

平成21年5月25日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390041
 研究課題名（和文） 機能改変タンパク質および核酸を基盤とした包括的抗腫瘍免疫治療システムの開発
 研究課題名（英文） Development of all-inclusive anti-tumor immunotherapy based on engineered protein and nucleic acid
 研究代表者
 高倉 喜信（TAKAKURA YOSHINOBU）
 京都大学・薬学研究科・教授
 研究者番号：31071432

研究成果の概要：

機能改変タンパク質および DNA ワクチンの両アプローチを基盤とした包括的抗腫瘍免疫治療システムの開発を試みた。熱ショックタンパク質 Hsp70 と卵白アルブミンの代表的な抗原エピトープから、新規 Hsp70 融合タンパク質を設計した。Hsp70 融合タンパク質、あるいはこれを発現するプラスミドベクターを投与することで、高い抗原特異的免疫応答の誘導に成功した。Hsp70 融合タンパク質発現ベクター投与群では、腫瘍生着も効率的に拒絶され、抗腫瘍免疫治療システムとしての有用性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：抗原デリバリー、DNA ワクチン、熱ショックタンパク質、抗原提示細胞、CpGモチーフ

1. 研究開始当初の背景

癌の免疫療法において有効な抗腫瘍ワクチンを開発するためには、腫瘍抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞すなわち細胞障害性 T リンパ球 (cytotoxic T cell; CTL) の効率的な誘導が可能なる方法論の確立が最も重要な因子となる。しかしながら、ワクチンの形で生体に投与した抗原は、通常、抗原提示細胞 (APC) により外来性抗原としてエンドサイトーシス経路により処理され、エピトープペプチド

は主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス II 分子上に提示され、CTL の誘導に必要な MHC クラス I 分子にはほとんど提示されない。従って、高い CTL 活性を誘導しワクチン療法を成功させるためには、ペプチド、タンパク質、遺伝子等の形でワクチンとして投与した抗原を積極的に APC の細胞質内に送り込みプロテアソーム・TAP 経路を介して MHC クラス I 分子上に効率よく提示させること、所謂クロスプレゼンテーションを高効率で

惹起できるデリバリーシステムの確立が必須である。現在までに、国内・国外を問わず抗原ペプチド/アジュバント複合体、微粒子性キャリアー、融合タンパク質、DNA ワクチン、樹状細胞などを用いた種々のアプローチが検討されているが、未だ十分な治療効果が得られる抗原デリバリーシステムは確立されていない。

一方、近年の免疫学の進展により、高い CTL 活性を得るためにはヘルパー T 細胞 (CD4 陽性 T リンパ球) を同時に活性化させることの重要性が指摘されている。このことは、MHC クラス I エピトープのみならず MHC クラス II エピトープをも APC に効率的にデリバリーすることが重要であることを意味する。申請者のグループは、これまで種々の評価系が確立されている卵白アルブミン (OVA) をモデル抗原に取り上げ、タンパク質の化学修飾および DNA ワクチンのデリバリーシステムの開発に取り組んできた。そこで本研究では、以上の研究背景を踏まえ、機能改変タンパクおよび DNA ワクチンの両アプローチを基盤とした包括的抗腫瘍免疫治療システムの開発を試みることを計画した。

2. 研究の目的

本研究では、代表的な熱ショックタンパク質である heat shock protein 70 (Hsp70) を基盤とした機能改変タンパク質および DNA ワクチンの 2 つのアプローチを同時に取り上げ、両者の総合的な評価を通じて MHC クラス I エピトープおよびクラス II エピトープのデリバリーが最適化できる包括的抗腫瘍免疫治療システムの開発を行なう。

3. 研究の方法

(1) 機能改変型 Hsp70-モデル抗原結合体の開発: APC にエンドサイトーシスにより取り込まれた後、エンドソーム内の酸性条件下において、プロトンスポンジ効果により積極的に細胞質に漏出し、クラス I 経路を介した効率的な提示が期待できるものとして 25 残基または 50 残基のポリヒスチジンを融合させた機能改変型 Hsp70 発現ベクター pHis25-Hsp70 および pHis50-Hsp70 を作製した。またモデル抗原としては、これまでの研究で豊富な情報が蓄積され、種々の評価系が確立されている卵白アルブミン (OVA) の代表的なクラス I エピトープペプチド (pepI, OVA257-264; SIINFEKL) およびクラス II エピトープペプチド (pepII, OVA323-339; ISQAVHAAHAEIN-EAGR) を選択した。これらに対応する配列を N 末あるいは C 末に組み込んだベクターを同様に作製した。別途、両ペプチドを融合した PepII-Hsp70-PepI も併せて作製した。各融合タンパク質は大腸菌で大量調製した。また、各融合タンパク質を発現するプラスミドベ

