

平成22年12月17日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780226

研究課題名(和文) 犬のリンパ腫におけるDNAワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of DNA vaccine for canine lymphoma

研究代表者

瀬戸口 明日香 (SETOGUCHI ASUKA)

鹿児島大学・農学部・講師

研究者番号：00396813

研究成果の概要(和文)：リンパ腫は犬で最も多く認められる造血器腫瘍であり、人と同様に根治が困難な疾患である。治療の第一選択は化学療法であり、この20年間多剤併用療法による治療成績の向上が検討されているが、腫瘍細胞が多剤耐性を獲得することなどから、1年程度の生存期間しか得られず大きな問題となっている。したがって化学療法以外の新規治療法の開発は急務であると考えられる。そこで本研究では、将来的な臨床応用が期待できる新規治療法の確立を目的として、免疫療法の可能性に着目し、腫瘍特異的抗原を発現させ、かつ腫瘍特異的免疫活性を誘導するDNAワクチンの作出を試みるとともに、ワクチン接種による生体での免疫応答および副作用の発現に関する基礎的検討を行うこととした。本研究ではまず、DNAワクチンプラスミドの構築を試みた。イヌB細胞由来リンパ腫細胞株(GL-1)、イヌT細胞由来リンパ腫細胞株(CL-1)および鹿児島大学農学部附属動物病院に来院し、低悪性度リンパ腫と診断された犬2例からゲノムを抽出し、腫瘍細胞が有するIg遺伝子の可変領域、あるいはTCR遺伝子の可変領域の遺伝子をPCR法により単離し、その塩基配列を決定した。得られた遺伝子を蛋白発現用プラスミドに組み込み、アフリカミドリザル腎臓由来細胞(Cos-7)にtransfectし蛋白発現を試みた。細胞を一定時間培養後、抗マウスおよび抗イヌ免疫グロブリン抗体、あるいは抗マウスおよび抗イヌT細胞受容体抗体を用いた間接蛍光抗体法、ならびにウェスタンブロット法により確認した。同時に、治療効果判定のために末梢血中の微小残存病変(MRD)をリアルタイムPCR法により測定する系を確立した。さらに臨床例におけるMRD測定を試み、治療とともにMRDは減少することや、治療終了時のMRDレベルが再発までの期間と相関することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Lymphoma is a most common hematopoietic tumor in dogs and cats and it is impossible to cure with the conventional treatment as in human medicine. The first line therapy for lymphoma is chemotherapy that has been investigated to improve the treatment result over two decades. However, there have been some outstanding problem such as acquired multi-drug resistance of tumor cells. The development of new treatment strategy for lymphoma in dogs and cats seems to be quite important.

In this study, we developed the novel immune-mediated treatment for canine lymphoma using DNA vaccine. At first, we tried to construct the vaccine plasmid including the sequence of highly variable lesion of immunoglobulin (Ig) or T cell receptor (TCR) which are encouraging candidate as tumor antigen for lymphoma cell. Two canine lymphoma cell line (CL-1: T cell lymphoma cell line, GL-1: B cell leukemia cell line) and tumor tissues obtained from two dogs diagnosed as low-grade lymphoma at Kagoshima University Veterinary Teaching Hospital for 2008-2009 were used. The obtained sequence of Ig or TCR by PCR were inserted to expression plasmid and this constructed vaccine plasmid was transfected to COS-7 cells. Expression of Ig or TCR protein on cell surface was examined by indirect immunofluorescence or Western blotting. At the same time, we tried to establish the method to evaluate the effect of DNA vaccine using minimal residual region (MRD) from peripheral blood samples using real-time PCR. Using this method, the MRD levels in clinical cases could evaluate during chemotherapy in 9 clinical cases. And it is indicated that MRD could be an objective marker to evaluate tumor cell burden in dogs with lymphoma. MRD at the end of chemotherapy could be a prognostic factor to predict remission duration after chemotherapy

