

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580443

研究課題名(和文)新規ナノ粒子アジュバンドを利用した犬癌ワクチンの臨床応用

研究課題名(英文)Development of peptide vaccine using nano-particle adjuvant for naturally occurring tumors in dogs

研究代表者

桃井 康行(MOMOI, YASUYUKI)

鹿児島大学・獣医学部・教授

研究者番号：40303515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、犬の癌ワクチン開発を目標に、腫瘍特異的抗原由来ペプチドを作成し、安全性が高い生体吸収性の新規のナノ粒子アジュバンドと共に犬に投与した。その結果、抗体価の上昇がみられた一方で、細胞性免疫の誘導は確認できなかった。担癌動物への投与(1例)では、副作用はみられなかったが、臨床的な効果は確認できなかった。有用な癌ワクチンにするためには改良が必要であるが、癌ワクチン開発について基礎的な情報を得ることができた。また研究の過程で免疫療法の標的となるTRP-2分子の遺伝子単離や多くの腫瘍抗原の発現系の構築に成功した。さらに犬で多発する肥満細胞腫表面でのKIT分子の発現を解析する方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to establish new tumor vaccine for canine naturally occurring tumor. We synthesized peptides in reference to epitope of tumor specific antigens. The peptides were conjugated with keyhole limpet hemocyanin and absorbed to the surface of nano-particle (adjuvant). The resultant products successfully induced antibody production against the peptide, however, cellular immunity against the target cells was not detected. Adverse events were not observed in vaccinated dogs but the clinical benefit (objective tumor reduction) was not detected in a dog with lymphoma. We newly reported canine TRP-2 cDNA nucleotide sequence and constructed TRP-2, melan-A, CD20-GFP fusion molecule, mammalian expression plasmid. The findings obtained in this study may be helpful to establish canine tumor vaccine.

研究分野：農学

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：犬 癌 腫瘍 ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

伴侶動物の獣医療において腫瘍は臨床上極めて重要な疾患である。動物における腫瘍の治療はこれまで人と同様に外科腫手術、化学療法、放射線療法により行われてきた。近年、医療においてさまざまな免疫療法が行われるようになっており、受動免疫を付与するヒト化抗体の投与を中心に臨床的有用性が証明されている薬剤もある。これら受動免疫による治療以外でも癌特異的抗原を標的として担癌患者に免疫を誘導する方法も多く研究されているが、未だ十分な効果は得られていない。

犬のリンパ腫は造血器腫瘍の中では最も多くみられる腫瘍である。ウイルスなど感染性因子の関与は知られておらず、比較的若い年齢から発症がみられる。診断された時点で全身に播種していることがほとんどで、化学療法が第一選択となる。治療に対する感受性はよく、およそ 65-84%の症例で完全寛解に導入することができ、寛解導入後は化学療法を一旦中止するプロトコルも広く用いられている。この化学療法に対する高い感受性と免疫抑制を解除できる休業期間は、患者(動物)自身に癌に対する免疫誘導を試みる癌ワクチンには理想的な対象疾患である。

CD20 は B 細胞に発現する 4 つの膜貫通領域をもつ 35kDa の膜蛋白である。この分子の機能については詳細にはわかっていないが、カルシウムチャネルと推測されている。人ではこの CD20 を標的にしたヒト化キメラ抗体(例: リツキシマブ)が医薬品として臨床応用されており、様々な B 細胞リンパ腫の症例で生存期間を延長することが示されている。また、本研究ではリンパ腫に加え悪性黒色腫についても検討を行っている。犬の悪性黒色腫は口腔や皮膚に発生し、局所浸潤と遠隔転移を比較的高頻度に起こす。化学療法の奏功率が低いこと、遠隔転移がみられることから、新しい治療が必要である。メラノーマについては特異的に発現する分子がいくつか同定されており、免疫治療を行うための知見が整っている。

## 2. 研究の目的

本研究では、最終的には犬で好発する腫瘍に対する癌ワクチン開発を目指している。そのためには適切な標的抗原の作成と免疫を増強するアジュバントが必要である。本研究では実際に癌特異的抗原を作成し新規アジュバントであるナノ粒子と共に接種した際の有効性について検討した。

(1) 腫瘍特異的抗原(ペプチド)と新規のアジュバントを組み合わせた癌ワクチンの作成とその効果の判定:

