

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 挑戦的萌芽研究
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 23659549
 研究課題名（和文） 次世代型メラノーマ経鼻噴霧ワクチンベクターによる遺伝子免疫療法
 研究課題名（英文） The genetic immunotherapy by novel nasal spray vaccine for melanoma using the next generation type virus vector
 研究代表者
 河野 光雄（KAWANO MITSUO）
 三重大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号： 00234097

研究成果の概要（和文）： 難治性の悪性腫瘍であるメラノーマに対し、従来の化学療法や放射線療法に代わる新たな治療法としての遺伝子免疫療法を確立するため、腫瘍特異抗原 TRP-2 遺伝子ならびに細胞性免疫誘導の強いアジュバンド活性をもつ Ag85B 遺伝子のそれぞれを搭載した非増殖型パラインフルエンザ 2 型ウイルスベクターを作製した。この次世代型メラノーマ経鼻噴霧型ワクチンをメラノーマ様モデルマウスに経鼻投与し、その抗腫瘍効果とメカニズムを解析した。

研究成果の概要（英文）： To establish a novel genetic immunotherapy instead of conventional chemotherapy and radiotherapy against refractory malignant melanoma, we have developed the parainfluenza type 2 virus vector introduced TRP-2 gene known as melanoma differentiation antigen or Ag85B gene inducing strong Th1 adjuvant activity. We analyzed the antitumor effect and the immune mechanisms by intranasal administration to melanoma like model mice using the next generation spray vaccine for melanoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：免疫学、ウイルス学、腫瘍学、分子生物学、
 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学
 キーワード：皮膚腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

メラノーマは、最も予後の悪い悪性腫瘍の一種で、従来行われている化学療法や放射線療法に対して難治性を示す。それゆえ治療のためには遺伝子免疫療法のような新規かつ有効な代替のアプローチが必要とされている。近年、様々な腫瘍特異抗原が発見され、それらを用いた癌ワクチンの開発が行われている。メラノーマにおいても、tyrosinase related protein (TRP)-1 や TRP-2 などのメラノーマ特異抗原をターゲットにした免疫治療を目的とする研究も行われている。しかしながら、現在研究されているメラノーマワクチンのデザインは、主に腫瘍抗原の MHC ク

ラス I 提示による CD8+T 細胞のみにフォーカスがあてられており、腫瘍特異抗原のセルフトレランスを回避できず、十分な抗腫瘍効果が得られていないのが現状である。

抗腫瘍効果を期待するものとして、腫瘍特異抗原に対する CD8+T 細胞 (CTL) がある。近年これに加えて、この腫瘍抗原特異的 CTL 活性を増強する方法として、活性化した CD4+T 細胞 (Th1) からの IFN- γ の存在が報告されている。さらにまた、相乗的な抗腫瘍効果として、腫瘍特異抗原の B 細胞レスポンスの重要性も示唆されてきている。

抗酸菌分泌抗原である Ag85B は抗酸菌が分泌する主要な蛋白であり、遺伝的背景に左右

されず強いTh1誘導活性を示すTh1タイプサイトカインを産生するため、癌治療、ワクチンアジュバントとしての効果を発揮する。

CD4+T細胞は、抗原提示細胞(APCs)によって活性化され、サイトカインを産生するエフェクターヘルパーT(Th)細胞に分化し、サイトカイン分泌と免疫制御機能に基づいてTh1, Th2, Th17, 濾胞ヘルパーT細胞に分類される。Tヘルパー17(Th17)細胞は炎症誘発サイトカインであるインターロイキン-17A(IL-17A)、IL-17F、IL-22を産生する。Th17細胞由来のサイトカインの中で、IL-17Aは様々なサイトカイン(CCL2, CCL7, CXCL1, CCL20)とマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP3, MMP13)の発現を誘導する。肺のIL-17Aの変異体過剰発現は炎症誘発遺伝子の発現と白血球による組織浸潤の誘導を起こす。一方、IL-17Aシグナルの阻害は細菌感染に対する宿主防御の障害と自己免疫疾患に対する抵抗性を導く。

