

癌栄養血管を標的とした新規癌遺伝子免疫療法

研究機関 福岡大学医学部

研究者名 廣松賢治

## 《研究の概要》

これまでの腫瘍細胞特異的抗原を標的とする CD8 キラーT 細胞 (CTL) の誘導による癌免疫ワクチン療法では十分な抗腫瘍効果が得られない。その要因として、癌細胞が悪性化するほどその細胞上の主要組織適合性抗原 (MHC) クラス I 分子の発現が低下するために CD8 キラーT 細胞が癌細胞を攻撃できないためと考えられる。本研究では MHC クラス I 分子の発現が低下/欠如している悪性度の高い癌に対する新規の癌免疫治療法の開発研究を目指した。その戦略は、癌細胞自体ではなく、癌栄養新生血管の CD8 キラーT 細胞 (CTL) による破壊により癌組織を“兵糧攻め”することである。本研究において、癌栄養新生血管に特異的に発現するアクアポリン 1 を標的とする CD8 キラーT 細胞を誘導する新規の遺伝子免疫療法(ユビキチン融合アクアポリン 1 DNA ワクチン) を確立し、MHC クラス I 発現が消失している悪性黒色腫 (B16melanoma F1) などに対する強力な抗腫瘍効果、転移抑制効果、治療効果をマウスモデルで確認した。癌組織新生栄養血管に発現するアクアポリン 1 を標的とする CD8 キラーT 細胞は、癌栄養血管を破壊し、主要組織に壊死を誘導し抗腫瘍効果を示した。そのため、本 DNA ワクチンは、MHC クラス I 発現が消失する悪性度の高い癌に対しても効果を発揮した。正常腎臓、皮膚などアクアポリン 1 発現正常組織への有害事象は特に認めなかった。また、本 DNA ワクチンによる抗腫瘍免疫効果は、癌抗原、および MHC の相違を超えて、さらに癌腫瘍の種類を超えて発揮されることが示された。本研究の如く、血管新生因子を標的にした対癌戦略は、さらに新たな血管新生因子やリンパ管新生因子への応用という、この分野での全く新しい展開へと導くことが予想される。

廣松 賢治	福岡大医学部 教授	研究立案、データ解析、総括
仇 斌 (Bin Chou)	福岡大学医学部 助教	研究実施、データ解析
石井 一成	福岡大学医学部 講師	DNA ワクチン、免疫学的解析

## 研究報告

### I 研究目的

薬剤耐性癌や転移癌に対しては免疫学的アプローチの必要性が指摘されているが、困難を極めている。その主な要因は以下の如くである。①癌抗原は同種の癌/腫瘍でも個体差があり、また同定されていない癌も多い。②癌細胞に対する主たる攻撃細胞はキラーT細胞(CTL)であるが、CTLは癌細胞上の主要組織抗原(MHC)クラスI(ヒトではHLA-A, B, C)に提示された癌抗原ペプチドを認識したうえで癌細胞を攻撃するが、癌が悪性化するほどMHCクラスIが発現されなくなるので、それらの癌細胞はCTLのターゲットにならない。③癌抗原に個体差がない場合でもMHCクラスIが異なれば、各々の個体のMHCクラスIが異なった癌抗原ペプチドを提示する。それ故ペプチド抗原を用いた免疫療法は各々の個体に対応するテイラーメイド的な癌抗原ペプチドの同定が必要となる。

以上の如く癌細胞を直接のターゲットとした免疫療法の確立は非常に困難である。近年免疫学的治療の方向性として、癌組織の栄養血管のブロックないしは新生阻止が有力な手段として想定されている。本研究では、癌栄養血管を標的とした新規癌遺伝子免疫療法を目指し、癌/腫瘍の新生栄養血管に発現するaquaporin-1(AQP-1)の遺伝子とユビキチン遺伝子の融合遺伝子を用いてDNAワクチンを行い、MHCクラスI分子を発現していない悪性度の強い癌・腫瘍に対する強い抗腫瘍免疫の誘導を検討した。本ワクチンで誘導される抗腫瘍免疫は癌細胞自体に対してではなく、AQP-1特異的CTLがMHCクラスIと共にAQP-1を発現している新生栄養血管を破壊することによる“兵糧攻め”効果を誘導することにある。