①犬の B 細胞性リンパ腫が発現する CD20 を標的とした癌ワクチンの開発  
本研究における主たる課題であり、B 細胞性

腫瘍細胞に対する癌ワクチンを作成し、健常犬を用いてその効果を調べる。また副作用についても評価する。さらに寛解導入されている少数の B 細胞リンパ腫の犬で飼い主が新規治療法を希望する場合に癌ワクチンの接種を行いその免疫誘導能や副作用をモニターする。

②犬の悪性黒色腫を標的とした癌ワクチンの開発

本研究では腫瘍に対する癌ワクチンの開発を目標としている。当初標的としていたリンパ腫以外に免疫治療の標的として適している悪性黒色腫(メラノーマ)についても、同様に、癌特異的なペプチドを合成しナノ粒子アジュバントと共に投与し、その免疫誘導能を評価する。

(2) 癌ワクチンに利用するための癌特異抗原の発現解析と遺伝子発現

①合成ペプチドを用いた癌ワクチンの効果が不十分な場合を考え、リンパ腫、メラノーマについて標的蛋白(CD20, Melan-A, TRP-2)の遺伝子をクローニングし、ほ乳類細胞での発現を行う。

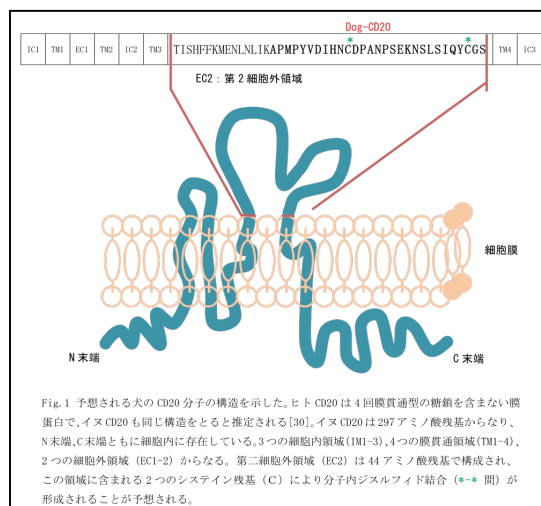
②犬で臨床的に多い、肥満細胞腫についても癌ワクチン開発を進めるために、標的抗原の候補として KIT 蛋白を選び、腫瘍細胞表面で KIT 発現を解析する。

## 3. 研究の方法

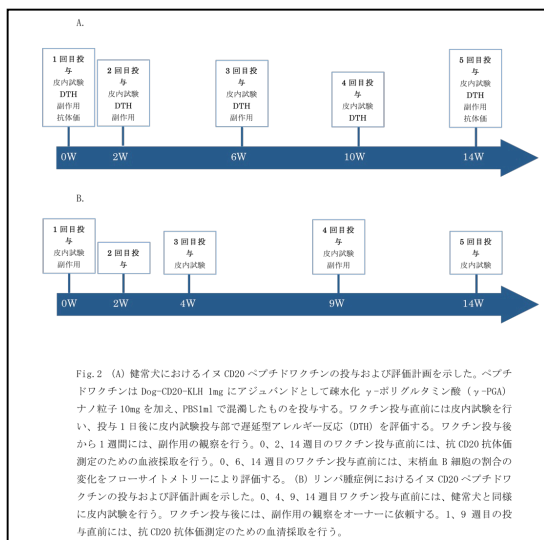
(1) 合成ペプチドとナノ粒子アジュバントによる癌ワクチンの開発

①B細胞性リンパ腫への癌ワクチン療法

ヒトの治療用モノクローナル抗体は CD20 の第 2 細胞外領域に存在するジスルフィド結合付近のエピトープを認識することが知られている。これまで報告されているイヌ CD20 のアミノ酸配列[30]を参照し、第二細胞外領域の 29 アミノ酸残基(NH<sub>3</sub>-APMPYVDIHNCDPANPSEKNSLSICYCGS-COOH)を合成し(ベックス, 東京)、分子内システイン結合を形成する Dog-CD20 を得た(fig. 1)。