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：【生物学】

科研費の分科・細目：【分科：畜産学・獣医学／細目：臨床獣医学】

キーワード：【腫瘍 免疫 ワクチン 犬】

1. 研究開始当初の背景

犬において、リンパ腫は最も多く認められる造血器腫瘍であり、発生率は犬における腫瘍の約 20%とされている。その多くはB細胞由来あるいはT細胞由来であり、発生する部位や組織学的分類により予後が異なる。犬のリンパ腫の約 90-95%は高悪性度リンパ腫であり、その治療の主体は多剤併用化学療法であるが、腫瘍細胞の薬剤耐性獲得や骨髄移植の

臨床応用の遅れなどの問題から、最も治療成績のよい型に限っても 1 年生存率は 80%、2 年生存率は 15%と予後が悪く問題となっている (Garret LD *et al.*, *J Vet Intern Med.* 16: 704-709, 2002)。そのためリンパ腫の新規治療法の開発は急務であるが、有効な治療法は未だ確立されていない。

人医領域においても同様の問題からリンパ腫に対する腫瘍抗原を利用した免疫療法

の開発が集約的に行われてきた。その中で大きな成果を上げているのが、B細胞表面抗原であるCD20を標的とする、抗CD20抗体(リツキシマブ)療法である(Maloney DG *et al.*, *J Clin Oncol* 15(10):3266-3274, 1997; Czuczman MS *et al.*, *J Clin Oncol* 17(1):268-276, 1998)。リツキシマブを犬のリンパ腫に应用する試みも報告されたが、有効性は認められなかった(Impellizzeri JA *et al.*, *Vet J*;171(3):556-558, 2006) (図1)。したがって新規の腫瘍特異的抗原を利用した免疫療法の開発が必要不可欠であると思われ、それを実現するためにはリンパ球を活性化させて行う養子免疫、腫瘍抗原を接種し樹状細胞(DC)を感作させるDCワクチンや、ペプチドを用いたワクチン、腫瘍抗原遺伝子をプラスミドに組み込み、生体に接種し発現させるDNAワクチンといった手法が考えられる。このような学術的背景より、リンパ腫に対するDNAワクチン療法の開発を目的とした研究を計画した。

2. 研究の目的

リンパ球はその表面にさまざまな分子を発現しているが、その一つにB細胞では免疫グロブリン(Ig)受容体が、T細胞ではT細胞受容体(TCR)があげられる。これらの分子は抗原に対する免疫応答の多様性を担うため可変領域を有している。この可変領域をコードする遺伝子は、遺伝子再構成によって個々のリンパ球でその配列が異なることから、リンパ球の異常クローンの検出および腫瘍細胞の免疫学的形質を検索する標的として用いられている。逆にこのことは、リンパ腫の腫瘍細胞は症例ごとに異なる蛋白を発現しており、それが新たな免疫療法の標的になることも考えられる。そこで、犬のリンパ腫症例個々における腫瘍細胞からIgあるいはTCR遺伝子を単離し、その遺伝子のコードする蛋白を腫瘍抗原として利用することで、より腫瘍細胞特異的な、個体ごとのテーラーメイド

ワクチンを作成することが可能であると思われる。また、DNAワクチンは個体ごとの腫瘍抗原遺伝子を同定し、必要な領域のみをワクチンプラスミドに組み込んで発現させるため、比較的短時間で作成が可能である点も、臨床応用において有用かつ実践的と考えられる。そこで本研究計画では、犬のリンパ腫に対する腫瘍特異的抗原としてIgおよびTCRを利用したDNAワクチン療法の臨床応用を見据えた基礎的研究を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 免疫グロブリン遺伝子(Ig)もしくはT細胞レセプター(TCR)遺伝子の単離同定とワクチンプラスミドへの組み込み

イヌB細胞由来リンパ腫細胞株(GL-1)およびイヌT細胞由来リンパ腫細胞株(CL-1)からゲノムを抽出し、腫瘍細胞が有するIg遺伝子の可変領域、あるいはTCR遺伝子の可変領域の遺伝子をPCR法により単離し、その塩基配列を決定する。得られた遺伝子をワクチンプラスミド(pVAX1, Invitrogen)に組み込む。その際に標識蛋白としてマウス免疫グロブリンの保存領域をキメラ蛋白として発現させるため、マウス免疫グロブリン遺伝子も同時に組み込む。

