The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Immunity against breast cancer by TERT DNA vaccine primed with chemokine CCL21
Author(s)	山野, 智基
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58236
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【139】

氏　　名	山　野　智　基（やま の とも き）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２４２７６　号
学位授与年月日	平成23年２月21日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
学　位　論　文　名	Immunity against breast cancer by TERT DNA vaccine primed with chemokine CCL21 （ケモカインCCL21の事前投与とTERT DNAワクチンで誘導された乳癌に対する免疫反応）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　金田　安史 （副査） 教　授　土岐祐一郎　　教　授　野口眞三郎

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

腫瘍関連抗原として多くのものが癌ワクチンに用いられているが、メラノーマに代表される腫瘍特異的な抗原が多い。TERT(Telomerase reverse transcriptase)はテロメラーゼの触媒ユニットであり、多くの悪性腫瘍で高発現している一方、ほとんどの正常組織では発現していない。またTERTは悪性腫瘍の増殖、生存に関わっていることが分かっている。従って、癌ワクチンの抗原として用いることが出来れば、多くの悪性腫瘍に適用可能なuniversal tumor antigenとなる。実際TERT特異的なペプチドに対する免疫反応が癌患者、健常人で誘導されていることが分かっており、癌ワクチンとして用いる試みがなされている。しかし、実際の腫瘍に対して効果を示すほど十分な免疫反応を誘導することは難しい。そこで我々は、TERT DNAワクチンにアジュバントとしてケモカインCCL21を加え、マウス乳癌腫瘍に対して抗腫瘍免疫を誘導する方法を検討した。

〔　方　法　〕

（細胞）

使用した細胞はマウス乳癌細胞TS/Aと4T1、マウスメラノーマ細胞B16である。

（動物）

マウス乳癌細胞TS/A と同系のBalb/cマウス（6－8週齢）を動物実験に用いた。

（ワクチンに用いたTERT発現ベクター）

ヒトTERT遺伝子（hTERT）はDr.Weinbergから供与された。BIMAS、SYFPEITHIという二つのコンピュータープログラムで、マウスMHC（H-2K^d）に対してhTERTの抗原性の高いペプチドを予想したところC末端よりの部分に抗原性の高いペプチドが多くあることが分かった。そこでhTERTの686アミノ酸からC末端までをcTERTとして実験に用いた。またユビキチンとPADREというペプチドを免疫反応増強目的でcTERT発現ベクターに組み込み、DNAワクチンに用いるcTERT発現ベクターcTERT/pVaxを作成した。

（cTERT組み換え蛋白）

特異的免疫反応を確認する実験で抗原として用いるために、大腸菌を用いてcTERT組み換え蛋白を作製した。ポリヒスチジン残基を付加し、組み替え蛋白の確認はポリヒスチジン残基に対する抗体を用いてウエスタンブロット法で行った。

（HVJリポソーム法）

DNAワクチンを行う遺伝子導入法として、HVJ-アニオニックリポソーム法を用いた。マウス当たり、1回のDNAワクチンにDNA120μgを用いた。

（ワクチンの方法）

MockワクチンとしてcTERTを含まないベクター（pVax）、cTERT ワクチンとしてcTERTを含む発現ベクター（cTERT/pVax）を1週間隔で3回マウス下肢に投与した。アジュバントとしてマウスCCL21蛋白（0.5μg）をcTERTワクチン施行24時間前に同一部位に投与したものをCCL21/cTERTワクチン、DNAワクチンは行わずCCL21蛋白のみをマウス下肢に投与したものをCCL21ワクチンとした。ワクチン開始2日前にTS/A細胞(3万個)を背部に皮下接種した場合を治療ワクチンモデル、ワクチン終了10日後に皮下接種する場合を予防ワクチンモデルとした。皮下接種後最低21日までは腫瘍径を2-3日おきに測定した。

（抗体反応）

ワクチン終了1週後にマウスから血液を採取し、cTERTに対する抗体反応（IgG2a）を組み替えcTERT蛋白を用いたELISA法で測定した。サンプルの吸光度がコントロール（Mockワクチン）の吸光度に比べて3SD以上高い場合を陽性として、陰性となるまでサンプルを希釈した。陽性となる最大希釈度を抗体価とした。

（サイトカイン測定）

予防ワクチンモデル、治療ワクチンモデル両方でワクチン終了1週後にマウスから脾臓を摘出した。*In vitro*で脾細胞をcTERT蛋白で48時間の刺激した群と刺激しなかった群で、培養上清中のサイトカイン（IFN-γ、IL-4、GM-CSF、TNF-α）産生能をELISA法で測定した。