このペプチドを免疫および測定に用いるため、Dog-CD20 1 mg に対し、キャリア蛋白であるキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) 2mg、または卵白アルブミン (OVA) 2mg とジカルボン酸リンカーを介して結合し、それぞれ Dog-CD20-KLH および Dog-CD20-OVA とした。犬への免疫にはこの Dog-CD20-KLH、1ml (1mg/ml) を用い、アジュバントとして疎水化  $\gamma$ -ポリグルタミン酸 ( $\gamma$ -PGA) ナノ粒子 (大阪大学大学院工学研究科、明石満教授より分与) 10mg を加えて 1.5ml マイクロチューブ中で超音波洗浄機を用いて懸濁した。この溶液を健常犬 (1 頭) の肩甲間の皮下へ注射した。投与は初回投与日、および等予備から 2、6、10、14 週目に計 5 回行った。同様に飼い主が治療に同意した 12 歳 9 カ月齢のマルチーズ (B 細胞リンパ腫、完全寛解後) にも投与を行った。投与後、臨床的な副作用および皮内試験および遅延型アレルギー反応、ペプチドに対する抗体価、リンパ球サブセットの変化を評価した (fig. 2)。



②メラノーマに対する癌ワクチン療法  
犬のメラノーマではメラノーマ特異的に発現するいくつかの蛋白が知られている。本研究ではそれらのうち Melan-A、TRP-2 についてヒトの HLA 拘束性のペプチド配列を参考に、イヌで相同な領域付近で免疫用ペプチドをそれぞれ合成、混合し、同様の方法で健常犬 (1 頭) に免疫し、副作用と免疫誘導を評価した。

(2) 癌ワクチンに用いるための癌特異抗原のクローニングとリコンビナント蛋白の発現

①イヌ CD20 についてはイヌ末梢血リンパ球から mRNA を抽出後、遺伝子クローニングを行った。犬では免疫学的に CD20 を検出する適切な方法が知られていないため CD20 を GFP 融合蛋白としてほ乳類細胞発現プラスミドを構築し HEK293 細胞に導入し発現を解析した。またメラノーマ特異的抗原である melan-A、TRP-2 については犬のメラノーマ細

胞株から抽出し、ほ乳類細胞での発現プラスミドを構築し、HEK293 細胞に導入し免疫染色により発現を解析した。

②肥満細胞腫における KIT 遺伝子の発現  
針吸引生検等で得られた微量の臨床サンプルを材料に、モノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーにより細胞表面 KIT の発現を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 腫瘍特異的抗原 (ペプチド) と新規のアジュバントを組み合わせた癌ワクチンの作成とその効果の判定:

ペプチド合成を依頼したメーカーにおいて CD20, melan-A, TRP-2 それぞれの由来の合成ペプチドを KLH コンジュゲートしたものをウサギに免疫した。その結果、すべてのペプチドについて特異的な抗体産生がみられた (fig. 3)。

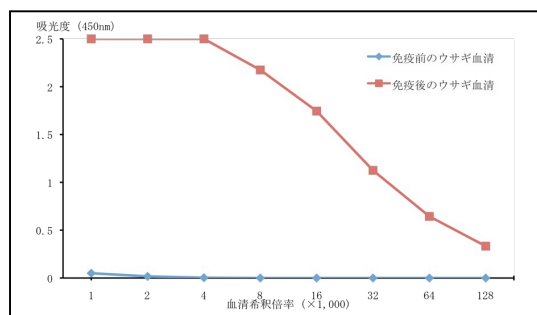


Fig. 3 Dog-CD20-KLH で免疫したウサギ血清の Dog-CD20 に対する抗体価を ELISA 法により測定した。96 穴プレートに Dog-CD20-OVA を吸着させ、希釈した血清と反応させた。450nm の吸光度を縦軸に、血清希釈倍率を横軸に示した。Dog-CD20-KLH 投与前のウサギ血清 (青線: ◆) と、3 回目の Dog-CD20-KLH 投与から 1 週間後のウサギ血清 (赤線: ■) の各希釈倍率での吸光度の推移を示した。

またナノ粒子アジュバントとともに KLH コンジュゲート蛋白を健常犬に対して投与したところ、すべてのペプチドについて特異的な抗体産生がみられた。CD20 についてはリンパ腫担癌犬に対しても投与を行い、健常犬と同様、抗体産生が示唆された (fig 4)。