クターについても、pcDNA3.1 を元に作製した。

(2) 細胞取り込み: マウス樹状細胞株 DC2.4 細胞を用い、各種機能改変型 Hsp70 誘導体の細胞取り込みを ¹¹¹In 評者標識体を用いて評価した。また、蛍光標識抗 Hsp70 抗体を用いて共焦点レーザー顕微鏡による観察を行ない、細胞内局在についても評価し、各融合タンパク質の細胞取り込み特性を明らかにした。

(3) 抗原提示: OVA のクラス I エピトープペプチドおよびクラス II エピトープペプチドをそれぞれ特異的に認識する T 細胞ハイブリドーマ CD8OVA1.3 細胞および DO11.10 細胞を用いた。各機能改変タンパクを樹状細胞に取り込ませた後、抗原刺激により各ハイブリドーマより産生される IL-2 を ELISA で測定することにより各機能改変タンパクの MHC クラス I およびクラス II 提示能を同時に評価した。プラスミドを用いた遺伝子導入後の抗原提示に関しても同様に検討した。

(4) 抗腫瘍免疫効果: 各 Hsp70 融合タンパク質を皮内投与することにより免疫を行い、免疫したマウスより一定の期間毎に血液を採取し、抗体産生を ELISA により測定した。免疫したマウスから脾臓細胞を単離し、CTL 活性を調べることで、ワクチン効果を総合的に判定した。別途、各 Hsp70 融合タンパク質で免疫したマウス背部皮下に、EG.7 細胞 (OVA 発現 EL4 細胞) を移植し、腫瘍増殖抑制および生存日数延長を観察し、予防的効果を評価した。

4. 研究成果

(1) Hsp70 融合タンパク質の細胞取り込み: Hsp70、Hsp70-pepI、His25-Hsp70-pepI はほぼ同程度の取り込み量を示し、その取り込み量は OVA と比較して高かった。これら Hsp70 融合タンパク質の細胞取り込みは、非標識 Hsp70 により有意に減少し、Hsp70 レセプターを介した取り込みであることが示唆された。また、His25-Hsp70-pepI、His50-Hsp70-pepI では細胞全体に強い蛍光が観察され、His 融合による細胞質への移行促進が確認された。

(2) 抗原提示: OVA の代表的エピトープ SIINFEKL と MHC クラス I 複合体を特異的に認識し、IL-2 を産生する CD8OVA1.3 細胞を用いて、MHC クラス I による抗原提示能を検討した結果、His25-Hsp70-pepI は Hsp70-pepI と比較して、有意に高い IL-2 産生を示した。一方、His50 を融合させた Hsp70 融合タンパク質は、著しく抗原提示能が低下することが示された。各種阻害剤を用いた検討から、これら融合タンパク質の抗原提示には、proteasome に依存した提示経路が主に関与していることが示された。一方、MHC クラス II における抗原提示能の検討では、pepII を組

み込んだ Hsp70 融合タンパク質が、非常に効率よく pepII を抗原提示することが明らかとなった。

(3) OVA 特異的免疫応答：Hsp70-抗原融合タンパク質によって免疫したマウスより採取した脾臓細胞を effector 細胞として、OVA を抗原としてもつモデル腫瘍細胞である EG7 細胞と、OVA を抗原として持たないコントロール細胞である EL4 細胞を target 細胞として用い、⁵¹Cr release assay を行った。いずれの群においても、EL4 細胞に対する反応はほとんど認められなかったのに対し、EG7 細胞に対しては His25-Hsp70-pepI 投与群が高い CTL 活性を示した。また、pepII 融合 Hsp70 に関しても、pepII-Hsp70-pepI 投与群は Hsp70-pepI 投与群と比較して、非常に高い CTL 活性を示した。その一方で、pepII のみを有する pepII-Hsp70 投与群では全く CTL 活性が認められず、CTL 誘導における pepI の必要性が再確認された。

