

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590357
 研究課題名（和文） CTL 高誘導型 Hsp90-癌抗原融合遺伝子ワクチンの基礎研究
 研究課題名（英文） Induction of tumor antigen-specific CTL by Hsp90-antigen fusion DNA vaccine
 研究代表者
 田村 保明（TAMURA YASUAKI）
 札幌医科大学・医学部・講師
 研究者番号：80322329

研究成果の概要

本研究は、Hsp90 遺伝子と既知の癌抗原遺伝子との融合遺伝子を用いた DNA ワクチンの有用性についての基礎的検討を行ったものである。癌抗原としては、我々が同定した癌抗原サバイビンを用いて、Hsp90-癌抗原融合遺伝子による DNA ワクチンの有効性をマウスを用いて評価した。特に癌抗原の抗原提示細胞による取り込みと抗原提示を促進する目的で、シグナルシークエンス (SS) を N 末端側に付加し、分泌型とした Hsp90-マウスサバイビン融合遺伝子ワクチンの有効性を検討した。その際、癌抗原サバイビンを Hsp90 の N 末端側 (SS-Survivin-Hsp90)あるいは C 末端側 (SS-Hsp90-Survivin) に融合した場合の、免疫効果を比較検討した。腫瘍はマウスリンパ腫細胞 A20 および、腎細胞癌株 RenCa を同型マウスに接種し、その免疫効果を検討した。非常に興味深いことに、いずれの腫瘍においても Hsp90 の N 末端側に抗原を配置した SS-Survivin-Hsp90 の遺伝子ワクチンでは強い抗腫瘍効果を認めしたが、C 末端側に配置した SS-Hsp90-Survivin では全く抗腫瘍効果を認めなかった。またシグナルシークエンスを付加していない Survivin-Hsp90 遺伝子ワクチンと比較すると、高い抗腫瘍効果を示した。また SS-Survivin-Hsp90 融合遺伝子ワクチンで免疫されたマウスでは有意なサバイビン特異的 CTL が誘導されていた。この抗腫瘍効果がサバイビンに対する CTL 誘導によることを示すものと考えられた。以上の結果は Hsp90 の C 末端側が樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞による取り込みの際に非常に重要である可能性を示唆しているものと考えられる。

交付額

	金額単位 円		
	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野 医歯薬学

科研費の分科・細目 基礎医学・人体病理学

キーワード Hsp90, 癌抗原、サバイビン、DNA ワクチン、細胞傷害性 T 細胞、シグナルシークエンス、抗原提示細胞、樹状細胞

研究開始当初の背景

我々は自己腫瘍由来の熱ショック蛋白質 HSP は、腫瘍特異抗原ペプチドを結合しており(HSP-ペプチド複合体)、これを動物に免疫すると腫瘍特異的免疫を誘導することができ、HSP を用いた癌の免疫治療有効性について世界に先駆け報告してきた。これはマクロファージ、樹状細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞(APC)によるクロスプレゼンテーションによることが示されている。これらの APC は受容体依存性エンドサイトーシスにより HSP-ペプチド複合体を取り込み、結果ペプチド特異的な獲得免疫を誘導することを我々は明らかにしてきた。また我々は *in vitro* において、ヒト精製 Hsp90 と腫瘍抗原との複合体を作製する方法を確立してきた。この Hsp90-抗原複合体は、樹状細胞に非常に効率良く **targeting** できることを示し、癌抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を活性化することを明らかにしてきた。この際、Hsp90-抗原複合体は樹状細胞上に発現していると考えられる Hsp90 特異的な受容体を介する、エンドサイトーシスにより取り込まれていることを見出した。Hsp90 に結合している抗原が MHC クラス I に提示されるものであれば、クロスプレゼンテーション経路により、**processing** を受け、MHC クラス I とともに細胞表面に発現・提示され、T 細胞を刺激・活性化する。この経路は細胞膜からリサイクルしてくるクラス I を利用することから、非常に早い免疫反応を誘導できることも示してきた。このように Hsp90-抗原複合体を用いた特異的癌の免疫療法は有用である可能性がある。以上の結果に基づき、現在リコンビナント Hsp90 を用いた癌のワクチン療法の臨床試験を計画している。一方で臨床

試験に用いる GMP grade の Hsp90 蛋白質精製はやや困難である。この問題を克服する手段として、本研究では、Hsp90 遺伝子と既知の癌抗原遺伝子との融合遺伝子を用いた DNA ワクチンの有用性についての基礎的検討を計画した。

研究の目的

外来性 Hsp90 の持つクロスプレゼンテーション誘導を介する、優れた免疫増強効果を応用した、Hsp90-癌抗原融合遺伝子による DNA ワクチンの有効性を評価する。