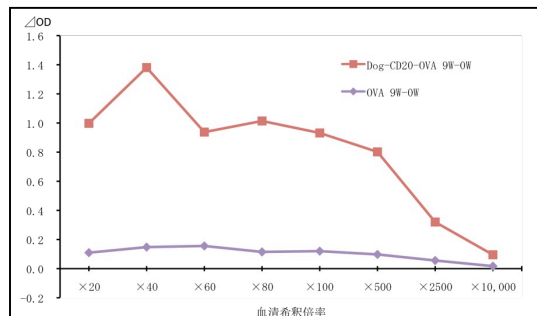


Fig. 4 Dog-CD20-KLH で免疫したリンパ腫症例の血清抗体価を ELISA 法により測定した。96 穴プレートに OVA または Dog-CD20-OVA を吸着させ、希釈した血清と反応させた。免疫後 (9 週目) の吸光度から免疫前 (0 週目) の吸光度を引いた OD を縦軸に、血清希釈倍率を横軸に示した。OVA をプレートに吸着させた場合 (◆) と、Dog-CD20-OVA をプレートに吸着させた場合 (■) の各血清希釈倍率における OD を示した。実験は 3 重試験を行い、各測定値を次の表に示した。

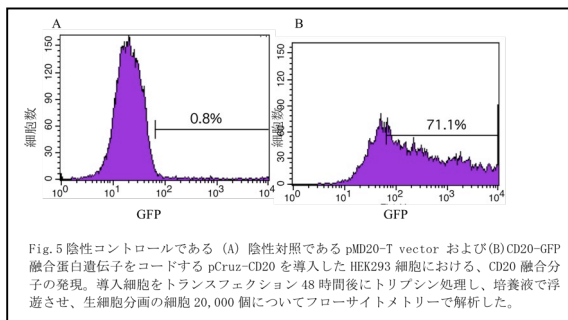
その他の免疫誘導についても解析した。CD20 を接種した健常犬で、経時的に末梢血流の B 細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析したが、B 細胞の減少は確認できなかった。

た。また、免疫前にペプチド単独および KLH のコンジュゲートをワクチン接種動物の皮内投与し、アレルギー反応の有無を観察したが、ワクチン投与による免疫誘導効果を観察することはできなかった。今回の実験では、投与に関連した副作用は臨床的に観察されなかった。リンパ腫の犬では癌ワクチン投与後、経過観察中にリンパ腫の再発がみられている。

これらの結果から、今回用いた、合成ペプチド-ナノ粒子アジュバントの組み合わせは、犬で抗体産生を誘導することがわかった。一方で、生体内細胞（腫瘍細胞を含む）に対する障害性誘導は確認できなかった。その理由を検索するために、CD20 ペプチドで免疫したウサギ血清を犬末梢血 B 細胞と反応させたところ、B 細胞が染色されず、今回用いたペプチドが有効な立体構造を維持していない可能性が示唆された。

## (2) 癌ワクチンに利用するための癌特異抗原の発現解析と遺伝子発現

一般にペプチドを免疫源とする場合には免疫源性が弱く、生体内の分子ではペプチドの場合生体内の立体構造を再現できない可能性もある。それを改善するためには細胞そのものや分子そのものを免疫源に用いた方法を検討する。本研究ではペプチドワクチンを作成した CD20, melan-A, TRP-2 について mRNA から cDNA をクローニングし、その発現プラスミドを構築し、HEK293 細胞に遺伝子導入し、その発現を解析した。CD20 についてはそれを検出する適切な抗体がないため、GFP 融合蛋白として構築し、CD20 の発現を指標にした。フローサイトメトリーの結果、GFP の発現が確認され、CD20 が発現されていることが示唆された (fig. 5)。



また melan-A, TRP-2 f についても同様の蛋白発現をおこなった。その過程において、これまでクローニングされていなかったイヌ TRP-2 の遺伝子単離に成功し、ほぼ全長の cDNA 配列をデータベースに登録した (accession AB766380.1)。これらの遺伝子を HEK293 細胞に導入したところ蛋白の発現が免疫染色により確認された (fig. 6)。また Western Blotting でも特異的なバンドが検出された。