（DTHの測定）

*In vivo*での細胞性免疫評価としてDTH(遅延型過敏反応)を測定した。予防ワクチンモデルでワクチン終了1週後に10μgのcTERT組み換え蛋白をマウス足底に注射し24時間、48時間後の足底の肥厚分をDTHとして専用の測定器で計測した。1ユニットを0.01mmとした。

（フローサイトメトリー(FACS)）

予防ワクチンモデルでワクチン終了1週後にマウスから脾臓、ワクチン部位の一次リンパ節に当たる鼠径リンパ節を摘出し、*in vitro*で脾細胞、リンパ節細胞をcTERT蛋白で48時間刺激した。CD4Tcell、CD8Tcellの割合、IFN-γ発現細胞の割合をフローサイトメトリー(FACS)で測定した。

（リアルタイムPCR）

マウス培養細胞、ワクチン後のマウス皮下腫瘍でのTERTの遺伝子発現量をリアルタイムPCRで測定した。GAPDHのコピー数も測定し、GAPDH百万コピー当たりのTERTコピー数で評価した。

〔　成　績　〕

（cTERTに対する液性免疫の誘導）

予防ワクチンモデル、治療ワクチンモデル両方でCCL21/cTERTワクチンはcTERTワクチン、CCL21ワクチンに比べて有意に高い抗体価を示した。

（cTERTに対するDTH反応の誘導）

CCL21/cTERTワクチンはMockワクチン、cTERTワクチン、CCL21ワクチンに比べて有意に高いDTHを示した。またcTERTワクチンもMockワクチン、CCL21ワクチンに比べると有意に高いDTHを示した。

（サイトカイン産生）

予防ワクチンモデルでは、CCL21/cTERTワクチンはcTERT蛋白の刺激の有無に関係なくMockワクチン、cTERTワクチンと比べて有意に高いIFN-γ、IL-4、GM-CSFを産生した。治療ワクチンモデルでは、CCL21/cTERTワクチンはcTERT蛋白の刺激の有無に関係なくMockワクチン、cTERTワクチン、CCL21ワクチンと比べて有意に高いIFN-γ、GM-CSF、TNF-αを産生した。

（ワクチン効果）

予防ワクチンモデルでCCL21/cTERTワクチンはMockワクチン、cTERTワクチンに比べて有意

に腫瘍の増殖を抑制した。また治療ワクチンモデルでもCCL21/cTERTワクチンはMockワクチン、cTERTワクチン、CCL21ワクチンに比べて有意に腫瘍の増殖を抑制した。しかし、cTERTワクチン単独ではMockワクチンに比べて有意な腫瘍増殖抑制効果はどちらのモデルでも示さなかった。

（フローサイトメトリー）

CCL21/cTERTワクチンは、Mockワクチン、cTERTワクチン、CCL21ワクチンと比べ脾臓ではCD4Tcell、CD8Tcellの割合に差は無かったがIFN-γを産生するCD4Tcell、CD8Tcellの割合は著しく増加していた。一方、リンパ節ではCD4Tcell、CD8Tcellの割合、IFN-γを産生するCD4Tcell、CD8Tcellの割合にワクチン間で差は無かった。

（マウス培養細胞、ワクチン後の腫瘍内でのTERT発現量）

マウス乳癌細胞TS/A,4T1,メラノーマ細胞B16は全てTERTを発現していた。ワクチン後の腫瘍内でのTERT発現量は腫瘍増殖に差があるにも関わらずワクチン間で差が無かった。

〔　総　　括　〕

CCL21を事前に投与しておくことで、cTERT DNAワクチンの免疫効果を高め、TERT発現乳癌腫瘍の増殖を抑制することが出来た。これはcTERT特異的な細胞性免疫、液性免疫を誘導出来たためと考えられた。

論文審査の結果の要旨

癌ワクチンに用いられる腫瘍関連抗原の多くは癌特異的なものが多く、疾患ごとに違う抗原を用いる必要がある。TERT(Telomerase reverse transcriptase)はテロメアを伸長させるテロメラーゼの触媒ユニットであり、正常細胞ではほとんど発現していないが、多くの悪性腫瘍で高発現している。本研究ではこのTERTを抗原とする癌DNAワクチンによりマウス乳癌皮下腫瘍モデルに対して抗腫瘍免疫を誘導する方法を検討した。ケモケインCCL21をワクチンのアジュバントとして用いることで、TERTに対する液性免疫、細胞性免疫を誘導し、腫瘍増殖を抑制する抗腫瘍免疫が得られることを示した。得られた結果はTERTによる多疾患に対する癌ワクチンの可能性、CCL21の癌ワクチンにおける高いアジュバント効果を示すものであり、他の抗原を用いるワクチンへの応用も考えられる価値のあるものである。よって本論文は博士（医学）の学位授与に値すると認められる。