

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：24701  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2014～2016  
課題番号：26861095  
研究課題名(和文) プロテアソームの形態制御によるユビキチン融合遺伝子導入樹状細胞癌ワクチンの新戦略

研究課題名(英文) A novel strategy for ubiquitin-fusion gene transduced dendritic cell vaccine in the control of the constituents of the proteasome

研究代表者  
宮澤 基樹 (Miyazawa, Motoki)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90549734  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：樹状細胞(DC)成熟化に伴い「構成型」から「免疫型」へのプロテアソームが形態変化をおこす。プロテアソームは腫瘍抗原をペプチドに分解し、HLAとともに抗原提示する役割があるが、プロテアソームの違いによる成熟DCと腫瘍細胞の両者でのペプチド-HLA Class I複合体の不一致を解消することで、DCワクチンによって効率的な抗腫瘍免疫を誘導できる可能性がある。これらの事象を証明するため、膵癌の腫瘍抗原であるMesothelinと抗原のプロテアソームによる分解シグナルであるユビキチンの融合遺伝子導入したDCを用いた抗腫瘍免疫の基礎的研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Immature dendritic cells contains the constitutive proteasome, however, mature dendritic cells differentiated from immature dendritic cells exposed with inflammatory mediator such as interferon-gamma contains immunoproteasome (ip) derived from immature dendritic cells. The inhibition of the immunoproteasome in mature dendritic cells using small interfering RNA transfection targeting the 3 inducible ip subunits might help to induce antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. In this study, I performed basic research about anti-tumor immune response targeting mesothelin which is tumor associated antigen of pancreatic ductal carcinoma, and using dendritic cells transduced with mesothelin gene fused with ubiquitin gene which is a degradation signal of proteasome.

研究分野：膵癌免疫療法

キーワード：プロテアソーム メソセリン 樹状細胞ワクチン ユビキチン

### 1. 研究開始当初の背景

近年、プロテアソームの形態解析が進み、未熟樹状細胞 DC は構成型プロテアソームを有しているが、インターフェロン (IFN)- などの炎症性メディエーターに暴露され、成熟 DC へと分化すると、免疫プロテアソームへと形態変化することが明らかとなった (Kloetzel et al. Nat Immunol 5:661-669 2004)。免疫プロテアソームは構成型プロテアソームに比べ、より効率的に MHC Class I 分子と会合し、細胞膜上で抗原提示されるペプチド断片に抗原蛋白を分解するが、一方で、そのペプチド断片のアミノ酸配列は、免疫プロテアソームと構成型プロテアソームで不一致が認められる (Toes et al. J EXP Med 194:1-12 2001)。腫瘍細胞では構成型プロテアソームで存在していることから、免疫プロテアソームを有する成熟 DC に腫瘍関連遺伝子 (TAA) を導入し、誘導した細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が、腫瘍細胞上のペプチド断片を認識できず、細胞死に誘導できない可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では DC による腫瘍抗原提示能力を最大限に発揮させるため、DC 成熟化に伴うプロテアソームの形態変化に着目した。すなわち、DC 成熟化に伴う「構成型」から「免疫型」へのプロテアソーム形態変化を阻害し、構成型プロテアソームを発現する成熟 DC を誘導することで、プロテアソームの違いによる成熟 DC と腫瘍細胞の両者でのペプチド-HLA Class I 複合体の不一致を解消することで、これまで研究を進めてきた Ubiquitin-Mesothelin (Ub-MSLN) 融合遺伝子導入 DC による効率的な腫瘍細胞に対する抗腫瘍免疫を誘導することを目的とする。

### 3. 研究の方法

MSLN が腫瘍の免疫療法の標的となりうるかを確認するため、浸潤性膵管癌のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を用いて免疫染色を行った。抗体は mouse monoclonal antibody to MSLN (Clone 5B2; LAB VISION, Fremont CA, USA)を用いた。