Th17細胞は様々なヒトの腫瘍で認められているが、癌免疫における機能は明らかにされていない。メラノーマの肺転移に関するIL-17A欠損マウスを使った研究では、抗腫瘍反応におけるIL-17の保護効果があることが報告されている。更に、腫瘍特異Th17細胞を用いたT細胞免疫療法は、様々な腫瘍に対して保護効果があり、肺メラノーマモデルでは、腫瘍特異的な細胞障害性T細胞の反応を促進することが示されている。

hPIV2ベクターは、気道粘膜に感染し、(-)極性の非分節型1本鎖RNAをもっている。そのため分節型のゲノムをもつインフルエンザウイルスのようにパンデミックな流行をもたらす分節間の変異(不連続変異)は起こらない。また、hPIV2は、生活環のすべてを細胞質で行うため、遺伝子治療等で用いられているアデノウイルスベクターやワクチンアジュバントのようなDNAウイルスベクターとは異なり、ウイルスゲノムの核内(染色体)への組込みは起こらず、それによる偶発的なガン化等は回避できる。さらに当該ベクターのもつ元来の病原性もそれらのウイルスよりも弱く、ヒト(成人)での病原性の報告もなく安全性は高い。現在、研究室プロトタイプとして用いられているベクターは、hPIV2粒子形成に必要な不可欠なMタンパク遺伝子上の2カ所にストップコドンを導入した非増殖型hPIV2ベクター[PIV2(Δ 289)]である。研究室プロトタイプベクターも非増殖型であるが、ストップコドンの導入により構造遺伝子の発現を調整した形態であるため、臨床応用に際し安全性を考慮すれば、M遺伝子を完全に欠損させた非増殖型hPIV2ベクター(PIV2 Δ M)へのスペック変更が必要となる。

hPIV2ベクターの最大の機能としては、導

入遺伝子産物が大量に回収可能(ウイルス産生遺伝子産物として最大)であり、導入遺伝子の分泌型蛋白として発現することで、ウイルス粒子形成の影響を抑制できることが挙げられる。また、このhPIV2ベクターを用いた研究成果から、hPIV2ベクターの機能として、導入遺伝子による接種動物の肺での高いワクチン効果ならびに免疫制御効果を示し、肺からの免疫で全身性の免疫制御効果が得られる可能性を示した。

2. 研究の目的

研究背景に示した事象を踏まえ、本研究においては、安全性の高い非増殖型hPIV2にメラノーマ腫瘍特異抗原であるTRP-2ならびに強いTh1誘導のアジュバント活性をもつAg85B遺伝子を導入したウイルスベクターを用いて、メラノーマ様モデルマウスに経鼻投与し、メラノーマの肺転移における抗腫瘍ワクチン効果ならびに抗腫瘍効果に関係すると考えられているTh17細胞の誘導能等の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) TRP-2ならびにAg85B遺伝子を導入したワクチンベクター(PIV2 Δ M)の作製

まず全長のPIV2 anti-genome cDNAコピーを含んだプラスミド(pPIV2)を鋳型とした2step PCRを行ないM遺伝子を全て除去したコンストラクト(pPIV2 Δ M)を完成させた。次に、図1に示したように、そのNot IサイトにAg85BならびにTRP-2遺伝子を挿入したプラスミド(pPIV2 Δ M/Ag85B, pPIV2 Δ M/TRP-2)を作製した。図1のゲノムを含むプラスミドと共に4種のプラスミド(pPIV2 Δ M; 5.0 μ g, NP; 2.5 μ g, P; 0.4 μ g, L; 2.5 μ g, T7; 1.8 μ g)を、リポフェクトアミンLTXを用いてBSRT7/5細胞にトランスフェクトし、Vero細胞との共培養によりレプリコン細胞を作製した。このレプリコン細胞と一過性にM遺伝子を発現させたCos細胞を共培養し、非増殖性のリコンビナントウイルス(PIV2 Δ M)を回収した。同様の方法でAg85BならびにTRP-2を導入したウイルス(PIV2 Δ M/Ag85BならびにPIV2 Δ M/TRP-2)を回収した。

