

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：10105
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23780317
 研究課題名（和文） 免疫寛容誘導因子 Gpnmb を分子標的とした犬悪性黒色腫の新規免疫療法に関する研究
 研究課題名（英文） Breaking immunological tolerance to canine malignant melanoma using anti-Gpnmb antibody and various antigen peptides associated with tumor.
 研究代表者
 富張 瑞樹 (TOMIHARI MIZUKI)
 帯広畜産大学・畜産学部・助教
 研究者番号：00552754

研究成果の概要（和文）：

犬の悪性黒色腫に対する新たな治療法として、免疫寛容を誘導するGpnmb蛋白質の阻害と、腫瘍関連抗原ペプチドを組み合わせた新規免疫療法について検討を行った。この結果、ペプチドの利用により有意な細胞傷害活性の上昇を認めたが、抗Gpnmb抗体を用いた改良法では、従来法と同程度の活性を示すにとどまった。今後は、条件等に対し検討を加えることで、より奏功性の高い新規免疫療法への開発が進むものと期待されるものである。

研究成果の概要（英文）：

We investigated new approach of immunological therapy for canine malignant melanoma, using anti-Gpnmb Ab and other various antigen peptides associated with tumor. The research showed that some peptides significantly activated T-lymphocytes compared to conventional method. However, the experiments with anti-Gpnmb Ab did not show notable results in T-cell activation. In the future research, we will thoroughly examine experimental conditions and intend to find more effective immunotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：獣医腫瘍免疫学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学(6605)

キーワード：獣医学、臨床、癌、免疫学、生体分子、犬

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性黒色腫（メラノーマ）は、犬の口腔内腫瘍の中で最も発生頻度が高い腫瘍である。本腫瘍は、組織侵襲性や再発率が高いことが知られ、腫瘍が発見された際には既にリンパ節・肺への微小転移を認める程、転移率も顕著に高い。本腫瘍に対しては、外科療法、化学療法や放射線療法等が実施されるが、本腫瘍のこれら療法に対する反応性は低いため、罹患動物の予後はきわめて悪いことが多い。そのため、悪性黒色腫に対する新たな治療法として、本腫瘍細胞の宿主免疫機構に認識されやすい性質、すなわち免疫原性の高いことを利用した様々な免疫療法の開発が試みられている。

(2) 従来の免疫療法は、①腫瘍に対して非特異的に患者本人の自然免疫を活性化させる方法と、②腫瘍特異的な自然免疫、ならびに獲得免疫を選択的に活性化させる方法とに大きく分類される。我々の帯広畜産大学動物医療センターの腫瘍免疫チームでは、上記の①、非特異的な免疫療法にあたる「活性化自己リンパ球療法」を行ってきた。これは、患者の血液中のリンパ球を分離し、*in vitro*においてIL-2ならびに抗CD3抗体を用いて、とくにT細胞を選択的に増殖、活性化させるリンフォカイン活性化キラー細胞療法（TLAK療法）と呼ばれるものである。今日までの適応症例における免疫療法の経験では、腫瘍の部分緩解や一般状態の改善、文献データと比較した寿命延長などの効果を認めてはいるものの、直接的な抗腫瘍効果として考えると、残念ながらその奏成功率は決して高いとは言えない。この原因の主なものとして、本療法にて非特異的に増殖させたリンパ球では、抗腫瘍効果を有するT細胞の割合が低く、腫瘍退縮に導くための絶対数が足りないためと考察された。

(3) この問題を解決すると考えられる②腫瘍特異的な免疫療法に目を転じてみると、罹患症例の腫瘍細胞を免疫抗原として調整後、再投与する方法（GS hodge *et al.*, *Cancer Gene Therapy*, 1999）や、腫瘍関連抗原ペプチドもしくは罹患症例の腫瘍細胞をパルスした樹状細胞ワクチン療法（Rodriguez-Lecompte JC *et al.*, *Anim Health Res Rev.*, 2004）、さらにはヒトTyrosinaseとGM-CSFを用いたDNAワクチン法（Bergman *et al.*, *Clin Cancer Res*, 2006）などの報告を認めることができる。しかしながら、これらのどの報告においても、実際の罹患症例における奏成功率はやはり低い。この原因として、悪性黒色腫がもつ強い免疫逃避機構が主因

