

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350533

研究課題名(和文) 微生物抗原遺伝子で抗腫瘍免疫を惹起する万能型抗腫瘍DNAワクチン創生の新戦略

研究課題名(英文) Novel DNA vaccine strategy to elicit antitumor immune responses by transfecting with plasmids coding for pathogenic antigens

研究代表者

伊藤 智子 (Ito, Tomoko)

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：80372910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗原性の高い微生物抗原の遺伝子を腫瘍細胞に導入し、「人工ネオ・アンティジェン」として免疫システムに認識させることで抗腫瘍免疫を惹起するシステムを考案した。膜結合性のESAT-6、および分泌型のAg85Bを同系坦癌モデルマウスに遺伝子導入すると、どちらも著しい抗腫瘍効果を示し、T細胞、単球系細胞の腫瘍組織への高い集積が見られた。両抗原の効果に差はなく、生合成された抗原は異種タンパクとして分解され、ネオ・エピトープとして提示されて免疫系細胞に働きかけると考えた。この仮説を証明するため、ネオ・エピトープを提示したエクソソームを調製し、その抗腫瘍細胞性免疫誘導効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a novel antitumor strategy by transfecting with the plasmids coding for pathogenic antigens. We examined the therapeutic effects of the transfection of the plasmid coding a membrane-associating protein, ESAT-6, or a secretory antigen, Ag85B. Both plasmids showed similar significant effects in tumor-bearing mice. Accumulation of T-cells and monocytic cells was observed in the diminished tumors. The antigens synthesized in the tumor cells would be degraded as heterologous proteins, and the degraded peptides would be presented on the cell surfaces as "artificial neoepitopes". The exosomes presenting the epitopes would be secreted from the cells, and were thought to play an essential role in eliciting antitumor immunity. This hypothesis was confirmed by the experiments with the exosomes presenting the "artificial neoepitopes", which had been prepared by transfection of the cultured cells with the pathogenic antigen genes.

研究分野：医用高分子、DDS

キーワード：DNAワクチン 遺伝子治療 ガン免疫治療

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、全ての腫瘍に有効な万能型の抗腫瘍 DNA ワクチンを創製するため、微生物抗原遺伝子を用いた新しい抗腫瘍治療戦略を構築することにある。

現在の日本人の死因の第一位はガンである。近年、患者本人の免疫作用を高めて治療する「ガン免疫治療」が注目されている。しかし、顕在化したガンは免疫回避能力が高く、有効な免疫活性化の手法は確立されていない。

抗腫瘍免疫を誘導する新しい治療法として「ガン・ワクチン治療」が考案された。ガン固有の抗原を投与して、抗ガン免疫を惹起する方法である。また、ガン抗原のタンパクそのものを投与するのではなく、代わりに抗原タンパクをコードした遺伝子を体内に投与して、生体内で抗原を生合成させる「DNA ガン・ワクチン」の開発も広く研究されている。

しかしこれらのガンをターゲットとしたワクチン治療は、患者のガン抗原を特定し、遺伝子を解析して合成するオーダーメイドの治療法であり、一般化が難しい。ガン・ワクチン製剤を一般化するためには、様々なガンに共通の抗原を見つけることが必要である。しかし、そのようなガンの共通抗原は発見されておらず、実用化の目は立っていない。

全ての腫瘍にユニバーサルに有効な DNA ワクチンが創成されれば、その社会的な意義は非常に高い。そのためには従来の発想に縛られない全く新しい戦略が必要である。

我々は、腫瘍抗原の遺伝子を投与するのではなく、腫瘍細胞に「危険信号」の遺伝子を導入して腫瘍細胞自体をトランスフォームして抗腫瘍免疫応答を惹起する新戦略を考案した。「危険信号」を取り込んだ抗原提示細胞が刺激を受けて成熟し、「危険信号」の抗原とともに、同時に取り込んだ腫瘍抗原を提示する、すなわち「危険信号」が抗腫瘍免疫を強制的に起動させるシステムである。

この戦略に不可欠なのは、腫瘍細胞に効率よく「危険信号」の遺伝子を導入し、発現させる遺伝子ベクターシステムである。我々は、ウイルスを使用しない、安全な人工遺伝子送達システムをすでに開発した。DNA とポリカチオンとのイオン複合体を天然酸性多糖で被覆したもので、凍結乾燥法で濃縮することで超微粒子化し、ウイルスを使わずに腫瘍細胞に高い遺伝子発現をもたらすことに初めて成功した。

