

# 新規ナノ粒子アジュバントを利用した犬癌ワクチンの臨床応用

桃井康行、仁位紀生、田崎由実

## <はじめに>

伴侶動物の獣医療では腫瘍は重要な疾患となっている。獣医療においても腫瘍の治療は医療分野同様、外科手術、放射線療法、化学療法が3本柱である。癌に対する免疫療法は、以前からその副作用の少なさとその効果が期待されてきた。近年、医療分野において抗CD20ヒト化抗体など新しい養子免疫の有効性が科学的に示されるようになったが、癌患者自身の免疫系の強化を狙った治療法についてはまだ十分な成果が得られていない。本研究では犬でよくみられる腫瘍を標的として、腫瘍特異的ペプチドを用いた抗腫瘍免疫の惹起を試みた。一般に、人を含む担癌動物において免疫療法により臨床的な成果を得ることが難しいのは、十分な免疫反応が惹起できないからである。その要因として、担癌動物の免疫能の低下、罹患動物の多くが高齢であること、癌抗原といえども基本的には自己抗原であり免疫寛容となっていることが要因と考えられる。これを打破するのは容易ではないが、打破のために鍵となるのがアジュバントと考えられる。これまでの強力なアジュバントには強い障害性がみられることが多かったが、本研究では全く新しいタイプのアジュバントとして生体分解性ナノ粒子を用いた癌ワクチンの可能性について検討してみた。具体的には犬で好発する2種類の腫瘍、すなわち第1章ではB細胞性リンパ腫を、第2章では悪性黒色腫（メラノーマ）対象として免疫能の誘導を検討した。また将来の免疫療法のためにそれぞれの腫瘍について標的となりうる腫瘍特異抗原の発現プラスミドを構築した。

本研究は科研費、基盤研究(C)：課題番号 23580443（2011～2013）の助成を受けて実施された。また、第1章のデータは仁位紀生君、第2章のデータは田崎由実君の卒業論文となっている（一部改変）。

## <目次>

第1章：犬のB細胞性リンパ腫に対するCD20を標的とした免疫療法	2
第2章：イヌのメラノーマ特異抗原Melan-A, TRP-2を標的としたワクチン療法	41
謝辞・総括	71

## 第1章 犬のB細胞性リンパ腫に対するCD20を標的とした免疫療法

### <要旨>

イヌのリンパ腫の多くを占めるB細胞性リンパ腫は、化学療法によく反応するため多くの症例で完全寛解に導入できる。しかしほとんどの症例が再発し、2年以内に死亡するため、新しい治療法が期待される。CD20はB細胞に発現する4回膜貫通型蛋白で、人医領域ではB細胞性リンパ腫に対してCD20を標的とした治療用のモノクローナル抗体(mAb)が臨床応用されている。イヌのリンパ腫に対してもCD20を標的とした治療が可能であると考え本研究を行った。本研究ではまず、ペプチドワクチン療法の開発を試みた。ヒトの治療用抗CD20mAbのエピトープを参考に、イヌCD20の第2細胞外領域の29アミノ酸残基で分子内ジスルフィド結合を保持したDog-CD20ペプチドを合成した。免疫原性の評価のため、キャリアー蛋白であるKLHと結合させウサギを免疫したところ、CD20ペプチドに対する著しい抗体価の上昇が認められた。そこでKLH結合Dog-CD20に、強力な免疫賦活作用を有し生体内吸収される $\gamma$ -PGAナノ粒子をアジュバントとして加えたペプチドワクチンを、健常犬および寛解導入されたリンパ腫症例に接種した。その結果、ワクチン投与に対する副作用は認められず、ウサギと比較して弱いものの、健常犬とリンパ腫症例それぞれに抗体産生が認められた。しかし、健常犬のリンパ球サブセットの変化をフローサイトメトリー(FCM)で解析したところ、ワクチン投与によるB細胞の減少はみられなかった。またリンパ腫のイヌでもワクチン投与後にリンパ腫の再発がみられたことから、有効なB細胞除去がおきていないことが示唆された。この原因を解析するため、ペプチドワクチンで免疫したウサギ血清をイヌリンパ球に反応させてFCMで解析したところ、ウサギ血清はイヌB細胞と反応しないことが示された。ウサギで産生された抗体は、コンフォーメーションの相違のため、細胞上のイヌCD20を認識しないことが示唆された。今後CD20ペプチドワクチンを有用なものにするためには、立体構造を維持した高分子のペプチドや立体構造を模倣するミモトープの開発が必要である。また、実際の症例は免疫能が低下していることも多いと思われ、より強力に免疫を誘導する手法の開発も必要であると考えられた。

