

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23501290

研究課題名(和文)糖鎖修飾に着目した新しい癌抗原提示法の開発

研究課題名(英文)Establishment of novel CTL inducing vaccine by glycan modification

研究代表者

秋山 暢丈(Nobutake, Akiyama)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：00338865

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)：蛋白質抗原を用いて、細胞障害性T細胞を誘導できるアジュバントを、カチオン性脂質をベースで作成し、ニワトリ由来のOVAをモデル蛋白質に用いて、CTL誘導能に着目して、改良を行った。OVA蛋白質を、大腸菌、ヒト細胞でそれぞれ作成し、ニワトリ由来のOVAとそのCTL誘導能を比較したところ、大腸菌、哺乳類細胞、ニワトリ由来の順に強くなった。哺乳類細胞でOVAを合成する際に、糖鎖合成阻害剤を用いて、発現した蛋白質の糖鎖構造を変更すると、CTL誘導能が向上する事が判明した。

研究成果の概要(英文)：An cationic lipid based adjuvant for inducing cytotoxic T cells (CTL) with protein antigens was prepared and developed to give strong CTL inducing activities by immunizing chicken Ovalbumin (OVA) protein as a model antigen. OVA proteins were expressed and purified in E.Coli and human mammalian cells, examined CTL inducing activities, and the strongest activity was observed with chicken derived antigen, followed by human cells and E.coli in this order. When the protein antigens were expressed in human cell lines, the modification of glycan structures by addition of glycan synthesis inhibitor increased the CTL inducing activity of antigens with cationic adjuvants.

研究分野：免疫学

キーワード：細胞免疫 抗原提示 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

当研究グループで開発したカチオン性脂質由来の細胞障害性 T 細胞誘導アジュバンドは、抗原蛋白質と混ぜるだけで、該当する CTL を強力に誘導できる事が判明している。蛋白質を免疫すると CTL が誘導されるというこのアジュバンドは、病原体や癌へのワクチンの作成および治療法の開発に対して有望な選択肢と考えている。このアジュバンドの開発に用いたオバルブミン蛋白質はニワトリ由来で糖鎖構造が人と異なっていた為、その CTL 誘導能に特殊な糖鎖構造が必要な可能性があった。また、他の糖鎖構造もこのアジュバンドと用いた時に誘導能を変化させる可能性があり、解析が待たれていた。

2. 研究の目的

癌細胞に代表される非極性細胞において、N 型糖鎖修飾を阻害する事により MHC クラス I 拘束性の抗原提示を増強させ、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導する新しい抗癌戦略の構築を目的とする。

具体的には、癌細胞に未熟な N 型糖蛋白質を作らせることにより、導入した蛋白質の一部がクラス I に提示されるか、OVA 特異的 CTL 株を用いて検証する。次に、癌細胞内に貯留した高マンノースタイプの OVA をマウスに免疫し CTL が誘導できるのか *in vivo* で検証する。さらに、これらの解析を踏まえて担癌マウスに糖鎖修飾を阻害した癌細胞を投与して癌治療の新しい免疫療法を構築する。

3. 研究の方法

シグナル配列、糖鎖付加配列、及び OVA のクラス I エピトープを融合したモデル蛋白質をコードする cDNA を作成し、哺乳類細胞に発現させ、細胞外と細胞内に存在するモデル蛋白質を精製する。糖鎖構造の異なるモデル

蛋白質の糖鎖構造の構造を解析すると共に、細胞内に取り残された蛋白質に選択的な糖鎖構造に対する抗体を作製する。

また細胞内に取り残される構造を持つ糖鎖構造を持つ OVA 蛋白質を糖鎖合成阻害剤の存在下で発現させ、精製する。また糖鎖構造を含まないモデル蛋白質として大腸菌で発現させ、非変成条件で精製する。

ニワトリ由来の OVA 蛋白質を免疫し、内包する OVA に対する MHC クラス I エピトープを *in vivo* で排除する活性を指標にして、カチオン性リポゾーム成分を含むアジュバンドの最適化を行う。