これらの技術を利用して、サイトカインをコードした DNA 複合体を担癌モデルマウスに投与したところ、非常に高い腫瘍増殖抑制効果がみられ、アロジェネティックモデルでは腫瘍は完全に消失した。しかし、サイトカインの遺伝子導入では、免疫回避性の高い原発性腫瘍を対象にした動物臨床研究においては、必ずしも十分な抗腫瘍免疫誘導効果は認め

られず、効率よい免疫惹起には「危険信号」による強い刺激が重要であることが示唆された。

免疫機構を惹起するための「危険信号」として、我々は抗原性の高い結核菌タンパクに着目した。結核菌タンパク、ESAT-6 の遺伝子をコードしたプラスミドを合成し、上記の DNA 複合体超微粒子を調製して担癌モデルマウスの腫瘍内に投与した。すると、この微生物抗原遺伝子は、サイトカイン遺伝子同等以上の著しく高い治療効果を示した。また、動物臨床研究において、イヌの原発性腫瘍に対しても、ESAT-6 の遺伝子は強い増殖抑制効果を持つことが確認された。

遺伝子導入によって合成された微生物抗原を樹状細胞が取り込んで刺激され、成熟し、同時に取り込んだ腫瘍抗原とともに T 細胞に提示して抗腫瘍免疫を活性化したものと考えられる。腫瘍細胞内で生合成された微生物抗原が樹状細胞に取り込まれるメカニズムとして、以下の三通りの可能性が考えられた。

< Mechanism-1 > 微生物抗原が細胞膜に結合し、その細胞断片を樹状細胞が貪食する。

< Mechanism-2 > 細胞外に分泌された微生物抗原を抗原提示細胞が飲作用により取り込む。

< Mechanism-3 > 生合成された微生物抗原タンパクが異種タンパクとしてプロセッシングされ、そのエピトープが MHC Class I、Class II に提示されたのち、その細胞断片を樹状細胞が貪食する。

微生物抗原遺伝子の導入が広くタイプの異なる様々な腫瘍に対して抗腫瘍効果を持つことが、動物臨床研究などを通して明らかになりつつある。タイプの異なる抗原性タンパクの比較検討、および腫瘍周辺の免疫担当細胞の挙動を詳細に調べ、その治療メカニズムを解明することが、このような微生物抗原遺伝子を用いた DNA ワクチンの最適構造の製剤設計を行うために重要である。

2. 研究の目的

上述のように、我々は免疫システムを活性化する「危険信号」として、微生物抗原の遺伝子を腫瘍細胞に導入し、抗腫瘍免疫を惹起する新戦略を考案した。微生物抗原遺伝子として結核菌抗原 ESAT-6 遺伝子を用い、これを担癌モデルマウスに投与すると、強い抗腫瘍免疫が得られることを確認している。

しかし、その免疫活性化・治療のメカニズムは不明である。より効率の高い治療システムを開発するため、本研究では細胞膜結合型 ESAT-6 に加えて、分泌型の結核菌抗原 Ag85B 遺伝子を用いてこれらの抗腫瘍活性を詳細に比較し、導入する抗原の構造と活性の相関を調べる。また、治療過程における腫瘍周辺の免疫担当細胞の挙動を詳細に調べ、このような「危険信号」抗原遺伝子の抗腫瘍免疫惹起の機序を解明し、最適構造の製剤設計を行うことで新しいガン・ワクチンの戦略を確立