(4) 抗腫瘍免疫の誘導：Hsp70-抗原融合タンパク質により免疫したマウスの最終免疫から 1 週間後に背部皮内に EG7 細胞を移植し、腫瘍径の経日変化を測定した。その結果、His25-Hsp70-pepI 投与群は、Hsp70-pepI に比較し腫瘍増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。さらに同様の実験条件において延命効果を評価したところ、His25-Hsp70-pepI 投与群は約 79% の生存率を示し、Hsp70-pepI 投与群の約 58% に比較し、より高い生存日数延長効果を示した。また、pepII-Hsp70-pepI 投与群においても、Hsp70-pepI 投与群と比較して、有意に高い腫瘍増殖抑制効果、ならびに延命効果が得られた。この結果は、Hsp70 の 1 分子上に MHC クラス I およびクラス II の両分子を搭載することが、Hsp70-pepI 単独投与群に比較し CTL 誘導を顕著に増強し、さらには高い腫瘍増殖抑制効果を発揮することが明らかとなった。

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 13 件)

Isaji K, Kawase A, Matono M, Guan X, Nishikawa M, Takakura Y. Enhanced CTL response by controlled intracellular trafficking of antigen in dendritic cells following DNA vaccination. *Journal of Controlled Release* (査読有) 135 (2009) 227-233.

Yoshida H, Nishikawa M, Yasuda S, Mizuno Y, Toyota H, Kiyota T, Takahashi R, Takakura Y. TLR9-dependent systemic interferon- β production by intravenous injection of plasmid DNA/cationic liposome complex in mice. *Journal of Gene Medicine* (査読有) in press.

Takahashi Y, Yamaoka K, Nishikawa M, Takakura Y. Quantitative and temporal analysis of gene silencing in tumor cells induced by small interfering RNA or short hairpin RNA expressed from plasmid vectors. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (査読有) 98 (2009) 74-80.

Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Nonviral vector-mediated RNA interference: its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* (査読有) in press.

Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Inhibition of tumor cell growth in the liver by RNA interference-mediated suppression of HIF-1 α expression in tumor cells and hepatocytes. *Gene Therapy* (査読有) 15 (2008) 572-582.

Takahashi Y, Nishikawa M, Suehara T, Takiguchi N, Takakura Y. Gene silencing of β -catenin in melanoma cells retards their growth but promotes the formation of pulmonary metastasis in mice. *International Journal of Cancer* (査読有) 123 (2008) 2315-2320.

Nishikawa M, Takemoto S, Takakura Y. Heat shock protein derivatives for delivery of antigens to antigen presenting cells. *International Journal of Pharmaceutics* (査読有) 354 (2008) 23-27.

Nishikawa M, Matono M, Rattanakit S, Matsuoka N, Takakura Y. Enhanced immunostimulatory activity of oligodeoxynucleotides by Y-shape formation. *Immunology* (査読有) 124 (2008) 247-255.

Kako K, Nishikawa M, Yoshida H, Takakura Y. Effects of inflammatory response on in vivo transgene expression by plasmid DNA in mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (査読有) 97 (2008) 3074-3083.

Yoshida H, Nishikawa M, Yasuda S, Mizuno Y, Takakura Y. Cellular activation by plasmid DNA in various macrophages in primary culture. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (査読有) 97 (2008) 4575-4585.

Ogawa Y, Yoshinaga T, Nishikawa M, Takakura Y. Unique cytokine production profile following stimulation with DNA in macrophages from NZB/W F1 mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* (査読有) 31 (2008) 1244-1249.

Yamasaki Y, Ikenaga T, Ohtsuki T, Nishikawa M, Takakura Y. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by immunization with negatively-charged soluble antigen through scavenger receptor-mediated delivery. *Vaccine* (査読有) 25 (2007) 85-91.

Takakura Y, Takemoto S, Nishikawa M. Hsp-based tumor vaccines: state-of-the-art and future directions. *Current Opinion in Molecular*

Therapeutics (査読有) 9 (2007) 385-391.

[学会発表] (計 19 件)

Rattanakiat S, Nishikawa M, Takakura Y. Development of DNA Nano-Assemblies with Enhanced Immunostimulatory Activity. 日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26-28 日、京都.

水野友美子、西川元也、的野光洋、Sakulrat Rattanakiat, Dan Luo、舟橋久景、高倉喜信. 免疫・化学療法に向けた短鎖 DNA を基盤とする DNA ナノ粒子・ハイドロゲル開発. 第 18 回アンチセンスシンポジウム、2008 年 11 月 17-18 日、岐阜.