Ub-MSLN 融合遺伝子導入アデノウイルスベクターの作成

#### 1. Ub 遺伝子の PCR による増幅

Ub は末梢血単核球 (PBMC) から抽出したヒトゲノムを用い PCR で増幅しました。プライマーは次のように設定した 5' primer (5' AGT CCG CTA GCC GCC ACC ATG CAG ATC TTC GTG AAG ACC 3')、3' primer (5' TAG TCC GTC GAC GTA TTT AAA TCG ACC CCC CCT CAA GCG CAG GAC 3')。プライマー内には後に融合遺伝子を作製するため制限酵素配列を設けておいた。

#### 2. Ub-MSLN 融合遺伝子導入アデノウイルスベクターの作成

Ub を ligation したアデノウイルスコスミドベクターに MSLN 遺伝子を ligation し、COS-TPC 法で Ub-MSLN 融合遺伝子導入アデノウイルスベクターを作成した。

### 細胞内染色による DC への MSLN 導入効率の評価

Ub-MSLN 融合遺伝子導入 DC で細胞内での蛋白分解が亢進していることを証明するため、細胞内の MSLN を FACS で検出した。細胞膜を浸透化し、細胞内の MSLN を FITC 標識抗 MSLN 抗体で染色し、FACS を行った。また、MSLN 蛋白分解がプロテアソームにより亢進していることを証明するため、プロテアソームインヒビター (MG132) によって処理した場合についても検討した。

MSLN 遺伝子導入 DC と Ub-MSLN 融合遺伝子導入 DC における MSLN 免疫組織化学染色 Mesothelin Ab-1 (Clone 5B2) 抗体を用いて免疫染色を行った。

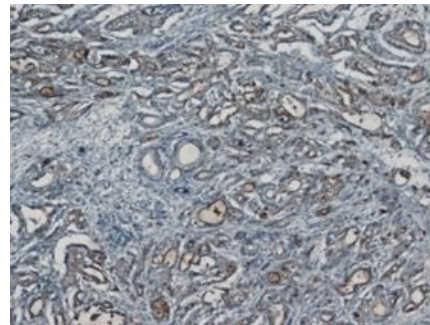
### iPsiRNA 導入成熟 DC への Ub-MSLN 融合遺伝子導入による抗腫瘍免疫誘導能の検討

構成型プロテアソームのサブユニット X (5), Y (1), Z (2) は IFN- などの炎症性サイトカインの作用で LMP7 (5i), LMP2 (1i), MECL-1 (2i) に入れ替わり、免疫プロテアソームが形成されることが報告されている。よって、iPsiRNA は LMP7 特異的 siRNA, LMP2 特異的 siRNA, MECL-1 特異的 siRNA から成る。iPsiRNA は LMP7 siRNA, LMP2 siRNA, MECL-1 siRNA (Santa Cruz Biotechnology) を用いる。抗腫瘍効果判定は Cr リリースアッセイにて行う。

CTL 誘導: Responder には自己の PBMC (HLA-A\*24 及び A\*02) を、Stimulator は遺伝子組換え adenovirus vector (AxCAMSLN, AxCAUb-MSLN, control: AxCALacZ) で遺伝子導入した自己成熟 DC を用いる。human recombinant (hr) IL-7 と hrIL-2 (PEPROTECH) の存在下で培養し、1 週間毎に計 3 回刺激して CTL を誘導する。標的細胞は MSLN の発現を認める腫瘍細胞株 PK1 (HLA Class I 陽性) を用いる。

### 4. 研究成果

浸潤性膵管癌切除標本における免疫組織化学染色による Mesothelin の発現  
浸潤性膵管癌では 10 例中 10 例に発現あり。

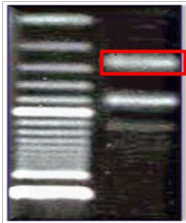


(Mesothelin × 100)

#### Ub 遺伝子の PCR による増幅

PCR を行うと、ラダー状にバンドが検出された。これはポリユビキチン遺伝子存在していると考えられた。これらのうち、mono ユビキチンを抽出し、TA クローニングを行った。

