを 5 種類ずつプールし、それぞれのプールペプチドグループをリポソーム表面に結合した抗原表面結合リポソームを作成した。これを CpG と混和してマウス皮下に免疫した。初回免疫の 7 日後に同様の方法で追加免疫を行った。  
追加免疫 5 日後に脾細胞を分離し、FITC 標識抗 CD107a 抗体存在下で各々のペプチドで抗原刺激した。その後、細胞内 IFN-g 染色によるフローサイトメトリー (ICS) をおこなった。具体的には、細胞表面を PerCP 標識抗 CD8 抗体で染色し、細胞を固定、細胞膜の透過処理を行った後、細胞内部を PE 標識抗 IFN-g 抗体で染色し、それぞれのエピトープに特異的に反応する CD107a<sup>+</sup>IFN-g<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>リンパ球の割合をフローサイトメーターにより測定した。
- 4) ペプチドワクチンによる免疫との比較  
上の選定エピトープのうち、最も CTL 誘導の高かったエピトープペプチドを、以下の二つの免疫方法でマウスに投与した。

①リポソーム表面に結合して CpG と混和したもの（リポソームワクチン群）

②ペプチドと IFA と混和したもの（ペプチドワクチン群）

初回免疫の7日後に同様の方法で追加免疫を行い、追加免疫5日後に脾細胞を分離した。

CTL誘導能の解析は以下の二つの方法で行った。

a. 抗原ペプチド-MHC マルチマー解析

脾細胞を、抗 CD8 抗体と抗原ペプチド-MHC デキストラマーで染色後、フローサイトメトリーを行い、CD8 細胞中のワクチン抗原特異的 CD8 細胞の割合を測定した。

b. IFN-g ICS

3)と同様の方法で、エピトープに特異的に反応する CD107a+IFN-g+CD8+リンパ球の割合をフローサイトメーターにより測定した。

5) 腫瘍細胞傷害試験

4)と同じ抗原表面結合リポソームでマウスを免疫し、追加免疫5日後に脾細胞を分離した。7日間抗原刺激した後、RMAHHD 細胞にペプチドをパルスしたもの、ペプチドをパルスしていない RMAHHD 細胞、RMA 細胞の三種類の標的細胞を DiOC で染色し、免疫脾細胞と混和して Propidium Iodide(PI)存在下で4時間培養し、細胞死を引き起こされた標的細胞 (DiOC+PI+細胞)の割合をフローサイトメトリーで測定した。ペプチドパルス RMAHHD 細胞または RMAHHD 細胞の死細胞の割合から RMA 細胞の死細胞の割合を減じたものを抗原特異的な反応とした。

6) 抗腫瘍効果

4)、5)と同じ抗原表面結合リポソームでマウスを免疫し追加免疫7日後に RMAHHD 細胞を 5x10<sup>4</sup> 個、大腿部皮下に移植し、腫瘍径の経時的变化と生存率を測定した。コントロールにはマウス腫瘍とは関係のない C 型肝炎由来エピトープを結合したリポソームワクチンで免疫したマウスを用いた。

7) ロングペプチド結合リポソームのワクチン効果の検討

マウス TERT とヒト TERT で共通のアミノ酸配列で、HLA-A2 と HLA-A24 への結合が予測される部位を複数含むロングペプチド(LP)、TERT914-953

を人工合成した。この LP をリポソーム表面に結合し、HHD マウスおよび HLA-A24Tg マウスに免疫し、免疫誘導能を検討した。

8) α ガラクトシルセラミド(α-GalCer) 結合リポソームのアジュバント能の検討

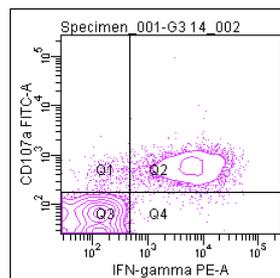
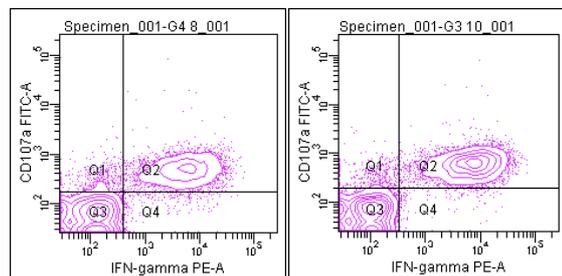
CpG に代わるアジュバントとして NKT 細胞の活性化能を持つ α-GalCer をリポソーム脂質膜に結合することで、リポソームにセルフアジュバント機能を付与できないか検討した。

