

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670441

研究課題名(和文)次世代型経鼻噴霧ワクチンベクターを用いた乳癌の転移抑制

研究課題名(英文) Suppression of breast cancer metastasis using the next generation nasal spray vaccine

研究代表者

河野 光雄 (Kawano, Mitsuo)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00234097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、我々はヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(hPIV2)を改変し、安全性、発現能、免疫誘導能の高い非増殖型医用スペックベクター化に成功した。

本研究においては、4T1-luc細胞をfat padに移植あるいは静注し作製した乳癌様モデルを用いて、Ag85Bを搭載したhPIV2 Mベクターの経鼻投与による乳癌の肺転移に対する抑制効果について検討した。特に、ワクチンをhigh doseで投与したマウスにおいて、肺における腫瘍転移抑制効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：Recently, we have established a novel functional replication-deficient virus vector; a recombinant human parainfluenza type 2 virus vector (hPIV2): highly safe, expressive and immunogenic vector.

In this study, we have developed hPIV2 engineered to express Ag85B (hPIV2/Ag85B) and investigated antitumor effects against breast cancer metastasis by intranasal administration to a breast cancer like model mice generated by transplanting 4T1-Luc cells using the hPIV2/Ag85B. Especially, suppression effects of breast cancer metastasis were recognized in mouse lungs vaccinated high dose hPIV2/Ag85B.

研究分野：分子ウイルス学

キーワード：hPIV2 乳癌 遺伝子免疫療法 腫瘍免疫 免疫活性化 細胞性免疫 液性免疫 転移

1. 研究開始当初の背景

初診時に遠隔転移を認め手術の適応がない転移乳癌の患者は約 10%であり、また初期治療終了後 10 年以内に約 30%の患者で再発をきたす。そのため転移乳癌の治療は乳癌診療のなかで大きな割合を占める。転移部位としては、肺、胸膜などが多く、転移乳癌の治療はきわめて困難であり、再発後の 10 年生存率は約 7~8%程度である。そのうち根治したと考えられる患者は 2~3%である。これらのことから乳癌の転移を予防することは患者の予後に大きな影響を与えたと考えられる。

乳癌に対する免疫療法はナチュラルキラー (NK) 細胞を用いた NK 療法が一般的である。しかし、NK 療法等の免疫細胞療法あるいは免疫療法において、副作用はないものの治療強度も確保できないものであり、標準治療とされる外科的手術、放射線、抗がん剤等薬物治療を補完する域を出ないものである。さらにその活性は相対的には弱いものであるため、繰り返し投与が必要であるとされている。また、NK 療法の拡大した治療法である ANK (Amplified Natural Killer) 療法では、NK 細胞を活性化し選択的に増殖させ体内に戻す。この ANK 治療法において治療強度は高くなるが、免疫刺激作用が非常に強いため、その副作用として悪寒や発熱を伴うことが指摘されている。一方、分子標的治療については、分子標的薬ハーセプチン(一般名: トラスツズマブ)による薬剤療法(HER2 陽性者)が最も一般的である。この薬剤は乳癌細胞の表面に存在する HER2 受容体に結びつく抗体で、転移性の乳癌の中でも、HER2 強陽性と判定された患者のみに効果を持つとされる。この療法は化学療法との併用で奏効率や生存期間の延長が得られ、乳癌の新しい治療薬として期待されているが、一部心臓障害などの副作用の報告がある。

Th17 細胞は様々なヒトの腫瘍で認められているが、癌免疫における機能は明らかにされていない。メラノーマの肺転移に関する IL-17A 欠損マウスを使った研究では、抗腫瘍反応における IL-17 の保護効果があることが報告されている。さらに、腫瘍特異 Th17 細胞を用いた T 細胞免疫療法は、様々な腫瘍に対して保護効果があり、肺メラノーマモデルでは、腫瘍特異的な細胞障害性 T 細胞の反応を促進することが示されている。しかしながら、乳癌においては、肺転移における Th17 細胞系の関与は明らかにされていない。また、抗酸菌分泌抗原である Ag85B は抗酸菌が分泌する主要な蛋白であり、遺伝的背景に左右されず強い Th1 誘導活性を示す Th1 タイプサイトカインを産生するため、癌治療、ワクチンアジュバントとしての効果を発揮する。

ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) ベクターは、気道粘膜に感染し、(-) 極性の非分節型 1 本鎖 RNA をもっている。そのため分節型のゲノムをもつインフルエン

ザウイルスのようにパンデミックな流行をもたらす分節間の変異(不連続変異)は起こらない。また、hPIV2 は、生活環のすべてを細胞質で行うため、遺伝子治療等で用いられているアデノウイルスベクターやワクチンアウイルスベクターのような DNA ウイルスベクターとは異なり、ウイルスゲノムの核内(染色体)への組込みは起こらず、それらによる偶発的なガン化等は回避できる。さらに当該ベクターのもつ元来の病原性もそれらのウイルスよりも弱く、ヒト(成人)での病原性の報告もなく安全性は高い。さらに安全性を確保するために、hPIV2 粒子形成に必要な不可欠な M タンパク遺伝子上の 2 ヲ所にストップコドン挿入し、M 蛋白の発現を欠失させた非増殖型 hPIV2 ベクター(PIV2 M)も既に作製している。

hPIV2 ベクターの最大の機能としては、導入遺伝子産物が大量に回収可能(ウイルス産生遺伝子産物として最大)であり、導入遺伝子の分泌型蛋白として発現することで、ウイルス粒子形成の影響を抑制できることが挙げられる。また、これまでの hPIV2 ベクターを用いた研究成果は、PIV2 ベクターの機能として、導入遺伝子による接種動物の肺での高いワクチン効果ならびに免疫制御効果を示し、肺からの免疫で全身性の免疫制御効果が得られる可能性を示した。

現在研究されている抗腫瘍ワクチンのデザインは、主に腫瘍抗原の MHC クラス I 提示による CD8+T 細胞のみにフォーカスが当てられており、腫瘍特異抗原のセルフトレランスを回避できず、十分な抗腫瘍効果が得られていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究においては、従来の癌ワクチンの弱点であった腫瘍特異抗原のセルフトレランスの回避増強を目的とし、強力なヘルパー T 細胞誘導アジュバント活性をもつ Ag85B ならびに乳癌関連抗原 HER2 遺伝子を搭載した安全性の高い非増殖型 hPIV2 ベクターを用いて、乳癌様モデルマウスへ経鼻投与し、次世代型経鼻噴霧タイプ抗腫瘍ワクチンとしての乳癌転移抑制効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) Ag85B ならびに HER2 遺伝子を導入したワクチンベクター(PIV2 M)の作製

図 1 に示したように、M 遺伝子上に 2 つのストップコドン挿入した pPIV2 M の Not I サイトに Ag85B ならびに HER2 遺伝子を挿入したプラスミド(pPIV2 M/Ag85B、pPIV2 M/HER2)を作製した。上記のゲノムを含むプラスミド(7.5 µg)と共に 4 種のプラスミド(pM; 5.0 µg、pNP; 1.25 µg、pP; 0.25 µg、pL; 1.25 µg)を、ViaFect を用いて BSRT7/5 細胞(6well)にトランスフェクトし、Vero 細胞との共培養によりレプリコン細胞を作製した。このレプリコン細胞と一過性に M 遺伝子を発

現させた Cos 細胞を共培養し、Ag85B ならびに HER2 を導入した非増殖型 PIV2 ワクチンベクター (PIV2 M/Ag85B ならびに PIV2 M/HER2) を回収した。

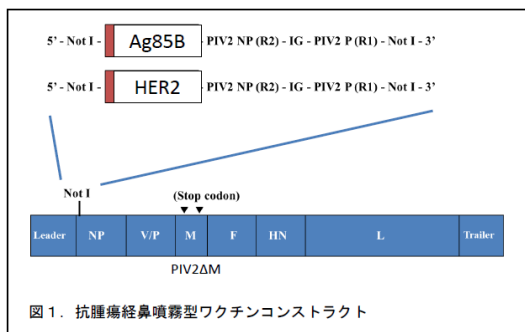


図1. 抗腫瘍経鼻噴霧型ワクチンコンストラクト

(2)乳癌様マウスモデルの作製

6 週齢の BALB/c マウス () に 4T1-luc 細胞 (3×10^5 cell/匹) を fat pad に移植し乳癌様モデルマウスを作製し、経時的な癌の増殖等を解析した。さらに早期に確実な肺転移を起こすため、同様の細胞をマウスに静注し、肺転移モデルマウスを作製した。fat pad の原発腫瘍では、直接的にその直径を測定した。

(3)抗腫瘍ワクチンベクター経鼻投与による肺転移抑制効果の検討

図2に示したプロトコールに従って、1群3匹のマウスを用いてその抗腫瘍効果について検討した。A~C群においては、4T1-luc 細胞 (3×10^5 cell/匹) を fat pad に移植した乳癌様モデルマウス、D~F群においては、4T1-luc 細胞 (3×10^5 cell/匹) を静注した肺転移モデルマウスを用いた。また、これらのモデルマウスに、抗腫瘍ワクチン (PIV2 M/Ag85B) を A群とD群には low dose [1×10^6 (TCID₅₀)], B群とE群には high dose [5×10^6 (TCID₅₀)] で、腫瘍移植 0、6、11 日後にそれぞれ経鼻投与し、腫瘍移植後 14 日でその治療・転移予防効果を解析した。

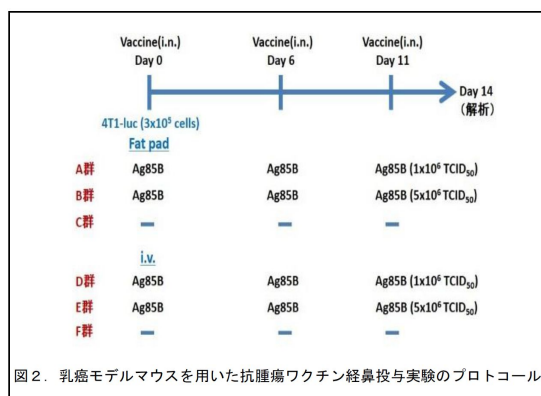


図2. 乳癌モデルマウスを用いた抗腫瘍ワクチン経鼻投与実験のプロトコール

(4)mRNA の精製および定量

採取したマウス肺をホモゲナイズし、TRIzol を用いて totalRNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を用いて total RNA から cDNA を合成した。この cDNA を用いサイトカインならびにケモカイン遺

伝子の発現量を TaqMan probe を用いたリアルタイム PCR によって定量した。

4. 研究成果

(1)乳癌に対する抗腫瘍ワクチンベクターの作製

研究の方法に示した手順でワクチン作製のコンストラクト (pPIV2 M/Ag85B, pPIV2 M/HER2) を作製した (図1)。これらのプラスミドを用いて、リバースジェネティクス法によるウイルス回収を行った。PIV2 M/Ag85B については、容易に 1×10^6 TCID₅₀/ml 程度のウイルスを回収ができた。一方、PIV2 M/HER2 については、プラスミドの収率が悪くウイルス回収が困難を極めた。研究期間終盤によく同程度のウイルス回収に成功した。

(2)乳癌様マウスモデルの作製

BALB/c マウスに 4T1-luc 細胞を fat pad に移植し乳癌様モデルを作製し、経時的な癌の増殖を解析した (図3)。さらに早期に確実な肺転移を起こすため、同様の細胞をマウスに静注し、肺転移モデルを作製した。図3に示したように、4T1-luc 細胞を fat pad に接種したマウスにおいては、原発腫瘍の経時的な増殖がみられた。一方、静注したマウスでは、肉眼と触診で fat pad での腫瘍の有無を確認したが、いずれのマウスにも腫瘍は形成されていないかった。

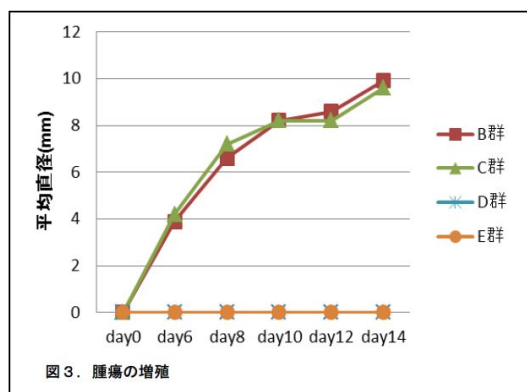


図3. 腫瘍の増殖

(3)抗腫瘍ワクチンベクター経鼻投与による抗腫瘍効果の解析

上記(1)に示したように抗腫瘍効果をもつと考えられる HER2 を搭載したワクチン (PIV2 M/HER2) については、ウイルス作製が遅れたため、この研究期間内に乳癌様モデルマウスを用いたワクチン効果の検討はできなかった。そこで、期間内に作製できた Th1 移行のアジュバント活性をもつ Ag85B 遺伝子を搭載したワクチン (PIV2 M/Ag85B) の乳癌に対する抗腫瘍効果ならびに転移抑制効果の検討を、図2に示したプロトコールに従い、1群3匹のマウスを用いて行った。

図4(A)に示したように fat pad に腫瘍細胞を移植したマウスにおいて、PIV2 M/Ag85B ワクチンを high dose で経鼻投与した

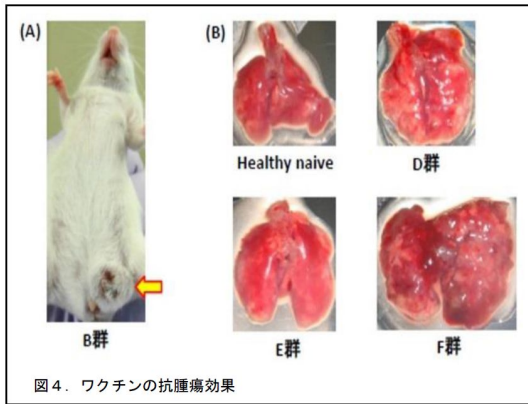


図4. ワクチンの抗腫瘍効果

マウス (B 群) においも、ワクチンを投与しなかったマウス (C 群) と同様に、乳腺における原発腫瘍が経時的に増殖し、その抗腫瘍効果は認められなかった。しかしながら、図 4 (B) に示したように腫瘍細胞を静注した肺転移モデルマウスにおいては、PIV2 M/Ag85B ワクチンを経鼻投与したマウス (D 群、E 群) において、ワクチンを投与しなかったマウス (F 群) と比較し、肺における結節の数が明らかに減少した。特にワクチンを high dose で経鼻投与したマウス (E 群) においては著しくその数が減少し、肺局所における腫瘍転移予防効果が認められた。

これらの機序解明のために、それぞれのマウスの肺を採取し、TaqMan probe を用いたリアルタイム PCR によりサイトカインプロファイルを作製した。

図 5 には、転移抑制効果の高い E 群において、発現の高いサイトカイン及びケモカインを示した。IL-17、IL-12(p40)、CCL20、IL-2 の発現が高く、中でもメラノーマの肺転移抑制への関与が示唆されている Th17 由来の IL-17 の発現量は、乳癌の明確な転移を示すワクチン投与してない群 (F) の約 180 倍の値を示した。

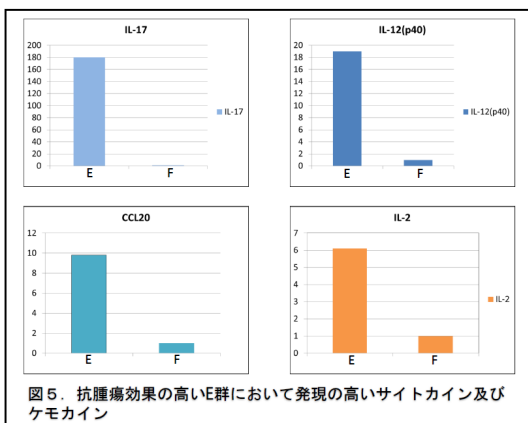


図5. 抗腫瘍効果の高いE群において発現の高いサイトカイン及びケモカイン

一方、図 6 には、転移抑制効果の高い E 群において、発現の抑制されたサイトカイン及びケモカインを示した。IL-10、CCL2、IL-18、IP-10 の発現が抑制され、特に、乳癌の転移を促進させることが示唆されている CCL2 の発現量は、ワクチンを投与していない群 (F) の約 1/30 に抑制されていた。

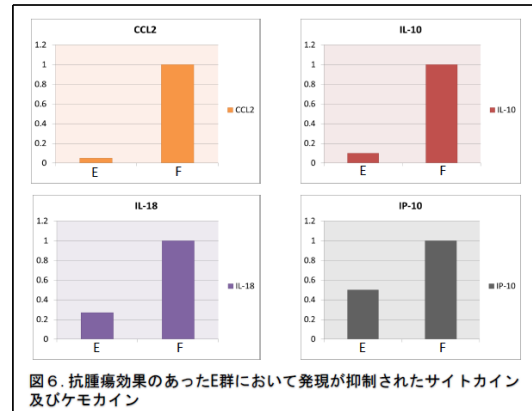


図6. 抗腫瘍効果のあったE群において発現が抑制されたサイトカイン及びケモカイン

PIV2 M/Ag85B ワクチンを経鼻接種した E 群においては、メラノーマの肺転移において、提唱されている Th17 細胞による IL-17 および CCL20 を介した抗腫瘍免疫反応の誘導メカニズムと同様なシステムで乳癌の肺転移を抑制することが示唆された。さらに、乳癌の肺転移をプロモートすると考えられている CCL2 の発現が著しく抑制されており、この CCL2 による転移経路を遮断することで乳癌の肺転移抑制を可能にしたと考えられる。これらに加え、細胞性免疫を誘導する IL-12 や非特異的抗腫瘍エフェクター細胞を誘導する IL-2 の発現増強および NK 細胞抑制に働く IL-18 や細胞性免疫応答抑制に働く IL-10 の発現抑制が E 群のマウス肺で確認されている。

これらの結果を総合すると、乳癌の肺転移様モデルマウスに経鼻投与した PIV2 M/Ag85B は、Th17 細胞系誘導能、細胞性免疫誘導能、肺転移抑制能を示唆し、乳癌に対する次世代型の経鼻噴霧ワクチンベクターとしての有効性が認められた。

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 10 件)

(1) Kihira S, Uematsu J, Kawano M, Itoh A, Oookohchi A, Satoh S, Maeda Y, Sakai K, Yamamoto H, Tsurudome M, O'Brien M, Komada H.

Ribavirin inhibits human parainfluenza virus type 2 replication in vitro.

Microbiol Immunol. 2014; 58: 628-635.

doi: 10.1111/1348-0421.12192. (査読有)

(2) Nishikawa K, Seo N, Torii M, Ma N, Muraoka D, Tawara I, Masuya M, Tanaka K, Takei Y, Shiku H, Katayama N, Kato T.

Interleukin-17 induces an atypical M2-like macrophage subpopulation that regulates intestinal inflammation.

PLoS One. 2014; 9: e108494.

doi: 10.1371/journal.pone.0108494. (査読有)

(3) Ohtsuka J, Fukumura M, Tsurudome M,

Hara K, Nishio M, Kawano M, Nosaka T.
Vero/BC-F: an efficient packaging cell line stably expressing F protein to generate single round-infectious human parainfluenza virus type 2 vector.
Gene Ther. 2014; 21: 775-784.
doi: 10.1038/gt.2014.55. (査読有)

(4) Kihira S, Uematsu J, Ishiyama Y, Chindoh M, Baba A, Kazuta R, Hasegawa T, Fujimoto K, Funouchi A, Yamamoto H, kawano M, Tsurudome M, O'Brien M, Komada H.

Calcium Ionophore A23187 inhibits human parainfluenza virus type 2 growth and monoclonal antibody against CD98 heavy chain recovers the inhibition.
International Journal of Sciences. 2014; 3: 14-20. (査読有)

(5) Watanabe K, Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K, Yasutomi Y.

Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization.
Vaccine. 2014; 32: 1727-1735.
doi: 10.1016/j.vaccine.2013.11.108. (査読有)

(6) Kitagawa H, Kawano M, Yamanaka K, Kakeda M, Tsuda K, Inada H, Yoneda M, Sakaguchi T, Nigi A, Nishimura K, Komada H, Tsurudome M, Yasutomi Y, Nosaka T, Mizutani H.

Intranasally administered antigen 85B gene vaccine in non-replicating human Parainfluenza type 2 virus vector ameliorates mouse atopic dermatitis.
PLoS One. 2013; 8: e66614.
doi: 10.1371/journal.pone.0066614. (査読有)

(7) Hara K, Fukumura M, Ohtsuka J, Kawano M, Nosaka T.

Human parainfluenza virus type 2 vector induces dendritic cell maturation without viral RNA replication/transcription.
Hum Gene Ther. 2013; 24: 683-691.
doi: 10.1089/hum.2013.024. (査読有)

(8) Tsurudome M, Nakahashi M, Matsushima Y, Ito M, Nishio M, Kawano M, Komada H, Nosaka T.

Full conversion of the hemagglutinin-neuraminidase specificity of the parainfluenza virus 5 fusion protein by replacement of 21 amino acids in its head region with those of the simian virus 41 fusion protein.

J Virol. 2013; 87: 8342-8350.
doi: 10.1128/JVI.03549-12. (査読有)

(9) Muraoka D, Nishikawa H, Noguchi T, Wang L, Harada N, Sato E, Luescher I, Nakayama E, Kato T, Shiku H.

Establishment of animal models to analyze the kinetics and distribution of human tumor antigen-specific CD8⁺ T cells.
Vaccine. 2013; 31: 2110-2118.
doi: 10.1016/j.vaccine.2013.02.056. (査読有)

(10) Hirayama M, Nishikawa H, Nagata Y, Tsuji T, Kato T, Kageyama S, Ueda S, Sugiyama D, Hori S, Sakaguchi S, Ritter G, Old LJ, Gnjjatic S, Shiku H.

Overcoming regulatory T-cell suppression by a lyophilized preparation of Streptococcus pyogenes.
Eur J Immunol. 2013; 43: 989-1000.
doi: 10.1002/eji.201242800. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 植松 淳, 酒井香江, 鈴木沙織, 吉見由美子, 山本秀孝, 河野光雄, 鶴留雅人, 駒田 洋
カスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK のパラインフルエンザウイルス2型増殖への作用
日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 28 日
デザイン・クリエイティブセンター神戸 (神戸)

(2) 酒井香江, 植松 淳, 山本秀孝, 河野光雄, 鶴留雅人, 駒田 洋

フラボノイドのパラインフルエンザウイルス2型増殖への作用
日本薬学会第 135 年会
2015 年 3 月 28 日
デザイン・クリエイティブセンター神戸 (神戸)

(3) 王立楠, 加藤琢磨, 瀬尾尚宏, 岡本幸子, 天石泰典, 峰野純一, 竹迫一任, 珠玖洋

ヒトと同様の発現様式を示す癌胎児性抗原 (CEA) トランスジェニックマウスを用いた CEA 特異的キメラ抗原受容体導入 T 細胞輸注療法の有効性と安全性の検討
日本がん免疫学会
2014 年 7 月 30 日 ~ 8 月 1 日
ひめぎんホール (松山)

(4) 山本秀孝, 鎌田未有紀, 谷口弘恵, 植松淳, 河野光雄, 鶴留雅人, 伊藤真, 駒田洋

グリチルリチン酸によるパラインフルエンザウイルス2型増殖阻害
日本薬学会第 134 年会
2014 年 3 月 27 日 ~ 3 月 30 日
熊本市総合体育館 (熊本)

(5) 鶴留雅人, 伊藤守弘, 西尾真智子, 河野光雄, 駒田洋, 大塚順平, 野阪哲哉

パラインフルエンザウイルスの HN 蛋白と F 蛋白の機能的相互作用の解析

日本ウイルス学会
2013年11月10日～11月12日
神戸国際会議場(神戸)

〔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

河野 光雄 (KAWANO MITSUO)
三重大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：00234097

(2) 研究分担者

加藤 琢磨 (KATO TAKUMA)
三重大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：60224515

(3) 連携研究者

()

研究者番号：