

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26640107

研究課題名(和文) エピトープの決定を必要としないT細胞ワクチン療法

研究課題名(英文) T cell vaccine therapy without epitope determinations

研究代表者

秋山 暢丈 (Nobutake, Akiyama)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：00338865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：カチオン性リポソームと共に免疫し、癌免疫を誘導させる蛋白質抗原を決定する為のcDNAライブラリーの構築を試みたが、この課題用に開発した高効率に抗原を発現させるエピソームベクターへの変換が出来なかった。OVAのcDNAを用いた検討では、このリポソームを用いたCTLの誘導には種特異的糖鎖が必要との結論となった。

その為、腫瘍選択的なCTLを誘導するワクチンとして、大腸癌細胞であるMC38細胞と肺がん細胞である3LL細胞に対して、自殺遺伝子による腫瘍の崩壊によってCTL活性が誘導するモデルを作成し、OVAのcDNAに対するCTLの誘導を出来るモデルを作製した。同時に、腫瘍の拒絶も確認できた。

研究成果の概要(英文)：The construction of cDNA library to determine protein antigen that can induce cancer immunity by immunizing with cationic liposome was attempted, but failed to convert into episomal vector which expresses antigen highly efficiently developed for this task. In the analysis using OVA as model cDNA, it was concluded that species-specific sugar chains are necessary for CTL induction with cationic liposome.

So, as a vaccine that induces tumor-selective CTL, a model in which CTL activity is induced by collapse of tumor by suicide gene therapy against MC38 colorectal cancer and 3LL lung cancer cell line was prepared and a model capable of inducing CTL against OVA cDNA was established. At this time, tumor rejection was also confirmed.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 CTL リポソーム

1. 研究開始当初の背景

癌に対する免疫療法において、癌細胞に対する細胞障害性 T 細胞 (CTL) を誘導する事は最も効果が高いアプローチの一つであるが、抗原蛋白質を用いた通常の免疫法では MHC クラス I 提示能が極めて低く、癌抗原に対する CTL の誘導は困難である

アジュバントは、抗原を免疫した際に免疫応答を増強する物質であるが、当研究部では OVA 蛋白質を免疫源とし、OVA を発現している細胞に対する CTL の誘導を指標に、カチオン性リポソームベースの開発を進めてきた。

このアジュバントを用いて OVA 蛋白質をマウスに免疫すると約 4 日後から、OVA のエピトープに対する CTL が強力に誘導される事が判った。

2. 研究の目的

この CTL を強く誘導するアジュバントの解析や改良を行い、応用法の検討を行う事を目的とする。B16 メラノーマをマウス尾静脈に静注し、その後このアジュバントを B16 メラノーマ細胞の破碎液と共に免疫を行うと、メラノーマの転移の阻害と共にメラノーマ自体の増殖も抑えられていた。よって、このアジュバントと共に免疫する事によって、メラノーマの転移及び増殖を抑制する効果を持つ抗原蛋白質の同定を目指す。

本課題ではエピトープの同定なしに MHC クラス I を認識する CTL を誘導できる事に特徴があるが、カチオン性リポソームによる免疫は細胞性免疫である Th1 有意の MHC クラス II の免疫応答を示す事が知られている為、通常の免疫応答であるヘルパー T 細胞の誘導によってメラノーマの抑制活性を示す抗原蛋白質の同定も目指す事とする。

これらの治験から MHC のハプロタイプに由来するエピトープの決定が不要な新しい癌免疫療法の手法を創出する為に、本アジュバントの活用法を検討し、新しい癌抗原蛋白質の開発も目指す。

3. 研究の方法

アジュバントの作成、及び、免疫法

すべてのリポソームは以下のプロトコルで作成したが、内容は実験ごとに、変更されたり、除外された。主に用いられている DCOT アジュバントは以下の様に作成された。

塩化ジデシルジメチルアンモニウム 400mg、コレステロール 200mg、1-0-oleyl-rac-glycerol 200mg and

Tween-80 400mg を 20ml のクロロホルムに溶解し、300ml のナス型フラスコを用いて、減圧環境下でクロロホルムを除去し、真空下で

乾燥させた。40ml の PBS バッファーに攪拌下、分散させ、更に 65 に 10 分間加熱し、室温に戻した後、UH-50 超音波分散器 (

エムステー社：東京) を用いて、超音波を 1 分間照射した。分散させたリポソームをガンマ線照射 (125 グレイ) を行った

後、使用時まで 4 度で保存した。マウスに免疫する際は、このアジュバント 100 μ l と PBS バッファーに溶解した抗原液 100

μ l を攪拌混合し、リポソーム溶液 200 μ l とし、C57BL/6N マウス (三協ラボ) (8 週令、雌) に腹腔内投与した。

CTL 活性の計測 in vivo CFSE アッセイ)