α-GalCer を脂質膜表面に結合したリポソームを作製し、マウスフットパッドに日か投与した。投与1日後、脾細胞中の CD11c+細胞のうち α-GalCer を CD1d に提示する細胞の割合を抗 α-GalCer-CD1d complex 抗体を用いたフローサイトメトリーで測定した。

4. 研究成果

1) 細胞表面リポソームにより免疫したマウスにおける、TERT エピトープ特異的 CD8 細胞の誘導

HLA-A2 または HLA-A24 への結合が予測されるエピトープペプチドを結合したリポソームをマウスに投与し、TERT 特異的 CD107a 陽性 IFN-g 陽性 CD8 リンパ球が誘導されるかどうか検討した。その結果、免疫原性のあるエピトープを複数同定した。そのうち、HLA-A2 で3つ、HLA-A24 で2つのエピトープは非常に強力な免疫誘導能を有していた(図1)。これらのエピトープはすべて MHC 結合部位のアミノ酸を置換した改変エピトープであり、アミノ酸を置換していない天然のエピトープ配列にも交差反応を示した。



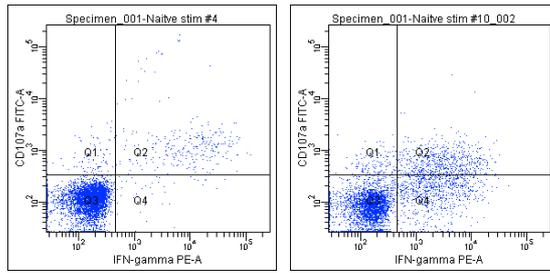


図1 免疫反応があったA2エピートープ(赤)、A24エピートープ(青)のFACS散布図  
横軸はIFN- $\gamma$ 、縦軸はCD107a

## 2) ペプチド+IFA 免疫と抗原表面結合リポソーム免疫の免疫誘導能の比較

同定エピートープのうち、最も強力にCD8リンパ球反応を引き起こした#14エピートープに関して、抗原-HLA マルチマーを合成し、ペプチド+IFA 免疫(ペプチドワクチン群)と表面結合リポソームによる免疫(リポソームワクチン群)での脾臓中の抗原特異的CD8リンパ球の割合を測定した。その結果、リポソームワクチン群はペプチドワクチン群と比較して著明に高い割合を示した(図2)。

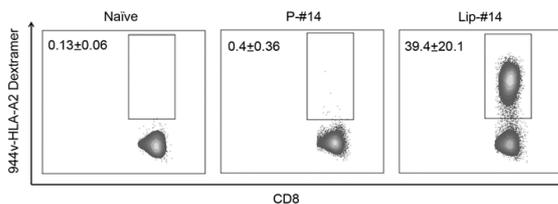


図2 ペプチド免疫とリポソーム免疫による抗原特異的リンパ球の割合の比較

左: コントロール、中央: ペプチド免疫、右: リポソーム免疫

横軸はCD8、縦軸は#14 特異的 HLA マルチマー

この脾細胞を#14の天然エピートープ配列である#13エピートープペプチドにより刺激したところ、リポソームワクチン群では抗原特異的に活性化したCD107a陽性IFN-g陽性CD8細胞が高率に認められたが、ペプチドワクチン群では活性化した細胞はほとんど認められず、#14エピートープは従来の免疫法では免疫反応を誘導できず、抗原表面結合リポソームを用いて初めて免疫誘導できるエピートープであることが示唆された。(図3)

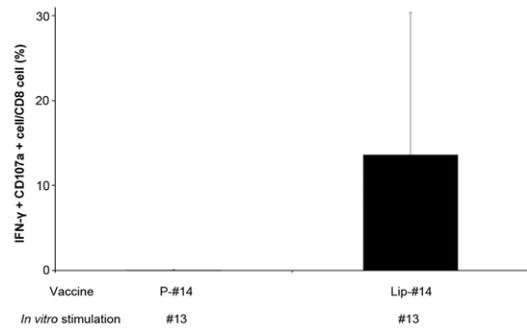


図3 ペプチド免疫またはリポソーム免疫したマウスの脾細胞中の、抗原刺激に反応するリンパ球の割合の比較

## 3) 内因性に TERT を発現する腫瘍細胞に対する細胞傷害活性誘導の検討

抗原表面リポソームワクチンにより誘導され、#14エピートープに反応するCD8リンパ球が、内因性にTERTを発現する腫瘍細胞に対して細胞傷害活性(CTL活性)を発揮するかについて検討した。

