

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380186

研究課題名(和文) イヌ悪性腫瘍に対する新規癌ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of a new type of cancer vaccine for dog malignancy

研究代表者

清水 佳奈子 (SHIMIZU, Kanako)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：20391980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：担癌犬に対する治療法の確立を目的に、自然免疫と獲得免疫を同時に誘導する新規癌ワクチンシステムである「イヌ型アジュバントベクター細胞」の開発に関する基盤研究を進めた。イヌ由来のベクター細胞のスクリーニングを行い、*in vitro*の研究の検証を踏まえて細胞作製の至適条件を決定した。更に、イヌ型アジュバントベクター細胞の有効性の評価の為に、本細胞をイヌに静脈内投与することにより免疫応答を確認することができた。本研究成果は、今後担癌犬に対する新たな癌免疫療法に向けた基礎的な知見となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To make a strategy of new type of cancer vaccine for cancer-bearing dogs, we have launched the study of canine-type adjuvant vector cells, which may link between innate and adaptive immunity. In this study, we initially have chosen the canine vector cells and determining the optimal conditions for establishing the cells. Then, when we administered it through intravenous route, we detected the immune response in immunized dogs. These results would demonstrate the important and fundamental information for applying this strategy for canine immunotherapy in future.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、臨床獣医学

キーワード：癌ワクチン 自然免疫 獲得免疫 NKT細胞

1. 研究開始当初の背景

癌に罹患する犬の数は、日本においておおよそ30万匹といわれている。治療として手術および化学療法が主流であるが、QOLを考慮すると免疫療法は新たな治療法の選択肢となりうる可能性を秘めている。

我々はこれまでワクチンシステムの開発研究に取り組み、従来の癌ワクチンとは異なる作用機序で自然免疫と獲得免疫を同時に誘導しうるワクチンシステム「人工アジュバントベクター細胞」を考案した。本ワクチンは自然リンパ球であるNKT細胞のアジュバント効果を利用している。これまでマウスモデルにおいて遺伝子導入の容易な線維芽細胞をベクター細胞として用い、腫瘍抗原由来のmRNAとNKT細胞リガンドを同時に線維芽細胞内で発現させた「人工アジュバントベクター細胞」を作製、これを動物に免疫することで、自然リンパ球である、NK/NKT細胞を活性化し、さらに抗原特異的な抗腫瘍効果を得られることを示した(Fujii et al Blood 2009)。この抗腫瘍免疫機構は、活性化したNKT細胞により腫瘍抗原を発現しているベクター細胞が細胞死を起こし、速やかに宿主の樹状細胞がこれを取り込み、効率よく抗腫瘍抗原特異的CTLを誘導できる点にある(Fujii et al Immunol Rev 2007, Trend Immunol 2008)。つまり、腫瘍抗原が判明している場合、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)に関係なく自然免疫と獲得免疫の両者を誘導しうることになり、MHCが明確に示されていないイヌを対象としては有効な治療法になりうるかと考え、以下の研究を実施した。

2. 研究の目的

これまで、マウスモデルで知見を重ねてきた、「人工アジュバントベクター細胞」を、イヌのシステムに応用し、同様の免疫応答等の効果が得られるか検証することを目的とし、(1)ベクター細胞の選択と作製(2)イヌ細胞における抗原の発現の検討、(3)イヌ人工アジュバントベクター細胞の免疫と免疫応答の解析、の3項目について検討を行う。

3. 研究の方法

(1)ベクター細胞の選択と作製

細胞株

ベクター細胞としては、これまでマウスモデルでは細胞増殖、遺伝子導入効率等より線維芽細胞であるNIH3T3を使用してきた。そこで、NIH3T3に替わるイヌ細胞で且つ非癌細胞株としてMDCK (canine renal tubular cells), Cf2TH (Canine thymus fibroblast)の2種をRIKEN BRC Cell Bankより購入した。

抗原 mRNA の作製、遺伝子導入、蛋白発現の検討

遺伝子導入効率、蛋白発現効率の検定のためにEGFP (in house でクローニング)、OVA (Dr.

