

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830106

研究課題名(和文) センダイウイルス粒子による抗腫瘍獲得免疫活性化の新機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of anti-tumor acquired immune activation mechanism by Sendai viral particles

研究代表者

佐賀 公太郎 (Saga, Kotaro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00563389

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)：本研究は不活化センダイウイルス粒子(HVJ-E)のFタンパク質が刺激する新規受容体を同定し、その受容体刺激によるがんに対する獲得免疫活性化の分子機構を明らかにすることを目的としている。Fタンパク質新規受容体の同定には至っていないが、質量分析によっていくつかの候補遺伝子を得た。また、HVJ-Eによる抗腫瘍獲得免疫活性化メカニズムとして、Fタンパク質がマクロファージを刺激することでIL-18の分泌を促進し、IL-18がT細胞の活性化に重要な働きを示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we will identify a novel receptor for F protein on inactivated Sendai virus particle (HVJ-E) and elucidate the mechanism of acquired immune activation against cancer via the receptor stimulation. Although we have not identified the novel receptor for F protein yet, we have found several candidate genes by mass spectrography. Moreover, we have revealed that IL-18, which is secreted from F protein-stimulated macrophage, exhibits the important effect for T cell activation.

研究分野：抗腫瘍免疫

キーワード：抗腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

癌は我が国における死因のトップであり、世界の先進諸国における死因においても上位を占める。これまでに抗癌剤を初め、癌に対する様々な治療法が研究・開発されており、ウイルスを利用した癌治療も古くから研究されている。腫瘍溶解性ウイルスは癌細胞特異的に感染し、癌細胞溶解を誘導することで高い抗腫瘍効果を示すことが知られている。しかし、腫瘍溶解性ウイルスは正常細胞にも感染する可能性があり、安全面での問題を含んでいる。一方、近年、当研究室から増殖能力のない不活化センダイウイルス (hemagglutinating virus of Japan; HVJ) 粒子 (HVJ-envelope; HVJ-E) が抗原提示細胞を刺激することで、抗腫瘍免疫を活性化することが示された (Kurooka et al. Cancer Res. 2007年)。それ以来、HVJ-E を利用した癌治療開発が試みられ、2009 年より癌患者を対象とした臨床研究が行われている。HVJ-E による抗腫瘍免疫活性化の際、HVJ-E は自然免疫活性化と同時に獲得免疫活性化を促進することが示された。しかし、HVJ-E による獲得免疫活性化機構の詳細は未だ不明である。この分子機構を解明し、それに基づき抗腫瘍免疫活性化能を更に増強させることができれば、より効果的な新たな癌治療の基盤を確立することができ、国際的にも初の試みとなる。

2. 研究の目的

インターロイキン (interleukin; IL) -12 は免疫細胞に作用してインターフェロン (interferon; IFN) - $\gamma$  の産生を誘導し、獲得免疫を活性化させる重要なサイトカインである。しかしながら、IL-12 の大量投与は激しい副作用を示すことから、癌治療における使用は困難である。これまでに HVJ-E のもつ融合タンパク質 (Fusion protein; F タンパク質) が脾細胞における IL-12 感受性を増強させ、IFN- $\gamma$  産生を劇的に促進させることを明らかにした (Saga et al. Clin Cancer Res. 2013年)。過去に HVJ と同じパラミクソウイルスの呼吸器合胞体ウイルス (RSV) の F タンパク質が Toll 様受容体 (TLR) -4 に認識されることが報告されているが、TLR-4 ノックアウトマウス由来脾細胞においても HVJ-E による IL-12 感受性の増強が確認されたことから、F タンパク質が免疫細胞表面の未知の受容体を刺激することで、免疫細胞の IL-12 に対する感受性を高めることが考えられる。本研究では、新たな癌治療戦略を提唱するために、ウイルス膜タンパク質が刺激する新規受容体を同定し、その受容体刺激による癌に対する獲得免疫活性化の分子機構を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

これまでに、HVJ-E 及び IL-12 刺激によ

て主に脾細胞中の T 細胞が IFN- $\gamma$  を産生すること、さらに脾細胞からマクロファージや一部の樹状細胞を含む CD11b 陽性細胞を除去することで、HVJ-E による IL-12 感受性が消失することを見出している。これらのことから、マクロファージや樹状細胞といった抗原提示細胞が F タンパク質認識受容体を有しており、抗原提示細胞が F タンパク質認識情報を T 細胞に伝えることで、T 細胞の IL-12 感受性を増大させ獲得免疫の活性化に貢献していると推察される。また、脾細胞から CD11b 陽性細胞を除いた細胞群とマクロファージ様細胞株 (P388.D1) を共培養することで、HVJ-E による IL-12 感受性が回復することから、P388.D1 においても F タンパク質認識受容体の発現、及び T 細胞への刺激伝達機構が保持されていると考えられる。以上より、本研究では F タンパク質を認識する新規受容体を同定し、その下流のシグナル伝達経路を解明するために、HVJ-E の F タンパク質を精製し、質量分析法により F タンパク質認識受容体を同定し、F タンパク質認識受容体の活性化に伴うシグナル伝達経路を解明することを目指す。