ターゲット細胞には、内因性にTERTを発現するマウスリンパ腫細胞RMAにHLA-A2遺伝子を導入したRMA-HHD細胞を、コントロールにはHLA-A2を細胞表面に発現しないRMA細胞を用いて、リンパ球の細胞傷害活性の測定を行った。その結果、リポソームワクチンによる免疫で、内因性にTERTを発現する腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を持つリンパ球が誘導されることがわかった(図4)。

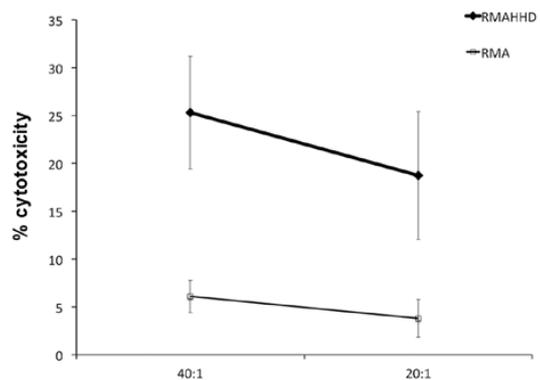


図4 #14 抗原表面結合リポソームで免疫したマウス脾細胞の、内因性にTERTを発現する腫瘍細胞に対する細胞傷害活性

## 4) 抗腫瘍効果の検討

#14エピートープペプチドまたは#13エピートープペプチドを結合したリポソームでマウスを免疫した後、大腿部皮下にTERT陽性HLA-A2陽性腫瘍細胞であるRMA-HHD細胞を $5 \times 10^4$ 個移植し、腫瘍径の推移とマウスの生存日数

について検討した。コントロールにはC型肝炎ウイルス由来エピトープペプチドを結合したリポソームで免疫したマウスを用いた。腫瘍移植後24日の時点の腫瘍径は#14ワクチン投与群がコントロール群、#13ワクチン群と比較して有意に低い値を示した(図5)。#13ワクチン投与群の腫瘍径はコントロール群のそれと比較して小さい傾向にあったが、有意差は認められなかった。生存日数に関しても、他の2群と比較して、#14ワクチン群が有意に長い生存日数を示した(図6)。

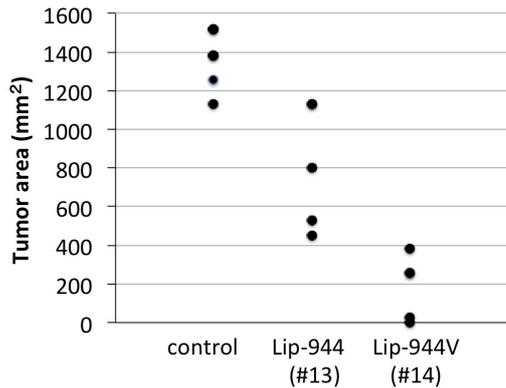


図5 Control ワクチン、#13 抗原結合リポソームワクチン、#14 抗原結合リポソームワクチンで免疫したマウスの腫瘍移植後24日の腫瘍径

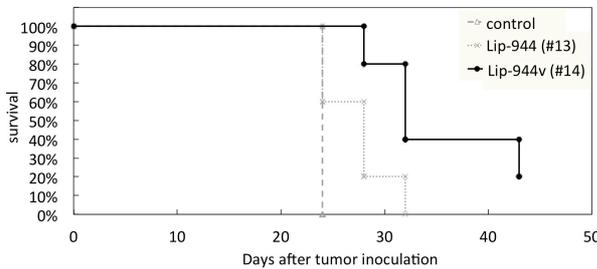


図6 Control ワクチン、#13 抗原結合リポソームワクチン、#14 抗原結合リポソームワクチンで免疫したマウスの腫瘍移植後の生存日数

### 5) ロングペプチド結合リポソームの免疫誘導能と抗腫瘍効果の検討

ヒト TERT とマウス TERT で共通のアミノ酸配列で、BIMAS 予測により HLA-A2 との結合が予測される部位を5カ所、HLA-A24 との結合が予測される部位を5カ所含む40merのペプチド配列 TERT914-953 を合成し、リポソーム表面に結合した。このリポソームと CpG を併用あるいは CpG を併用せずリポソーム単独で HHD マウスまたは HLA-A24 Tg マウスに投与した。

CpG を併用した群では、HLA-A2 においてロングペプチドの配列内に存在する3種類のエピトープペプチドに対する CD8 免疫反

応が誘導された。一方、HLA-A24 では明らかな免疫反応は認められなかった。CpG を併用しないリポソーム単独投与群では HLA-A2、HLA-A24 とともに明らかな免疫誘導は認められず、エピトープを複数含むロングペプチドを結合したリポソームでも CpG の併用は必要であった(図7)。

