

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01371

研究課題名(和文) 樹状細胞を標的とした新規ナノ粒子がんワクチンのヒト化デザインの検討

研究課題名(英文) Study of nano particle cancer vaccines targeting for Dendritic cells.

研究代表者

矢那瀬 紀子 (Yanase, Noriko)

東京医科大学・医学部・兼任助教

研究者番号：10210303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト化マウスの作成するために重度複合免疫不全マウスNOD-Prkdcscid-IL2R-;null(NSG)-HLA-A*0201にヒト造血幹細胞を移植して試みたところ、末梢血中のヒトリンパ球(CD45陽性)80%以上のヒト化マウスが作成できた。次にヒト化マウスにあらかじめ抗DEC205抗体結合HER2ペプチド-CpG ODN内包ミセルをワクチン注射したのち、HER2陽性乳がん細胞株JIMT-1-HLA-A*0201を移入した。移植14日目に対照群では腫瘍サイズ200mm³あり、抗DEC205抗体結合HER2ペプチド-CpG ODN内包ミセル処置群では腫瘍サイズがその1/2であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以上の結果からがんワクチンとして樹状細胞特異抗原に対する抗体を結合したHER2ペプチド-CpG ODN内包ミセルは樹状細胞を有効に惹起し、抗腫瘍活性がヒト化マウスで働いていると考えられ、ヒト乳がん治療での有効性が期待できることが明らかになった。

しかしながら、ヒトでの実用化あたっては臨床を含めた更なる実証が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Humanized mouse was created by transferred human hematopoietic stem cells into the severe complex immunodeficiency mice, NOD-Prkdcscid-IL2R null (NSG)-HLA-A*0201.A humanized mouse in which 80% or more of human lymphocytes (hCD45 positive cells) in peripheral blood could be prepared and used in the vaccine experiments. These humanized mice were vaccinated with anti-DEC205 antibody-binding HER2 peptide-CpG ODN-encapsulating micelles and then the HER2-positive breast cancer cell line JIMT-1-HLA-A*0201 was transferred. On day 14 of transplantation, the control group had a tumor size of 200 mm³, while the anti-DEC205 antibody-binding HER2 peptide-CpG ODN-encapsulating micelle-treated group had a tumor size half that. In these experimental groups, tumor growth was suppressed even on the 21st day of transplantation.

研究分野：免疫学

キーワード：がん 免疫 ワクチン ナノ粒子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ナノ粒子は抗がん剤のみならず免疫原も送達できることから、ワクチンの新規抗原デリバリーシステムの基剤としても注目されている(Krishnamachari et al., Pharm Res. 28:215-38, 2011)。研究協力者のナノキャリア(株)原田研究員らは、ポリエチレングリコール(PEG)とポリアミノ酸からなるブロック共重合体から、新規ナノ粒子ポリマーを開発した。この新規ナノ粒子ポリマーは作製が容易なだけでなく、抗がん剤やDNAと効率よく結合し、ミセルを形成した後の安定性が高く、内容物を継続的に徐放し(Matsumura & Kataoka, Cancer Sci. 100:572, 2009)、しかも副作用がないという優れた特徴を備えていることから、抗がん剤のドラッグデリバリーシステムへの応用が進んでいる。そこで我々は、マウスからヒトへ移行するトランスレショナルな実験法として『ヒト化マウスモデル』を用い、同様の新規ナノ粒子がヒトがん免疫応答の効率的な誘導にも有効かどうか、本研究にて提案するに至った。

2. 研究の目的

ナノ粒子は、ワクチンの基剤としても注目されているが、*in vitro*での研究に留まる場合が多い。本研究では、HLA-A*0201-Tg NSG ヒト化マウスを用いた、ヒト乳がんのモデルを作製し、1)がん抗原ペプチドの選定、2)樹状細胞への選択的取り込み方法、3)アジュバントの選択を中心に検討し、ヒトを対象とした新規ナノ粒子製剤のがんワクチン開発にかかる研究基盤を構築する。樹状細胞サブセットはマウスとヒトとでの相違が大きく、ヒト化マウスの有用性が期待される。

