

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 2 月 21 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450434

研究課題名(和文) 犬がんペプチドワクチンのためのDLA-88型検査の確立

研究課題名(英文) Establishment of DLA-88 typing for canine cancer peptide vaccine

研究代表者

塚田 晃三 (Ohkusu-Tsukada, Kozo)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：90304930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウスモデルにおいて精神的ストレスの影響によって誘導されるがんの肺転移がペプチドワクチンで防止できることから、がん再発・転移防止に重点を置いた新しい治療戦略として、犬のがんペプチドワクチンの開発を進めている。本研究では、1)細胞傷害性Tリンパ球(CTLs)誘導能を有する犬のがん特異的ペプチド(melan-A、TRP-2、survivin)を検出し、2)犬のMHC class I (DLA-88)型タイピングにより、DLA-88型に適合するがん関連抗原ペプチドを同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Because the lung metastasis of cancer that is induced depending on the effect of psychological stress was able to be prevented by a peptide-vaccine in mouse model, the development project of a peptide-vaccine using dog is advanced as the new strategy for treatment by which targeted the prevention of the recurrence and metastasis of progressive cancer. This study succeeded in finding of the canine peptide epitope (melan-A, TRP-2, survivin) for inducible specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs),1) and had arrived in the detection of the those peptides-restricted specific canine MHC class I (DLA-88) types identified by DLA-88 gene typing.2)

研究分野：免疫学、獣医病理学

キーワード：DLA-88型 犬メラノーマ melan-A TRP-2 survivin 犬がんペプチドワクチン

1. 研究開始当初の背景

犬の悪性腫瘍のうち、口腔内メラノーマは浸潤性が強く予後不良で、このタイプの腫瘍では下顎（又は上顎）ごとの外科的切除は著しいQOL低下を招くため、多くのケースで放射線療法や化学療法に頼る傾向がある。しかし、第一選択治療で一時的に縮小できても再発・転移することがあり、その再発がんのほとんどが同じ治療に対して耐性を示すことが多い。

がんペプチドワクチンは、がん細胞の主要組織適合性複合体(MHC) class I に提示されているエピトープと同じアミノ酸 (AA) 配列の合成ペプチドを皮膚にワクチン接種することで、皮膚の樹状細胞に抗原提示され、生体内でがん特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) を誘導し、がん細胞を排除することを期待した治療法の1つである。マウスを用いた実験報告やヒトでの多数の症例報告があるが、犬では MHC class I 情報が少ないため、犬での実施報告はない。

犬メラノーマに対するペプチドワクチンの実施のため、DLA-88型に適合したワクチン用抗原ペプチドを同定する必要がある。犬メラノーマに高発現する蛋白質として、melan-A、TRP-2の他、多くの腫瘍に発現する survivin がある。Survivinは、犬では、リンパ腫、鼻腔腺癌、メラノーマ、悪性組織球腫、乳腺癌、骨肉腫、非小細胞肺癌、扁平上皮癌、膀胱移行上皮癌、血管肉腫、肥満細胞腫で高発現することが報告されている。犬における melan-A は118個のAA、survivinは142個のAAと短い、TRP-2は548個のAAと比較的長い、犬の MHC class I (DLA-88) 型に提示される特異的エピトープの数は melan-A や survivin より多いことが期待される。これらの蛋白質はがん細胞の細胞質内の営みに利用されるが、古くなった蛋白質はプロテアソームにより分解され、小胞体に入り、丁度良い9個のAA配列を有するペプチドが MHC class I 分子と組み合わさることで、ゴルジ装置を介して細胞表面に発現され、がん関連抗原として CTL に認識される。この仕組みは、ほとんどのエピトープは自己抗原として提示されるが、生体の胸腺組織における自己反応性 T 細胞の排除機構により、自己抗原を認識して細胞傷害性を発揮する細胞は削除されており、*in vitro* の系においても増殖活性を示すことはほとんどない。