Lotze MT, ピッツバーグ大学より供与) 遺伝子を、また NKT リガンドを提示させるために Human CD1d 遺伝子(Origine より購入)を、標的抗原として Human WT1, Human tyrosinase 遺伝子(Origine より購入)を用いた。*イヌでは CD1d 分子が同定されていないものの、これまでの報告および自験例において、human CD1d, mouse CD1d をイヌ NKT 細胞が認識することを確認しているため、本研究では human CD1d を遺伝子導入することとした。各々の遺伝子について mRNA を作製し、エレクトロポレーション法により遺伝子導入を行った。EGFP、CD1d についてはフローサイトメトリーにより発現を確認、OVA については OVA ELISA kit (ITEA) で、WT1 および tyrosinase については WB 法で蛋白発現を確認した。

NKT 細胞の反応性の検討

NKT リガンドである α -GalCer (理研石井先生より供与) を添加した細胞株にヒト CD1dmRNA、抗原 mRNA を遺伝子導入しベクター細胞を作製した。ヒト NKT 細胞株とアジュバントベクター細胞を共培養し、NKT 細胞の活性化能をヒト NKT 細胞の産生する IFN- γ (BD human IFN- γ ELISA kit を使用) により検定した。

(2)イヌ細胞における抗原の発現の検討

イヌメラノーマ細胞株 (CMeC1, CMeC3, KMeC, LMeC) における tyrosinase の発現を WB 法により検討した。

(3)イヌ人工アジュバントベクター細胞の免疫と免疫応答の解析

α -GalCer を添加し、標的抗原 tyrosinase, CD1dmRNA を遺伝子導入したイヌアジュバントベクター細胞を理研で作成し、山口大水野へ郵送し、健康犬(ビーグル犬)へ静脈投与により免疫した。2匹に 5×10^7 cells を免疫、2匹には PBS を投与した。免疫後経時的に採血し、生化学検査、免疫解析を行った。免疫解析では、NKT 細胞、CD4, CD8T 細胞の細胞頻度、血清 IL12 (ELISA) を測定した。

4. 研究成果

(1)ベクター細胞の選択と作製

MDCK、Cf2TH の両者に EGFP mRNA を遺伝子導入し、経時的に EGFP の発現をフローサイトメトリーで検討したところ、両者ともほぼ 100% の遺伝子導入効率で差を認めなかった(図1)。

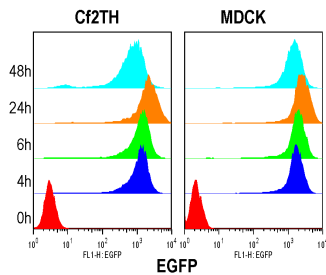


図1 EGFP mRNA 導入効率の検定

次に、hCD1dおよび OVAmRNA を遺伝子導入し、各々の蛋白発現を検討した(図2)

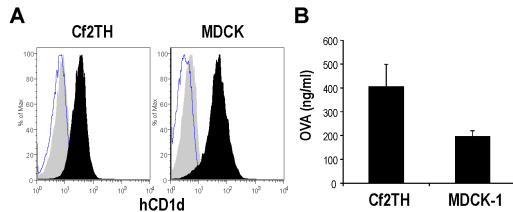


図2 A. CD1d 発現および 2B OVA 蛋白産生

その結果、CD1d の発現には差を認めなかったものの、OVA 蛋白産生に関しては Cf2TH の方がより高かった。

さらに、CD1d を遺伝子導入した Cf2TH および MDCK 細胞に α -GalCer を添加培養し、当研究室で樹立した2種類のヒト NKT 細胞株(B57, B65) と共培養し、NKT 細胞からの IFN- γ 産生を検討したところ、図3のように Cf2TH 細胞が、いずれの NKT 細胞への抗原提示能がより高いことが判明した。以上のことより、Cf2TH をベクター細胞として選択することにした。

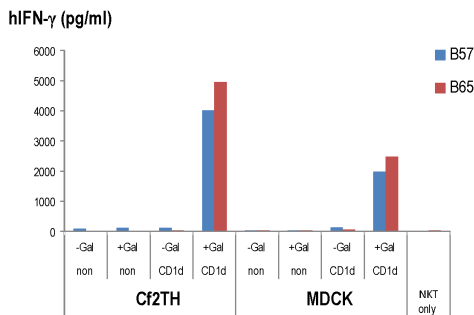


図3 NKT 細胞活性化能の検定

当初、本研究では標的抗原として Wilms' tumor 1 (WT1)抗原を使用する計画であった。WT1 抗原はヒト臨床において幅広い悪性腫瘍に発現し、有用な抗原として知られており、我々のイヌリンパ腫における予備的検討でもその発現を確認していたためである。しかしながら、臨床検体および正常組織における発現を数種の異なるクローンの抗体を用いて検討したところ、正常組織における発現を否定できない結果となった。そのため、研究グループで議論した結果、悪性黒色腫の腫瘍抗原である tyrosinase に切り替えることにした。tyrosinase 抗原はヒト臨床においても悪性黒色腫の有用な抗原であり、human tyrosinase を用いた xenogenic DNA ワクチンとしてイヌ進行悪性黒色腫に臨床応用した報告があったためである (Bergman PJ et al. Clin Cancer Res 2003)。