癌細胞由来の癌特異抗原ペプチドを用いて免疫した場合、CTLの誘導はほとんど不可能である。我々は近年、ペプチド抗原をコードする遺伝子とユビキチン遺伝子の融合(キメラ)遺伝子を用い、ユビキチンプロテアソーム経路(UPS)【次ページ 図1参照】を活性化させることによるDNAワクチン法で、そのペプチド抗原に特異的なCTLを強力的に誘導できる系を確立した。このDNAワクチン法により、C57BL/6マウスの肺癌(3LL)や良性メラノーマ(B16F1)に対して強いCTL活性を誘導するとともに、それらの腫瘍に対して著しい抗腫瘍免疫を誘導することに成功した。なおこれらの腫瘍はそれらの細胞表面上にMHCクラスI分子を発現していた。ところがこの免疫方法でもMHCクラスI分子を発現していない悪性メラノーマ(B16F10)に対してはメラノーマ特異的癌抗原TRP-2(tyrosine-related protein 2)に対するCD8 CTL活性は誘導できたにも関わらず、抗腫瘍効果は全く誘導できなかった《図1参照》。

本研究で開発を行う新規癌遺伝子免疫療法は、癌/腫瘍の新生栄養血管に発現するアキアポリン1[aquaporin-1(AQP-1)]遺伝子とユビキチン遺伝子の融合遺伝子を用いたDNAワクチンを

行ない、MHC クラス I 発現が低下、消失しているような悪性度の高い癌、腫瘍に対する画期的な抗腫瘍免疫の誘導を計ろうとするものである。本研究では本ワクチンの proof of principle 《概念検証》を行い、本ワクチンの抗腫瘍効果のエフェクターレベルでの詳細な解析、有害事象の有無の検討を行い、新規創薬へのステップを目指すことを目的とする。

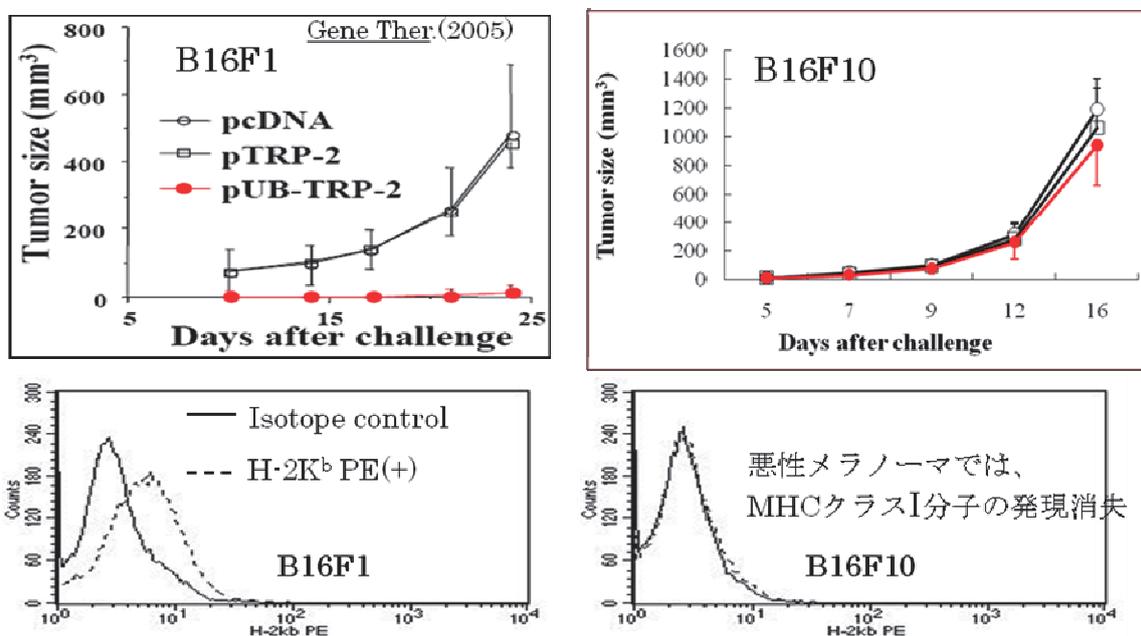


図1 メラノーマ特異的癌抗原 TRP-2 (*tyrosinase-related protein 2*) を標的にしたユビキチン (UB)・プロテアソーム経路の活性化による DNA ワクチン

(説明：UB-TRP-2 DNA ワクチンは B16F1 メラノーマには極めて有効だが、B16F10 メラノーマには全く無効。その原因は、悪性度の高い B16F10 メラノーマは MHC クラス I 分子を発現していないためである。)

## II 研究計画及び材料と方法

1) Ubiquitin・Aquaporin-1 (UB-AQP-1) DNA のワクチンの構築 (ベクター構築、Aquaporin-1 発現確認) AQP-1 を発現する血管(皮膚内)から AQP-1 をコードする遺伝子をクローニングし、ユビキチン遺伝子の 3' 側に融合させ、発現ベクターに組み込む。この際に、AQP-1 のシグナル配列を削除し細胞膜上への表出を抑制した。作成したワクチンベクターを試験管内で培養細胞 (COS-7 cell) に導入し、ユビキチン融合型 AQP-1 が発現することを確認した。同時にプロテアソーム阻害剤を加え、プロテアソームによる AQP-1 の分解も確認した。