ヒトでは、HLA 型-A 座、-B 座、-C 座が知られ、特に A 座の内、A*0201 又は A*2402 の型を有する日本人は全人口の約 80%に相当することから、HLA-A*0201 又は A*2402 に絞って、これらの型に適合するがん抗原ペプチドの開発が行われている。しかし、犬の MHC class I 情報は少なく、以前より、犬では DLA 型-12 座 (3 種類)、-64 座 (3 種類)、-88 座 (56 種類)、-79 座 (12 種類) が知られているが、これらの役割などはよくわかっていない。これらの内、DLA-88 座のみが多型に富み、現在

では我々の新規 DLA-88 型を含めると 124 種類に及ぶ型が明らかになりつつある。また DLA 型-88 座はヒトの HLA 型-A 座と類似する点が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究は、がん罹患犬の DLA-88 座情報を基に、それに適合するがん抗原ペプチドのワクチン療法、即ち犬の個体ごとに適応した免疫療法の実施に向けたがん抗原エピトープとそれを提示する DLA-88 型を明らかにすることを目的とする。

がんペプチドワクチンの利点は、活性化リンパ球療法や樹状細胞療法の様に培養設備を必要としない点にあり、皮膚にワクチン接種するだけの簡便さで、一般診療の獣医師に普及させることが期待される。

3. 研究の方法

犬末梢血は大学附属動物医療センターより検査後の余剰分を入手し、その末梢血単核球 (PBMC) から磁気ビーズ抗体を用いて CD8 陽性 T 細胞とプレート接着細胞に分離後、プレート接着細胞に犬リコンビナント GM-CSF と合成ペプチドを添加して抗原提示細胞 (APC) へと分化誘導させた。90 分後に X 線照射により増殖活性を消失させた APC と精製した CD8 陽性 T 細胞を混合培養し、10 日前後で誘導される CTL の有無を経時的に鏡検した。入手した検体の血液量および精製した CD8 陽性 T 細胞の数に応じて、実施する項目数を調整した。これらの活性の見られた検体からゲノム DNA を精製後、DLA-88 型の exon 2-3 領域をシーケンスし、タイピングを行った。このようにして、予め用意したペプチドについて、melan-A (mel-01, mel-41, mel-70, mel-88, mel-95, mel-109) (表 1)、TRP-2 (tp-1, tp-2, tp-3, tp-4, tp-5, tp-6, tp-7, tp-8, tp-9, tp-10, tp-11, tp-12)、survivin (sv-01, sv-10, sv-19, sv-59, sv-88, sv-90) に反応したそれぞれの DLA-88 型を調べた。

表 1 Melan-A 合成ペプチドのアミノ酸配列

Melan-A	AA sequence
ml-01	MPREEAHFI
ml-41	LLIACWYCR
ml-70	LRGRCPHEG
ml-88	FQESNCELV
ml-95	LVVFNAPPA
ml-109	AEQSSPPYL

4. 研究成果

犬メラノーマの免疫療法の1つ、がんペプチドワクチンの3つの抗原 (Melan-A ペプチド6本、survivin ペプチド6本、TRP-2 ペプチド12本) について、現在まで犬血液 687 検体について解析したところ、Melan-A ; 66 検体、survivin ; 81 検体、TRP-2 ; 64 検体にペプチド活性を認めた (図 1)。

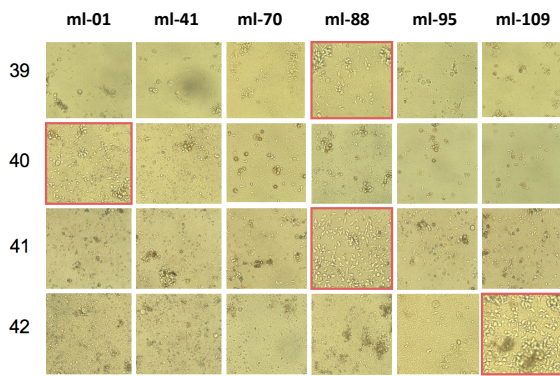


図1 Melan-A ペプチド活性のスクリーニングの例

1) Melan-A について DLA-88 型のタイピングを終え、犬種、DLA-88 型、6 種ペプチドの活性を記載した表が完成した (表 2)。3 回以上の頻度で検出された DLA-88 型は、高親和性を示す 003:02、017:01、501:01、028:01、029:01、508:01、nov15*、nov25* の 8 種と、2 回の頻度で検出された DLA-88 型は、低親和性を示す 001:03、004:02、005:01、006:01、012:01、032:01、051:01、502:01、nov6*、nov8*、nov9*、nov17*、nov24* の 13 種が判明した。(*;新規については系統樹解析により明らかにされる予定である)

