

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462425

研究課題名(和文) survivin導入樹状細胞と新規癌抗原C10orf3を併用した遺伝子免疫療法

研究課題名(英文) Centrosome related gene introduced dendritic cells (DC), with functional modification of DC, show cytotoxic activity.

研究代表者

藤井 令央奈 (Fujii, Reona)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：30326368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：survivin遺伝子導入により、DCのviabilityが延長することが確認できた。遺伝子導入DCにより誘導したCTLの検討では、E/T比25でsurvivin導入DCではT-24に対して19%、LNCaPには48%の細胞障害活性を確認。Cep55/C10orf3ではT-24に対して29%、LNCaPには45%の障害活性を確認した。さらにこれら2つの遺伝子を併用することにより、障害活性はT-24に対しては45%に、LNCaPに対しては65%にそれぞれ増強効果を認めた。中心体関連腫瘍抗原を遺伝子導入したDCによる免疫療法は、新しい治療アプローチの可能性を示唆するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Both survivin and Cep55/C10orf3 are centrosome-related genes expressed in various malignancies. Survivin, isolated as an inhibitor of the apoptosis protein family, has anti-apoptotic effects. In this study, we targeted both survivin and Cep55/C10orf3, and modified the function of dendritic cells (DC) by transducing survivin gene to DC. DC were infected with the survivin gene (DC-survivin) and Cep55/C10orf3 gene (DC-Cep55/C10orf3). DC-survivin and DC-Cep55/C10orf3 induced cytotoxic activity against T-24 and LNCaP respectively. However, cytotoxic activity against HLA non match cells (DU145) was very low. DC transduced with survivin maintained cell viability three weeks after culture, while control DC showed deterioration. By combination of two genes, survivin and Cep55/C10orf3, the cytotoxic activity against LNCaP was increased from 48 to 65%. Against T-24 it was also enhanced from 19 to 45%. This combination might offer a useful approach for the urologic cancers.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：免疫療法 遺伝子免疫療法 癌幹細胞 中心体関連抗原 Cep55/C10orf3 survivin 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

ペプチド療法の欠点と DC に遺伝子導入することの利点

樹状細胞 (DC) は強力な抗原提示能を示し、DC を用いたペプチドワクチン療法が多く研究されてきた。我々はペプチドワクチン療法の問題点を打破すべく DC に腫瘍関連抗原 (Tumor Associated Antigen :TAA) の遺伝子を導入する方法を提唱してきた。

DC に TAA 遺伝子を導入する利点は、導入された TAA 遺伝子が内因性に処理されるため、未知のペプチドを提示することが可能。

HLA タイプの制限がない。複数のペプチドの提示が可能。交叉抗原提示により MHC class だけでなく class も活性化させる。といった事があげられる。

この手法を用いて前立腺特異抗原 (Prostate Specific Antigen:PSA) 遺伝子を DC に導入し、HLA タイプによる制限を受けずに、前立腺癌に対する極めて強い抗腫瘍免疫反応が誘導される多価ワクチンの可能性を報告してきている (第 93 回日本泌尿器科学会総会賞、*BJU Int* 104:1766-1773, 2009)。

survivin 遺伝子導入 DC の研究成果

TAA 遺伝子導入 DC の妥当性、有用性については一定の結果を我々は得てきたが、その効果はまだ限定的であった。その原因の一つとして誘導された DC の問題が考えられる。がん患者から採取できる DC は、抗原提示能、viability は低くなるため実際には十分な効果が得られない。この問題を解決するため、我々は survivin 遺伝子導入 DC 用いた遺伝子免疫治療についても報告を行って来た (科学研究費補助金 若手研究 B 課題番号: 22791492)。survivin を遺伝子導入することにより、その抗アポトーシス作用で、DC がより長期にわたって生存することが可能になった。この survivin 導入 DC と PSA 導入 DC を用いることにより、さらなる障害活性の増強効果についての確認ができた。

導入遺伝子に新規癌抗原 chromosome 10 open reading frame 3 (C10orf3) を使用することの利点

更なる抗腫瘍効果を得るために使用する導入遺伝子についての検討をおこなった。

理想的な導入遺伝子とは、

多くの癌で発現が認められ、癌細胞のみに発現する。癌の増殖に必要である。事が考えられる。今回、導入遺伝子として中心体関連抗原の一つである chromosome 10 open reading frame 3 (C10orf3) に着目した。中心体関連抗原は細胞分裂の G2/M 期に移行するために必要であり、centrosome に局在している。C10orf3 はその一つで、有糸分裂の際に重要と考えられ、その他ユビキチン化、転写の制御にもかかわっているとされる。