### 2) Ubiquitin・Aquaporin-1 DNA ワクチンによる抗腫瘍免疫効果の解析

種々のマウス系統、C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>)、BALB/c (H-2<sup>d</sup>)、C3H/He (H-2<sup>k</sup>) と各々のマウス由来の腫瘍細胞 (B16F10 cell (マウス悪性黒色腫 H-2<sup>b</sup>)、Colon 26 (マウス大腸癌細胞 H-2<sup>d</sup>)、MBT2/p (膀胱癌細胞 H-2<sup>k</sup>) を用いて、ワクチンベクターによる抗腫瘍効果の誘導を詳細に検討した。ユビキチン融合 AQP-1 プラスミド DNA 6 マイクログラムを Helios Gene Gun を用いてマウスに免疫した (2 週間隔、4 回)。最終免疫後 10 日後に各種腫瘍細胞をチャレンジし、腫瘍増殖 (サイズ)、マウス生存率を経時的に解析した (本 DNA ワクチンの予防的抗腫瘍効果)。一部の実験では、本ワクチンの治療的効果判定のために、癌接種後 1 日目より DNA ワクチンを行い治療効果の判定を行った。

### 3) ユビキチン融合 AQP-1 DNA ワクチンにおけるエフェクター細胞サブセットの同定

抗腫瘍効果を示すエフェクター細胞サブセットが CD8 T 細胞であることを示すために、抗 CD4m Ab、抗 CD8mAb を投与しそれぞれ CD4 T 細胞、CD8 T 細胞を除去し抗腫瘍効果に及ぼす影響を検討した。また、本ワクチン効果が ubiquitin proteasome 経路による MHC クラス I 抗原提示経路の効率化によることを示すために、免疫プロテアソーム関連遺伝子欠損マウス (PA28<sup>-/-</sup>, LPM2<sup>-/-</sup>, LMP7<sup>-/-</sup>) を用いて実験を行った。

### 4) アクアポリン 1 (AQP-1) 特異的 CD8 T 細胞の増殖反応、サイトカイン産生能

樹状細胞ライン DC2.4 (B6 マウス由来) に AQP-1 (アクアポリン 1 をトランスフェクトし、抗原提示細胞として用い、本ワクチンで誘導される AQP-1 特異的 CD8 T 細胞の細胞増殖反応、IFN $\gamma$ 、パーフォリン、グランザイムなど細胞傷害キラー活性に関与する分子の発現を検討した。

### 5) AQP-1 特異的 CD8 T 細胞の CTL キラー活性

a) In vitro CTL アッセイ 抗原提示細胞ラインである樹状細胞ラインに AQP-1 遺伝子を遺伝子導入し target 細胞として用いて、ワクチン接種マウスからの CD8 T 細胞をエフェクターキラー T 細胞として用いて CTL (細胞傷害活性) アッセイを試験管内で行った。

b) In vivo CTL アッセイ AQP-1 transfected EL4 細胞や non-transfected EL4 を異なった濃度の CFSE でラベルし DNA ワクチン接種マウスに静注し、18 時間後にマウスから脾臓細胞を分離し、CFSE ラベル標的細胞の生存率を FACS にて解析することにより、生体内 in vivo での AQP-1 特異的 CD8 キラー T 細胞細胞傷害活性を検討した。

6) 遺伝的背景が異なるマウス・腫瘍株に対する本ワクチンによる予防および治療効果 B16F10 melanoma (C57BL/6 H-2<sup>b</sup>) のみならず、大腸がん colon 26 (BALB/c H-2<sup>d</sup>)、膀胱がん MBT2/p (C3H/He H-2<sup>k</sup>) における本 UB-AQP-1 DNA ワクチンの予防的効果、治療効果 (腫瘍接種後に DNA immunization) を検討し、本ワクチンの抗腫瘍効果が腫瘍種、MHC クラス I の違いを越えて一般化できるか否か検討した。

7) pUB-AQP-1 DNA ワクチン接種による腫瘍血管新生阻害の検討 pUB-AQP-1 DNA ワクチン群あるいはコントロールマウスに B16F10 メラノーマを皮下接種し、腫瘍組織壊死部分の面積を検討した。さらに、腫瘍組織中の新生栄養血管を特異的抗体 (PE-結合抗 CD31 抗体又は PE-結合抗 VWF 抗体) を用いて蛍光染色後ハイスループット蛍光観察システムにて観察し、腫瘍の新生血管密度及び総血管面積と腫瘍面積との比率などを計測し、ワクチン接種による腫瘍血管新生の阻害を評価する。腫瘍組織における AQP-1 の発現を免疫組織学的に検討した。