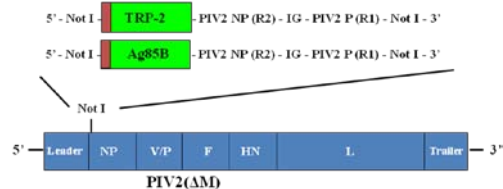


図1. メラノーマワクチンベクター(PIV2 Δ M)コンストラクト

(2) メラノーマ肺転移様モデルマウスの作製

早期に確実な肺転移を起こすため、6週齢のC57BL/6マウス(♀)にマウスメラノーマ細

胞である B16-F10(3×10^6 cell/匹)を尾から静注し、肺転移モデルを作製した。

(3)メラノーマ抗腫瘍ワクチンベクターの経鼻投与による肺転移抑制効果の検討

作製したメラノーマ抗腫瘍ワクチン PIV2 Δ M/TRP-2 ならびに PIV2 Δ 289/Ag85B ベクターをメラノーマ肺転移様モデルマウスに経鼻投与し、一群6匹のマウスを用いてその抗腫瘍効果を図2のプロトコールに従って検討した。

A、B、C、D、E 群は B16-F10 細胞を静注した肺転移様モデルマウス、F、G 群はメラノーマを移植していないノーマルマウスを用い、抗腫瘍ワクチンならびに PBS を以下のように経鼻投与した。

A 群:PIV2 Δ 289/Ag85B (4×10^6 TCID₅₀)

B 群:PIV2 Δ M/TRP-2(1×10^5 TCID₅₀)

C 群:PIV2 Δ 289/Ag85B (2×10^6 TCID₅₀)

PIV2 Δ M/TRP-2 (5×10^4 TCID₅₀)

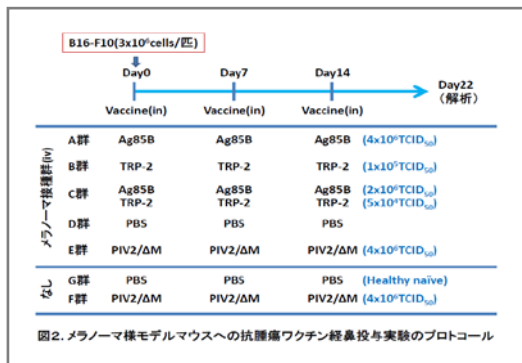
D 群:PBS

E 群:PIV2 Δ M(4×10^5 TCID₅₀)

F 群:PIV2 Δ M(4×10^5 TCID₅₀)

G 群:PBS

腫瘍移植 0、7、14 日後にワクチンをそれぞれ経鼻投与し、腫瘍移植後 22 日目に肺転移予防効果の解析を行った。



(4)mRNA の精製および定量

採取したマウス肺をホモゲナイズし、TRIzol を用いて totalRNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を用いて total RNA から cDNA を合成した。この cDNA を用いサイトカインならびにケモカイン遺伝子(L-17、IL-2、L-12、IL-6、CCL20、CCL2、IFN- γ 、TNF- α)の発現量を TaqMan probe を用いたリアルタイム PCR によって定量した。

4. 研究成果

(1)メラノーマ抗腫瘍ワクチンベクターの作製

① 2 遺伝子搭載型 PIV2 Δ M ベクターの導入遺伝子位置による発現量の検討

研究計画に示した Ag85B および TRP-2 の 2

遺伝子を搭載したメラノーマ抗腫瘍ワクチンベクター作製にあたり、pPIV2 Δ M プラスミドの HN-L 間に Sal I サイトを導入したコンストラクトを作製した。この 2 種の導入遺伝子サイトをもつ pPIV2 Δ M(N-S) の Sal I サイトにのみ、また、Sal I サイト及び Not I サイトの両方に EGFP 遺伝子を挿入したコンストラクトを作製し、2 遺伝子搭載型 PIV2 Δ M ベクターの導入サイトにおける発現量の比較を行なった。図3に示したように Sal I サイトに導入した EGFP の発現量は、想定外の極めて少ない発現量($\ll 1/10$)であった。PIV2 と同じパラミクソウイルス科のセンダイウイルスにおいて、同位置での発現が 80~90% 程度との報告があり、これと同程度の発現を PIV2 Δ M ベクターに期待していたが、本ベクターにおいては、その発現量が著しく低いことが同定された。これらの結果により、本ベクターにおける 2 遺伝子同時発現が確認され、さらに Sal I の位置に導入した遺伝子発現の実用性は低いことが示唆された。