であると考えられている。

(4) そこで我々は、悪性黒色腫に特異的な新規の免疫寛容誘導因子であるGpnmb（Glycoprotein nmb）の発現動態を解析してきた。Gpnmbは、黒色細胞に特異的な膜貫通型の糖蛋白質で、細胞間接着に関連した機能を有し（Tomihari M *et al.*, *Exp Dermatology*, 2009）、マウス悪性黒色腫細胞において顕著に発現していることが判明している。また我々は、マウス悪性黒色腫細胞株を用い、Gpnmbがnegative regulatorとして宿主の免疫寛容を誘導することを明らかにし、悪性黒色腫細胞株におけるGpnmb発現をsiRNAによりブロックすることで従来の免疫療法の実効性をさらに高める可能性を示した（Tomihari M *et al.*, *Cancer Res*, 2010）。さらに、犬の悪性黒色腫培養細胞株（CMeC1, CMeC2）、ならびに自然発症悪性黒色腫においても、GpnmbがmRNA・蛋白質の両レベルにおいて顕著に発現していることを初めて発見し、同蛋白質が今後の抗腫瘍免疫療法の新たな分子標的となる可能性を示唆した（未発表）。と同時に、Gpnmb蛋白質は膜上に発現されることから、腫瘍関連抗原のひとつとして特異的な腫瘍免疫を誘導できる可能性も考えられた。こうした臨床経験、ならびに研究成果を経て我々は、このGpnmbを介した経路の遮断をうまく利用することで、犬の悪性黒色腫に対する非特異的な免疫療法の改善と、新たな免疫療法の開発を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、Gpnmbによる免疫寛容誘導の阻害を主目的とすると同時に、免疫療法としての実効性を高めるため、犬の悪性黒色腫においてまとまった報告の少ない腫瘍関連抗原の発現動態を明らかにし、症例の腫瘍に対して最も有効と思われる数種の標的蛋白質を混合させたペプチドワクチン療法と組み合わせることで、腫瘍特異性の高い新規の免疫療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) イヌ悪性黒色腫細胞株6種（Pu, Mi, KMec, C1, C2）は、東京大学農学生命科学研究科獣医外科学研究室の佐々木伸雄教授より譲渡していただいたものを用いた（表1）。また、悪性黒色腫自然発症例は、2009～2012年までに帯広畜産大学動物医療センターに来院した症例、ならびに2012年に酪農学園大学附属動物病院に来院した症例（n=10）よ

り組織を採材した。また、対照としては、口腔内にその他の腫瘍を発症した症例 (n=8)、ならびに健常犬の口腔内組織 (n=1) を採材し、実験に供した。

表1 犬悪性黒色腫培養細胞株

細胞株名	参考文献中の名称	犬種	性別	発症部位	腫瘍採取部位	ステージ (WHO分類)
Pu	(CMM1)	トイプードル	オス	口腔	原発巣	T2bN1M0
M	(CMM2)	雑種	不詳	口腔	原発巣	T2aN0M0
K Mec			オス	口腔	原発巣	T3N1M0
L Mec		ビーグル	メス	口腔	リンパ節転移	T4N1M0
C1	(C Mec-1)				原発巣	T3N1M0
C2	(C Mec-2)	チャウチャウ	オス	皮膚	肺転移(マウス腫代)	

(2) 腫瘍関連抗原としては、ヒトやマウスなどで既に報告されている悪性黒色腫に特徴的な gp100、Tyrosinase、MART1、TRP2 の4種に加え、腫瘍一般に発現するとされている survivin の計5種を対象とした。これらの発現量をリアルタイム RT-PCR を用いて解析するとともに、過去の文献で報告のある配列部位を参考にして、それぞれの抗原に対する合成ペプチドを作製した (表2)。