研究の方法

I. Hsp90-癌抗原マウスサバイビン遺伝子融合遺伝子の作製とその抗腫瘍効果の検討

- (1) 既に取得しているヒト Hsp90 遺伝子とヒトサバイビン遺伝子を FLAG tag 付きベクター (pCAGGS) に挿入する。加えて、アデノウイルス E3 由来のシグナルシーケンスを付加し、分泌型とした Hsp90-マウス Survivin 融合遺伝子を作製する。またコントロールとして Survivin 単独 DNA および Hsp90 単独 DNA ワクチンを作製する。
- (2) このベクター-DNA を BALB/c マウスの大腿四頭筋に投与し、同部位の凍結切片組織を用いて、免疫組織化学的に FLAG およびサバイビンの発現を確認する。
- (3) 発現が確認されれば、融合遺伝子を含むベクター投与したマウスの単径リンパ節および脾細胞を採取し、サバイビ

ンペプチドとの共培養の後、⁵¹Cr release assay によりサバイビン特異的 CTL の誘導につき確認する。

- (4) 同時に ELISPOT assay、テトラマー解析を行い、サバイビン特異的 CTL の誘導・活性化を検討する。
- (5) またワクチン DNA として、サバイビン単独 DNA, Hsp90 単独 DNA を用いた場合との抗腫瘍効果および CTL 誘導能を比較する。

研究成果

シグナルシーケンス負荷 Hsp90-Survivin 融合 DNA ワクチンの作製。
シグナルシーケンスを付加した、SS-Survivin-Hsp90 および SS-Hsp90-Survivin はいずれも細胞外に分泌されることを Western blotting にて確認した。

Hsp90-Survivin 融合 DNA ワクチンの免疫効果

これらの融合遺伝子を 1 回ワクチンしたのち、Survivin を発現しているマウスリンパ腫細胞 A20 および、腎細胞癌株 RenCa を接種した。非常に興味深いことに、いずれの腫瘍においても Hsp90 の N 末端側に抗原を配置した

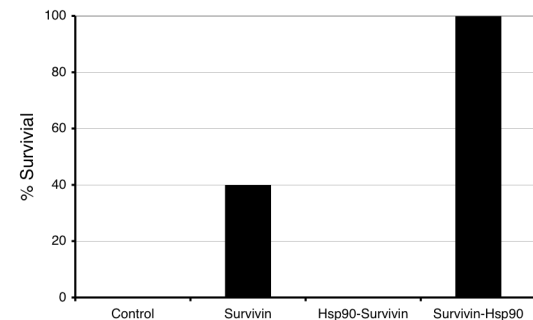
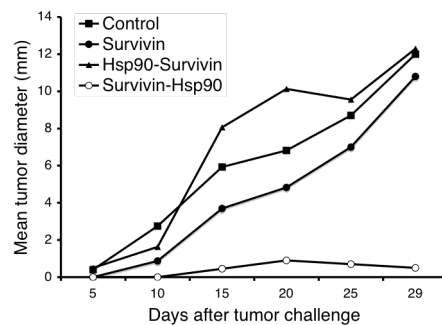
SS-Survivin-Hsp90 の遺伝子ワクチンでは強い抗腫瘍効果を認めたが、C 末端側に配置した SS-Hsp90-Survivin では全く抗腫瘍効果を認めなかった (図)。さらに生存率を比較しても、

SS-Survivin-Hsp90DNA ワクチン群は

の生存を示した (図)。また

SS-Survivin-Hsp90 融合遺伝子ワクチンで免疫されたマウスでは有意な Survivin

特異的 CTL が誘導されていた。この抗腫瘍効果が Survivin に対する CTL 誘導によることを示すものと考えられた。以上の結果は Hsp90 の C 末端側が樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞による取り込みの際に非常に重要である可能性を示唆しているものと考えられる。今後 Hsp90 の deletion mutant 遺伝子を作成して、C 末端側の意義について明らかにする予定である。



Hsp90-Survivin 融合 DNA ワクチンの抗腫瘍効果機序の解析

SS-Survivin-Hsp90 の遺伝子ワクチンの免疫を行ったマウスの脾細胞からサバイビンの特異的に認識する細胞障害性 T 細胞 (CTL) を誘導可能であった。この CTL は同時に A20 リンパ腫細胞も障害した。以上の結果は SS-Survivin-Hsp90 の遺伝子ワクチンによる抗腫瘍効果は、CTL 誘導を介する免疫応答によるものであることが示された。また、樹状細胞にサバイビン遺伝子を導入した細胞を抗原提示細

胞として用いた ELISPOT assay によっても反応性を認めた。ただし、CD4 T 細胞の関与も想定されることから、現在抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体を用いて in vivo depletion assay を行い、エフェクター細胞の同定を行っている。