4. 研究成果

F タンパク質の刺激によるシグナル伝達経路の解明

HVJ-E が IL-12 による IFN- $\gamma$  誘導効果を増強させる分子機構を明らかにするために、C57BL/6 マウス脾細胞に IL-12 や HVJ-E のそれぞれ、または同時に刺激を加え、どのような遺伝子の発現が増加するのかをリアルタイム RT-PCR 法によって検討した。その結果、HVJ-E の刺激が加わる時に IL-18 の発現が著しく増加することが明らかとなった (図 1)。IL-18 は不活性化型の proIL-18 として

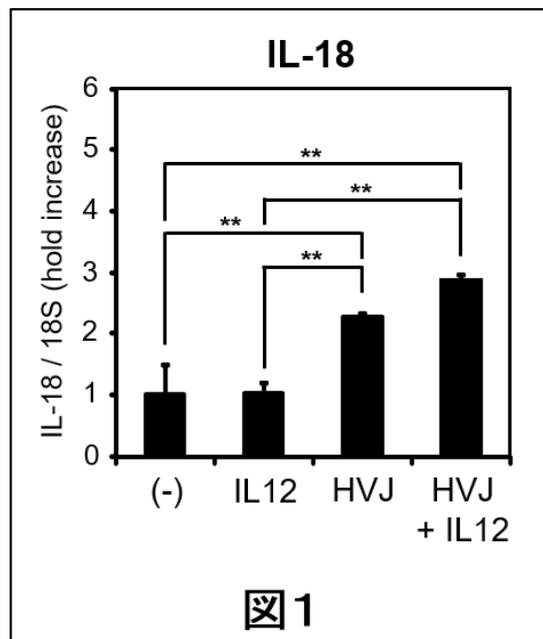


図 1

合成されるが、カスパーゼ (Caspase; Casp) -1

によって切断させることで活性化型 IL-18 として分泌される。CD11b 陽性細胞と陰性細胞を磁気細胞分離装置 (MACS) で分離し、それぞれの Casp-1 発現レベルをリアルタイム RT-PCR で検討した結果、CD11b 陽性細胞において著しく発現が増加していることを見出した(図2)。マウス脾細胞への HVJ-E

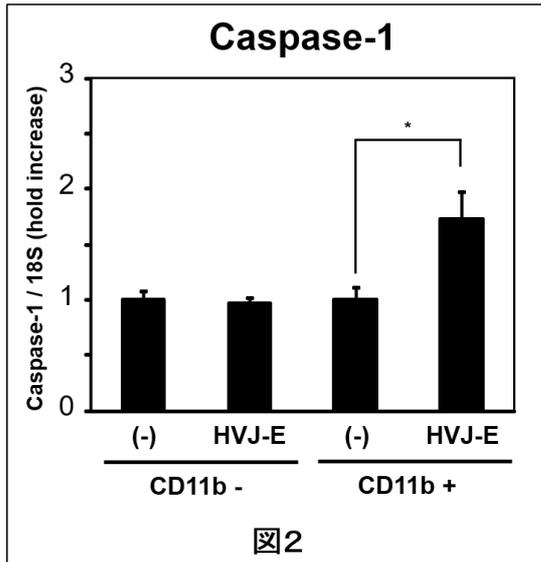


図2

による IL-12 活性促進作用における IL-18 の影響を調べるために、抗 IL-18 中和抗体や抗 IL-18 受容体中和抗体を HVJ-E/IL-12 脾細胞刺激時に投与した。HVJ-E/IL-12 刺激 24 時間後の細胞上清中の IFN- $\gamma$  濃度を ELISA によって検討した結果、抗 IL-18 受容体中和抗体 (図3)、抗 IL-18 中和抗体 (図4) 共