表 2 Melan-A 合成ペプチドの DLA-88 型適合表

本数	DLA88 型 21 個							
	ml-01	ml-41	ml-70	ml-88	ml-95	ml-109	003:02	017:01
6	ml-01	ml-41	ml-70	ml-88	ml-95	ml-109	003:02	017:01
6	ml-01	ml-41	ml-70	ml-88	ml-95	ml-109	501:01	
5	ml-01		ml-70	ml-88	ml-95	ml-109	508:01	
4			ml-70	ml-88	ml-95	ml-109	006:01	
3	ml-01	ml-41		ml-88			029:01	
3	ml-01		ml-70	ml-88			nov25	
2			ml-70			ml-109	001:03	
2	ml-01		ml-70				005:01	
2	ml-01	ml-41					012:01	028:01
2		ml-41				ml-109	nov8	502:01
2			ml-70	ml-88			nov15	
2		ml-41	ml-70				nov17	
1	ml-01						051:01	nov24
1		ml-41					004:02	032:01
1				ml-95			nov9	nov6

2) 表 2 に示すように、Melan-A ペプチド ml-01、ml-41、ml-70、ml-88、ml-95、ml-109 を抗原提示できる DLA-88 型を特定することができた。例えば、DLA-88*003:02 型、DLA-88*017:01 型、DLA-88*501:01 型はこれら 6 つのペプチド全てを提示できる型であるので、これら 6 つのペプチドをがんワクチンとして用いることができる。

3) 一方、DLA-88*501:01 型は ml-41 以外の ml-01、ml-70、ml-88、ml-95、ml-109 を抗原提示できるので、これらの 5 つのペプチドをがんワクチンとして用いることができる。同様に、DLA-88*006:01 型には ml-70、ml-88、ml-95、ml-109 を、DLA-88*029:01 型には ml-01、

ml-41、ml-88 を、DLA-88*001:03 型には ml-70、ml-109 を、というようにそれぞれの DLA-88 型に適応したペプチドをがんワクチンとして用いることができる。

このように本研究は、犬の DLA-88 型情報に基づいたがん抗原 Melan-A の特定のペプチド配列との組み合わせを明らかにした点にあり、犬のメラノーマに対する免疫療法を実施する上で、予め DLA-88 型を検査した後、その型に適合する特定のペプチド配列がある場合に有効なワクチンとして用いることができる。

また、Survivin についても同様に解析した結果、合成ペプチド特異的に活性を示す DLA-88 型を以下に示す。

表 3 Survivin 合成ペプチドのアミノ酸配列

Survivin	AA sequence
sv-01	MGAPTLPPA
sv-10	WQPFLLKDR
sv-19	ISTFKNWP
sv-59	FCFKELEGW
sv-88	SVKKQFEEL
sv-90	KKQFEELTLG

表 4 Survivin 合成ペプチドの DLA-88 型適合表

N=	1-9	10-18	19-27	59-67	88-96	90-98	DLA88型:21個
6	sv-01	sv-10	sv-19	sv-59	sv-88	sv-90	501:01
6	sv-01	sv-10	sv-19	sv-59	sv-88	sv-90	508:01
5		sv-10	sv-19	sv-59	sv-88	sv-90	034:01
4	sv-01		sv-19	sv-59	sv-88	sv-90	003:02
4	sv-01	sv-10	sv-19			sv-90	006:01
4	sv-01	sv-10		sv-59		sv-90	012:01
4	sv-01	sv-10		sv-59	sv-88		029:01
4	sv-01	sv-10		sv-59	sv-88		028:01
3			sv-19		sv-88	sv-90	nov25
3	sv-01	sv-10		sv-59			004:02
2		sv-10				sv-90	502:01
2	sv-01	sv-10					nov3
2	sv-01				sv-88		045:01
1			sv-19				002:01
1						sv-90	001:03
1		sv-10					nov4
1					sv-88		012:02
1	sv-01						nov18
1	sv-01						nov37
1	sv-01						038:01