表2 悪性黒色腫関連抗原の合成ペプチド

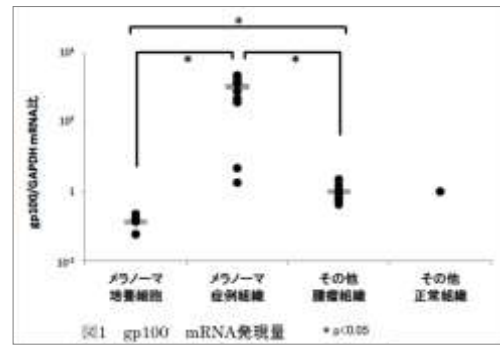
抗原	動物種	抗原決定基	配列	アミノ酸数
hgp100	ヒト	25-33	KVPRNGDNL	9
cgp100	イヌ	25-33	EGPRDQDNL	9
cTyrosinase	イヌ	206-214	GFLPWHRLF	9
cTyrosinase	イヌ	369-377	YMNGTMSQV	9
cMART1	イヌ	26-35	EAAGIGILTV	10
hMAGE1	ヒト	27-35	NYKHCFPEI	9

(3) 細胞障害活性を測定する方法として、従来より報告のある LDH 法、CFSE 染色とフローサイトメトリーによる解析法、Calcein 染色を用いた方法、wst-8 染色を用いた方法についてそれぞれ比較、検討した。

(4) 細胞障害活性の測定系を確立した後、従来の TLAK 療法と、腫瘍関連抗原ペプチドを添加した改良型 TLAK 療法とに対し、その細胞障害活性について比較、検討した。さらに、ペプチドに加えて Gpmb 抗体を添加した場合についても検討を重ねた。

4. 研究成果

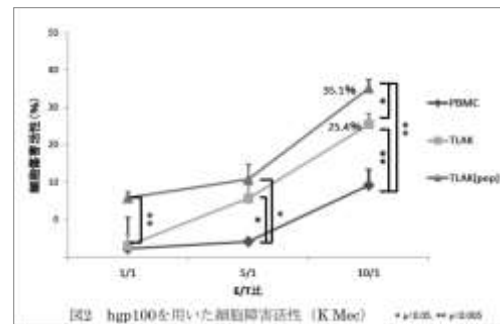
(1) 腫瘍関連抗原である gp100、MART1、TRP2、Tyrosinase、Survivin の mRNA 発現量を、悪性黒色腫 (メラノーマ) の培養細胞、症例組織、その他腫瘍症例組織、健常犬の正常組織において比較した。この結果、すべての腫瘍関連抗原において、メラノーマ症例組織の平均が、その他腫瘍組織の平均と比較して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。一方で、メラノーマ培養細胞の平均は、メラノーマ症例組織の平均と比較し有意に低値を示した ($p < 0.05$)。図1には、gp100 の結果を示した。



この結果は従来の報告と同様に、イヌのメラノーマ組織においてメラノーマ関連抗原の発現量が高いことを示すとともに、培養細胞における腫瘍関連抗原の発現量が低下していることを示した。さらに、症例ごとの発現パターンには個々における差異が存在しており、症例に応じた腫瘍関連抗原の発現量の相違があることも確認された。

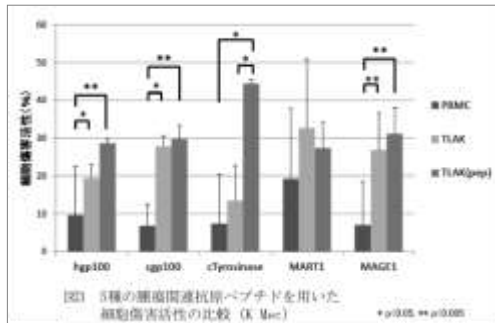
(2) 次に、細胞傷害活性の測定系の確立を目的とし、4 種の方法について比較、検討した。まず、LDH 法は、最終的に Effector cell の LDH 活性が混入してしまい、良好な結果を得られなかった。また CFSE 染色とフローサイトメトリーによる解析法では、結果の精度に乏しく、細胞傷害活性の微妙な差異を明確に示すことができなかった。さらに Calcein 染色を用いた方法では、本研究で用いた悪性黒色腫細胞株 6 種すべてにおいて、positive control においてですら、検出可能な蛍光強度を得ることができなかった。これらに対し、wst-8 染色を用いた方法では、安定して良好な結果を得ることが可能であった。