本研究により、CD20, TRP-2, melan-A についてリコンビナント蛋白の作成に成功し、今後

の免疫源として利用する準備ができた。

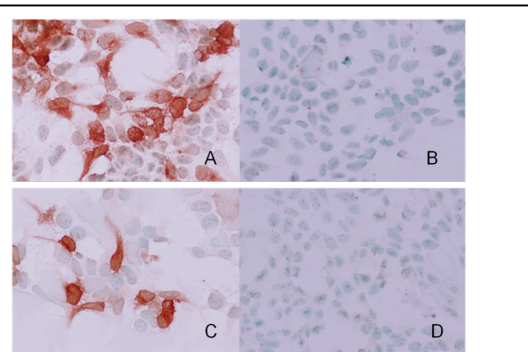
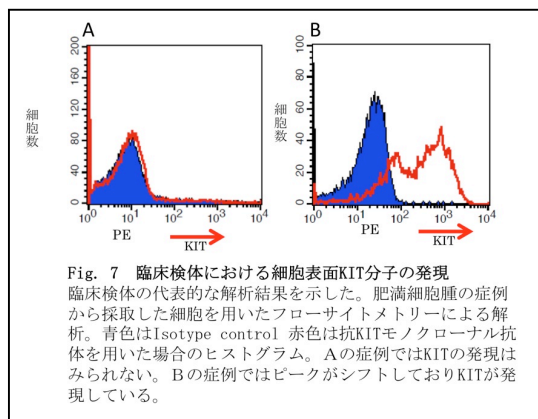


Fig. 6 発現プラスミドを導入した HEK293 細胞での Melan-A および TRP-2 蛋白の発現  
HEK293 細胞に発現プラスミドを導入し、ABC 法による免疫染色を行った。A) pEB-dog-Melan-A を導入した HEK293 細胞で、細胞質が茶色に染まる陽性細胞が多数散見された。B) pEBMulti-Neo のみを導入した HEK293 細胞で、同様の染色を行ったコントロール。C) pEB-dog-TRP-2 を導入した HEK293 細胞で、細胞質が茶色に染まる陽性細胞が認められた。D) pEBMulti-Neo のみを導入した HEK293 細胞で、同様の染色を行ったコントロール。

また、新しい標的として犬の肥満細胞腫について免疫療法の標的分子の探索をおこなった。これまで肥満細胞腫のほとんどはチロシンキナーゼ型レセプターである KIT 蛋白を発現していると考えられていた。本研究では従来の免疫染色よりも特異性が高いと思われるモノクローナル抗体を用い、生検材料について KIT 蛋白の発現を解析した。その結果、KIT は肥満細胞腫の半数程度に発現していること、またこれまで発現が報告されている黒色腫には発現が確認できないことが明らかとなった (fig. 7)。これらの知見は、肥満細胞腫の免疫療法としての KIT の可能性や KIT を標的とした分子標的療法の開発に有用である。



## 結語

本研究で用いた癌特異的に発現する分子を標的にしたペプチドおよび新規のナノ粒子アジュバントを用いた癌ワクチンにより、抗体産生を誘導できることがわかった。ナノ粒子アジュバントは使用した限り有害な事象は観察されず、その後の観察においても、他のアジュバントでよくみられる局所硬結などの反応はみられていない。ナノ粒子アジュバント有望なアジュバントと思われるが、今後、既存のアジュバントとの有効性の比較が必要であろう。また抗原として用いるペプチ

ドについてはさらなる検討が必要である。今回、ヒトでの研究を参考にエピトープになりうる領域を推測して実験に使用したが、実際に犬に免疫を強く惹起できる領域や立体構造について検討していく必要がある。また、本研究で用いたリコンビナント蛋白など、より大きな分子を抗原として用いる研究をおこなっていきたいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

1. 濱田亜以、三浦直樹、桃井康行. 犬の肥満細胞腫における KIT の発現. 日本獣医内科学アカデミー 2013 年大会 2 月 23 日 パシフィコ横浜
2. 濱田亜以、三浦直樹、桃井康行. 犬の肥満細胞腫における KIT の発現.. 第 3 4 回動物臨床医学会 1 1 月 1 7 日 大阪国際会議場

[その他]

本研究の報告は鹿児島大学リポジトリに登録し閲覧可能である。

<http://hdl.handle.net/10232/20878>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

桃井 康行 (MOMOI Yasuyuki)

鹿児島大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：40303515

(2) 研究分担者

木之下 (瀬戸口) 明日香

(SETOGUCHI (KINOSHITA) Asuka)

鹿児島大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：00396813