3. 研究の方法

樹状細胞を標的として作製した、ミセル型ナノ粒子を用いた新規がんペプチドワクチンの、マウスからヒトへのトランスレショナルな基盤研究を行う。HLA-A*0201-Tg NSG ヒト化マウスにHER2^{hi} HLA-A*0201⁺ 乳がん細胞株 JIMT-1 を移植。この担がんヒト化マウスモデルを用い、樹状細胞表面マーカー抗体 (Anti-DEC205)による効率的な抗原ペプチドの取り込み、樹状細胞活性化のためのアジュバント(CpG)の添加、ワクチンの投与方法などの検討などを行い、ヒトへの円滑な移行を検討する。ペプチドワクチンの評価は担がんマウスの生存率、樹状細胞の活性化状態や機能評価、ミセル化ナノ粒子の取り込まれ方等にて行う。

- (1) ヒト化マウスの作成(分担:豊田):ヒト化マウスは理化学研究所石川文彦グループディレクターらの方法(Ishikawa et al., PNAS, 107:13022-13027, 2010)に従って作成する。レシピエントマウスは、重度複合免疫不全マウス NOD-Prkdc^{scid}-IL2Rγ^{null} NSG-HLA-A*0201 Tg を用いる。
- (2) ヒト幹細胞の調製:ヒト臍帯血を、Anti-ヒト CD34 結合磁気ビーズにて CD34 陽性細胞を磁気ソートし、さらにセルソーターBD FACS Ariaにて白血球分化マーカー陰性の CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻ CD19⁻ CD56⁻ CD34⁺ 幹細胞に分離する。
- (3) ヒト幹細胞の投与方法の検討:(2)にて調製したヒト造血幹細胞は、(1)の NSG マウスの生後 24~48 時間の新生仔マウスの顔面静脈に注射($2 \times 10^2 \sim 2 \times 10^4$)する。本研究ではより平易で安定したヒト化マウスの実験系を目指す。ヒト幹細胞の生着の確認は、移植 8~12 週後にマウスの末梢血、脾臓のヒト T 細胞(Anti-CD3)、細胞(Anti-CD19)、それぞれの抗体を用いて、フローサイトメトリー解析により確認する。
- (4) ミセル型ナノ粒子ペプチドワクチンの作成:基本的なミセル型ナノ粒子の作成は、先行研究である研究代表者らの実験に従う。本研究では、あらためてヒトワクチンを作成するため、標的とするヒト樹状細胞に発現している標的分子を考慮したミセル型ナノ粒子を作る必要がある。特異的取り込みを促す樹状細胞活性化のためのアジュバント(CpG)、乳がん HER2 抗原の抗原エピトープの選択、2つのポイントに関して、それぞれナノ粒子製剤作成時に必要な種類と量と質とのタイトレーションを行う。最適なミセル型ナノ粒子は、ヒト培養樹状細胞を用いた *in vitro* の実験系によって、抗原の取り込みと樹状細胞活性化マーカー上昇をフローサイトメトリー解析によって評価する。
- (5) ヒト乳がん細胞株の樹立(分担:秦):本研究では、研究の目的で示した通り HER2 高発現、HLA-A*0201 陽性のヒト乳がん細胞を用いた実験を計画しているが、これまでの報告では至適な細胞株が存在しない。ヒト乳がん細胞株として JIMT-1 を計画しているが、JIMT-1 は HER2 のみ陽性、MHC-7 は HLA-A*0201 であり、それぞれに実験に不足している HER2 と HLA-A*0201 とをサブクロニングし、補完した乳がん細胞株を樹立する。その際、生体イメージングアナライザー IVIS による実験も考慮し、緑色蛍光タンパク質 EGFP を遺伝子導入マーカーとして用い、生体イメージングにも対応した細胞株を同時に樹立する。
- (6) ヒト化マウスを用いたミセル型ナノ粒子ペプチドワクチンの抗腫瘍効果の検討:(3)で作成したヒト化マウスに、(5)で作成した HER2 高発現、HLA-A*0201 陽性のヒト乳がん細胞 $1 \sim 5 \times 10^6$ /body を、マトリゲルとともに マウス頸部もしくは乳房の皮下脂肪組織内に移