8) pUB-AQP-1 DNA ワクチンの副作用の検索 pUB-AQP-1 DNA ワクチン接種後 3 カ月間、マウスの体重を測定し、ワクチン非接種群と比べて体重増加率が減少していないか検討する。pUB-AQP-1 を接種したマウスの腎臓の組織学的変化の有無を HE 染色により評価した。さらに、マウス尿を用いて潜血反応、タンパク反応、糖などの有無を検討した。非癌組織正常組織に少量発現している AQP-1 (腎臓、皮膚) の発現を IHC (免疫組織学的 (IHC) に解析し、pUB-AQP-1 DNA ワクチンにより健康組織中の AQP-1 の発現の変化の有無を検討した。

9) 新たな血管新生因子やリンパ管新生因子 (Id1, NRP1, NRP2 などの候補分子) を標的とする新しい対癌戦略の構築 腫瘍細胞由来の腫瘍特異抗原を標的とせず、腫瘍を栄養する血管新生因子をターゲットにした新しい対癌戦略の有効性が実証することができれば、次のステップとして、この新しい対癌戦略を aquaporin-1 以外のさらに新たな血管新生因子やリンパ管新生因子へと

応用する。重要なことは、本研究の UB-AQP-1DNA ワクチンと、これらの血管新生因子やリンパ管新生因子を標的とした遺伝子治療のコンビネーションにより、腫瘍・癌原発巣の制御のみならず、最も予後に関係する重要なファクターである癌転移巣の制御・抑制できる可能性が存在することである。そこで、aquaporin-1 以外のさらに新たな血管新生因子やリンパ管新生因子の候補分子として Id-1 (**Science** 319, 195(2008) Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis) Neuropilin1,2 などを取り上げ、ワクチンの候補としての実現可能性について検討を加えた。それぞれの候補分子のユビキチン融合遺伝子ワクチンのベクター構築・タンパク発現の確認を行ったのちに、マウスに遺伝子銃を用いたワクチンを行い、B16F10 メラノーマなどを用いた抗腫瘍免疫効果の検討を行い、どの分子が有効であるかを判定した。

10) 今後の新たな展開に向けた研究 悪性腫瘍組織内浸潤 M2 マクロファージ、N2 好中球による新生血管増生のメカニズム解析及び、これらの抑制型自然免疫細胞群 (myeloid derived suppressor cells:MDSC) を標的とした癌栄養血管標的免疫療法の探索

近年、種々の慢性感染症、炎症、癌において、共通のプラットフォームとして、自然免疫系細胞群 (マクロファージ、好中球) が働いていることが明らかとなってきた。特に、IL-4 や IL-13 などの Th2 系サイトカインで分化促進される M2 マクロファージ (alternatively activated macrophage) や N2 タイプ好中球など骨髄細胞系抑制型自然免疫担当細胞【myeloid derived suppressor cells:MDSC】の癌進展における役割が注目されてきている (The growing diversity and spectrum of action of myeloid-derived suppressor cells, Mantovani A, Eur. J. Immunol. 2010, 40:3317-20)。我々は、今後の抗腫瘍免疫の研究の方向性として、これらの MDSC を標的とする癌遺伝子免疫療法と pUB-AQP-1DNA ワクチンとの combination therapy を考えている。そこでまず、M1 マクロファージ (Th1 系サイトカイン IFN $\gamma$  で分化誘導されるマクロファージ) と M2 マクロファージや、N1 好中球と N2 好中球の誘導の分子機構を明らかにし、標的候補分子の選別を行うための基礎研究を行う。これらの M2 マクロファージや N2 好中球が腫瘍組織新生血管増生に及ぼす影響を検討し、将来的には、これらの M2 マクロファージや N2 好中球に対する癌遺伝子免疫療法の可能性検証を遺伝子免疫療法マウス悪性黒色腫実験モデルを用いて行う。

### III 研究成果

1) Ubiquitin・Aquaporin-1 (UB-AQP-1) DNA ワクチンベクター構築、Aquaporin-1 発現確認

ユビキチン融合型 AQP-1DNA ワクチンベクターを構築し、COS7 細胞における UB-AQP-1 の発現、および、プロテアソーム阻害剤を加え、プロテアソームによる AQP-1 の分解も確認した。