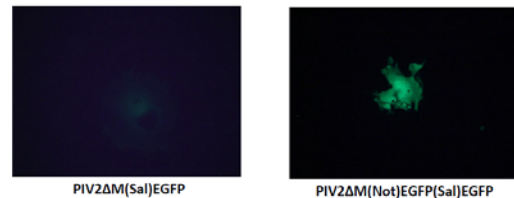


図3. 遺伝子導入位置による発現量の違い

②Ag85B ならびに TRP-2 遺伝子導入 PIV2 Δ M ベクターの作製

研究の方法に示した手順でワクチン作製のこのコンストラクト(pPIV2 Δ M/TRP-2)を作製した。まず、導入遺伝子のインサージョンの確認のため Not I サイトを挟んで作製したプライマー(上流:5G、下流:3G)を用いて PCR を行なった。図4(A)に示したように遺伝子の挿入が確認された。次に遺伝子の5'に付加した TPA のシグナルシーケンスに相当するプライマー(5' TPA)と上記の 5G もしくは 3G プライマーを用いて導入遺伝子の挿入方向を確認した。

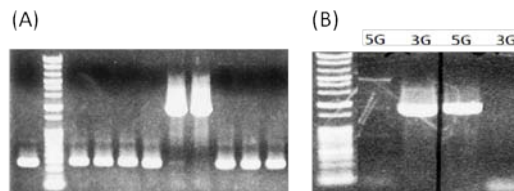


図4. 導入遺伝子の方向確認

これらのプラスミドを用いて、リバースジェネティクス法によるウイルス回収を行ない、PIV2 Δ M/TRP-2 を 3×10^5 TCID₅₀/ml のタイターで 5 ml を回収することができた。同様に PIV2 Δ M/Ag85B についてもほぼ同量のウイル

スを回収できた。

(2)メラノーマ肺転移様モデルマウスの作製

C57BL/6 マウス(♀)にマウスメラノーマ細胞の B16-F10 細胞(3×10^6 cell/匹)を尾から静注し、肺転移モデルを作製した。腫瘍移植後 21 日目に解析を行ったところ、図 5 に示したようにメラノーマの肺転移が見られた。



図 5. 腫瘍移植後 21 日目の肺転移

(3)メラノーマ抗腫瘍ワクチン経鼻投与による肺転移抑制効果の検討

上記ベクター作製において示したように、今回作製した目的の 2 種メラノーマ抗腫瘍ワクチンベクターは、 3×10^5 TCID₅₀/ml 程度と High タイターのウイルスストックが得られなかったため、Ag85B 導入ベクターについては、既に作製してあった M 遺伝子上の 2 カ所にストップコドン挿入した非増殖型 hPIV2 ベクター [PIV2(Δ 289)/Ag85B] を使用した。

図 2 に示したプロトコールに従い、一群 6 匹のマウスを用いてその肺転移抑制効果について検討した。

各群でのメラノーマの肺転移率は、A 群：67%、B 群：75%、C 群：50%、D 群：67%、E 群：33%で、予想に反しコントロールとして接種した PIV2 Δ M のみの経鼻投与が最大の転移阻止効果を示した。

これらの機序解明のために、それぞれのマウスの肺を採取し、TaqMan probe を用いたリアルタイム PCR によりサイトカインプロファイル (IL-2、IL-6、IL-12、IL-17、IFN- γ 、TNF- α 、CCL2、CCL20) を作製した。