植する。数日後に腫瘍の生着が確認できた時点で、(4)で作成したミセル型ナノ粒子ペプチドワクチンの投与を開始する。ミセル型ナノ粒子の投与方法は、投与量・投与回数・投与間隔・投与開始時期などの検討を行うと同時に①マウス背部皮下の腫瘍とは無関係な部位、②マウス頸部もしくは乳房の所属リンパ節近傍など、ワクチン接種の場所による検討を加える。腫瘍免疫応答の指標として腫瘍サイズ、肺転移などの全身転移、Kaplan-Meier 生存曲線による生存日数を解析する。脾臓の免疫細胞及び腫瘍周辺の浸潤細胞の数、表面マーカーをフローサイトメトリーおよび病理切片で解析する。

- (7) ワクチン接種による樹状細胞活性化の評価: 樹状細胞全分画およびクロスプレゼンテーションに特化している CD141 陽性樹状細胞を分画し、活性化樹状細胞マーカーである、CD69、CD80、CD86、MHC ClassII の発現をフローサイトメトリーにより解析する。樹状細胞の食作用は、蛍光標識したミセル型ナノ粒子を用いて計測する。抗原提示能は、ヒト化マウスの CD8 陽性 T 細胞との bulk 培養と反応した CD8 陽性 T 細胞の ELISPOT アッセイにより評価する。
- (8) ワクチン接種による乳がん抗原特異的 CTL 誘導の評価: HLA-A*0201-HER2 テトラマーによる HER2 特異的 CTL のフローサイトメトリー解析、in vivo CTL アッセイ、in vitro CTL アッセイの3つの方法にて解析する。テトラマーは既に市販されており、本研究に使用可能である。HER2^{high} HLA-A*0201⁺ JIMT-1/MCF-7 と、コントロールとして HER2^{neg} HLA-A*0201⁺を蛍光色素 CFSE にて染め分け、CTL による HER2 特異的細胞傷害活性をフローサイトメトリーにて解析する。
- (9) ミセル型ナノ粒子ペプチドワクチンの生体内動態の解析(分担: 豊田): ナノ粒子に蛍光色素 FITC による蛍光標識を行い、樹状細胞のフローサイトメトリー解析による食作用の評価する。
- (10) ミセル型ナノ粒子ペプチドワクチン接種によるがん細胞増殖環境の変化の検討: 近年がん病巣の微小環境において、がん細胞より誘導され、間質細胞や血管内皮細胞から分泌されるサイトカイン等による血管再生・免疫抑制が問題となっている。特に所属リンパ節における抗炎症性細胞(制御性 T 細胞や myeloid-derived suppressor cell (MDSC) など) に注目し、ミセル型ナノ粒子ペプチドワクチン接種によって、抗炎症細胞の分化が抑制可能かどうか、特異的抗体(MDSC は Anti-CD11b+Anti-Gr-1、制御性 T 細胞は Anti-CD3 +Anti-CD4+Anti-Foxp3)により細胞数、活性化細胞とのサブセットの比、サイトカイン分泌をフローサイトメトリーにて解析する。

4. 研究成果

今回我々は、JIMT-1 および HCC1954 が HER2 を高発現することから、ヒト化マウスに移植するがん細胞としてこれらの細胞株を使用した。この HER2 は乳がんのがん抗原として詳細な研究がなされており、エピトープは HLA ハプロタイプの中でも HLA-A*0201 にロードされることが明らかになっている。また HLA-A*0201 はヒト主要な HLA ハプロタイプであることから、既に HLA-A*0201 トランスジェニック(Tg)NSG マウスが確立されている。しかしながら JIMT-1 および HCC1954 は HLA-A*0201 陰性であることから、これらの細胞株に HLA-A*0201 を導入した。HLA-A*0201 をレトロウィルスベクターにサブクロニングし、パッケージング細胞に導入後、得られたウィルス上清を乳がん細胞株 JIMT-1 と HCC1954 に感染導入した。FACS によるソート後、HLA-A*0201 および HER2 に対する特異抗体を用いたフローサイトメーター解析により HLA-A*0201 高発現した安定株が得られたことを確認した。これらの細胞株を NSG マウス移植したところ、28 日目には腫瘍サイズが JIMT-1 親細胞株移入マウス群の平均 680mm³で JIMT-1 HLA-A*0201 陽性細胞株移入マウス群の平均 687mm³であり HLA-A*0201 を導入してもヒト乳がん細胞株の NSG マウスで生着、増殖に差異がないことが明らかになった。また、HCC1954 細胞株でも同様の結果が得られ、HLA-A*0201-Tg NSG ヒト化マウス移植に適した細胞株を得ることができた。