C10orf3 は正常組織では精巣に高発現し、胸腺、胎盤、脾、胃にわずかに発現を認める

のみである。これに対し、胃癌、肝細胞癌、肺癌、膵癌、乳癌、大腸癌など多くの癌種での発現が確認されている。

さらに C10orf3 siRNA を癌細胞に導入し、その機能を抑制すると viable cell が減少するとの報告があり、C10orf3 は癌細胞の増殖にも密接に関与していると考えられる。

これら C10orf3 と survivin 遺伝子導入 DC を併用した遺伝子免疫治療は、より更なる抗腫瘍効果を得られるものと考えられた。

2. 研究の目的

survivin 遺伝子導入 DC と、新規癌抗原 chromosome 10 open reading frame 3 (C10orf3) を併用することによる遺伝子免疫療法の新しい治療戦略を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

各種泌尿器癌細胞株における C10orf3 発現の検討

・ヒト DC の誘導および成熟化

・C10orf3 遺伝子導入 DC の作成

・C10orf3 遺伝子導入 DC による CTL の誘導と抗腫瘍効果の検討

・C10orf3 遺伝子導入 DC と survivin 遺伝子導入 DC 併用による CTL の誘導と抗腫瘍効果の検討

・各種泌尿器癌細胞株における C10orf3 発現の検討

各種泌尿器癌細胞株 (OUR10、KN41、UMUC3p142、DU145、HT1376p23、HT24 等) より total RNA を抽出し、RT-PCR 法にて C10orf3 の mRNA 発現を確認する。また、western blot によりタンパク発現を確認する。

・ヒト DC の誘導および成熟化

健康人末梢血より DC の誘導

ヒト末梢血より Ficoll-Hypaque 法にて単核球を分離。AIM- に浮遊し、T-75 フラスコ内で 1.5 時間培養。翌日、付着細胞を IL-4、GM-CSF の存在下で 7 日間培養後、浮遊細胞を回収。

DC の maturation と maturation の評価

上記の方法で用意した未熟樹状細胞をさらに 2 日間、GM-CSF を含む AIM- で培養し BCG-CWS を添加する。2 日後細胞は 4 で 10mM EDTA を含む PBS 中で回収する。成熟化の評価は細胞表面マーカーを計測することにより行う。

・C10orf3 遺伝子導入 DC の作成

C10orf3 発現アデノウイルスベクターの作製および調整

C10orf3 cDNA (札幌医科大学第 1 病理学教室より供与) を cosmid vector pAxCawt (TaKaRa) に ligation し、COS-TPC 法を用いて C10orf3 発現アデノウイルスベクター AxCa- C10orf3 を作製する。

DC への C10orf3 遺伝子の導入とその発現アデノウイルスベクター AxCa-C10orf3

を上記方法で得た DC に遠心法を用いて感染させ、C10orf3 遺伝子導入 DC (DC-C10orf3) を作製する。導入効率を RT-PCR による mRNA 発現、western blot analysis によるタンパク発現で確認する。また、同時に DC の viability を trypan blue staining で確認する。

C10orf3 遺伝子導入 DC による CTL の誘導と抗腫瘍効果の検討

泌尿器癌細胞株に対する細胞傷害活性の検討

健常者から採血を行い in vitro にて responder を自己 PBMC、stimulator を DC-C10orf3、DC-LacZ、naiveDC とし IL-2、IL-7 存在下に 2 回刺激し CTL を得る。C10orf3 発現泌尿器癌細胞株を target として 4 時間 LDH-release assay にて細胞傷害活性を測定し、グループ間での細胞傷害活性を比較検討する。抗癌剤耐性株にも細胞障害活性が得られることを確認する。

C10orf3 遺伝子導入 DC と survivin 遺伝子導入 DC 併用による CTL の誘導と抗腫瘍効果の検討

泌尿器癌細胞株に対する細胞傷害活性の検討

健常者から採血を行い in vitro にて responder を自己 PBMC、stimulator を DC-C10orf3、DC-survivin、DC-LacZ、naiveDC とし IL-2、IL-7 存在下に刺激し CTL を得る。survivin、C10orf3 発現泌尿器癌細胞株を target として 4 時間 LDH-release assay にて細胞傷害活性を測定しグループ間での細胞傷害活性を比較検討する。

4. 研究成果

各種泌尿器癌細胞株 (OUR10、KN41、UMUC3p142、DU145、HT1376p23、HT24 等) で、C10orf3 の mRNA、タンパク発現を確認した。