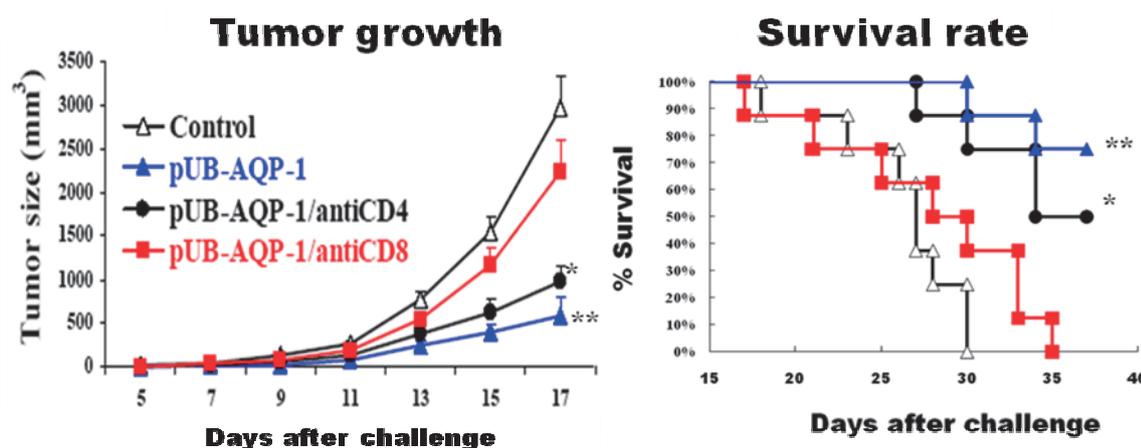
2) Ubiquitin・Aquaporin-1DNA ワクチンによる抗腫瘍免疫効果

ユビキチン融合 AQP-1 プラスミド DNA 6 マイクログラムを Helios Gene Gun を用いて C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) マウスに免疫した (2 週間隔、4 回)。最終免疫後 10 日後に B16F10 cell (マウス悪性黒色腫 H-2<sup>b</sup>) をチャレンジし、腫瘍増殖 (サイズ)、マウス生存率において本 DNA ワクチンの顕著な予防的抗腫瘍効果を認めた。癌接種後 1 日目より DNA ワクチンを行っても腫瘍増殖サイズ、生存率の顕著な改善を認め、本ワクチンの治療的効果が認められた。

3) ユビキチン・プロテアソーム経路による MHC クラス I 抗原提示経路活性化による CD8T 細胞の誘導

CD4T 細胞、CD8T 細胞を mAb 投与によりそれぞれ除去したマウスでの本ワクチン抗腫瘍効果の検討により CD8T 細胞が抗腫瘍効果を示すエフェクター T 細胞であることを示した【次ページ 図 2 参照】。また、本ワクチン効果がユビキチン・プロテアソーム経路による MHC クラス I

抗原提示経路の効率化によることが免疫プロテアソーム関連遺伝子欠損マウス (PA28<sup>-/-</sup>, LPM2<sup>-/-</sup>, LMP7<sup>-/-</sup>) を用いた検討で明らかにした。



(B16F10 melanoma)

N=8, mean ± SD

\*p < 0.05, \*\*p < 0.02

## 図2 Ubiquitin(UB)-Aquaporin-1 DNA ワクチンによる抗腫瘍免疫効果

(図2の説明： 図1で示したメラノーマ特異的癌抗原 TRP-2 を標的にしたワクチンが全く無効であった悪性メラノーマ B16F10 (MHC クラス I 分子の発現が消失している) に対しても、癌栄養血管の Aquaporin-1 を標的とする本ワクチンは顕著な抗腫瘍効果を示す。本ワクチンの抗腫瘍効果を担う細胞は CD8T 細胞である。)

### 4) アクアポリン1 (AQP-1) 特異的 CD8 T細胞の増殖反応、サイトカイン産生

本ワクチンで誘導された抗腫瘍効果を示すエフェクターCD8T細胞がAQP-1特異的CD8T細胞であることを細胞増殖反応、IFN $\gamma$ 、パーフォリン、グランザイムなど細胞傷害キラー活性に関与する分子の発現増強を見る実験系で明らかにした。

### 5) AQP-1 特異的 CD8T 細胞の CTL キラー活性(in vivo および in vitro)

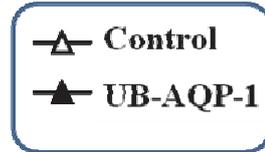
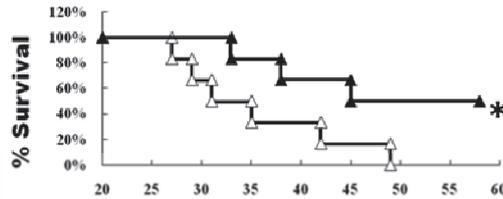
樹状細胞ラインに AQP-1 遺伝子を遺伝子導入し target 細胞として、ワクチン接種マウスからの CD8T 細胞をエフェクターキラーT細胞として用いてCTL (細胞傷害活性) アッセイにてAQP-1特異的CD8キラー細胞が本ワクチンで誘導されることを証明した。さらに、In vivo CTL アッセイ法により、生体内 in vivo での AQP-1 特異的 CD8 キラーT細胞細胞傷害活性を証明した。