(2) *In vitro*における蛋白発現の確認

(1)で作成したワクチンプラスミドをアフリカミドリザル腎臓由来細胞(Cos-7)にtransfectし蛋白を発現させる。蛋白発現の確認に関しては、細胞表面あるいは細胞内に発現する場合と、培養上清中に分泌される場合を想定して行う。発現蛋白はイヌとマウス由来のキメラ蛋白であることから(図5)、細胞表面あるいは内部に発現している蛋白については、細胞を一定時間培養後、抗マウスおよび抗イヌ免疫グロブリン抗体、あるいは抗マウスおよび抗イヌT細胞受容体抗体を用いた間接蛍光抗体法、ならびにウェスタンブロット法により確認する。また分泌蛋白に関しては培養上清中の発現蛋白を同様の抗

体を用いた ELISA 法、ならびにウェスタンブロット法により確認する。

(3) 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) を共発現させる発現系の検討

腫瘍免疫には細胞性免疫の誘導が不可欠であると思われる。GM-CSF は生体内で Th1 型の免疫を誘導することが知られていることから、イヌ GM-CSF 遺伝子 (Gen Bank accession No. S47738) を単離し、発現用プロモーターとともに前述のワクチンプラスミドに組み込み、サイトカインアジュバントとしての可能性を検討する。ここではまず、共発現が可能であるか *in vitro* で確認し、それが困難な場合は発現ベクターを分けて、co-inoculation による共発現系を用いる。

(4) 生体内での免疫応答の確認

作成した DNA ワクチンを実験動物 (犬) に投与し、血清中の抗マウス免疫グロブリン抗体を ELISA で検出する。またサイトカインアジュバントを加えたワクチンとの効果の比較のために、ワクチン接種された犬の末梢血リンパ球サブセットの変化と、血中各種サイトカイン濃度の測定および mRNA の発現量の検討を行う。

(5) 作成した DNA ワクチンの生体への副作用の検討

前年度に作成した DNA ワクチンを実験動物 (犬) に投与する。投与部位の生検を行い、局所での免疫反応については病理組織学的検索を行う。また全身状態、炎症反応の有無についての検討を行う。ワクチンの投与量、投与方法、投与間隔などについても様々な条件を設定し検討を行う。

(6) 微小残存病変 (Minimal residual disease) の検出系の確立

寛解状態にある症例において、ワクチンの効果を評価するためには、体内の微小残存病変の定量が不可欠であることからその定量系を確立する。具体的には、症例の腫瘍組織から得られた免疫グロブリンあるいは T 細胞

受容体の可変領域の遺伝子配列を PCR 法により単離同定する。得られた塩基配列を基に設計したプライマーおよび遺伝子定量用プローブを用いて Real time PCR を行い、一定量の血液中における免疫グロブリンあるいは T 細胞受容体遺伝子のコピー数から腫瘍細胞数を定量する。Real time PCR を用いることで、通常では検出不可能な微量な末梢血中の腫瘍細胞を検出することが可能となる。

4. 研究成果

1) 免疫グロブリン遺伝子 (Ig) もしくは T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子の単離同定とワクチンプラスミドへの組み込み

はじめに、ワクチンプラスミドの構築と蛋白発現について確認するための系を確立する目的で、イヌ B 細胞由来リンパ腫細胞株 (GL-1) およびイヌ T 細胞由来リンパ腫細胞株 (CL-1) からゲノムを抽出し、腫瘍細胞が有する Ig 遺伝子の可変領域、あるいは TCR 遺伝子の可変領域の遺伝子を PCR 法により単離し、その塩基配列を決定する。得られた遺伝子をワクチンプラスミド (pVAX1, Invitrogen) に組み込んだ。