100 bp



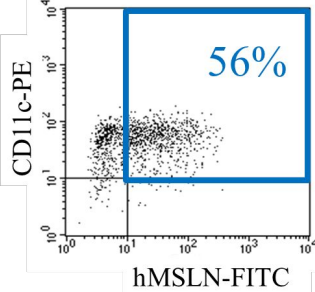
mono Ub 228 bp  
primer含め270 bp

Ladder状にpolyUb検出される。

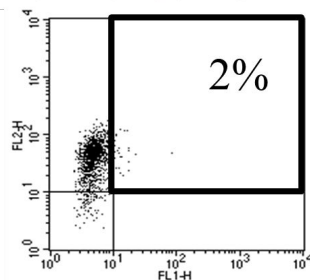
### 細胞内 MSLN 染色

MSLN 遺伝子導入 DC では細胞内染色で DC の 56% に MSLN 発現を認めたのに対し、Ub-MSLN 融合遺伝子導入 DC では MSLN の DC の細胞内発現は 2% であった。一方、Ub-MSLN 融合遺伝子導入 DC をプロテアソームインヒビターで処理したところ、DC の 46% に細胞内の MSLN の発現が回復した。以上よりユビキチン融合遺伝子では DC 内の MSLN 蛋白分解が亢進し、その蛋白分解はプロテアソームに依存していた。

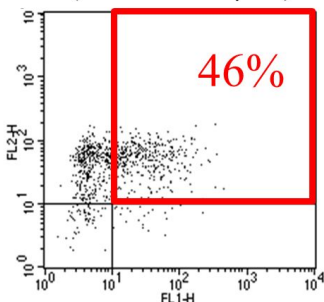
### DC-AxCaHMSLN



### DC-AxCaUbhMSLN



### DC-AxCaUbhMSLN (MG132:10μM)



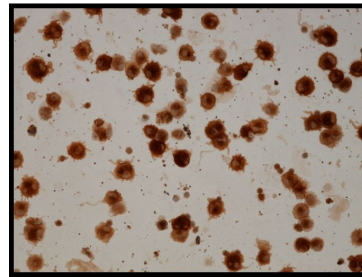
Ub-MSLN 融合遺伝子導入 Adenovirus vector 感染後 proteasome inhibitor

(MG132、10 μM) 添加

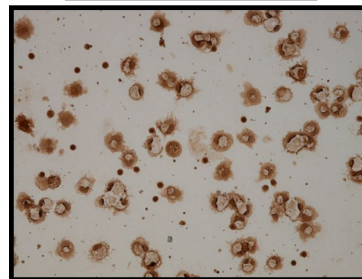
免疫染色による MSLN 遺伝子導入 DC および UbMSLN 融合遺伝子導入 DC における Mesothelin の発現

MSLN 遺伝子導入 DC では全視野の 90% で MSLN 免疫染色陽性で高率に発現していることがわかった。一方、融合遺伝子導入 DC ではリング上に染色され、細胞質での MSLN 発現が低下しており、MSLN 分解が亢進していることが示唆された。

### DC-AxCaHMSLN



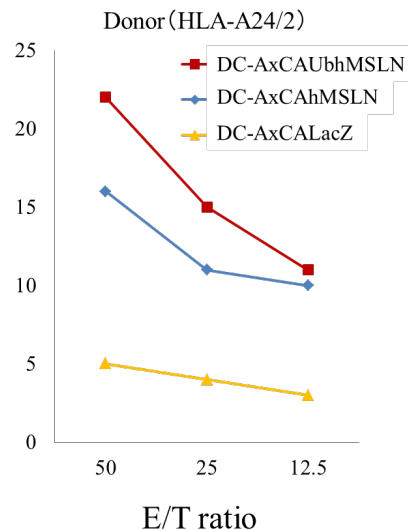
### DC-AxCaUbhMSLN



iPsiRNA 導入成熟 DC への Ub-MSLN 融合遺伝子導入による抗腫瘍免疫誘導能

まず、Ub-MSLN 融合遺伝子導入 DC を用いて CTL を誘導し、MSLN 遺伝子導入 DC、コントロールとして LacZ 遺伝子導入 DC でそれぞれ誘導した場合と比較した。

