

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592409

研究課題名(和文)新規 p53 標的遺伝子を用いた前立腺癌ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of immunomodulatory p53-targeted vaccine for mouse model of prostate cancer

研究代表者

佐藤 威文 (SATO, TAKEFUMI)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：50286332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：転移を有する前立腺癌への新たな免疫療法・がんワクチンの開発を目的として、p53遺伝子をターゲットとする抗腫瘍ワクチンにつき、マウス前立腺癌細胞を対象として検討を行った。研究協力機関を含めた検討の結果、細胞障害性T細胞の誘導などの機序が明らかとなりつつある。今後、ナチュラルキラー細胞の活性や、サイトカインの評価を含めた更なる解析を検討している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this preclinical study was to develop an immunomodulatory p53-targeted vaccine for mouse model of prostate cancer. Result of this study, including collaborated research institutions, mechanisms such as induction of cytotoxic T cells was confirmed in this immunomodulatory approach. Further additional analysis are expected.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 転移 抗腫瘍免疫

## 1. 研究開始当初の背景

近年の血清前立腺癌特異抗原 (PSA) のスクリーニングにより、前立腺癌の検出効率は飛躍的に向上し、本邦においても、その罹患率は急激に増加している。1994 年には約 11,000 人であった罹患数は、2020 年には 78,000 人以上へと著しい増加が見込まれており、成人男性における悪性腫瘍別の罹患率で第 2 位となることが予測され、現在、本邦における悪性腫瘍で最も高い増加率を示している。またこのような PSA スクリーニングが進められているにも関わらず、本邦における前立腺癌の死亡症例数は増加の一途を呈しており、特に転移性前立腺癌に対する新たなアプローチによる治療オプションの開発・確立が急務である。

悪性腫瘍における治療オプションとして、外科的治療、放射線治療、ならびに化学療法は確立された療法としてそれぞれ発展してきているが、近年、遺伝子・細胞治療による免疫療法の有効性が確立されてきている。前立腺癌においては、米国 FDA が 2010 年 4 月に自己細胞による免疫細胞製剤である sipuleucel-T を、去勢抵抗性前立腺癌患者に対する免疫療法として使用することを初めて承認し、従来の化学療法の次に加わる新たな治療として確立されつつある。

また本研究で用いる新規 p53 標的遺伝子は、研究代表者らの pre-clinical study により、マウス前立腺癌細胞への同遺伝子導入による p53 発現促進とアポトーシス誘導作用、ならびに in vivo におけるアデノウイルスをベクターに用いた腫瘍内局注により、前立腺局所での殺細胞効果に加え、抗腫瘍免疫の誘導を確認・報告している。当該検討での ex vivo での導入ワクチンによる pre-clinical study が確立することで、現在の米国での臨床研究対象である限局性前立腺癌から、転移性前立腺癌・去勢抵抗性 (ホルモン抵抗性) 前立腺癌への応用が期待できる。

## 2. 研究の目的

転移を有する前立腺癌への新たな免疫療法・がんワクチンの開発を目的として、p53 遺伝子をターゲットとする抗腫瘍ワクチンの確立を目的とする pre-clinical study である。

## 3. 研究の方法

(1) 遺伝子導入がんワクチンの作製  
マウス前立腺癌細胞の RM-9 に対して、ex vivo での遺伝子導入を実施する。同トランスフェクション後、複数の異なる線量 (Gy) を照射して細胞分裂を抑制する。

(2) 抗腫瘍効果の確認

Day0: マウス前立腺癌細胞である RM-9 (5x10<sup>3</sup> cells) を前立腺局所に注入し、同日にマウス尾静脈より同じく RM-9 (5x10<sup>3</sup> cells) を注入し、正所性・転移性前立腺癌

マウスを作製する。

Day7, Day9, Day11: 上記(1)で作成した遺伝子導入がんワクチンを、2回に分けて皮下接種し、そのコントロール群として、HBSS のみの接種、ならびにβ-gal をアデノウイルスベクターで導入したコントロールがんワクチンの計 3 群で評価を行う。