### 6) 癌腫、MHC ハプロタイプの違いを超えた抗腫瘍効果の誘導

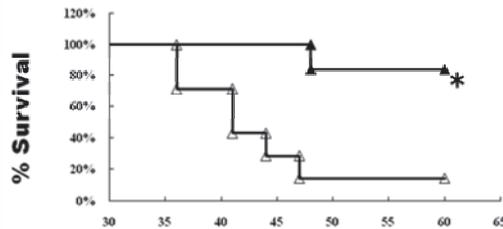
C57B6 や Balb/c、C3H/He

マウスなど MHC クラス I 遺伝子ハプロタイプの異なるマウスに遺伝子銃を用いてワクチンを行い、夫々 B16F10 melanoma、colon26、MBT2/p の3種類の癌腫をチャレンジし、ユビキチン融合 aquaporin-1 遺伝子癌免疫の予防効果、治療効果を明らかにした。これらのことから、本 DNA ワクチン法による抗腫瘍免疫効果は、癌抗原及び MHC の相を超えて、さらに癌腫瘍の種類を超えて発揮されることが考えられた。他方、3LL (lung carcinoma)、Renca (renal cell carcinoma 腎細胞癌) に対する本ワクチンの抗腫瘍効果を検討したところ、これらの腫瘍に対しては有意な本ワクチンの抗腫瘍効果は認められなかった。腫瘍増殖のスピード、栄養血管要求性の腫瘍による違いが可能性として考えられる【図3参照】。

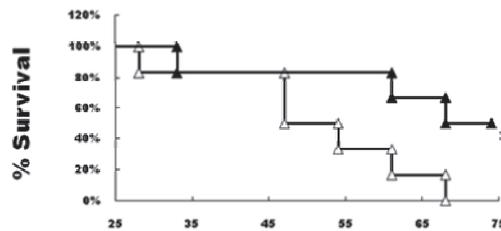
B16F10 (C57BL/6 *H-2<sup>b</sup>*)  
に対して



MBT2/p (C3H/HeN *H-2<sup>d</sup>*)  
に対して



Colon26 (Balb/c *H-2<sup>d</sup>*)  
に対して



\*  $P \leq 0.05$   
N=6

Days post challenge

図3 UB-AQP1 DNA ワクチンによる癌抗原及びMHCの相違を超えた抗腫瘍免疫の誘導

7) 癌転移抑制における本ワクチンの効果

実験的癌転移マウスモデル (B16F10 メラノーマ 肺癌転移モデル) における本ワクチンの有効性を確認した。これらのことから、癌組織中の新生栄養血管に発現される aquaporin-1 を分子標的とする本遺伝子免疫療法が、種々の癌腫の癌治療、転移抑制、再発防止に用いられる可能性が高いと考えられた。

8) pUB-AQP-1 DNA ワクチン接種による腫瘍血管新生の阻害による腫瘍壊死

本ワクチンにより、腫瘍組織壊死部分の著しい増加、腫瘍組織内血管密度の低下、総血管面積と腫瘍面積との比率の低下を認めた。これらの変化は、同時にアクアポリン1の発現低下を伴っていた。また、健全組織(皮膚、腎臓)におけるアクアポリン1の発現には pUB-AQP-1 DNA ワクチンは特に影響を与えなかった。以上のことより、腫瘍新生血管に発現されるアクアポリン1を標的とするアクアポリン1特異的CD8キラーT細胞による抗腫瘍効果が明らかとなった。

9) pUB-AQP-1 DNA ワクチンの有害事象検索

pUB-AQP-1DNA ワクチン接種後3カ月間、マウスの体重測定を行ったが特に異常を認めなかった。本ワクチンを接種したマウスの腎臓の組織学的変化のHE染色により評価でも異常を認めなかった。マウス尿を用いた潜血反応、タンパク反応、糖などの検査でも異常認めなかった。さらに、非癌組織正常組織に少量発現しているAQP-1(腎臓、皮膚)の発現をIHC(免疫組織学的(IHC))に解析し、pUB-AQP-1DNA ワクチンにより健全組織中のAQP-1の発現の変化の有無を検討したが、健全組織におけるアクアポリン1の発現には pUB-AQP-1 DNA ワクチンは特に影響を与えなかった。