Target:PK1 (HLA-A24/24)



Ub-MSLN 融合遺伝子導入 DC で誘導した CTL で抗腫瘍効果の増強傾向がみられたが、再現性に乏しかった。よって、今後 iPsiRNA を用いた基礎実験を進めていく。

#### 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 20 件)

1: Okada KI, Hirono S, Kawai M, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Ueno M, Hayami S, Yamaue H. Phase I Study of Nab-Paclitaxel plus Gemcitabine as Neoadjuvant Therapy for Borderline Resectable Pancreatic Cancer. *Anticancer Res.* 2017;37:853-858. (査読有)

2: Hirono S, Kawai M, Okada KI, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Ueno M, Yanagisawa A, Yamaue H. Factors Associated With Invasive Intraductal Papillary Mucinous Carcinoma of the Pancreas. *JAMA Surg.* 2017;152:e165054. doi:10.1001/jamasurg.2016.5054. (査読有)

3: Okada KI, Hirono S, Kawai M, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Ueno M, Hayami S, Kojima F, Yamaue H. Value of apparent diffusion coefficient prior to neoadjuvant therapy is a predictor of histologic response in patients with borderline resectable pancreatic carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2017;4:161-168. doi: 10.1002/jhbp.430. (査読有)

4: Miyazawa M, Katsuda M, Maguchi H, Katanuma A, Ishii H, Ozaka M, Yamao K, Imaoka H, Kawai M, Hirono S, Okada KI, Yamaue H. Phase II clinical trial using novel peptide cocktail vaccine as a postoperative adjuvant treatment for surgically resected pancreatic cancer patients. *Int J Cancer.* 2017;140:973-982. doi: 10.1002/ijc.30510. (査読有)

5: Hirono S, Kawai M, Okada KI, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Ueno M, Yamaue H. Treatment Strategy for Borderline Resectable Pancreatic Cancer With Radiographic Artery Involvement. *Pancreas.* 2016;45:1438-1446. (査読有)

6: Kitadani J, Ojima T, Iwamoto H, Tabata H, Nakamori M, Nakamura M, Katsuda M, Miyazawa M, Hayata K, Yamaue H. [Cancer Immunotherapy Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Dendritic Cells(iPSDCs)Expressing Carcinoembryonic

Antigen]. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2016;43:1071-3. Japanese. (査読無)

7: Okada K, Kawai M, Hirono S, Satoi S, Yanagimoto H, Ioka T, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Yamaue H. Impact of treatment duration of neoadjuvant FIRINOX in patients with borderline resectable pancreatic cancer: a pilot trial. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016;78:719-26. doi: 10.1007/s00280-016-3121-8. (査読有)

8: Okada K, Kawai M, Ueno M, Hirono S, Miyazawa M, Hayami S, Shimizu A, Shigekawa Y, Kitahata Y, Miyamoto A, Yamaue H. Depth of Hepatic Infiltration and Lymph Node Swelling as Factors for Considering Surgery for T2-4 Gallbladder Carcinoma Patients. *Anticancer Res.* 2016;36:3075-80. (査読有)

9: Hirono S, Kawai M, Okada K, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Ueno M, Yanagisawa A, Yamaue H. Long-term surveillance is necessary after operative resection for intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Surgery* 2016;160:306-17. doi: 10.1016/j.surg.2016.04.007. (査読有)

10: Hirono S, Kawai M, Okada K, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Ueno M, Yamaue H. Pancreatic neck cancer has specific and oncologic characteristics regarding portal vein invasion and lymph node metastasis. *Surgery.* 2016;159:426-40. doi: 10.1016/j.surg.2015.07.001. (査読有)

11: Okada K, Kawai M, Hirono S, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Yamaue H. Perioperative administration of Daikenchuto (TJ-100) reduces the postoperative paralytic ileus in patients with pancreaticoduodenectomy. *Hepatogastroenterology.* 2015;62:466-71. (査読有)