10% 牛胎児血清含有 RPMI1640 培地中の C57BL/6N マウス由来の脾臓細胞一億個を 2 等分し、片側に合成した OVA エピトープペプ

チド DMSO 溶液 (Bex 社：配列 SIINFEKL) 最終濃度 10 μ g/ml になるように加え、片側には同僚の DMSO のみを加え、5% 二酸化

炭素濃度下、37 で培養した。遠心操作により、培地を除去し、更に 2 回 PBS により細胞を洗浄し、各々 5 ml の PBS 溶液に分散させた。ペプチドを加え

た細胞懸濁液に、5 μ M の CFSE (Dojindo 社) を加え、ペプチドを加えない細胞懸濁液には 0.5 μ M の CFSE を加え、8 分間室温で

反応させた。反応後、牛胎児血清 0.5ml を加え、遠心操作で上清を除去し、各細胞を 5 ml の 10% 牛胎児血清含有 RPMI1640

培地に懸濁し、両者を混合した後、細胞を遠心操作で除去し、2ml の PBS に懸濁した。この細胞懸濁液 0.2ml を、免疫しないマウスと免疫したマウスの尾静脈に注射し、5 時間放置後、脾臓を摘出し、FACS (ミル

テニーバイオテク社) により、CFSE 陽性細胞を計測した。

免疫しないマウスの CFSE の強い陽性細胞の数 CFSE^{HI}-CTRL と CFSE^{low}-CTRL、及び免疫したマウスのマウスの CFSE の強い陽性

細胞の数 CFSE^{HI} と弱い細胞の数 CFSE^{low} を計測し、細胞傷害活性 (率) を $100 \times (1 - ((CFSE^{HI} / CFSE^{low}) / (CFSE^{HI} - CTRL$

(/CFSElow-CTRL))として算出した。以下、特に明記しない限り、細胞傷害活性とは上述のプロトコルでOVAのMHCクラスIエ

ピトープ (SIINFEKL ペプチド)を用いて得られた値を示すものとする。

スクリーニング用発現ベクターの作成

理研のファントムライブラリー(pFLCIII)とほぼ同じマルチクロニングサイトを持ち、Epstein-Barr ウイルスのレプリケーションオリジンとCAGプロモーター及びポリアデニレーションシグナルを持ち、カナマイシン耐性であるベクターを作製した。また、N末端にヒスチジンタグを持つOVAをコードするcDNAをpFLCIIIにサブクローン化し、制限酵素SfiIでインサートを切り出し、発現ベクターにサブクローニングし、NucleoBond Xtra Midi (宝酒造)でプラスミドを精製した。HEK-293細胞にEpstein-BarrウイルスのBNA-1核内抗原を恒常的に発現させた細胞を樹立し、上記の発現ベクターをトランスフェクトし、過剰発現させた細胞もしくは培地を得た。

自殺遺伝子および抗原を発現させるベクターの構築

ヒト elongation factor-1のプロモーター、Internal ribosome entry site(IRES)、薬剤耐性遺伝子(ネオマイシン耐性遺伝子、若しくはプラスタサイジン耐性遺伝子)を持つ発現ベクターを作製した。

このHSV-TK遺伝子、もしくはヒトチミジンフォスファターゼをサブクローニングし、C57BL/6由来の大腸癌細胞MC38にリポフェクタミン2000を用いてトランスフェクトし10µg/mlのプラスタサイジンにより、自殺遺伝子を恒常的に発現するクローンを単離した。

さらに、このクローンにOVAとネオマイシン耐性遺伝子を発現させるベクターをトランスフェクトし、G418とプラスタサイジンに両耐性をもち、両遺伝子が発現するクローンを選択した。

自殺遺伝子によるCTLの誘導、及びMC38大腸癌細胞によるチャレンジ

C57BL/6Nマウスの背中に各薬剤耐性遺伝子を導入したMC38細胞を 2×10^6 個を皮下注射した。腫瘍が直径8mmになってから、HSV-tk遺伝子の場合、ガンシクロビル8mgを5日間に渡り、腹腔内投与し、2日間、休薬後、更に5日間投与した。人チミジンフォスファターゼの場合にはカペシタピン15mgを5日間経口投与し、2日の休薬期間を置いた後、更に5日間投与した。腫瘍が消失してから、2週間観察し、腫瘍の

形成がない事を確認してから、プラスミドを導入していない親細胞であるMC38細胞 1×10^6 個を背中の皮下注射により移植し、腫瘍の拒絶を調べた。

4. 研究成果

癌免疫の抗原のスクリーニングに関して

EBウイルスの複製起点を用いたエピゾームベクターを作製すると共に、核内抗原を発現させ浮遊細胞であるHEK293細胞を樹立し、モデル蛋白質であるOVAをコードするcDNAをライブラリーを模倣したプラスミドを作製した。それらを用いてライブラリー変換を行い、効率よくバルクでライブラリーを変換できる事を確認した。しかしながら、用いたライブラリーは、目的の蛋白質のスタートコドンの前にコザックルールに添った翻訳開始点があり、制限酵素を用いた入れ替えでは、目的蛋白質の発現が不可能な事が判明し、この翻訳開始点を取り除いてcDNAライブラリーを入れ替える技術の検討を行った。大腸菌の中に2つのベクターを導入し、相同組み換えによって目的の構造を持つ発現ベクターに組換えられるシステムの構築を目指したが、課題を達成する事が出来なかった。また、制限酵素を用いたり、PCRを用いる系を検討したが、スクリーニングに適した変換法にはなりえなかった。