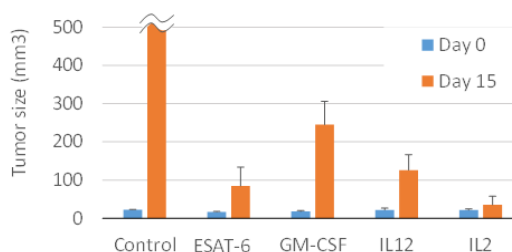
し、全てのガンに有効な新規 DNA ワクチンを創生することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 細胞膜結合型結核菌抗原である ESAT-6、および分泌型結核菌抗原の Ag85B の各遺伝子をコードしたプラスミドを合成した。
- (2) GM-CSF、IL-2、IL-12 などのサイトカイン遺伝子をコードしたプラスミドを合成した。
- (3) 希薄条件下でこれらのプラスミド DNA とポリエチレンイミン、およびコンドロイチン硫酸を混合し、得られた超微粒子を凍結乾燥・再水和して DNA 複合体微粒子濃厚液を調製した。
- (4) これらの DNA 複合体を B16 細胞に導入し、その細胞毒性を評価した。
- (5) B16 細胞をシンジェネティックマウスの皮下に移植して担癌モデルマウスを作成し、サイトカインまたは微生物抗原タンパクをコードしたプラスミド DNA 複合体を腫瘍内に局所投与して腫瘍のサイズの変化を経時的に測定した。
- (6) ESAT-6 タンパクをコードしたプラスミド複合体と、サイトカイン遺伝子を持つプラスミド複合体を混合して担癌マウスに投与し、微生物抗原とこれらの免疫賦活化タンパクの併用による相乗効果を検討した。
- (7) 微生物抗原遺伝子によって治癒を施した担癌マウスの血液を、微生物抗原タンパクとインキュベートしたときの IFN- γ 分泌量を測定し、微生物抗原遺伝子による細胞性免疫誘導効果を調べた。
- (8) 微生物抗原遺伝子により治癒を施した担癌マウスの腫瘍組織を採取し、免疫染色して組織内に集積した免疫細胞の種類、数、活性化状態などを評価した。
- (9) 微生物抗原遺伝子の治癒メカニズムを確認するために、培養細胞に微生物抗原遺伝子を導入してその培養上澄みから微生物抗原エピトープを持ったエクソソームを単離し、その抗腫瘍効果を調べた。
- (10) 安全性、治癒効果の確認された DNA 複合体を腫瘍に罹患したイヌに投与し、原発性腫瘍に対する治癒効果を確認した。

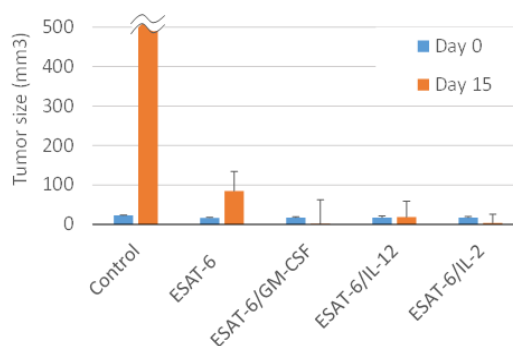
4. 研究成果

前述のように、我々は結核菌抗原タンパクである ESAT-6 の遺伝子をコードしたプラスミドを合成し、その複合体の投与が担癌腫瘍モデルマウスにおいて著しい腫瘍退縮を引き起こすことを見出した。その効果は、サイトカイン遺伝子を用いた遺伝子治療同等以上であった(図1)。



(図1) ESAT-6 遺伝子およびサイトカイン遺伝子の抗腫瘍効果。DNA 複合体の投与直後、および15日後の腫瘍サイズの平均値 (n=3)。

また、ESAT-6 遺伝子を GM-CSF などの遺伝子と同時投与することで顕著な相乗効果が見られ、最適な混合比においてはシンジェネティックモデルにおいても全てのマウスで腫瘍の完全消失が見られた(図2)。



(図2) ESAT-6 遺伝子とサイトカイン遺伝子の相乗効果。DNA 複合体の投与直後、および15日後の腫瘍サイズの平均値 (n=3)。

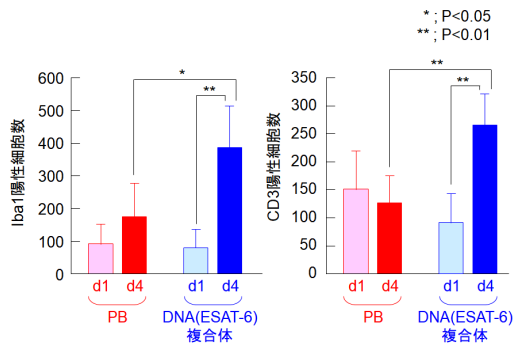
後述のように ESAT-6 をコードした DNA の複合体自体の毒性は低い。また、サイトカイン遺伝子の併用が強い相乗効果を示したことから、ESAT-6 の抗腫瘍作用は ESAT-6 タンパクによる直接の殺細胞効果ではなく、抗腫瘍免疫を活性化する効果によると推測された。そのメカニズムを調べるために以下の実験を行った。