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

1. Kobayashi J, Hirohashi Y, Torigoe T, Michifuri Y, Yamamoto T, Tamura Y, Kamiguchi L, Miyazaki A, Yamaguchi A, Hariu, H, Hiratsuka H, Sato N. Clonal diversity of cytotoxic T lymphocytes that recognize autologous oral squamous cell carcinoma. *Hum Immunol.* 70 (2): 89-95 2009. 査読有り。
2. Sugawara T, Torigoe T, Tamura Y, Kamiguchi K, Nemoto K, Oguro H, Sato N. Polyamine compound deoxyspergualin inhibits heat shock protein-induced activation of immature dendritic cells. *Cell Stress Chaperones.* 14 (2): 133-139, 2009. 査読有り。
3. Okochi M, Hayashi H, Ito A, Kato R, Tamura Y, Sato N, Honda H. Identification of HLA-A24-restricted epitopes with high affinities to Hsp70 using peptide arrays. *J Biosci Bioeng.* 105 (3): 198-203. 2008. 査読有り。
4. Shinagawa N, Yamazaki K, Tamura Y, Imai A, Kikuchi E, Yokouchi H, Hommura F, Oizumi S, Nishimura M. Immunotherapy with dendritic cells pulsed with tumor-derived gp96 against murine lung cancer is effective through immune response of CD8+ cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Cancer Immunol Immunother.* 57(2): 165-174 2008. 査読有り。
5. Maeda, H et al, Biological heterogeneity of the peptide binding motif of the 70-kDa heat shock protein by surface plasmon resonance analysis. *J Biol Chem.* 282:26956-26962,2007. 査読有り。
6. Kurotaki, T. et al. Efficient Cross-Presentation by Heat Shock Protein 90-Peptide Complex-Loaded Dendritic Cells via an Endosomal Pathway. *J. Immunol.* 179:1803-1813, 2007. 査読有り。
7. Takahashi, H. et al. Interferon gamma assay for detecting latent tuberculosis infection in rheumatoid arthritis patients during infliximab administration. *Rheumatol. Int.,* 27:1143-1148, 2007. 査読有り
8. Imai, A. et al. Inhibition of endogenous MHC class II-restricted antigen presentation by tacrolimus (FK506) via FKBP51. *Eur J Immunol.* 37:1730-1738, 2007. 査読有り。
9. Tabata, A. et al. Suppression of alloreactivity and allograft rejection by SP600125, a small molecule inhibitor of c-Jun N-terminal kinase. *Transplantation.* 査読有り。 83:1358-1364, 2007.
10. Tamura, Y. et al. Extracellular heat shock proteins (eHSPs) pilot exogenous antigen into cross-presentation pathway: A superguide from extracellular world to

intracellular tour. *Annals Cancer Res. and Therapy.* 15:41-49,2007. 査読無し。

〔学会発表〕 計 4 件

1. 田村 保明、熱ショック蛋白質を用いた癌抗原のターゲティング、第 回日本癌学会総会シンポジウム、腫瘍免疫療法の進歩、横浜、2007、10 月 4 日
2. 田村 保明、「樹状細胞を用いたがん免疫療法の確立にむけて 熱ショック蛋白質 (HSP) によるシャペロン分子の時・空間的制御と免疫制御」。第 回日本リンパ網内系学会総会シンポジウム、樹状細胞研究の新展開と樹状細胞免疫療法の現状と将来、札幌、2008 年 月 日
3. 田村 保明、樹状細胞を用いたがん免疫療法、日本ハイパーサーミア学会総会シンポジウム、名古屋、2008、9 月 13 日。
4. 田村 保明、HSP-抗原ペプチド複合体は static endosome に誘導されることによって効率よくクロスプレゼンテーションされる。第 回臨床ストレス応答学会大会、秋田、2008 年 月 日

〔図書〕 計 5 件

1. *Piloting of Exogenous Antigen into Cross-Presentation Pathway by Heat Shock Proteins*, Tamura Y., Kutomi G., Torigoe T., Sato N. In *Heat Shock Proteins in Cancer*, 2007, 383-396. Springer.
2. 抗原クロスプレゼンテーションの新機軸-抗原提示経路における初期エンドソームの重要性: 免疫エンドソームの提唱、田村保明、九富五郎、佐藤昇志 免疫 2008, 2007,32-42. 中外医学社。
3. 九富 五郎、田村 保明、HSP を用いた免疫増強と HLA 消失による免疫回避、2008, *医学のあゆみ*, 627-630. 医歯薬出版。
4. 田村 保明、熱ショック蛋白質による免疫制御と癌ワクチン開発、*がんの温熱免疫療法*、2008, 95-100. 診断と治療社。
5. 田村 保明、分子シャペロンによる免疫制御とがんワクチン開発、*分子医学*、2008,

巻、29-35. 先端医学社。

研究組織

(1) 研究代表者

田村 保明 TAMURA YASUAKI
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号 80322329

(2) 研究分担者

佐藤 昇志 SATO NORIYUKI
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号 50158937