

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830110

研究課題名(和文) 免疫系ヒト化マウスを用いた特異的拒絶を誘導できるヒト癌関連抗原の探索モデル

研究課題名(英文) Screening assay for human tumor-associated antigen eliciting specific rejection immunity using human immunized mice

研究代表者

崔 林(CUI, LIN)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・特任助教

研究者番号：30717822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：全身放射線照射したNOD/SCID/JAK3null免疫不全マウスにヒト末梢血を移植することによってヒトマウスキメラ成立を確認した。ヒト胆道癌細胞をヒト免疫キメラ化マウスの皮下に移植して治療実験に最適な担癌免疫系ヒト化マウスモデルの作成にも成功した。また、腫瘍関連抗原遺伝子は膵・胆道癌で高発現が知られている抗原遺伝子を発現するプラスミドを構築して、アジュバント遺伝子と同時に発現するように高分子ポリマーミセルに搭載したDNAワクチンを作成した。胆道癌の担癌ヒト化免疫マウスを用いた治療実験で、DNAワクチンの抗腫瘍効果が確認され、抗原特異的な拒絶免疫を誘導するメカニズムの検証を行っている。

研究成果の概要(英文)：We have established human immunized mice model by implantation of human peripheral blood mononuclear cells after total irradiation in immunodeficient NOD/SCID/JAK3 null mice, which exhibits a chimera state with predominant human and minor mouse immune cells. We have also established the human immunized mice harboring human biliary tract cancer. We constructed the open-reading frames of several tumor-associated antigen genes as TAA-expression plasmids, and formed DNA vaccine encapsulating the TAA and adjuvant (GM-CSF and CD40L) expression plasmids with nano-sized block/homo-polymer micelles. In the human immunized mice with biliary tract cancer, DNA vaccine expressing TAA-X and adjuvant genes exhibited a significant therapeutic effect. We are on going to identify the mechanism for the induction of TAA-X-specific rejection immunity.

研究分野：癌免疫治療

キーワード：DNAワクチン 腫瘍関連抗原遺伝子 免疫系ヒト化マウス

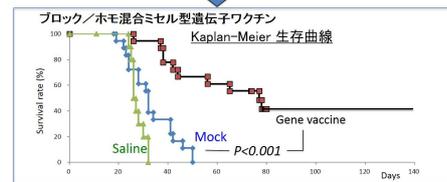
1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

- (1) ペプチドワクチン治療は低侵襲性の個別化(テーラーメイド)治療として、現在盛んに臨床研究が行われているが(Takahashi N, et al: Cancer Sci 2012; 103: 150-3; Matsumoto K, et al: J Clin Oncol 2011; 29: 337-44)課題も散見される。包括的ゲノム探索法の進歩により腫瘍関連遺伝子が探索されているにもかかわらず、HLA結合能を有しCTLを誘導できるペプチドの同定は容易ではなく、また患者のHLAタイプとペプチドのマッチングが必要で適応に制約が伴う(Berzofsky JA, et al: Seminars in oncology 2012: 39, 348-57)。
- (2) 細胞ワクチンは、抗原提示能がある樹状細胞(DC)や腫瘍細胞にウイルスベクターを用いて、腫瘍関連抗原遺伝子やアジュバント遺伝子をex vivoで導入し体内に投与するもので、高いワクチン効果が期待される。しかし、その作成には細胞やウイルスベクターを利用することから多くの時間と労力(製造コスト)が必要で、標的抗原の改変(汎用性)も容易でない(Mackiewicz J, et al: Eur J Pharmacology 2009: 625, 84-89)。
- (3) 一方、直接体内に腫瘍関連抗原遺伝子+/-アジュバント遺伝子を導入する遺伝子ワクチンは、上記の問題点を克服できると考えられているが、十分な遺伝子導入効率を達成できる非ウイルスベクターが開発されていなかったこと、また、ウイルス成分や樹状細胞といったアジュバント成分に代わる遺伝子組成が同定されていない、という課題が残る。

申請者の研究室では、現在、ブロック/ホモポリマー混合型遺伝子キャリアを用いた難治癌に対する新しい遺伝子治療の臨床応用研究を展開中である[先端融合領域

遺伝子ワクチンの課題を克服する当研究室の成果
①非ウイルス型キャリアの遺伝子発現効率の低さ
→ブロック/ホモ混合ミセル型遺伝子ベクターの使用にて克服
②アジュバント効果を誘導する遺伝子組成見出されていない
→ワクチン遺伝子組成(腫瘍関連抗原+アジュバント遺伝子)の開発
(特願2013-0X9X5X)(PCT出願準備中)



イノベーション創出拠点形成プログラム]。ブロック/ホモポリマー混合型遺伝子キャリアはウイルスベクターと異なり複数の遺伝子を容易に入れ替えて生体内に発現させる事ができる為(Ohgidani M, et al: J Control Release 2013, 167(3):238-47; Kumagai M, et al: J Control Release 2012: 160(3), 542-51)搭載する遺伝子のスクリーニング検討が可能である。その利点を生かし効率的にCTLを誘導するアジュバント遺伝子群のスクリーニングを行い、有効なアジュバント遺伝子組成を同定した。右図は腫瘍関連抗原として知られるSART3(Yamada A, et al: Clin Cancer Res 2006; 12: 1325-32)遺伝子をこのアジュバント遺伝子と同時に発現させた場合、同種大腸がんの腹膜播種マウスの生存率が有意に延長することを示す(特願 2013-079854; 論文投稿中)。