ESAT-6 遺伝子を担癌モデルマウスの腫瘍内に投与すると、4 日後には顕著な腫瘍退縮が認められた。そのことで、投与1日後、および4 日後に腫瘍組織を採取し、免疫染色を行った。コントロールとしてリン酸緩衝液を投与したマウスでは免疫応答は全く観察されなかったのに対し、ESAT-6 遺伝子を投与したマウスで、縮小した腫瘍組織中には、T 細胞、単球系の細胞の高い集積が見られた(図3)。

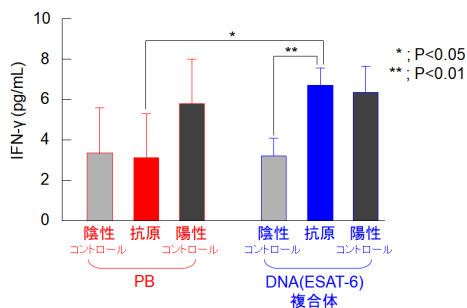
また、ESAT-6 遺伝子の投与による、同タンパクに対する細胞性免疫の誘導効果を調べるため、治療開始 4 日後のマウスの血液を ESAT-6 抗原とインキュベートし、IFN- γ の分泌を定量した。

ESAT-6 遺伝子を投与したマウスではコントロール群(リン酸緩衝液を投与)に比べて有意に高い IFN- γ の産生がみられ、ESAT-6 遺伝子によって抗 ESAT-6 細胞性免疫が効率

よく誘導されていることが確認された(図4)



(図3) DNA複合体の投与1日後、および4日後の腫瘍組織中のIba1およびCD3陽性細胞の数

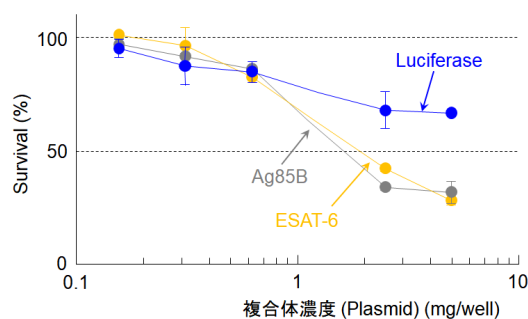


(図4) 抗原またはアジュバントとインキュベートしたときのIFN- γ の分泌量(投与4日後)

我々の遺伝子導入・発現システムは、腫瘍細胞において高い遺伝子発現を誘導する。遺伝子導入によって細胞で生合成されたESAT-6は、何らかの経路で樹状細胞にとりこまれ、T細胞にクロスプライムされて抗ESAT-6免疫、および抗腫瘍免疫を惹起したものである。

そこで次に、遺伝子導入によって細胞で生合成されたESAT-6がどのように樹状細胞に取り込まれるのかを検討した。

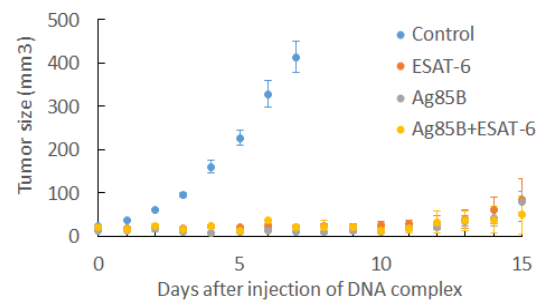
腫瘍細胞内で合成されるESAT-6タンパクは膜親和性が高く、細胞外への分泌は少ないと考えられる。そこで分泌性結核菌タンパクであるAg85Bをコードしたプラスミドを合成し、その抗腫瘍効果をESAT-6と比較検討した。Ag85BをコードしたDNAの複合体自体の細胞毒性はESAT-6のものとは差がなかった(図5)。



(図5) ESAT-6遺伝子またはAg85B遺伝子をコードしたDNA複合体の細胞毒性

Ag85B遺伝子は、坦癌マウスに腫瘍内投与することでESAT-6遺伝子とほとんど同程度の腫瘍の退縮を引き起こした。

これらの微生物抗原タンパクが細胞外に分泌されて効果を発揮するのであれば、Ag85Bはより高い抗腫瘍効果をあらわすはずであり、細胞膜に結合した状態で働くのであれば、ESAT-6の効果がより高いはずである。しかし、これら二つの対照的な抗原タンパクの効果はほぼ同等であり、また、Ag85B、ESAT-6二種の抗原遺伝子を混合投与しても、その効果に差は見られなかった(図6)。