ヒト化マウスは Ishikawa らの方法(PNAS, 107:13022 2010)に従って作成を試みた。レシピエントマウスは、重度複合免疫不全マウス NOD-Prkdc^{scid}-IL2Ry^{null} (NSG)に、ヒト白血球型抗原の HLA-A*0201 を導入したマウスを用いた。ヒト幹細胞の調製: ヒト臍帯血からヒト造血幹細胞を、Anti-ヒト CD34 結合磁気ビーズにて CD34 陽性細胞として磁気ソートした。得られた CD34 陽性細胞数は 1~9X10⁵であり、フローサイトメーター解析で、元のヒト臍帯血では CD34 陽性細胞は 0.1-0.2%であったのに対して、磁気ソートにより得られたヒト造血幹細胞では 89-95%の CD34 陽性細胞であった。ヒト幹細胞の移入: 磁気ソートにより調製したヒト造血幹細胞は、NSG マウスの生後 24-48 時間の新生仔マウスの顔面静脈に注射(2×10⁴~2×10⁵)した。ヒト幹細胞の生着は、移植 4-16 週後にマウスの末梢血中のヒトリンパ球(Anti-CD45)、T細胞(Anti-CD3)、細胞(Anti-CD19)、それぞれの抗体を用いて、フローサイトメトリー解析により確認した。ヒト造血幹細胞移入した新生仔マウスのうち 52%で生着が期待された。解析したマウス群では移入後 4 週間でヒトリンパ球 (Anti-CD45)が出現し、7 週間後には平均 60%で 11 週間後には平均 79%で CD45 陽性であった。7 週間後では CD19 陽性細胞は平均 33%で、CD3 陽性細胞は平均 3%でありヒト細胞がヒト T 細胞よりも優位であった。しかし 11 週間後の解析では CD3 陽性細胞 11%、さらに 16 週間後では 25%とヒト T 細胞が着実に生着増加していた。ヒト T 細胞の中でも CTL 活性に重要な CD8 陽性細胞も CD3 陽性細胞中平均 30%出現していた。重度複合免疫不全マウス NSG- HLA-

A*0201 にヒト造血幹細胞を移植して作成したマウスのうち、末梢血中のヒトリンパ球 (CD45 陽性)80%以上で T/B 比でヒト T 細胞が優位に増殖しているマウスをヒト化マウスとして実験に用いた。ヒト化マウスにあらかじめ抗 DEC205 抗体結合 HER2 ペプチド-CpG ODN 内包ミセルを皮下注射した。比較対照群には抗 DEC205 抗体のみで HER2 ペプチド-CpG ODN を含有しないミセルを用いた。これらのミセルを週に 1 回、2 週間にわたり注射後 HER2 陽性乳がん細胞株 JIMT-1-HLA-A*0201 を移入した。移植 14 日目では対照群で腫瘍サイズ 200mm³あり、HER2 陽性乳がん細胞株 JIMT-1-HLA-A*0201 未治療群(前回測定)とほとんど変わらなかったが、抗 DEC205 抗体結合 HER2 ペプチド-CpG ODN 内包ミセル処置群では腫瘍サイズはその 1/2 であった。移植 21 日目でも腫瘍増殖は抑制されていた。以上のことからがんワクチンとして樹状細胞特異抗原に対する抗体を結合した HER2 ペプチド-CpG ODN 内包ミセルは樹状細胞を有効に惹起し抗腫瘍活性が働いていると考えられる。しかしながら、実用化にあたっては更なる実証が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	秦 喜久美 (Hata Kikumi) (30287156)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	
研究分担者	豊田 博子 (Toyota Hiroko) (80468660)	東京医科大学・医学部・助手 (32645)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関