その検討中に発現させたOVA蛋白質を用いて、OVAに対して選択的な細胞障害性T細胞の誘導を行い、CFSEを用いたMHCクラスIエピトープに対するCTL活性をin vitroの系で評価した。詳細に検討した所、大腸菌で発現させたOVA及び上述の293細胞で発現させ精製したOVA蛋白質のCTL活性はニワトリ由来の蛋白質と比べ、著しく低かった。本課題のリポゾームによって誘導されたCTL活性は、ニワトリの糖鎖構造に特異的であると考えられた。以前の研究でHEK293に過剰発現させた際、細胞内に残留するものと放出される蛋白質の糖鎖構造が違う事が判っており、特に高マルトース型の糖鎖構造を取る事が判っている。よって糖鎖修飾阻害剤に処理する事によって、糖鎖構造を変更し、ニワトリ様のCTL誘導活性が導けるか検討したが、目的とする糖鎖修飾阻害剤を得る事は出来なかった。同様にニワトリの細胞であるDT40とOVAを発現させたHEK293細胞をセンダイウイルスを用いて細胞融合させ、その細胞もしくは細胞抽出液のリポゾーム混合物で免疫をマウスに行ったが、OVAに対するCTLは誘導されなかった。

C57BL/6由来のマウス大腸癌であるMC38細胞に自殺遺伝子(チミジンフォスファターゼ、もしくは単純ヘルペス由来のチミジンキナーゼ)をステーブルに発現させた細胞を樹立した。この細胞をC57BL/6マウスの皮下に移

植し、腫瘍を形成させた後に対応する薬物をマウスに投与し、腫瘍を消失させた所、移入した細胞に対するCTL活性が誘導されていた。また、この抗腫瘍活性は導入した自殺遺伝子に対してのみでなく、遺伝子導入前の親株であるMC38に対しても抗腫瘍活性を持っており、 1×10^6 個の再移入は拒絶された。(図1) また、自殺遺伝子とOVA蛋白質を同時に発現させて、マウスに移植し治療を行うと、腫瘍の拒絶を行うようになると共に、OVAのMHCクラスIエピトープに対するCTLの活性も誘導されている事を確認できた。(図2) また、この腫瘍の拒絶に関するCTL活性は3か月以上も保持されていた。

これらの事より、腫瘍抗原を同定しないままに、腫瘍抗原のMHCクラスIエピトープに関連したCTLの誘導の確認が出来た。本課題に用いているアジュバントはTh1優位に免疫を誘導する事が判っているため、全細胞抽出液と共に免疫する事により、自殺遺伝子を用いた誘導されたCTLによる腫瘍の拒絶能の向上が期待できる。癌の再発の防止に焦点をあてた免疫療法の手法として有用と考えられる。

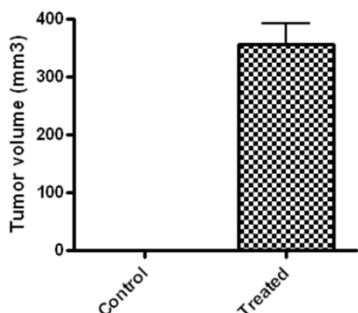


図1: 大腸癌MC38細胞に自殺遺伝子(TP)を導入し、C57BL/6に移植後、カペシタビンにより完治させ、その後、MC38細胞を 1×10^6 個を皮下移植した14日後の腫瘍の体積の比較

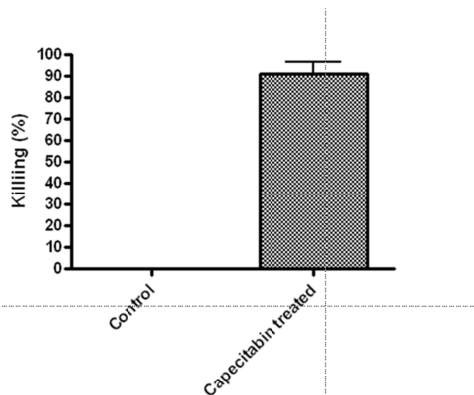


図2 MC38細胞に自殺遺伝子(TP)とOVA蛋白質を発現させ、移植後、カペシタビンで処置する事により誘導されたOVAのクラスIエピトープ(SIINFEKL)に対するIn vivo CTL活性

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[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)別：

[その他]
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋山暢丈(Nobutake Akiyama)
 東京慈恵会医科大学・医学部・講師
 研究者番号：00338865

(2)研究分担者

斎藤三郎(Saburo Saito)
 東京慈恵会医科大学・医学部・教授
 研究者番号：10186934