Day 21: 上記の 3 群につき、前立腺局所腫瘍重量、肺転移数を確認する。また同時に前立腺組織、リンパ節、肺組織、脊椎・大腿骨を採取し、それぞれホルマリン、OCT コンパウンドで保存し、後で実施する病理学的評価の準備を並行して実施する。

(3) 毒性の確認

タイムコースの実験として、上記(2)と同一の内容にて、Day0, Day7, Day14, Day21 の各ポイントでマウス剖検を行い、脾臓、肝臓、肺の重量測定と組織保存を行う。また同時に末梢血を採取し、生化学的評価を実施して、各主要臓器への毒性につき評価を行う。

(4) 病理学的解析

前立腺、肺転移組織において、HE, CD8, CD4, F4/80, apoptotic index による免疫染色による病理学的評価を行い、骨組織ではサイトケラチンによる免疫染色で評価を行う。

(5) 免疫学的解析

タイムコースでの検討として、末梢血におけるリンパ球の解析として、フローサイトメトリーによる各 T リンパ球 (CD3, CD4, CD8) ならびに NK 細胞数の経時的評価を実施し、同時に各時点での血清中における IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-12 の測定を ELISA 法で評価する。

細胞障害性試験による NK 細胞の機能解析、および脾臓由来リンパ球の機能解析 (CTL 活性、ELISPOT アッセイ、depletion 検討) を実施し、明らかにする。

## 4. 研究成果

研究協力機関を含めた検討により、マウス前立腺癌細胞の RM-9 に対して、上記腫瘍細胞を用いたワクチンの至適条件については、100 MOI が適していることが明らかとなった。また上記腫瘍細胞ワクチン作製に際しての、細胞に対する放射線照射量については、100 Gy を用いることで細胞増殖が完全に抑制されることが確認された。

またその抗腫瘍メカニズムの解明につき、細胞障害性 T 細胞の誘導、およびナチュラルキラー (NK) 細胞などが、その中心機序となっている傾向が明らかとなってきている。

これまでに米国ベイラー医科大学・MD アンダーソン癌センターで実施されているアデノウイルス 5 型をベクターとした遺伝子治療、ならびに代表者の施設で実施されているア

デノウイルス 5 型をベクターとした Herpes Simplex Virus-thymidine kinase (HSV-tk) 遺伝子治療においては、それぞれ予後不良なハイリスク前立腺癌患者に対して、PSA 低下を含めた明らかな臨床効果を認めているものの、アデノウイルスを患者体内(前立腺内)に直接注入することによる発熱や肝機能障害、血液凝固系の延長が確認されており、同事象は保存的に軽快するものの、その一定頻度で認められる毒性を回避できないことが判明してきている。また前立腺内に直接ベクターを注入するこれらのプロトコールでは、転移性前立腺癌に対する適応が困難であり、毒性回避と効率の良い抗腫瘍免疫の誘導・獲得が次のステップとして必要とされている。今回の腫瘍ワクチンの皮下投与によるアプローチは、遺伝子導入に伴う患者毒性と、効率良い抗腫瘍免疫獲得の双方が解決でき、今後の転移性前立腺癌への臨床応用を目的とした、新たな治療ストラタジーとして有望であると考えられた。

当該研究においては、最終年度以降においても更なる解析の継続を予定している。

今後の研究の展開ならびに計画については、フローサイトメトリーによる各 T リンパ球 (CD3, CD4, CD8) ならびに NK 細胞数の経時的評価を実施し、同時に各時点での血清中における IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-12 の測定などの継続検討を予定している。

## 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 3 件)

Kubo M, Satoh T, Tabata K, Tsumura H, Iwamura M, Baba S, Thompson TC, Obata F. Enhanced central memory cluster of differentiation 8+ and tumor antigen-specific T cells in prostate cancer patients receiving repeated in situ adenovirus-mediated suicide gene therapy. *Mol Clin Oncol (in press)* 査読有

Fujita T, Satoh T, Timme TL, Hirayama T, Zhu JX, Kusaka N, Naruishi K, Yang G, Goltsov A, Wang J, Vlachaki MT, Teh BS, Brian Butler E, Thompson TC. Combined therapeutic effects of adenoviral vector-mediated GLIPR1 gene therapy and radiotherapy in prostate and bladder cancer models. *Urol Oncol*.32:92-100, 2014 査読有