よってイヌ人工アジュバントベクター細胞は図4のように human CD1d および human tyrosinase mRNA を Cf2TH 細胞株に共遺伝子導入し、作製した。

このように、CD1d と tyrosinase を共遺伝子導入する際に、各々の mRNA 量について図5のように検定を行った結果、CD1d mRNA10ug, Tyrosinase 20ug の場合、CD1d の発現および tyrosinase の蛋白量が十分確保できることが判明した。また、この蛋白発現は γ 線照射をしても低下しないことを確認した。以上よりイヌ人工アジュバントベクター細胞の作製条件を決定した。

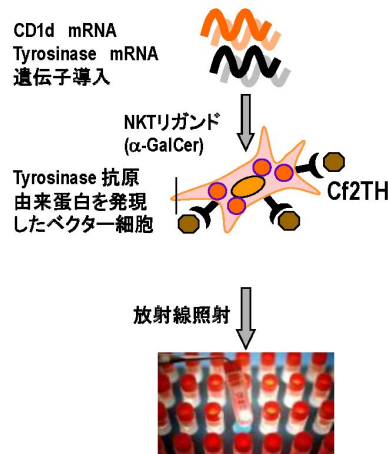


図4 . イヌ人工アジュバントベクター細胞の作製

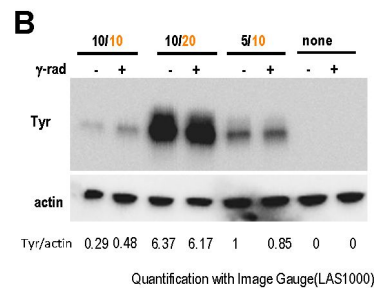
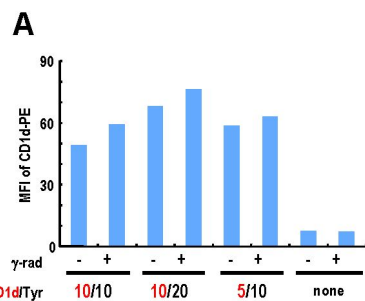


図5 . CD1dmRNA と tyrosinase mRNA の共遺伝子導入の条件検討

(2) イヌ細胞における抗原の発現の検討
マウスメラノーマ細胞株を陽性コントロールとして、イヌメラノーマ細胞株における tyrosinase 抗原の発現を WB 法により検討した。その結果、図6のようにイヌメラノーマ細胞においても抗原が発現していることを確

認できた。

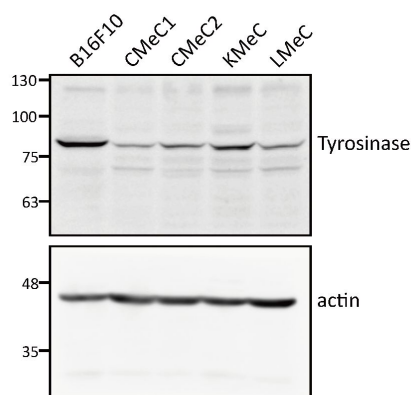


図6 .イヌメラノーマ細胞株における tyrosinase 抗原の発現の検討

(3) イヌ人工アジュバントベクター細胞の免疫と免疫応答の解析

理研において(1)で条件検討を行い作製した、イヌ人工アジュバントベクター細胞を山口大へ送付し、健常犬に免疫した。投与後、特に理学所見等は問題なく、生化学検査においても一過性のCRPの上昇等の炎症反応は見られたものの、重篤な異常は認められなかった。

一方、末梢血を用いた免疫学的解析においては、CD4、CD8T細胞、NKT細胞の細胞頻度を解析すると、CD4、CD8T細胞に関しては大きな細胞頻度の変化は認められなかった。しかし、NKT細胞に関しては、図7のように免疫後d7をピークに免疫前に比べ、5倍から16倍の細胞頻度の上昇をみとめた。

イヌ抗原特異的なT細胞の解析に関しては、イヌMHCが不明であり、また認識するエピトープも不明なため、tyrosinase抗原を発現した自己の抗原提示細胞を作製するのがポイントであった。今回は、抗原提示細胞として、invitroで誘導した樹状細胞に tyrosinase mRNA を遺伝子導入し、tyrosinase 抗原発現樹状細胞の作製を試みたものの、細胞数、導入効率等の問題により、現在のところ成功していない。よって、tyrosinase 特異的T細胞に関しては本研究期間中には解析できなかった。今後別の方法も考慮したいと考えている。