(図6) ESAT-6遺伝子、Ag85B遺伝子およびそれら二種混合投与による抗腫瘍効果

全く性質の異なるこれらのタンパクがほぼ同様の効果を示したことから、以下のことが推測された。すなわち、外来遺伝子により生合成されたこれらのタンパクは、そのままの形で樹状細胞に取り込まれるのではなく、異種タンパクとして細胞内で分解され、ペプチド・エピトープとなって細胞膜上に提示される。樹状細胞がその細胞の断片をとりこみ、MHC上に提示されたこれらの抗原エピトープを「危険信号」と認識して活性化するというメカニズムである。

これは、近年大きくクローズアップされている、ネオアンティジェンの効果と類似している。腫瘍細胞がネオアンティジェンを持たず、共通抗原だけしか持たない場合には、免疫システムは活性化されず、抗腫瘍免疫は誘導されにくい。一方、腫瘍細胞が変異によって生成したネオアンティジェンを持つ場合には、免疫システムがこれを攻撃ターゲットとして認識し、抗腫瘍免疫が効果的に惹起される。

我々のシステムでは、腫瘍細胞内で外来遺伝子によって生成された微生物抗原は、人為的に導入された「人工ネオアンティジェン」として機能すると思われる。すなわち、生成したESAT-6は異種タンパクとしてプロテアソームで分解され、生じたペプチド・エピトープはMHC Class I, Class IIと結合して細胞表面に提示される。これを取り込んだ樹状細胞がこの「人工ネオエピトープ」を外来の「危険信号」として認識して成熟し、T細胞をクロスプライムする。そのとき、同時に取り込んでいる腫瘍抗原も提示し、抗腫瘍免疫も惹起されるものと考えられる。

ここで、樹状細胞が捕食するのは丸ごとの腫瘍細胞ではなく、その断片、あるいは腫瘍細胞由来のアポトーシス小胞、エクソソームやエクソソームであろう。腫瘍細胞から分泌され続けるエクソソームがその担い手の一つとして大きく関わっていると考えた。

これを検証するために以下の実験を行った。in vitro で B16 メラノーマ細胞に ESAT-6 遺伝子導入して培養し、ESAT-6 エピトープが膜表面の MHC Class I、Class II に結合した「人工ネオエピトープ提示エクソソーム」を調製した。

得られたエクソソームの表面に ESAT-6 エピトープが存在することを抗 ESAT-6 抗体との結合性により確認した。

ESAT-6 エピトープを提示した「人工ネオエピトープ提示エクソソーム」を B16 細胞を移植した同系担癌モデルマウスに投与した。すると、ESAT-6 遺伝子を投与したときと同様、著しい腫瘍増殖抑制効果が観察された。また、ESAT-6 エピトープ提示エクソソームで処理したマウスには、高い抗腫瘍細胞性免疫が誘導されていることが認められ、このような微生物抗原遺伝子が「人工ネオエピトープ」効果により腫瘍を縮小させるメカニズムが確認された。

動物臨床研究において、ESAT-6 遺伝子のイヌの各種原発性腫瘍に対する治癒効果を評価したところ、このような微生物抗原遺伝子は原発性腫瘍に対しても顕著な抗腫瘍効果を持つことが多くの症例で観察された。

以上のように、微生物抗原遺伝子による治療は、免疫原性の低い腫瘍のエスケープをブロックし、抗腫瘍免疫を効果的に惹起する、安全で効果の高い新しいタイプの抗腫瘍 DNA ワクチンシステムとして高い可能性を持つことが示唆された。

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 4 件)

Tomoko Ito, Masazumi Eriguchi, Yoshiyuki Koyama, Effect of pDNA complex particle size on gene expression: difference between in vitro and in vivo experiments, Journal of Nanomaterials & Molecular Nanotechnology, 査読有, Vol. 5, 2016, pp. 1-5, DOI:10.4172/2324-8777.1000202
Yoshiyuki Koyama, Tomoko Ito, Aya Hasegawa, Masazumi Eriguchi, Toshio Inaba, Takahiro Ushigusa, Kikuya Sugiura, Exosomes derived from tumor cells genetically modified to express Mycobacterium tuberculosis antigen: Novel vaccine for cancer therapy, Biotechnology Letters, 査読有, Vol. 38, 2016, pp. 1857-1866,