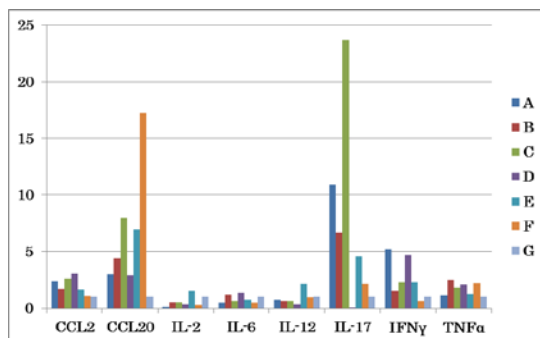


図 6. メラノーマ様モデルマウスへのワクチン投与によるサイトカインプロファイル

図 6 には healthy control である G 群の平均値を 1 とし、各群におけるそれぞれのサイトカインおよびケモカインの平均値を示した。また、図 7 には同様に各群における転移の有無による Th17 系関連の IL-17、CCL20 および CCL2 発現量を比較した。

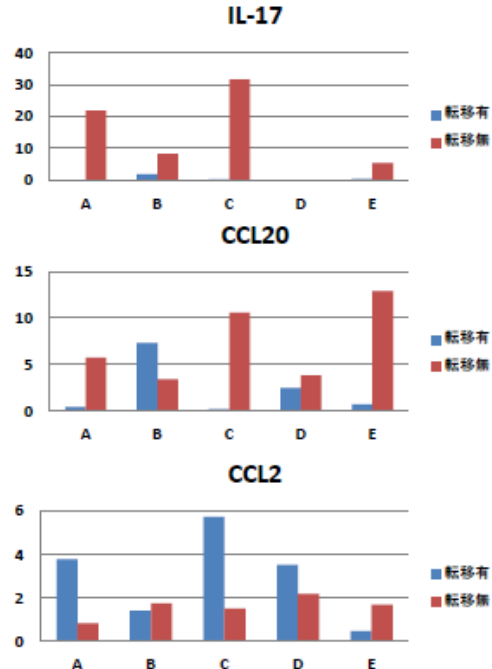


図 7. メラノーマ肺転移の有無による Th17 系サイトカインおよびケモカインの発現

これらの結果を総合すると、ワクチンを接種しなかった D 群においては、メラノーマの肺転移の有無にかかわらず IL-17 の発現が著しく抑制されていた。一方、ワクチンを投与したそれぞれの群で、転移抑制に相関して IL-17 の強発現がみられた。特に、2 種のワクチンを同時投与した C 群において顕著であった。さらに Th17 系のケモカインである CCL20 についても同様の傾向がみられ、特に最大の転移阻止効果を示した E 群で顕著であった。また、同系の CCL2 の発現に関しては、転移抑制と逆の相関の傾向がみられた。他のサイトカインについては、転移抑制に関連する差異は認められなかった。

近年、メラノーマの肺転移において、Th17 細胞による IL-17 および CCL20 を介した抗腫瘍免疫反応の誘導メカニズムが提唱されている。上記に示した結果は、メラノーマ肺転移様モデルマウスに経鼻投与した PIV2 Δ M、PIV2(Δ 289)/Ag85B ならびに PIV2 Δ M/TRP2 の Th17 細胞系誘導能を示唆し、メラノーマの肺転移抑制における抗腫瘍ワクチンベクターとしての有効性が認められた。

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 6 件)

(1) **Karamatsu K, Matsuo K, Inada H, Tsujimura Y, Shiogama Y, Matsubara A, Kawano M, Yasutomi Y.** Single systemic administration of Ag85B of mycobacteria DNA inhibits allergic airway inflammation in a mouse model of asthma. *J Asthma Allergy*. 2012;5:71-79. doi: 10.2147/JAA.S37667 (査読有)

(2) **Tsuda K, Yamanaka K, Kondo M, Matsubara K, Sasaki R, Tomimoto H, Gabazza EC, Mizutani H.** Ustekinumab improves psoriasis without altering T cell cytokine production, differentiation, and T cell receptor repertoire diversity. *PLoS One*. 2012; 7(12):e51819. doi: 10.1371/journal.pone.0051819. (査読有)