COS-TPC 法により survivin、C10orf3 発現アデノウィルスベクターを作製し、遠心法により各遺伝子導入 DC を作製した。survivin 遺伝子導入による DC の viability を trypan blue staining で検討した。3 週間経過時点で LacZ 遺伝子導入 DC の viability は約 60% であるのに対して、survivin 遺伝子導入 DC の viability は約 90% であり、survivin による DC の viability の延長効果を確認できた。

遺伝子導入 DC により誘導したリンパ球を用いた検討では、各種泌尿器癌細胞株に対して E/T 比 25 で survivin 導入 DC では T-24 に対して 21%、LNCaP には 48% の細胞障害活性を確認 (Fig.1)。Cep55/C10orf3 では T-24 に対して約 29%、LNCaP には 45% の障害活性を確認した (Fig.2)。

さらにこれら 2 つの遺伝子を併用することにより、障害活性は T-24 に対しては 45% に、LNCaP に対しては 65% にそれぞれ増強効果を確認した (Fig.3)。

中心体関連腫瘍抗原を遺伝子導入した DC による免疫療法は、新しい治療アプローチの

可能性を示唆するものと考えられた。

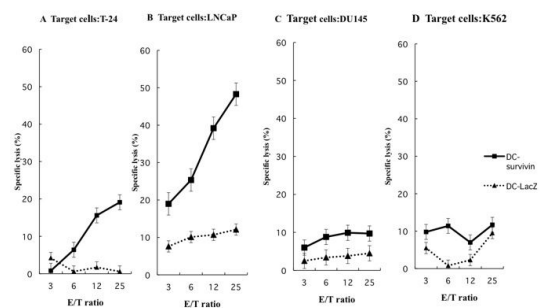


Fig.1 Induction of cytotoxic T lymphocytes (CTL) using autologous DC transfected with AxCA-survivin (DC-survivin).

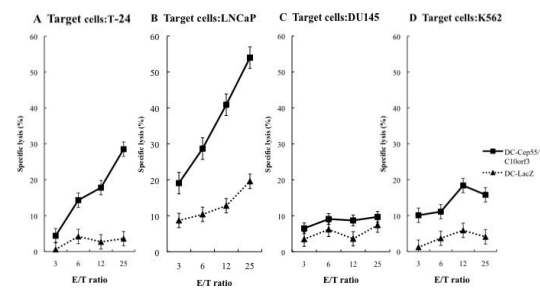


Fig2. Induction of cytotoxic T lymphocytes (CTL) using autologous DC transfected with AxCA-C10orf3 (DC-C10orf3).

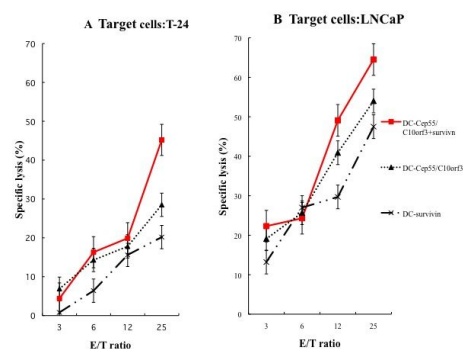


Fig3. Cytotoxicity of CTL induced by combination of DC-survivin and DC-C10orf3 against cancer cell lines.

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)

[学会発表](計 3件)

第105回日本泌尿器科学会総会
survivin 導入樹状細胞と新規癌抗原
C10orf3 を併用した 遺伝子免疫療法
藤井 令央奈

第30回日本バイオセラピー学会学術集会
総会

中心体関連腫瘍抗原 (survivin、
Cep55/chromosome 10 open reading frame 3
(Cep55/C10orf3)) を遺伝子導入した樹状細胞による免疫療法の基礎的検討
藤井 令央奈

第27回泌尿器科分子・細胞研究会
中心体関連腫瘍抗原 (survivin、
Cep55/chromosome 10 open reading frame 3
(Cep55/C10orf3)) を遺伝子導入した樹状細胞による免疫療法の基礎的検討
藤井 令央奈

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 令央奈 (FUJII Reona)

和歌山県立医科大学 泌尿器科 博士研究員

岸和田徳州会病院 泌尿器科 医長

研究者番号：30326368

(2)研究分担者

柑本 康夫 (KOHJIMOTO Yasuo)

和歌山県立医科大学 泌尿器科 准教授

研究者番号：50295820

吉川 和朗 (KIKKAWA Kazuro)

和歌山県立医科大学 泌尿器科 講師

研究者番号：30423940

(3)連携研究者 無し

(4)研究協力者 無し