以上より、本研究では、マウスモデルで知見を重ねてきた「人工アジュバントベクター細胞」を、イヌに応用し、同様の免疫応答等の効果が得られるか検証する目的ですすめてきた結果、イヌ人工アジュバントベクター細胞が in vivo で機能し、NKT細胞応答を誘導することを確認できた。T細胞の解析系等の問題はあるものの、マウスのみならず大動物であるイヌで、このワクチンシステムが機能することは、イヌ臨床においてもまた、ヒトへの応用を考えた場合でも今後の更なる発展が期待できると考える。

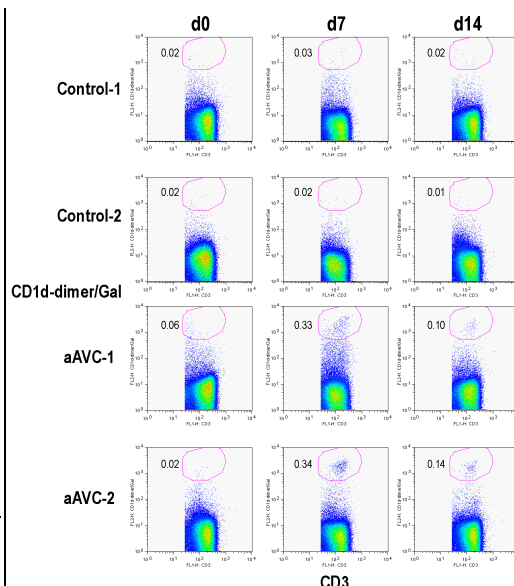


図7 .末梢血 NKT 細胞頻度の経時的推移 (CD3+T cell で gate)

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 7 件)

1. Fujii S, Shimizu K, Okamoto Y, Kunii N, Nakayama T, Motohashi S, Taniguchi M. NKT cells as an ideal target for anti-tumor immunotherapy. *Front. Immunol.* 2013, 4:409. URL: <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fimmu.2013.00409/full> 査読有
2. Shimizu K, Asakura M, Shinga J, Sato Y, Kitaha Hoshino K, Kaisho T, Schoenberger SP, Ezaki T, *Fujii S. Invariant NKT cells induce plasmacytoid DC cross-talk with conventional DCs for efficient memory CD8⁺ T cell induction. *J Immunol* 2013, 190:5609-5619. doi: 10.4049/jimmunol.1300033 査読有
3. *Fujii S and Shimizu K. Immunotherapy with artificial adjuvant vector cells (aAVCs): harnessing both arms of the immune response. *Oncol Immunol* 2013, 2:e23432. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3654573/> 査読有
4. Shimizu K, Mizuno T, Shinga J, Asakura M, Kakimi K, Ishii Y, Masuda K, Maeda T, Sugahara H, Sato Y, Matsushita H, Nishida K, Hanada KI, Dörrie J, Schaft N, Bickham K, Koike H, Ando T, Nagai R, *Fujii S. Vaccination with antigen-transfected, NKT cell ligand-loaded, human cells elicits robust in situ immune responses by dendritic cells. *Cancer Res.* 2013,