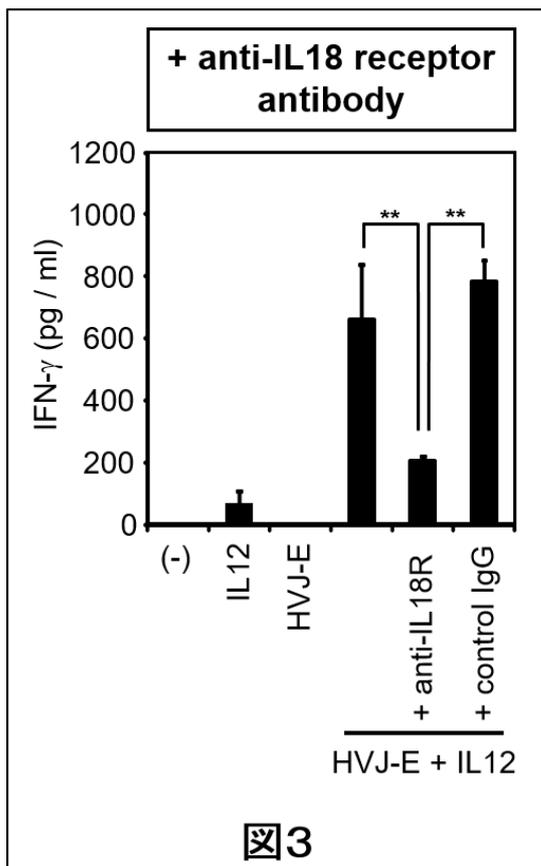


図3

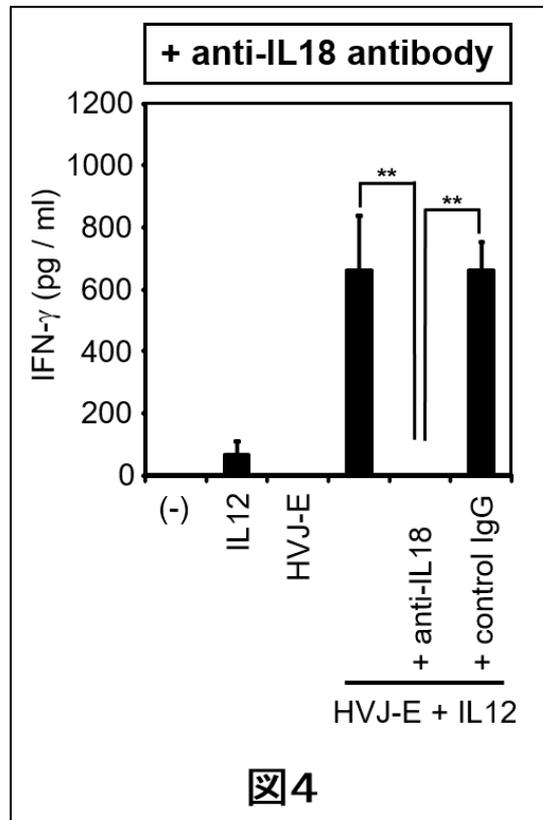


図4

に HVJ-E による IFN- $\gamma$  分泌増強効果を抑制した。以上より、HVJ-E は CD11b 陽性細胞からの IL-18 分泌を誘導することで、IL-12 による IFN- $\gamma$  誘導効果を増強させることが明らかとなった。また、マウス脾細胞の HVJ-E/IL-12 刺激時に NF- $\kappa$ B 阻害剤を投与すると、HVJ-E による IFN- $\gamma$  分泌増強効果が抑制されたことから、その下流のシグナルに NF- $\kappa$ B が寄与していることが示唆された。

#### F タンパク質受容体の検討

マクロファージ様細胞株 (P388.D1) をプロテアーゼインヒビター含有の細胞破碎緩衝液中でホモジナイズし、段階的に遠心分離を行うことで膜画分を得た。P388.D1 膜画分を溶解緩衝液にて溶解することで、P388.D1 膜タンパク質溶解液を作製した。一方、鶏卵で作製した HVJ を NP40 含有溶解緩衝液に溶解し、遠心分離後の上清を回収することで HVJ 膜タンパク質を得た。この HVJ 膜タンパク質に抗 F タンパク質抗体を加え、プロテイン G アガロースビーズによって F タンパク質を精製した。精製 F タンパク質と P388.D1 膜タンパク質溶解液を混合し、抗 F タンパク質抗体免疫沈降によって共沈してきたタンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離した。電気泳動後ゲルの銀染色によってタンパク質を染色し、F タンパク質と共沈してきたタンパク質を質量分析で同定することにより、いくつかの F タンパク質受容体の候補遺伝子を得た。まだ F タンパク質の新規受容体同定には至っていないが、今後は CRISPR-Cas9 システムを利用した候補遺伝子欠損 P388.D1 細胞を

作製することで、F タンパク質新規受容体を  
同定する予定である。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

発表者：佐賀公太郎

発表標題：Development of novel  
immune-stimulatory pseudovirion for cancer  
immune therapy

学会名：第20回日本遺伝子治療学会

発表年月日：2014年8月7日

発表場所：慈恵医科大学(東京都・港区)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

佐賀 公太郎 (SAGA Kotaro)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00563389

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：