また、TRP-2 についても同様に解析した結果、合成ペプチド特異的に活性を示す DLA-88 型を以下に示す。

表 5 TRP-2 合成ペプチドのアミノ酸配列

TRP-2	AA sequence
trp-1	AMSPFGWGL
trp-2	MAKECCPPL
trp-3	WTGHDCNQR
trp-4	LERDLQQLI
trp-5	ARQDDPTLI
trp-6	DDYNNRVTL
trp-7	KDIQDCLSL
trp-8	SQVMSLHNL
trp-9	LHNLVHSFL
trp-10	FPVVTNEEL
trp-11	VLFFLQYRR
trp-12	LMETHLSDR

表6 TRP-2 合成ペプチドの DLA-88 型適合表

N-	31-39	67-75	144	258	296	321	354	394	399	467	518	534	DLA88型-17個
8				trp-4	trp-5	trp-6	trp-7		trp-9	trp-10	trp-11	trp-12	00402
8			trp-3						trp-8	trp-9	trp-11	trp-12	02901
7				trp-4	trp-5	trp-6			trp-8	trp-10	trp-11	trp-12	50801
7	trp-1			trp-4	trp-5	trp-6			trp-8	trp-9	trp-11		05101
5	trp-1	trp-2				trp-6					trp-11	trp-12	00601
5			trp-3		trp-5			trp-9			trp-11	trp-12	02801
4			trp-3		trp-5		trp-7				trp-11	trp-12	00103
4			trp-3				trp-7		trp-9	trp-10			nov8
4			trp-3	trp-4		trp-6						trp-12	01201
3			trp-3								trp-11	trp-12	00302
3			trp-3								trp-11	trp-12	01701
3	trp-1	trp-2			trp-5						trp-11	trp-12	03401
2				trp-4							trp-11		00501
2								trp-9				trp-12	03901
2													50101
1		trp-2		trp-4	trp-6								04501
1													nov19

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) Ohkusu-Tsukada K, Ito D, Okuno Y, Tsukada T, Takahashi K. Signs of atopic dermatitis and contact dermatitis affected by distinct H2-haplotype in the NC/Nga genetic background. *Scientific Reports* 2018. 8: 2586 査読有 doi:10.1038/s41598-018-21049-x
- 2) Ohkusu-Tsukada K, Yamashita T, Tsukada T, Takahashi K. Low expression of a D^{dm7}/L^{dm7}-hybrid mutant (D/L^{dm7}) in the novel haplotype H-2^{nc} identified in atopic dermatitis model NC/Nga mice. *Genes and Immunity* 2018. 査読有 doi:10.1038/s41435-017-0003-y.
- 3) Ohkusu-Tsukada K, Tsukada T, Takahashi K. Clonal deletion of T cell repertoires with specific T cell receptor Vβ chains by two endogenous superantigens in NC/Nga mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2017. 81: 2160-2163. 査読有 doi:10.1080/09168451.2017.1374829.
- 4) Machida Y, Michishita M, Wada M, Hori T, Kawakami E, Yoshimura H, Ohkusu-Tsukada K, Taya K, Takahashi K. Malignant Oestrogen-producing Teratoma in a Cat. *J Comp Pathol.* 2017. 156(2-3):178-182. 査読有 doi:10.1016/j.jcpa.2016.11.273.
- 5) Nakahira R, Yoshida R, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K, Takahashi K. Effect of Gonadectomy on the Androgen-Dependent Behavior of Ganglion Cell-Like Cells in Djungarian Hamsters (*Phodopus sungorus*). *Comp Med.* 2016. 66(1): 25-9. 査読有 <http://www.ingentaconnect.com/content/aalas/cm/2016/00000066/00000001/art00004>
- 6) Arai K, Kobayashi M, Harada Y, Hara Y, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K, Takahashi K.