2. 研究の目的

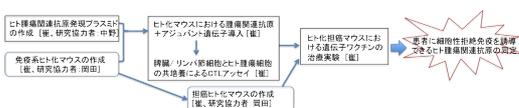
生来、体に備わる免疫力を再賦活化し抗原分子を標的として疾病を制御するワクチンは、体に優しい治療法として、近年、抗原エピーペプチド等を用いて臨床研究が盛んに行われている。

当該研究室では腫瘍関連抗原遺伝子とアジュバント遺伝子を搭載する高分子ミセルが高いワクチン効果を発揮するプラ

ットフォーム（特許申請中）となることを見出している。**免疫系ヒト化マウス**に応用することで、**細胞性免疫の活性化を誘導できるヒト抗原遺伝子を同定する探索システム**を開発する。

3. 研究の方法

本研究計画・方法の骨子は、1) 細胞性免疫を誘導する腫瘍関連抗原遺伝子を同定するための探索システムを免疫系ヒト化マウスで確立し、2) 同定した抗原 DNA ワクチンの治療効果を「担癌ヒト化マウス」を作成して検証することにある。以下に、研究の流れと研究体制の概要を示す。



ヒト化マウスは臍帯血・幹細胞の扱いに習熟した研究協力者：岡田、服部（熊本大学）[業績：Okada S, et al: Int J Hematol 2008; 88,476-82]の支援で崔が作成し、遺伝子改変・導入実験は研究協力者：中野の指導の下にテクニシャン2名のサポートを得て実施する。免疫実験に関しては研究背景の結果でわかるように既に手技は習得しており[論文投稿準備中]、研究目標は十分に達成できるものと考えられる。

4. 研究成果

我々は以前、腫瘍関連遺伝子とアジュバント遺伝子を内包したブロック/ホモ混合ポリプレックスミセル（DNA ワクチン）を用いて担癌マウスにおいてその抗腫瘍効果と高い安全性を確認した。ヒトと実験動物の間には免疫学的応答性に種差があり、ワクチン効果を誘導するヒト腫瘍関連抗原を予測することが難しく、免疫原性の高いヒト腫瘍関連抗原を探索するシステムを確立する重要性が増している。

そこで本研究において我々は担癌免疫系ヒト化マウスを作成して、ブロック/ホモポ

リマー遺伝子キャリアを用いてヒト腫瘍関連抗原遺伝子とアジュバント遺伝子を担癌ヒト化マウスに導入し、特異的細胞性免疫の誘導・活性化によるワクチン効果を検討し、DNA ワクチンとして有効なヒト腫瘍関連抗原をスクリーニングする系の確立を試みた。

まず、我々は全身放射線照射した NOD/SCID/JAK3^{null} 免疫不全マウスにヒト末梢血単核球細胞を移植することによってヒト・マウス免疫キメラ状態（ヒト：優位）の成立を確認した。更にヒト膵・胆道癌細胞をその免疫ヒト化マウスの皮下に移植する条件を最適化して、ワクチン治療実験での腫瘍関連抗原の免疫原性の評価に有用な担癌免疫ヒト化マウスモデルの作成にも成功した。腫瘍関連抗原遺伝子は膵・胆道癌で高発現が知られている遺伝子（ヒトの YB1, SART3, Mutant Kras, MUC-1, CEACAM1）がアジュバント遺伝子（hGM-CSF、hCD40L）と同時に発現するように両発現プラスミドを高分子ポリマー型遺伝子ベクターに内包した DNA ワクチンを作成し、担癌ヒト化マウスモデルを用いた抗腫瘍治療実験を行った。現在、抗腫瘍効果が得られた組み合わせに絞って、抗原特異的な拒絶免疫を誘導・活性化するメカニズムの検証を行っている。

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 1 件)

Cui L, Osada K, Imaizumi A, Kataoka K, Nakano K., Feasibility of a subcutaneously administered block/homo-mixed polyplex micelle as a carrier for DNA vaccination in a mouse tumor model. J Control Release. 2015 May 28;206:220-31.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 第 114 回日本外科学会(2014.4.3, 京都)、新規癌遺伝子ワクチンとしての腫瘍関連抗原遺伝子を内包した高分子ミセルの安全性と治療効果の検討。

2. AACR Annual Meeting 2015 (2015. 3.2, Philadelphia), Tumor-associated antigen gene-loading polyplex micelle is a promising platform for anticancer DNA vaccine.
3. 第 115 回日本外科学会(2015.4.16, 名古屋), 非ウイルス性ベクターを用いた DNA ワクチンによる難治癌に対する集学的治療への試み。
4. 第 21 回日本遺伝子治療学会学術集会 (2015.7.24, 大阪), Tumor-associated antigen gene-loading polyplex micelle: a promising platform of anti-tumor DNA vaccine.
5. 18thECCO-40thESMO European Cancer Congress (2015.9.26, Vienna), Tumor-associated antigen gene-loading polyplex micelle: a promising platform of anti-tumor DNA vaccine
6. 第 74 回癌学会学術集会 (2015.10.9, 名古屋). Investigation of a subcutaneously administered polyplex micelle as a carrier for DNA vaccination in a mouse tumor model.
7. 第 116 回日本外科学会(2016.4.14, 大阪), マウス腫瘍モデルにおけるポリプレックスミセル型キャリアの DNA ワクチン効果の検討)

究拠点・薬物送達グループ・特任助教
研究者番号：30717822

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

〔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：
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

崔 林 (CUI Lin)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研