最適化したアジュバンド共に糖鎖構造を改変したモデル蛋白質をマウスに免疫し、糖鎖構造の改変に対する CTL 誘導能の増強効果を調べる。

担癌モデル細胞の糖鎖構造を変化させ、上述のアジュバンド共に免疫し、抗癌活性を評価する。

4. 研究成果

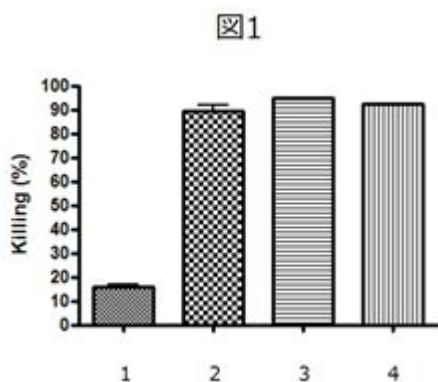
シグナル配列、糖鎖付加配列、及び OVA のクラス I エピトープを融合したモデル蛋白質を HEK-293 由来の細胞に発現させ、細胞外と細胞内に存在するモデル蛋白質を精製した。これらをウサギ、マウスに免疫して、細胞内に取り残されたモデル蛋白質の糖鎖構造に特徴的な高いマンノース型である (Hex)2-7+(Man)3+(GlcNAc) 型の糖鎖に対する選択的な抗体を得ることが出来なかった。しかし、OVA の蛋白質を発現させる際に、キフネンシン、カスターノスペルミンを添加すると、この糖鎖構造を持つ OVA 蛋白質が発現され、細胞外に効率的に放出され、非変成条件で簡便に精製する事が出来た。

次に、免疫する際に用いるアジュバンドの最適化を行った。

ニワトリ由来の OVA 蛋白質を抗原として免疫し、6 日後に *in vivo* で内包するエピトープ

(アミノ酸配列：SIINFEKL)を持つ単核球の排除を指標に、カチオン性脂質をベースとしてアジュバントの最適化を行った。この結果、カチオン性脂質である Dimethyldioctadecylammonium bromide(DDA) と、1-Oleoyl-rac-glycerol, コレステロールと界面活性剤である Tween-80 を基本成分にもつアジュバントを用いると効率よく CTL を誘導する事が出来た。このアジュバントは分散性に優れ、免疫直前に抗原と混合し免疫するだけで、CTL を誘導する事ができ、リポゾーム内への封入作業は必要なく、封入操作による誘導活性の向上も無かった。この CTL の誘導はヘルパー T 細胞に非依存性であり、TLR リガンドも必要なかった。初回免疫後、CTL 活性は非常に短時間(約4日)で誘導され、6日目では該当するエピトープをもつレポーター細胞の排除は90%排除され、活性は低減するが、2週間は活性が認められた。

このアジュバントを持ちいて、糖鎖の無い大腸菌もしくは HEK-293 細胞により発現させた OVA 蛋白質、ニワトリ由来の OVA 蛋白質を用いて CTL 誘導能を比較した所、大腸菌、HEK-293 細胞、ニワトリ由来の順で強くなった。HEK-293 細胞で作成する際にキフネンシン、カスタノスベルミンで糖鎖構造を変更すると CTL 誘導能は増大した。(図1)



- 1 : HEK-293由来OVA (未処理)
- 2 : (カスタノスベルミン処理)
- 3 : (キフネンシン処理)
- 4 : ニワトリ由来OVA

次に、マウスメラノーマ細胞である B6 細胞をキフネンシン存在、もしくは非存在下で培養し、ハーベスト後、超音波で破碎し、抽出液とした。C57BL/6N マウスに B6 細胞を尾静脈より導入し、その後、抽出液とアジュバントの混合液を用いて、腹腔に免疫した。一か月後、メラノーマ細胞の肺への転移数と腫瘍の大きさを比較したところ、キフネンシン処理した抗原の方が、より転移を抑制し、また転移した癌の大きさも小さい傾向があった。再現性の向上など、更なる検討が必要であるが、抗原の糖鎖修飾の修飾による CTL 誘導の向上を経る、新しい癌のワクチン療法の開発を期待させる結果であった。

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 件)

[学会発表](計 2 件)

秋山暢文、CTL induction with liposome based adjuvants、日本免疫学会、2013年12月11日、「幕張メッセ(千葉県千葉市)」

秋山暢文、Enhancement of CTL induction with cationic liposome by the modification of N-glycan structure、日本免疫学会2014年12月11日、「国立京都国際会館(京都府京都市)」

[図書](計 件)

[産業財産権]
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

秋山 暢丈 (AKIYAMA NOBUTAKE)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：00338865

(2) 研究分担者

斎藤 三郎 (SAITO SABURO)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10186934

(3) 連携研究者

()

研究者番号：