Histopathologic and immunohistochemical features of soft palate muscles and nerves in dogs with an elongated soft palate. *Am J Vet Res.* 2016. 77:77-83. 査読有 doi:10.2460/ajvr.77.1.77.

- 7) Kishimoto TE, Yoshimura H, Saito N, Michishita M, Kanno N, Ohkusu-Tsukada K, Takahashi K. Salivary Gland Epithelial-Myoepithelial Carcinoma with High-Grade Transformation in a Dog. *J Comp Pathol.* 2015 153(2-3): 111-5. 査読有 doi:10.1016/j.jcpa.2015.06.006.
 - 8) Yoshimura H, Kimura-Tsukada N, Ono Y, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K, Matsuda Y, Ishiwata T, Takahashi K. Characterization of Spontaneous Mammary Tumors in Domestic Djungarian Hamsters (*Phodopus sungorus*). *Vet Pathol.* 2015. 52(6):1227-34. 査読有 doi:10.1177/0300985815583097.
 - 9) Yoshimura H, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K, Matsuda Y, Ishiwata T, Naito Z, Takahashi K. Cellular sources of tenascin-C in canine mammary carcinomas. *Vet Pathol.* 2015. 52(1): 92-6. 査読有 doi:10.1177/0300985814522817.
 - 10) Yoshimura H, Nakahira R, Kishimoto TE, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K, Takahashi K. Differences in indicators of malignancy between luminal epithelial cell type and myoepithelial cell type of simple solid carcinoma in the canine mammary gland. *Vet Pathol.* 2014. 51(6):1090-5. 査読有 doi:10.1177/0300985813516637.
- [学会発表] (計 5 件)
- 1) Ohkusu-Tsukada K, Ito D, Okuno Y, Takahashi K. The novel H-2 haplotype related with the high sensitivity to 2,4-dinitro fluorobenzene-induced dermatitis in NC/Nga mice. 第45回日本免疫学会学術集会 沖縄コンベンションセンター2016-12-7
 - 2) 吉村久志、吉田彩花、山本昌美、松田陽子、石渡俊行、道下正貴、塚田晃三、高橋公正 イヌの乳腺腫瘍における nestin の発現と悪性度との相関 第3回日本獣医病理学専門家協会学術集会 三鷹市公会堂 2016-03-30
 - 3) 塚田晃三、伊藤大貴、奥野祐樹、山下匡、塚田晃代、高橋公正 NC/Nga系におけるユニークなH-2ハプロタイプとアトピー性皮膚炎発症との関連性について 第158回日本獣医学学会学術集会 北里大学獣医学部 2015-09-09
 - 4) 塚田晃三、山下匡、塚田晃代、中平嶺、道下正貴、高橋公正 NC/Nga系におけるユニークなH-2ハプロタイプのアロ反応と OT-II

TCR の I-A^k 拘束性³²³⁻³³⁹ クロス反応 第 157
回日本獣医学会 北海道大学 2014-09-12

5) 塚田晃三 がん微小環境における免疫病
態 第3回動物臨床免疫療法研究会 大阪府
立大学りんくうキャンパス 2014-10-04

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 犬の DLA-88 型適合性がんペプチド

発明者: 塚田晃三

権利者: (学) 日本医科大学

種類: 特許

番号: 未公開

出願年月日: 2017年11月11日

国内外の別: 国内

○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

<http://www.nvlu.ac.jp/veterinary-medicine/members/005.html/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚田晃三 (TSUKADA Kozo)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号: 90304930

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

森友忠昭 (Moritomo Tadaaki)

日本大学・生物資源学部・獣医免疫学研究室・教授

宮前二郎 (Miyamae Jiro)

日本大学・生物資源学部・獣医免疫学研究室・大学院生

竹嶋伸之輔 (TAKESHIMA Shin-nosuke)

理化学研究所・分子ウイルス学特別研究ユニット・研究員／東京大学大学院 新領域創成科学研究科・メディカル情報生命専攻・感染制御分子機能解析分野／客員准教授