Nakamura M, Tsumura H, Satoh T, Matsumoto K, Maruyama H, Majima M, Kitasato H. Tumor apoptosis in prostate cancer by PGD(2) and its metabolite 15d-PGJ(2) in murine model. *Biomed Pharmacother* 67: 66-71, 2013 査読有

[学会発表](計 12 件)

佐藤威文 前立腺がん患者における Bone Health 第 66 回日本泌尿器科学会西部総会(教育セミナー)(招待講演) 2014 年 11 月 8 日 倉敷アイビースクエア(岡山県倉敷市)

佐藤威文 前立腺がん患者における Bone Health 第 64 回日本泌尿器科学会中部総会(教育セミナー)(招待講演) 2014 年 10 月 17 日 アクティシティ浜松(静岡県浜松市)

佐藤威文 泌尿器科領域 PET 診断の cutting edge 第 79 回日本泌尿器科学会東部総会(シンポジウム)(招待講演) 2014 年 10 月 13 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

佐藤威文 前立腺がん患者における Bone Health:見えてきた診療のポイントと課題 第 52 回日本癌治療学会学術集会(教育セミナー)(招待講演) 2014 年 8 月 29 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

佐藤威文 去勢抵抗性前立腺癌に対する新しい治療戦略と課題 青森県泌尿器科医会(招待講演) 2014 年 8 月 25 日 ホテル青森(青森県青森市)

佐藤威文 去勢抵抗性前立腺癌に対する新しい治療戦略と課題 前立腺癌学術講演会(招待講演) 2014 年 6 月 24 日 横浜ベイシェラトン&タワーズ(神奈川県横浜市)

佐藤威文 前立腺癌治療 Up to Date 第 102 回日本泌尿器科学会総会(教育セミナー)(招待講演) 2014 年 4 月 25 日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

佐藤威文 進行性前立腺がんの治療(卒後教育プログラム)(招待講演) 第 101 回日本泌尿器科学会総会 2013 年 4 月 25 日 札幌プリンスホテル国際館パミール(北海道札幌市)

佐藤威文 前立腺癌に対する新たな治療戦略(イブニングセミナー)(招待講演) 第 101 回日本泌尿器科学会総会 2013 年 4 月 25 日 札幌プリンスホテル国際館パミール(北海道札幌市)

佐藤威文 限局性前立腺がんの診断と治療(招待講演) 第 77 回日本泌尿器科学会東部総会 2012 年 10 月 17 日 東京ドームホテル(東京都文京区)

佐藤威文 高齢 mCRPC 患者に対する治療ストラタジー(招待講演) 第 39 回尿路悪性腫瘍研究会 2012 年 7 月 21 日 ホテルグランドパレス(東京都千代田区)

Takefumi Satoh, Makoto Kubo, Ken-ichi Tabata, Shinji Kurosaka, Masaki Kimura, Kazumasa Matsumoto, Tetsuo Fujita, Fumiya Obata, Yasutomo Nasu, Hiromi Kumon, Dov Kadmon,

Malcolm K. Brenner, Timothy C. Thompson, Shiro Baba. Systemic T-cell activation following neoadjuvant in situ gene therapy in high-risk prostate cancer patients. American Urological Association Annual Meeting 2012年5月21日 Georgia World Congress Center(アメリカ合衆国ジョージア州アトランタ)

(3)連携研究者 ( )

研究者番号 :

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況(計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

佐藤 威文(SATOH, Takefumi)  
北里大学・医学部・講師  
研究者番号 : 50286332

### (2)研究分担者

田畑 健一(TABATA, Kenichi)  
北里大学・医学部・講師  
研究者番号 : 20327414

黒坂 眞二(KUROSAKA, Shinji)  
北里大学・医学部・助教  
研究者番号 : 10348568

久保 誠(KUBO Makoto)  
北里大学・医療衛生学部・講師  
研究者番号 : 40464804

津村 秀康(TSUMURA, Hideyasu)  
北里大学・医学部・助教  
研究者番号 : 20348569