10) 新たな血管新生因子やリンパ管新生因子を標的とする新しい対癌戦略の構築

aquaporin-1 以外のさらに新たな血管新生因子やリンパ管新生因子の候補分子として Neuropilin1, RGS5, DLL-4, Id1 の分子を取り上げ、ユビキチン融合遺伝子のDNAワクチンとしての抗腫瘍効果を検討した。B16F10 メラノーマを用いた検討では、UB-Neuropilin1, UB-DLL-4 ワクチンによる予防効果が認められた。UB-RGS5 や UB-Id-1 による抗腫瘍免疫効果はあまり認め

なかった。今後、UB-AQP-1DNA ワクチンと、これらの血管新生因子やリンパ管新生因子を標的とした遺伝子治療のコンビネーションにより、腫瘍・癌原発巣の制御のみならず、最も予後に関係する重要なファクターである癌転移巣の制御・抑制できる可能性が存在する可能性が考えられた。

11)抑制型自然免疫細胞群 (myeloid derived suppressor cells:MDSC、N2 型好中球、M2 マクロファージ誘導の分子機構の一連の検討において、serum amyloid A により IL-10 産生型好中球(N2)が誘導されること、この免疫抑制性サイトカイン産生が TLR2 依存性であることを、肺炎クラミジアマウス肺感染実験系で明らかにした。現在担癌マウス(B16 メラノーマ)における N2 好中球、M2 マクロファージ、MDSC 出現と serum amyloid A 等の関与を検討中である。慢性感染症と腫瘍担癌宿主において共通に認められることが多い抑制型自然免疫細胞群 (myeloid derived suppressor cells:MDSC、N2 型好中球、M2 マクロファージの出現メカニズムの解明に繋がるものではないかと考えている。

#### IV 考察

本 DNA ワクチンにより誘導された CTL の標的は癌抗原そのものではなく、腫瘍組織内の MHC クラス I 分子と共に AQP-1 を発現した新生栄養血管である。そのため悪性度が高く MHC クラス I を発現していない癌/腫瘍にも、その組織内の新生栄養血管を破壊することにより、癌細胞の増殖抑制/死滅を誘導することが免疫組織学的解析で明らかとなった。さらに AQP-1 特異的 CTL を誘導する DNA ワクチンは、MHC クラス I の異なった個体や異なった癌抗原を持つ癌/腫瘍に対しても効果を示すユニバーサルワクチンである。

本研究で確立したユビキチン融合アクアポリン 1 DNA ワクチンにより誘導される CTL キラーT 細胞のターゲットは癌抗原そのものではなく、腫瘍組織内の MHC クラス I 分子と共に AQP-1 を発現した新生栄養血管である。そのため悪性度が高く MHC クラス I を発現していない癌/腫瘍にも、その組織内の新生栄養血管を破壊することにより、癌細胞の増殖抑制/死滅を誘導する可能性が極めて高い。さらに AQP-1 特異的 CTL を誘導する DNA ワクチンは MHC クラス I の異なった個体や異なった癌抗原を持つ癌/腫瘍に対しても効果的である事が予想される。癌特異抗原を用いた癌テラーメイドペプチドワクチンでは、個々個人の HLA クラス I 分子のハプロタイプに応じた癌特異抗原蛋白由来のペプチドを同定・合成することが必要であるが、本 DNA ワクチンでは、個々個人の HLA クラス I 分子に適合するアクアポリン 1 由来の抗原ペプチドは自動的に宿主樹状細胞内でユビキチン・プロテアソーム・システムにより切り出され MHC クラス I により抗原提示されるので、ペプチド同定・合成の必要性がない。即ち、本ワクチンはすべてのヒトに適応可能なユニバーサルワクチンである。この様な発想による癌に対する DNA ワクチンの開発研究は皆無に近い。

抗癌薬による科学療法は、悪性腫瘍に対して強力な増殖抑制作用を有しているが、薬剤耐性がしばしば誘導され、また正常細胞の細胞分裂をも阻害するという強い副作用も併せ持つ。本研究で確立した新規癌遺伝子免疫療法は、生体の免疫反応を利用して悪性腫瘍の増殖を促進する血管新生因子を分解するため、MHC クラス I が発現していない、既存の免疫療法が全く無効な悪性度の高い癌に対しても有効である可能性が強く、その副作用は抗癌剤と比較して劇的に軽減できることが予想される。また、投与方法は、皮下の免疫細胞に提示させるだけで十分な効果がみられる、皮下投与型という次世代型抗ガン療法として期待できる。さらに、抗 VEGF 抗体

(Bevacizumab)などの血管新生阻害剤の臨床試験では、阻害剤単独では効果が乏しく、化学療法剤との併用で効果が見られる。本ワクチンでは、癌新生血管を完全に破壊することで化学療法剤との併用なしに単独で制癌作用が期待できる。本ワクチンは副作用も特に認めず安全性が高い、頻回に投与する必要がない、コストが軽減できるなど多くのメリットが想定される。