(3) **Uematsu J, Koyama A, Takano S, Ura Y, Tanemura M, Kihira S, Yamamoto H, Kawano M, Tsurudome M, O'Brien M, Komada H.** Legume lectins inhibit human parainfluenza virus type 2 infection by interfering with the entry. *Viruses*. 2012; 4(7): 1104-15. doi: 10.3390/v4071104 (査読有)

(4) **Tsuda K, Yamanaka K, Kitagawa H, Akeda T, Naka M, Niwa K, Nakanishi T, Kakeda M, Gabazza EC, Mizutani H.** Calcineurin inhibitors suppress cytokine production from memory T cells and differentiation of naïve T cells into cytokine-producing mature T cells. *PLoS One*. 2012;7(2):e31465. doi: 10.1371/journal.pone.0031465. (査読有)

(5) **Kakeda M, Yamanaka K, Kitagawa H, Tsuda K, Akeda T, Kurokawa I, Gabazza EC, Mizutani H.** Heat-killed bacillus Calmette-Guérin and Mycobacterium kansasii antigen 85B combined vaccination ameliorates dermatitis in a mouse model of atopic dermatitis by inducing regulatory T cells. *Br J Dermatol*. 2012; 166(5): 953-63. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10763.x. (査読有)

(6) **Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Nakahashi M, Kawano M, Komada H, Nosaka T, Ito Y.** Identification of domains on the fusion (F) protein in trimer that influence the hemagglutinin-neuraminidase specificity of the f protein in mediating cell-cell

fusion. *J Virol*. 2011, 85(7): 3153-3161. doi:10.1128/JVI.01666-10 (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

(1) **紀平佐保子、植松淳、山本秀孝、河野光雄、鶴留雅人、駒田洋、リバビリンによるヒトパラインフルエンザウイルス 2 型増殖阻害に対するニトロベンジルチオイノシン、アクチノマイシン D 及びグアノシンの中和作用、日本薬学会 133 年会、2013 年 3 月 30 日、パシフィコ横浜 (横浜)**

(2) **山本秀孝、内田美香、坂倉百合香、出口小百合、紀平佐保子、植松淳、河野光雄、鶴留雅人、駒田洋、カテキン混合物及びタンニン酸によるパラインフルエンザウイルス 2 型増殖阻害、日本薬学会 133 年会、2013 年 3 月 30 日、パシフィコ横浜 (横浜)**

(3) **鶴留雅人、大塚順平、駒田洋、河野光雄、伊藤守弘、野阪哲哉、パラミクソウイルスの膜融合誘導機構：二分子蛍光相補性 (BiFC) 法を用いた受容体結合蛋白と膜融合蛋白の相互作用の解析、第 60 回日本ウイルス学会、2012 年 11 月 15 日、グランキューブ大阪 (大阪)**

(4) **山本秀孝、伊藤愛、前田友里恵、大河内愛弓、佐藤冴美、紀平佐保子、植松淳、河野光雄、鶴留雅人、駒田洋、漢方薬によるパラインフルエンザウイルス 2 型増殖阻害、日本薬学会 第 132 年会、2012 年 3 月 30 日、北海道大学 (札幌)**

(5) **紀平佐保子、大河内愛弓、佐藤冴美、伊藤愛、前田友里恵、河野光雄、鶴留雅人、植松淳、山本秀孝、駒田洋、リバビリンによるパラインフルエンザ 2 型増殖阻害、日本薬学会 第 132 会、2012 年 3 月 29 日、北海道大学 (札幌)**

(6) **Masato Tsurudome, Mito Nakahashi, Yoshiaki Matsushima, Machiko Nishio, Mitsuo Kawano, Hiroshi Komada, Tetsuya Nosaka.** Identification of amino acids of simian virus 41 (SV41) fusion protein that convert parainfluenza virus 5 fusion protein to a protein which specifically interacts with SV41 hemagglutinin-neuraminidase by substitution. *International Union of Microbiological Societies 2011 Congress*. September 15, 2011. Sapporo Convention Center (Sapporo, Hokkaido)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 光雄 (KAWANNO MITSUO)

三重大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号： 00234097

(2) 研究分担者

山中 恵一 (YAMANAKA KEIICHI)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号： 70314135