次に、本研究では犬のリンパ腫の中でもワクチンの効果が期待できると考えられる低悪性度リンパ腫をターゲットとして研究を遂行した。鹿児島大学農学部附属動物病院に来院した症例のうち、病理組織学および遺伝子再構成を用いたクローナリティー解析により低悪性度リンパ腫と診断された犬 2 例のリンパ節あるいは末梢血単核球からゲノムを抽出し、Ig 遺伝子あるいは TCR 遺伝子の可変領域の遺伝子を単離した。単離した遺伝子の塩基配列を決定した。得られた遺伝子を蛋白発現用プラスミドに組み替え、ワクチンプラスミドを構築した。

(2) *In vitro* における蛋白発現の確認

(1) で構築したリンパ腫細胞株 (CL-1、GL-1) 由来のワクチンプラスミドの *in vitro*

における蛋白発現を確認するための系の検討を行った。今回計画した系では蛋白の発現効率が悪かったために、使用する発現プラスミドの変更や組み込み遺伝子の変更、発現細胞の変更など種々の検討を重ねた。

(6) 微小残存病変 (Minimal residual disease) の検出系の確立

犬リンパ腫腫瘍細胞株 (UL-1) より得られた TCR 遺伝子の可変領域遺伝子の塩基配列解析を行い、リアルタイム PCR で用いるための、UL-1 特異的なプライマーとプローブを作成した。また、得られた UL-1 の TCR γ 可変領域遺伝子をプラスミドに組み込み、別途作成した UL-1 のゲノムを組み込んだプラスミドと既知のコピー数となるように混和し、リアルタイム PCR により UL-1 由来 TCR γ 可変領域遺伝子をもつプラスミドを検出できる感度を検討したところ、10-100,000 コピー/反応の間で正確に定量可能であることが明らかとなった。本定量システムを用いることで、10,000 個の末梢血単核球 (腫瘍細胞を含むリンパ系細胞および単球) の中から目的の腫瘍細胞 1 個を検出・定量可能であることが明らかとなった。

次に、リンパ腫の腫瘍症例 9 例における末梢血中抗原受容体遺伝子再構成解析を行い、腫瘍細胞特異的な Ig あるいは TCR の可変領域の塩基配列を決定した。得られた腫瘍細胞特異的な Ig あるいは TCR 可変領域遺伝子塩基配列をもとにして、腫瘍細胞特異的なプライマーとプローブを症例毎にデザインし、リアルタイム PCR によって末梢血中の腫瘍細胞数 (微小残存病変: MRD) を測定した。MRD レベルは治療とともに減少し、初診時の MRD レベルと治療後寛解時の MRD には有意差が確認された。また、治療終了時の MRD レベルに応じて寛解期間の長さが異なること、臨床的に再発が認められる 1-4 ヶ月前から RD レベルの上昇が認められることが臨床例を用いた研究で明らかとなった。

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 3 件)

1. Yamazaki, J., Baba, K., Goto-Koshino, Y., Setoguchi-Mukai, A., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Quantitative assessment of minimal residual disease (MRD) in canine lymphoma by using real-time polymerase chain reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 126:321-331 (2008).
2. Ide, K., Setoguchi-Mukai, A., Nakagawa, T., Uetsuka, K., Nakayama, H., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Disseminated histiocytic sarcoma with excessive hemophagocytosis in a cat. *J. Vet. Med. Sci.* 71:817-820 (2009).
3. Yamazaki, J., Takahashi, M., Setoguchi, A., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Monitoring of minimal residual disease (MRD) after multidrug chemotherapy and its correlation to outcome in dogs with lymphoma: a proof-of-concept pilot study. *J. Vet. Intern. Med.* 24:897-903 (2010).

[学会発表] (計 2 件)

- 1 瀬戸口明日香「ミニチュアダックスフントの消化器型リンパ腫」平成 19 年度日本獣医師会学会年次大会シンポジウム, 高松.
- 2 瀬戸口明日香「リンパ腫の治療: きほんのき」第 5 回日本獣医内科学アカデミー総会総会教育講演, 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬戸口 明日香 (SETOGUCHI ASUKA)
鹿児島大学・農学部・講師
研究者番号：00396813

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：