12: Yamaue H, Tsunoda T, Tani M, Miyazawa M, Yamao K, Mizuno N, Okusaka T, Ueno H, Boku N, Fukutomi A, Ishii H, Ohkawa S, Furukawa M, Maguchi H, Ikeda M, Togashi Y, Nishio K, Ohashi Y. Randomized phase II/III clinical trial of elpamotide for patients with advanced pancreatic cancer: PEGASUS-PC Study. *Cancer Sci.* 2015;106:883-90. doi: 10.1111/cas.12674. (査読有)

13: Miyazawa M, Kawai M, Hirono S, Okada

K, Shimizu A, Kitahata Y, Yamaue H. Preoperative evaluation of the confluent drainage veins to the gastrocolic trunk of Henle: understanding the surgical vascular anatomy during pancreaticoduodenectomy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2015;22:386-91. doi: 10.1002/jhbp.205. (査読有)

14: Okada K, Kawai M, Hirono S, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Tani M, Yamaue H. A replaced right hepatic artery adjacent to pancreatic carcinoma should be divided to obtain R0 resection in pancreaticoduodenectomy. *Langenbecks Arch Surg.* 2015;400:57-65. doi: 10.1007/s00423-014-1255-x. (査読有)

15: Okada K, Kawai M, Tani M, Hirono S, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Yamaue H. Preservation of the left gastric artery on the basis of anatomical features in patients undergoing distal pancreatectomy with celiac axis en-bloc resection (DP-CAR). *World J Surg.* 2014;38:2980-5. doi: 10.1007/s00268-014-2702-0. (査読有)

16: Tani M, Kawai M, Hirono S, Okada KI, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Yamaue H. Randomized clinical trial of isolated Roux-en-Y versus conventional reconstruction after pancreaticoduodenectomy. *Br J Surg.* 2014;101:1084-91. doi: 10.1002/bjs.9544. (査読有)

17: Okada K, Kawai M, Tani M, Hirono S, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Yamaue H. Predicting factors for unresectability in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2014;21:648-53. doi:10.1002/jhbp.109. (査読有)

18: Hirono S, Kawai M, Tani M, Okada K, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Yamaue H. Indication for the use of an interposed graft during portal vein and/or superior mesenteric vein reconstruction in pancreatic resection based on perioperative outcomes. *Langenbecks Arch Surg.* 2014;399:461-71. doi: 10.1007/s00423-014-1182-x. (査読有)

19: Kitahata Y, Kawai M, Tani M, Hirono S, Okada K, Miyazawa M, Shimizu A, Yamaue H. Preoperative cholangitis during biliary drainage increases the incidence of postoperative severe complications after pancreaticoduodenectomy. *Am J Surg.*

2014;208:1-10. doi:10.1016/j.amjsurg.2013.10.021. doi: 10.1016/j.amjsurg.2013.10.021. (査読有)

20: Kawai M, Tani M, Hirono S, Okada K, Miyazawa M, Yamaue H. Pylorus-resecting pancreaticoduodenectomy offers long-term outcomes similar to those of pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy: results of a prospective study. *World J Surg.* 2014;38:1476-83. doi: 10.1007/s00268-013-2420-z. (査読有)

〔学会発表〕(計 14 件)

【国際学会】

1. Miyazawa M, M. Kawai, S. Hirono, K. Okada, A. Shimizu, Y. Kitahata, H. Yamaue : Phase I clinical trial using peptide vaccine for human vascular endothelial growth factor receptor 2 in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. APA/JPS Meeting Poster of Distinction Highlights, Hapuna Beach Prince Hotel November 7, 2014  
2. Miyazawa M, T Ojima, M Kawai, S Hirono, K Okada, A Shimizu, Y Kitahata, and H Yamaue : Dendritic cells adenovirally-transduced with full-length mesothelin cDNA elicit mesothelin-specific cytotoxicity against pancreatic cancer cell lines in vitro. PCCA and IAP meeting, October 27 2015 Shanghai