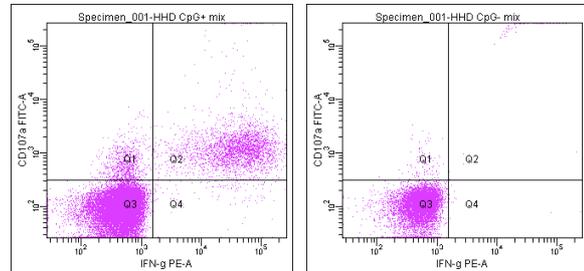


図7 ロングペプチド結合リポソームと CpG を併用(左)またはロングペプチド結合リポソーム単独(右)で免疫した HHD マウス脾細胞の抗原刺激に対する反応。横軸は IFN- $\gamma$ 、縦軸は CD107a。

### 6) $\alpha$ -GC を表面に結合したリポソームによる免疫活性化能の検討

リポソーム表面に結合した  $\alpha$ -GC が抗原提示細胞上の CD1d に提示されるかについて検討した。 $\alpha$ -GC を結合したリポソーム ( $\alpha$ -GC 群) または何も結合していないリポソーム (コントロール群) を投与して、脾臓中の CD11c 陽性細胞のうち、CD1d 上に  $\alpha$ -GC を結合している細胞の割合を測定したところ、 $\alpha$ -GC 群とコントロール群の間には有意な差は認められず(図8)、リポソーム表面に  $\alpha$ -GC を結合することは、アジュバントとしては有用ではないことが判明した。

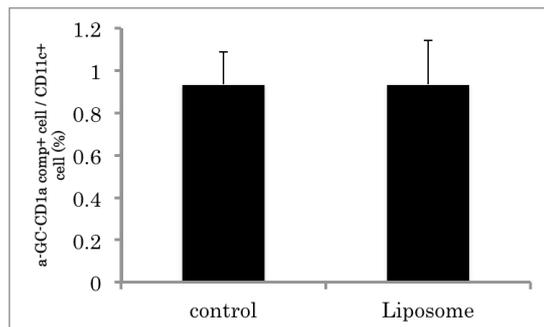


図8  $\alpha$ -GC 結合リポソームまたはコントロールリポソームを投与したマウス脾臓中の、 $\alpha$ -GC を CD1a 上に結合している CD11c 細胞の割合の比較

### 7) 結語

以上の結果から、エピトープペプチドの MHC 結合部分のアミノ酸を置換した改変抗原を表面に結合したリポソームは、低免疫原性抗原を標的とした新しい抗腫瘍ワクチンとな

りうる可能性があることが示唆された。しかし、その免疫誘導には CpG がアジュバントとして必要であった。

#### 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 1 件)

1. Targeting cryptic epitope with modified antigen coupled to the surface of liposomes induces strong antitumor CD8 T-cell immune responses in vivo. Horiuchi, Y., Takagi, A., Uchida, T., and Akatsuka T. *Oncol Rep.* 査読有 DOI: 10.3892/Or.2015.4299, (2015)

[学会発表] (計 1 件)

1. Horiuchi Yutaka, Takagi Akira, Uchida Tetsuya, Akatsuka Toshitaka. Identification of new hTERT-derived HLA-A2\*0201 restricted CTL epitopes for tumor vaccine with antigen chemically coupled to the surface of liposomes. 第 43 回日本免疫学会 京都 2014 年 12 月 12 日.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称: ペプチド結合リポソーム、細胞傷害性 T リンパ球活性化剤、および抗腫瘍ワクチン。  
発明者: 堀内 大、赤塚俊隆、内田哲也.  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2015/076214  
出願年月日: 2015 年 9 月 16 日  
国内外の別: 国外
2. 名称: ペプチド結合リポソーム、細胞傷害性 T リンパ球活性化剤、および抗腫瘍ワクチン。  
発明者: 堀内 大、赤塚俊隆、内田哲也.  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2014-196454  
出願年月日: 2014 年 9 月 26 日  
国内外の別: 国内

○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

堀内 大 (HORIUCHI, Yutaka)  
埼玉医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 30608906

(2) 研究分担者

赤塚 俊隆 (AKATSUKA Toshitaka)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 30159321

小林 信春 (KOBAYASHI Nobuharu)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 10150616

(3) 連携研究者

内田 哲也 (UCHIDA Tetsuya)  
埼玉医科大学・医学部・特任教授  
研究者番号: 50176690