(3) そこで、まず ①末梢血単核球 (PBMC: Peripheral blood mononuclear cell) と、②従来条件で活性化した TLAK、③腫瘍関連抗原ペプチドを添加した改良型 TLAK (TLAK(pep)) とにおいて、これらの細胞障害活性について比較、検討した。図2には、悪性黒色腫細胞株 K Mec に対し、hgp100 のペプチドを添加した場合の結果を示した。

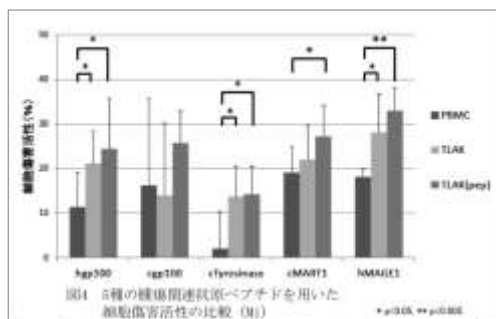


この結果、hgp100 ペプチド添加により、細胞障害活性を有意に向上させることが可能であった。また同様に、K Mec に対して cgp100、

cTyrosinase、MART1 のペプチド添加により、細胞障害活性を上昇させることが可能であった。一方で、MART1 を用いた場合には有意な上昇を認めることができなかった (図 3)。



同様の解析を異なる細胞株である Mi に対して行ったところ、cgp100 に対してのみ有意な上昇を認めることができなかった (図 4)。



これらの結果より、ほとんどの腫瘍関連抗原ペプチドの添加により細胞障害活性が上昇を認めたこと、しかしながら細胞株ごとに効果のある腫瘍関連抗原ペプチドが異なることが示された。しかしながら、これらの有効性と、各腫瘍関連抗原の mRNA 発現量との相関を認めることはできなかった。このことより、臨床症例に関して単純に mRNA 発現量を測定するのみでは、有効な腫瘍関連抗原ペプチド選定を行うことができない可能性があるものと推測された。

(4) さらに上記の評価系を用いて、④TLAK + ペプチド添加 + 抗 Gpnmb 抗体を同時に添加し、得られたリンパ球の、K Mec, Mi 両細胞株に対する細胞障害活性を評価した。しかしながらどちらの細胞株に対しても、対照と比較して同程度であり、有意な細胞障害活性の上昇を認めることはできなかった。同様の免疫寛容誘導蛋白質である CTLA4 に対しては抗体製剤 (イピリムマブなど) が実用化されていることなどから、今後は、抗体添加のタイミング、抗体添加量等の条件設定をさらに検討する必要があるものと考えられた。

(5) 以上の成果より、本研究では、犬悪性黒色腫における腫瘍関連抗原の発現動態を明らかにするとともに、これらに対するペプ

チドを利用することで、従来の活性化リンパ球療法の抗腫瘍活性を高め、さらには腫瘍に対する特異性をもたせることに成功した。残念ながら抗 Gpnmb 抗体を用いた免疫寛容誘導経路の遮断に対する有意な結果は得られていないが、さらなる検討を重ねることにより、より奏功性の高い、現実可能な免疫療法の開発が可能になるものと強く期待されるものである。

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 1 件)

The DC-HIL ligand syndecan-4 is a negative regulator of T-cell allo-reactivity responsible for graft-versus-host disease.

Chung JS, Tomihari M, Tamura K, Kojima T, Cruz PD Jr., Ariizumi K.

Immunology. 2013 Feb;138(2):173-82.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富張 瑞樹 (TOMIHARI MIZUKI)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号: 00552754

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし