

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430172

研究課題名(和文) アジュバント機能が包含された人工タンパク質抗原を用いたがんワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of cancer vaccine using adjuvant function encrypted artificial antigens

研究代表者

伊藤 正紀 (Masaki, Ito)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：80297366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞性免疫ワクチンには、アジュバントが必須であるが、副作用が指摘されている。アジュバントフリーワクチンを作成するため、これまでに抗原提示細胞への抗原取込能力(物理アジュバント機能)を包含した抗原を作成してきた。本研究では、物理アジュバント機能に加えて、抗原提示細胞を成熟化させる信号アジュバント機能を抗原自身に付与した。試験管内の実験では、抗原提示細胞の成熟化機能が発揮されたが、動物実験では信号アジュバント付与による物理アジュバント機能の低下が影響し、細胞性免疫の誘導が得られなかった。アジュバントフリーワクチンを作成するためにはアジュバント機能を最適化して抗原に導入する必要が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：From a functional viewpoint, adjuvants are classified into two categories: "physical adjuvants" increase the efficacy of antigen presentation by antigen-presenting cells (APC) and "signal adjuvants" induce the maturation of APC. We created the artificial antigens by appending the TLR4 agonistic peptide motifs to create "adjuvant-free" vaccine. The antigens with TLR4 agonistic motifs have activated NF- κ B signaling pathways through TLR4. These proteins also induced the maturation of APC in vitro. Unexpectedly, signal adjuvant-encrypted proteins have lost their ability to be physical adjuvants because they did not induce cytotoxic T lymphocytes in vivo. These results confirmed that the manifestation of a motif's function is context-dependent and simple addition does not always work for motif-programing. Further optimization of the molecular context of the TLR4 agonistic motifs in antigens should be required to create adjuvant-free antigens.

研究分野：分子生物学

キーワード：TLR4 抗原提示細胞 細胞性免疫 Molcraft OVA(Ovalbumin) 人工抗原 人工タンパク質

1. 研究開始当初の背景

がんワクチンには、免疫賦活化剤としてアジュバントが必須である。アジュバントは機能面から、物理アジュバント（抗原の分解抑制、抗原提示細胞への取り込み）と信号アジュバント（Toll-like-receptor, TLR等を介した抗原提示細胞の成熟化など）に分ける事ができる。

現状のがんワクチンでは、がん抗原エピソードペプチドと、物理アジュバントであるオイルアジュバント（Incomplete Freund's Adjuvant, IFA）を混合して投与方法が一般的である。IFAは持続的な抗原の放出を促す（デポ効果）。しかし、IFAは、接種部位に持続的に炎症を誘発し、細胞障害性T細胞(CTL)が、ワクチン接種部位に集積し、腫瘍部位への移行が抑制されるため、CTL誘導能は高いが、抗腫瘍効果が低い事が報告されている。(Hailemichael Y, *et al.*, 2013, *Nat Med*3:10)。家畜や実験動物では、IFAに結核死菌体を混合した、強力な細胞性免疫誘導能を持つ Complete Freund's Adjuvant(CFA)が使用されている。結核死菌体は、TLRシグナルを刺激し、抗原提示細胞を成熟化させ、細胞性免疫を誘導する信号アジュバントとして機能する。しかしながら、CFAは副作用が強く、未だ医薬品として承認を受けていない。このような状況から、物理アジュバントと信号アジュバントの両者がバランス良く機能し、腫瘍免疫の本体である細胞性免疫を誘導する、安全で強力なアジュバントの開発が期待されている。

2. 研究の目的

アジュバントの機能は、抗原の取り込みを促進する物理アジュバント機能と、抗原提示細胞の成熟を促す信号アジュバントの機能に大きく分かれる。我々は、「class I エピソード」、「class II エピソード」と「様々な構造支持配列」を組合わせた重合することで、オイルアジュバントを使用せずに細胞性免疫を誘導できる人工抗原の作製法に成功した。すなわち、タンパク質の構造を最適化する事で、物理アジュバント機能を抗原自身に賦与できることが明らかとなった。本課題では、この研究をさらに発展させ、物理アジュバント機能に加えて、信号アジュバント機能をも包含した人工タンパク質抗原を創製し、それ単独で腫瘍免疫を強力に誘導するがんワクチンの開発を行う。

3. 研究の方法

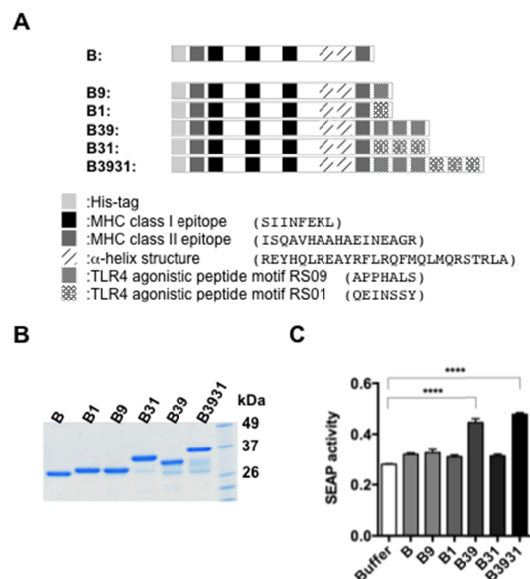
我々は、従来の抗原に付加して機能を発揮するタイプのアジュバントではなく、抗原自身にアジュバントの機能を持たせられないかと考え、OVA(ovalbumin)をモデル抗原として、独自に開発した人工タンパク質を創製す

るシステム MolCraft 法を用いて、MHC class I、class II エピソード、ヘリックス構造形成配列を組合わせた結合した人工タンパク質を作成し、物理アジュバント機能（抗原提示細胞への取込能力）を抗原自身に包含した細胞性免疫を強力に誘導する人工抗原 F37A を創製している。そこで、人工抗原 F37A に、TLR4 アゴニストリガンドモチーフ配列 (TLR4 モチーフ) を結合した人工タンパク質を作製、信号アジュバント機能（抗原提示細胞の成熟化）と腫瘍免疫の本体である細胞性免疫誘導能の両方の機能を持つ抗原をスクリーニングした。

4. 研究成果

「実施内容」

TLR4のリガンドであるLPSの機能を模倣するTLR4モチーフ#1:RS01と#9:RS09が同定されているので、これらの配列を信号アジュ



バントとして使用した。Shanmugam A, *et al.* (2012) *PLoS One* 7(2):e30839. 物理アジュバント機能を有する人工タンパク質抗原 F37A のC末に#1(RS01)と#9(RS09)を組合わせた結合した抗原を作成精製した。精製はLPSを産生しない大腸菌から精製し、endotoxinレベルが0.05EU/μg以下であることを確認している。(Fig 1A.B.)

Fig.1

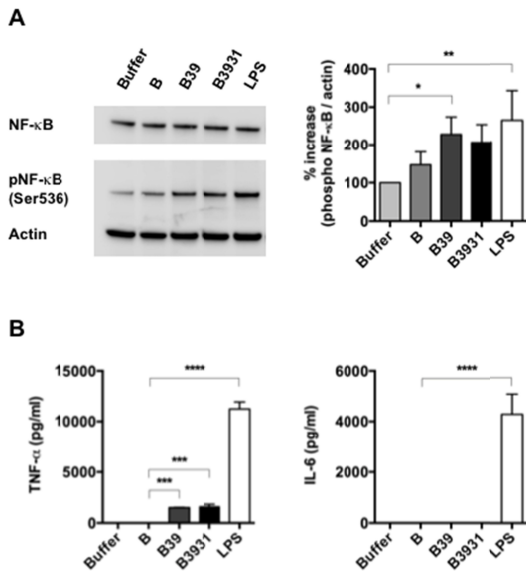
TLR4を介してNFκBシグナルの活性化をアルカリフォスファターゼSEAP活性で測定するHEK-Blue(InVivoGen)を使用して、作成した抗原のNFκBシグナルの活性化能を測定した。その結果、TLR4モチーフ#9を3連に連ねたB39とB3931に活性が認められた。(Fig 1C.)

抗原提示細胞様細胞としてRAW264.7細胞を用いて、NFκBシグナルの活性化をNFκBのリン酸化を指標として評価した。TLR4モチー

フを持たない抗原 B(F37A)に較べて、B39 は強い NFκB のリン酸化を示し、RAW264.7 細胞においても NFκB シグナルを活性化出来る事がわかった。(Fig 2A.)

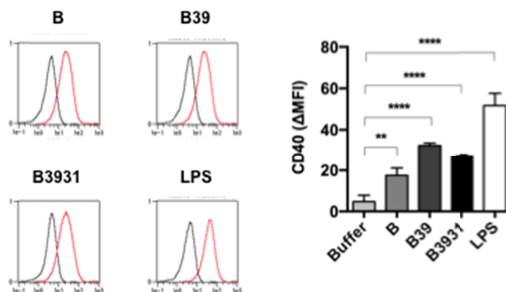
さらに、TLR4 モチーフを持たない抗原 B(F37A)で発現のみられない炎症性サイトカイン TNF-α の産生が B39 と B3931 には認められた。(Fig 2B.)また、LPS で見られる IL-6 の産生は見られなかった。これらの結果は、TLR4 モチーフ#9 を 3 連に連ねた構造が、TLR-4 リガンドである LPS とは異なるメカニズムで機能している事を示唆している。

Fig.2



抗原提示細胞の成熟化マーカー CD40 の発現を調べたところ、TLR4 モチーフを持たない抗原 B(F37A)に較べて、TLR4 モチーフを持つ B39 と B3931 は強く CD40 の発現上昇を示した。これらの結果から、*in vitro* において TLR4 モチーフ#9 を 3 連に連ねた構造を付加した B39 と B3931 が、抗原提示細胞を成熟化させる信号アジュバント能力がある事が明らかとなった。(Fig 3.)

Fig.3



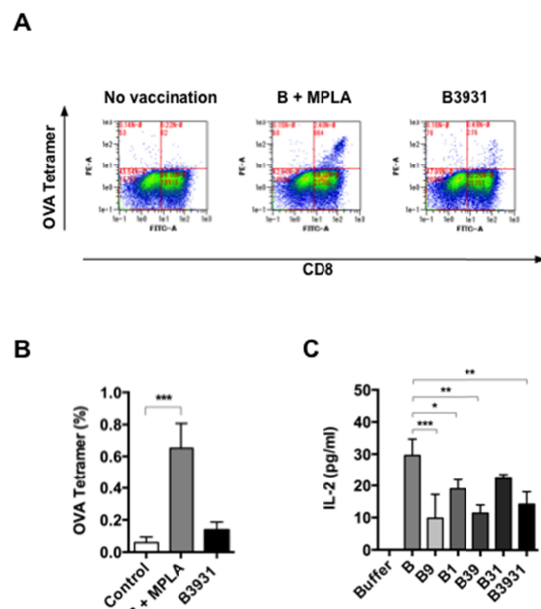
アジュバントを全く使用せずに抗原 B3931 のみをマウスに投与し、抗原特異的細胞障害性 T 細胞(CTL)誘導能を OVA テトラマーアッセイにより測定した。(Fig 4A.)物理アジュバント機能を持つが、信号アジュバント機能を持たない抗原 B(F37A)と信号アジュバント TLR4 リガンド MPLA (monophosphoryl lipid A)

を同時に投与すると有意に CTL の誘導が見られたが、抗原 B3931 のみをマウスに投与群では有意な CTL の誘導は見られなかった。(Fig 4B.)

そこで、TLR4 モチーフを付加した抗原の抗原提示能を樹状細胞 DC2.4 細胞と OVA 特異的 T 細胞 (RF33.70)を用いて IL-2 産生能で調べた。その結果、TLR4 モチーフ#9 を付加した抗原 B9、B39、B3931 は IL-2 産生能が低下しており抗原提示能が減弱している事が明らかになった。(Fig 4C.)従って、*in vitro* において信号アジュバント機能を示した抗原 B3931 が、*in vivo* で CTL 誘導を引き起こさずに細胞性免疫を誘導出来なかった原因として、TLR4 モチーフ#9 の付加が、抗原 B(F37A)に包含された物理アジュバント機能に影響を与え、抗原提示細胞への取込効率が低下した事が示唆された。

これらの結果から、アジュバントフリーの抗原を作成するためには、信号アジュバント機能を発揮する TLR4 モチーフ#9 を、抗原 B(F37A)の C 末に導入するのはなく、物理アジュバント機能を損なわない形で、最適化して導入する必要である事が明らかになった。

Fig.4



「得られた成果のインパクト」

これまでのアジュバント(免疫賦活剤)は抗原と同時に投与されその機能を発揮する。

我々は、抗原(タンパク質)自身に抗原提示細胞を成熟化させる信号アジュバント機能を付与させる事ができる事を明らかにした。

アジュバントは機能面から信号アジュバントと物理アジュバントに分けられ、この両方の機能が細胞性免疫を誘導するアジュバ

ントには必須である。

i)我々は信号アジュバントと物理アジュバントを抗原自身に包含させ、アジュバントフリーワクチンを作成するためには、これらの機能が相互に影響しあわない形で、最適化して導入される必要があることを示した。

「今後の展開」

本研究により、抗原タンパク質自身にアジュバント機能を付与するためには、物理アジュバント機能と信号アジュバント機能をバランス良く導入する必要が示された。

この知見を元にして、連携研究者 芝清隆らが開発したMolCraft法(Motif programming)を用い、抗原のMHC class I、class II エピトープ、ヘリックス構造タンパク質安定化配列、TLR4モチーフなどを、組み合わせ的に結合した人工タンパク質ライブラリーを作成し、この中から強力に細胞性免疫誘導能を持つタンパク質を探索、物理アジュバントと信号アジュバント機能がバランス良く調整された人工抗原を特定し、腫瘍免疫の本体である細胞性免疫を誘導する事ができるアジュバントフリーワクチンの開発を進める予定である。

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 8 件)

原著論文

Hayashi K, Nagasaki E, Kan S, Ito M, Kamata Y, Homma S, Aiba K. Gemcitabine enhances rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity to B cell lymphoma by CD20 upregulation. *Cancer Sci*. 査読有り 2016 ;107(5):682-9. Kan S, Koido S, Okamoto M, Hayashi K, Ito M, Kamata Y, Komita H, Nagasaki E, Homma S. Up-regulation of HER2 by gemcitabine enhances the antitumor effect of combined gemcitabine and trastuzumab emtansine treatment on pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *BMC Cancer*. 査読有り 2015 ;15:726.

Komita H, Koido S, Hayashi K, Kan S, Ito M, Kamata Y, Suzuki M, Homma S. Expression of immune checkpoint molecules of T cell immunoglobulin and mucin protein 3/galectin-9 for NK cell suppression in human gastrointestinal stromal tumors. *Oncol Rep*. 査読有り 2015 ;34(4):2099-105.

Kan S, Koido S, Okamoto M, Hayashi K, Ito M, Kamata Y, Komita H, Ishidao T,

Nagasaki E, Homma S. Gemcitabine treatment enhances HER2 expression in low HER2-expressing breast cancer cells and enhances the antitumor effects of trastuzumab emtansine. *Oncol Rep*. 査読有り 2015 ;34(1):504-10.

Koido S, Kan S, Yoshida K, Yoshizaki S, Takakura K, Namiki Y, Tsukinaga S, Odahara S, Kajihara M, Okamoto M, Ito M, Yusa S, Gong J, Sugiyama H, Ohkusa T, Homma S, Tajiri H. Immunogenic modulation of cholangiocarcinoma cells by chemoimmunotherapy. *Anticancer Res*. 査読有り 2014 ;34(11):6353-61.

Ito M, Hayashi K, Adachi E, Minamisawa T, Homma S, Koido S, Shiba K. Combinatorial contextualization of peptidic epitopes for enhanced cellular immunity. *PLoS One*. 査読有り 2014 24; 9(10): e110425. doi:10.1371/journal.pone.0110425.

Koido S, Ohkusa T, Kan S, Takakura K, Saito K, Komita H, Ito Z, Kobayashi H, Takami S, Uchiyama K, Arakawa H, Ito M, Okamoto M, Kajihara M, Homma S, Tajiri H. Production of corticotropin-releasing factor and urocortin from human monocyte-derived dendritic cells is stimulated by commensal bacteria in intestine. *World J Gastroenterol*. 査読有り 2014 ;20(39):14420-9.

Koido S, Ito M, Sagawa Y, Okamoto M, Hayashi K, Nagasaki E, Kan S, Komita H, Kamata Y, Homma S. Vaccination with vascular progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells elicits antitumor immunity targeting vascular and tumor cells. *Cancer Immunol Immunother*. 査読有り 2014 ;63(5):459-68.

〔学会発表〕(計 4 件)

伊藤正紀、Antigen-presenting cells recognize the molecular contexts of artificial protein antigen. *がん免疫療法・マクロファージ国際会議 2015*、平成 27 年 7 月 9 日、東京大学 伊藤謝恩ホール(東京都文京区)

伊藤正紀、Encrypted peptidic ligand for TLR-4 augmented the cellular immunity of artificial proteinous antigens. 第 74 回日本癌学会学術集会、平成 27 年 10 月 10 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

伊藤正紀、The influence molecular context of epitopes on the cross-presentation activity of immune cells. 第 39 回日本分子生物学会、平成 27 年 12 月 3 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

伊藤正紀、Artificial antigen appended with

TLR-4 agonist peptide motif stimulates cytokine production of antigen-presenting cells. 第75回日本癌学会学術集会、平成28年10月7日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：細胞性免疫誘導ワクチン
発明者：伊藤正紀、芝 清隆
権利者：学校法人慈恵大学、公益財団法人がん研究会
種類：知財出願
番号：特願 2015-525203 PCT/JP2014/67355
出願年月日：平成 26.6.30
国内外の別：日本 米国

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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
伊藤 正紀 (ITO MASAKI)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：80297366

(2)研究分担者
本間 定 (HOMMA SADAMU)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：50192323

(3)研究分担者
小井戸 薫雄 (KOIDO SHIGEO)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70266617

(4)連携研究者
芝 清隆 (SHIBA KIYOTAKA)
がん研究所・蛋白創製研究部・部長
研究者番号：40196415