- 73:62-73. doi: 10.1158/0008-5472 査読有
5. Nagato K, Motohashi S, Ishibashi F, Okita K, Yamasaki K, Moriya Y, Hoshino H, Yoshida S, Hanaoka H, Fujii S, Taniguchi M, Yoshino I, Nakayama T. Accumulation of activated invariant natural killer T cells in the tumor microenvironment after α -galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells. *J Clin Immunol* 2012, 32:1071-81. doi: 10.1007/s10875-012-9697-9 査読有
 6. Watarai H, Yamada D, Fujii S, Taniguchi M, Koseki H. Induced pluripotency as a potential path towards iNKT cell-mediated cancer immunotherapy. *Int J Hematol*. 2012, 95:624-31. doi: 10.1007/s12185-012-1091-0 査読有
 7. Shimizu K, Asakura M, *Fujii S. Prolonged antitumor NK cell reactivity elicited by CXCL-10-expressing dendritic cells licensed by CD40L+CD4+ memory T cells. *J Immunol*. 2011:186:5927-37. doi: 10.4049/jimmunol.1003351 査読有
- 〔学会発表〕(計 36件)
- 国際学会 11件
1. Shimizu K, Shinga J, Yamasaki S, Sato Y, Asakura M, Fujii S. "The cross-talk between plasmacytoid DC and conventional DCs shapes the anti-tumor memory CD8+T cells" 15th International Congress of Immunology (Milan, Italy) 8/22-27/2013 [poster]
 2. Shimizu K, Mizuno T, Shinga J, Asakura M, Kakimi K, Sato Y, Fujii S. "Vaccination with mRNA-transfected, NKT cell ligand-loaded, human vector cells elicits robust immune responses through *in situ* dendritic cell (DC) maturation" 12th International Symposium on Dendritic Cells (Daegu, Korea) 10/7-11/2012 [poster] 他9件
- 国内学会 25件
3. Shimizu K, Sato Y, Yamasaki S, Fujii S. "The cross-talk between plasmacytoid DC and conventional DCs shapes the memory CD8+ T cells".第72回日本癌学会学術総会 2013年10月3-5日(横浜) ワークショップ
 4. Shimizu K, Asakura M, Shinga J, Sato Y, Hoshino K, Kaisho T, Ezaki T, Fujii S. "Long-term memory T cell response induced by adjuvant role of iNKT cells" 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5-7日(神戸) ポスター
 5. 清水佳奈子*, 朝倉三貴, 信賀順, 佐藤悠輔, 藤井眞一郎. 人工アジュバントベクター細胞の開発. 第4回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会. 2012年8月18日(金沢) ワークショップ
 6. 清水佳奈子, 朝倉三貴, 信賀順, 水野拓也, 垣見和宏, 佐藤悠輔, 藤井眞一郎*. 「生体内樹状細胞を標的とした人工アジュバントベクター細胞の開発」第16回日本がん免疫学会総会. 2012年7月26-28日(札幌) シンポジスト
 7. Shimizu K, Asakura M, Fujii S. "Prolonged anti-tumor natural killer cell reactivity elicited by CXCL10-expressing dendritic cells licensed by CD4+ effector memory T cells." 第40回日本免疫学会総会学術集会. 2011年11月27-29日(千葉) ワークショップ
 8. Shimizu K, Asakura M, Sugahara H, Shinga J, Fujii S. "Development of anti-tumor artificial adjuvant vector cells linking innate and adaptive immunity." 第73回日本血液学会総会 2011年10月14-16日(名古屋) ワークショップ
 9. 清水佳奈子, 朝倉三貴, 信賀順, 菅原英俊, 佐藤悠輔, 藤井眞一郎. 「自然免疫賦活による記憶免疫誘導」第3回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会. 別府, 2011年8月20-21日 ワークショップ
 10. Shimizu K, Sugahara H, Shinga J, Kakimi K, Mizuno T, Asakura M, Fujii S. "Development of anti-tumor artificial adjuvant vector cells linking innate and adaptive immunity." 第15回日本癌免疫学会総会 2011年6月30日-7月1日(吹田) ワークショップ
- 他17件
- 〔図書〕(計 9件)
1. 藤井眞一郎, 信賀順, 清水佳奈子. 「人工アジュバントベクター細胞による癌免疫治療」血液フロンティア 2013, 23(7):23-31.
 2. 藤井眞一郎, 山崎哲, 佐藤悠輔, 清水佳奈子. 「がん抗原ワクチン」実験医学 2013, 31: 142-147.
 3. 藤井眞一郎, 清水佳奈子. 「樹状細胞によるNK細胞の長期活性化」臨床免疫・アレルギー科 2012, 58(5):534-542.
 4. 清水佳奈子, 藤井眞一郎. 「樹状細胞によるNK細胞、NKT細胞の抗腫瘍作用増強」臨床免疫・アレルギー科 2012, 58(2):156-164.
 5. 藤井眞一郎, 清水佳奈子. 「樹状細胞によって誘導される長期に持続する抗腫瘍NK細胞機構」実験医学 2011, 29: 2760-2766.
 6. 藤井眞一郎, 佐藤悠輔, 清水佳奈子. 「慢

性骨髓性白血病の免疫能と免疫増強」
Biotherapy 2011, 25(4):723-728.
他3件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 佳奈子 (Shimizu Kanako) 独
立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究セ
ンター・上級研究員
研究者番号：20391980

(2) 研究分担者

水野 拓也 (Mizuno Takuya)
山口大学・共同獣医学部・教授
研究者番号：90398826

(3) 研究分担者

藤井 眞一郎 (Fujii Shin-ichiro)
独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究
センター・チームリーダー
研究者番号：10392094