Takakura Y. Optimization of Design and Delivery of Plasmid Vector for Interferon Gene Therapy. 2008 KCRS Annual Conference: Research Networking for Future Therapy, 2008 年 9 月 4-5 日、Jeju Island, Korea.

Rattanakiat S, Nishikawa M, Takakura Y. DNA-based Nanoassembly Formation for Enhanced Immunostimulatory Activity of Oligodeoxynucleotides. 第 24 回日本 DDS 学会学術集会、2008 年 6 月 29-30 日、東京.

松岡奈穂、西川元也、Sakulrat Rattanakiat、高倉喜信. ホスホロチオエート DNA の組み込みによる Y 型 DNA の免疫賦活化能の増強. 第 24 回日本 DDS 学会学術集会、2008 年 6 月 29-30 日、東京.

西川元也. 持続的インターフェロン遺伝子発現システムの開発による癌・アレルギー疾患治療. 日本薬剤学会第 23 年会、2008 年 5 月 20-22 日、札幌.

吉田寛幸、西川元也、豊田敬康、安田幸代、水野友美子、高倉喜信. DNA 刺激によるマクロファージ活性化に対するフィブロネクチンの細胞活性化抑制機構の解析. 日本薬剤学会第 23 年会、2008 年 5 月 20-22 日、札幌.

末原徹也、高橋有己、西川元也、滝口直美、高倉喜信. β -catenin 遺伝子発現抑制による癌細胞増殖抑制と肺転移の亢進. 日本薬剤学会第 23 年会、2008 年 5 月 20-22 日、札幌.

豊田敬康、安田幸代、西川元也、吉田寛幸、高倉喜信. CpG モチーフを含まないプラスミド DNA/リポソーム複合体によるマクロファージからのサイトカイン産生機構の解析. 日本薬剤学会第 23 年会、2008 年 5 月 20-22 日、札幌.

西川元也. 導入遺伝子発現プロファイルの速度論解析に基づく遺伝子デリバリーシステムの最適化. 遺伝子・デリバリー研究会第 8 回シンポジウム、2008 年 5 月 9 日、大阪.

Yoshida H, Nishikawa M, Yasuda S, Mizuno Y, Toyota H, Takakura Y. Unique Property of IFN- β Production upon Intravenous Injection of CpG Plasmid DNA/Cationic Liposome Complex. The 4th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists、

2008 年 4 月 22-24 日、Kyoto.

吉田寛幸、西川元也、安田幸代、水野友美子、豊田敬康、高倉喜信. マウスにおける DNA に対する免疫応答プロファイルの評価. 日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 26-28 日、横浜市.

Rattanakiat S, Nishikawa M, Takakura Y. Enhanced immunostimulatory activity of oligodeoxynucleotides by cholesterol conjugation. 日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 26-28 日、横浜市.

水野友美子、西川元也、直井智幸、高倉喜信. DNA を基盤とする抗癌剤デリバリー・免疫活性化システムの開発. 日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 26-28 日、横浜市.

Nishikawa M. Development of DNA-based nanosized DDS. BioJapan2007、2007 年 9 月 19-21 日、横浜市.

Rattanakiat S, Matono M, Nishikawa M, Takakura Y. Enhanced immunostimulatory activity of oligodeoxynucleotides by Y-shape formation. 第 23 回日本 DDS 学会学術集会、2007 年 6 月 14-15 日、熊本市.

関心、竹本誠二、西川元也、太田淳、高倉喜信. MHC クラス I・II 両エピトープ搭載型 Hsp70 抗原デリバリーシステムの開発. 第 23 回日本 DDS 学会学術集会、2007 年 6 月 14-15 日、熊本市.

矢田智也、西川元也、大野祐司、関心、竹本誠二、高倉喜信. DNA ワクチンの投与部位依存的免疫応答の誘導. 第 23 回日本 DDS 学会学術集会、2007 年 6 月 14-15 日、熊本市.

吉田寛幸、西川元也、安田幸代、水野友美子、光井優、高倉喜信. プラスミド DNA に対する炎症応答の評価とその制御. 日本薬剤学会第 22 年会、2007 年 5 月 21-23 日、さいたま市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高倉 喜信 (TAKAKURA YOSHINOBU)
京都大学・薬学研究科・教授
研究者番号 31071432

(2) 研究分担者

西川 元也 (NISHIKAWA MAKIYA)
京都大学・薬学研究科・准教授
研究者番号 40273437

(3) 連携研究者