3. Miyazawa M, T Ojima, M Katsuda, K Hayata, M Nakamura, M Nakamori, K Manabu, S Hirono, K Okada, A Shimizu, Y Kitahata and H Yamaue. Dendritic cell vaccine transduced with ubiquitin-mesothelin fusion gene for pancreatic cancer. ASCO 2016 June 4 Chicago

4. Miyazawa M, Katsuda M, Maguchi H, Ishii H, Yamao K, Kawai M, Hirono S, Okada K, Shimizu A, Kitahata Y, Yamaue H : Phase II clinical trial using a novel peptide vaccine cocktail combined with gemcitabine for surgically resected pancreatic cancer patients HBP Surgery Week 2017 & The 46th Annual Congress of the Korean Association of HBP Surgery, March, 2017 Jeju

【国内学会】

5. 宮澤基樹 勝田将裕 谷 眞至 川井学 廣野誠子 岡田健一 清水敦史 北畑裕司 水本有紀 山上裕機 : 膵癌に対するペプチドワクチン療法の開発 第 69 回日本消化器外科学会総会 2014.7 郡山

6. 宮澤基樹 勝田将裕 谷 眞至 川井学 廣野誠子 岡田健一 清水敦史 北畑裕司 水本有紀 山上裕機 : 標準療法不応膵

癌に対する TS-1 隔日投与方法併用ペプチドワクチン療法 第 52 回日本癌治療学会学術集会 2014.8 横浜

7.宮澤基樹 勝田将裕 川井 学 廣野誠子 岡田健一 清水敦史 北畑裕司 水本有紀 山上裕機：膵癌ペプチドワクチン療法臨床試験の現状と展望 第 27 回日本バイオセラピー学会 2014.12 大阪

8.宮澤基樹 勝田将裕 川井 学 廣野誠子 岡田健一 清水敦史 北畑裕司 水本有紀 北谷純也 津村亜矢子 山上裕機：膵癌に対するペプチドワクチン療法臨床試験 第 36 回癌免疫外科研究会 2015.6 奄美大島

9.M Miyazawa, M Kawai, S Hirono, K Okada, A Shimizu, Y Kitahata, M Ueno, S Hayami, S Yamaguchi, H Yamaue : Preoperative evaluation of the surgical vascular anatomy during PD using 3D-CT portography. The 70th General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterological Surgery 2015.7 Hamamatsu

10.宮澤基樹 勝田将裕 川井 学 廣野誠子 岡田健一 清水敦史 北畑裕司 水本有紀 北谷純也 津村亜矢子 和田 聡 山上裕機：進行膵癌に対する化学療法を併用した新規がんペプチドワクチンの臨床研究 第 53 回日本癌治療学会学術集会 2015.10 京都市

11.宮澤基樹 勝田将裕 川井 学 廣野誠子 岡田健一 清水敦史 北畑裕司 水本有紀 山上裕機：切除不能膵癌に対する新規ペプチドワクチン療法 -第 I/II 相臨床試験 - 第 28 回日本バイオセラピー学会 2015.12 川越市

12.Miyazawa M, Katsuda M, Kawai M, Hirono S, Okada K, Shimizu A, Kitahata Y, Mizumoto Y, Wada S, Yamaue H : Clinical trials using therapeutic peptide vaccine for patients with advanced pancreatic cancer The 71th General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterological Surgery 2015.6 Tokushima

13.宮澤基樹 勝田将裕 川井 学 廣野誠子 岡田健一 清水敦史 北畑裕司 真口宏介 金 俊文 和田 聡 山上裕機：膵癌に対するがんペプチドワクチン臨床研究 第 54 回日本癌治療学会学術集会 2016.10 横浜市

14.宮澤基樹 勝田将裕 真口宏介 石井浩 山雄健次 川井 学 廣野誠子 岡田健一 清水敦史 北畑裕司 山上裕機：膵癌に対する再発予防のための新規ペプチドワクチンを用いた第 相医師主導治験 第 29 回日本バイオセラピー学会 2016.12 久留米市

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

宮澤 基樹 (MIYAZAWA, Motoki)

和歌山県立医科大学・医学部・助教