DOI:10.1007/s10529-016-2185-1

Yoshiyuki Koyama, Kikuya Sugiura, Chieko Yoshihara, Toshio Inaba, Tomoko 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, Pharmaceuticals, 査読有, Vol. 7, 2015, pp. 152-164, DOI:10.3390/pharmaceutics7030152

Yoshiyuki Koyama, Chieko Yoshihara, Tomoko Ito, Novel antitumor strategy by transfection of plasmid expressing mycobacterium tuberculosis antigen as a "Danger Signal" to block immune escape of tumor cells, Pharmaceuticals, 査読有, Vol. 7, 2015, pp. 165-174, DOI:10.3390/pharmaceutics7030165

[学会発表](計 11 件)

小山義之, 伊藤智子, 長谷川綾, 杉浦喜久弥, 稲葉俊夫, 江里口正純, 「人工Neoantigen」遺伝子を導入した細胞由来のエクソソームを用いた抗腫瘍免疫治療、第 14 回日本免疫治療学研究会学術集会、2017 年 2 月 11 日、東京大学(東京都・文京区)

Yoshiyuki Koyama, Tomoko Ito, Kikuya Sugiura, Toshio Inaba, "Artificial neoepitope"-bearing exosomes as novel vaccine for cancer immunotherapy、第 45 回日本免疫学会学術集会、2016 年 12 月 5 日~7 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

小山義之, 伊藤智子, 長谷川綾, 杉浦喜久弥, 稲葉俊夫, 江里口正純, 「人工ネオエピトープ」を担持した腫瘍由来エクソソームによるガン免疫治療、第 3 回日本細胞外小胞学会、2016 年 8 月 30 日~9 月 2 日、グランドプリンスホテル広島(広島県・広島市)

伊藤智子, 長谷川綾, 牛草貴博, 杉浦喜久弥, 稲葉俊夫, 江里口正純, 小山義之、人工 Neoantigen (新抗原) 遺伝子を用いた抗腫瘍免疫治療システムの創製、遺伝子・デリバリー研究会第 16 回シンポジウム、2016 年 5 月 16 日、川崎生命科学・環境研究センター(神奈川県・川崎市)

小山義之, 伊藤智子, 長谷川綾, 杉浦喜久弥, 稲葉俊夫, 江里口正純、人工 Neoepitope を担持したエクソソームを用いた抗腫瘍免疫治療、遺伝子・デリバリー研究会第 16 回シンポジウム、2016 年 5 月 16 日、川崎生命科学・環境研究センター(神奈川県・川崎市)

Yoshiyuki Koyama, Tomoko Ito, Eriguchi Masazumi, Aya Hasegawa, Toshio Inaba, Kikuya Sugiura, "Artificial neoepitope"- bearing exosomes derived

from tumor cells being genetically modified to express Mycobacterium tuberculosis antigen: a novel vaccine for cancer therapy、the 5th Annual Meeting of International Society for Extracellular Vesicles、2016年5月4日～7日、Rotterdam (Netherlands)

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、第37回日本バイオマテリアル学会大会、2015年11月9日、京都テルサ(京都府・京都市)

Tomoko Ito, Yoshiyuki Koyama, Masazumi Eriguchi, Makoto Otsuka、Preparation and therapeutic effect of calcium phosphate nano-capsules enclosing DNA/PEI/hyaluronic acid complex for durable gene expression、27th European Conference on Biomaterials、2015年8月31日～9月2日、Kraków (Poland)

Tomoko Ito, Yoshiyuki Koyama、DNA complex release system by injectable auto-forming alginate gel including amorphous calcium phosphate、the 2015 Society For Biomaterials Annual Meeting & Exposition、2015年4月16～17日、Charlotte, NC (USA)

Tomoko Ito, Yoshiyuki Koyama、Development and Therapeutic Efficacy of the DNA Complex-Releasing Systems Comprising Injectable Auto-Forming Alginate Gel、ESGCT and NVGCT Collaborative Congress、2014年10月23日～26日、The Hague (Netherlands)

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、ESGCT and NVGCT Collaborative Congress、2014年10月23日～26日、The Hague (Netherlands)

江里口 正純 (ERIGUCHI Masazumi)

牛草 貴博 (USHIGUSA Takahiro)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 智子 (ITO Tomoko)

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：80372910

(2) 連携研究者

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

(3) 研究協力者