共同研究者の姫野、石井、仇らが最初に開発した UPS 《ユビキチン・プロテアソーム・システム》の活性化に基づいた、癌抗原遺伝子とユビキチン遺伝子のキメラ遺伝子を用いた DNA ワクチン法は MHC クラス I 分子を発現している癌/腫瘍には著効を示したが、その発現がない悪性癌に対しては無効であった。さら汎腫瘍マーカーである survivin を用いた同様の DNA ワクチンもこの種の癌には無効であった。一般的に癌免疫療法のネックは MHC クラス I 分子が低/無発現の悪性度の高い癌に対処する戦略が見出せないことにある。本研究の如く、“血管新生因子をターゲットにした” 対癌戦略はさらに“新たな血管新生因子やリンパ管新生因子への応用”という、この分野での全く新規の展開へ導く事が予想される。

最後に、本研究事業に貴重なご支援を賜りました、財団法人車両競技公益資金記念財団に対して深謝申し上げます。

## V 研究成果の発表

1. Imai T, Shen J, **Chou B**, Duan X, Tu L, Tetsutani K, Moriya C, Ishida H, Hamano S, Shimokawa C, Hisaeda H, Himeno K\_Involvement of CD8+ T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with Plasmodium yoelii 17XL strain. **Eur J Immunol.** ;40(4):1053-61. 2010
2. **Chou B**, **Hiromatsu K**, Hisaeda H, Duan X, Imai T, Murata S, Tanaka K, Himeno K. Genetic immunization based on the ubiquitin-fusion degradation pathway against Trypanosoma cruzi. **Biochem Biophys Res Commun.** 392(3):277-82. 2010
3. Yamazaki A, Yasunami M, Ofori M, Horie H, Kikuchi M, Helegbe G, Takaki A, **Ishii K**, Omar AH, Akanmori BD, Hirayama K. Human leukocyte antigen class I polymorphisms influence the mild clinical manifestation of Plasmodium falciparum infection in Ghanaian children. **Hum Immunol.** 72(10):881-8. 2011
4. Komori T, Nakamura T, Matsunaga I, Morita D, Hattori Y, Fujiwara N, **Hiromatsu K**, Sugita M. A microbial glycolipid functions as a new class of target antigen for delayed-type hypersensitivity. **J Biol Chem.** 286(19):16800-6. 2011
5. Sato-Deguchi E, Imafuku S, Chou B, Ishii K, **Hiromatsu K**, Nakayama J. Topical vitamin D(3) analogues induce thymic stromal lymphopoietin and cathelicidin in psoriatic skin lesions. **Br J Dermatol.** 167(1):77-84. 2012
6. Hattori Y, Matsunaga I, Komori T, Urakawa T, Nakamura T, Fujiwara N, **Hiromatsu K**, Harashima H, Sugita M. Glycerol monomycolate, a latent tuberculosis-associated mycobacterial lipid, induces eosinophilic hypersensitivity responses in guinea pigs. **Biochem Biophys Res Commun.** 409(2):304-7. 2011

7. **Bin Chou, Kenji Hiromatsu**, Shinji Okano, **Kazunari Ishii**, Xuefeng duan, Tohru Sakai, Shigeo Murata, Keiji Tanaka, and Kunisuke Himeno, Antiangiogenic Tumor Therapy by DNA Vaccine Inducing aquaporin-1-specific CTL based on Ubiquitin-Proteasome system in mice, *J. Immunology* Accepted for publication June 11, 2012 In press
8. 石井一成、廣松賢治、ユビキチン化 DNA ワクチンによる CD8+T 細胞の誘導 臨床免疫・アレルギー科、58(1)1～7, 2012
9. Sato E, Imafuku S, **Ishii K**, Itoh R, **Chou B**, Soejima T, Nakayama J and **Hiromatsu K**. Vitamin d-dependent Cathelicidin inhibits Mycobacterium marinum infection in human monocytic cells. Submitted
10. **Chou B**, Ishii K, Soejima T, **Hiromatsu K**. Induction of myeloid derived suppressor cells in Chlamydia infection is dependent on serum amyloid A proteins. Submitted
11. Itoh R, Murakami I, Suzuki T and **Hiromatsu K**. NLRP3 inflammasome mediated caspase-1 activation is required for intracellular growth of Chlamydia pneumonia in murine macrophages. Submitted
12. Murakami I, Itoh R, Chou B and **Hiromatsu K**. C.pneumoniae can infect and proliferate in adipocytes via activation of NLRP3 inflammsome mediated caspase-1. Submitted