次に治療用抗CD20イヌ化抗体の作製を目指して、イヌCD20発現細胞の作製を試みた。これまでイヌCD20の細胞外領域を認識するモノクローナル抗体は知られていない。B細胞性リンパ腫の犬からイヌCD20cDNAをクローニングし、5'、または3'側にGFP遺伝子を組み込んだ2種の発現プラスミドを構築した。HEK293細胞へ導入したところ、FCMによりGFP蛋白の発現がみられ、CD20-GFP融合蛋白の発現が示唆された。今後このイヌCD20発現細胞をマウスやラットの細胞へ導入し免疫源とすることで、イヌの細胞外領域を認識する抗イヌCD20mAbの作製を行い、そのmAbの相補性決定領域のアミノ酸配列を参考に、治療用抗イヌCD20mAbの作製ができると考えられた。

## 序論

リンパ腫はイヌで最も多くみられる造血器腫瘍であり、全造血器腫瘍のおよそ 90%を占める [1]。英国で保険に加入しているイヌのデータによると、90/100,000 頭の発生率であったとされる [2]。現在のところ感染因子の関与は知られていないが、飼育環境や化学物質などの環境要因が関与していることも示唆されている [3-5]。

イヌのリンパ腫は、フローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原の解析 [6-10]、T 細胞レセプター $\gamma$ 鎖や免疫グロブリン H 鎖の遺伝子再構成解析 [11,12]を行い細胞起源が分類されている。イヌのリンパ腫は B 細胞由来が 74~83%と多く [1]、多くの研究で B 細胞性リンパ腫の生存期間は T 細胞性リンパ腫に比べ長いことが報告されている [13-15]。また B 細胞性リンパ腫は完全寛解への導入率 (B 細胞性 : 81~84%、T 細胞性 : 50~67%) [1]および完全寛解期間の中央値 (B 細胞性 : 12 ヶ月、T 細胞性 : 8 カ月) [13]においても、T 細胞性リンパ腫に比べて良好であることが示されている。

イヌのリンパ腫では、現在 4~6 種類の抗癌剤を併用する治療プロトコールが用いられることが多い。完全寛解導入後には維持療法を行うプロトコール [16]もあるが、現在は化学療法を休止するプロトコールが用いられることが多い [1,17,18]。近年この寛解期間を生かし、テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) を標的としたワクチン療法 [19]や、抗腫瘍免疫誘導のための腫瘍抗原をコーティングしたマイクロビーズ投与 [20]などの免疫治療の研究が行われている。

ヒトでは B 細胞性リンパ腫の症例を対象に、リツキシマブなどの CD20 分子を標的とした抗ヒト CD20 モノクローナル抗体が臨床応用されており、生存期間を延長することが示されている [21-24]。ヒト CD20 は 4 つの膜貫通領域を持つ約 35kDa の糖鎖不含疎水性膜蛋白で、ほぼ B 細胞のみに特異的に発現している。CD20 は細胞膜では 4 量体を形成してカルシウムチャンネルとして機能する。B 細胞が活性化することで CD20 発現が増加し、さらに CD20 がリン酸化されると、B 細胞内のカルシウム濃度が上昇する。CD20 はこのような機構を介して細胞回転や B 細胞分化に関与していると考えられている [25,26]。CD20 はプレ B 細胞から 成熟 B 細胞までの分化段階にある B 細胞に発現し、プロ B 細胞や形質細胞には発現しない [27,28]とされているが、ヒトの B 細胞性リンパ腫症例では 93%と高率に発現していた [29]。イヌ CD20 遺伝子は 2005 年に cDNA が単離解析されており、CD20 がイヌにおいても正常 B 細胞や多くの B 細胞性リンパ腫で発現していることが報告されている [30]。イヌ CD20 のアミノ酸配列は、ヒト CD20 の配列と 73%、マウス CD20 の配列と 68%の相動性を示しており、基本的な分子構造や機能はヒトやマウスと類似していることが示唆される [30]。しかし現在利用されている多くのヒトやマウスに対する CD20 抗体は、一部の細胞内領域を認識する抗体を除いてイヌ CD20 には反応しない [31,32]。また、生体外でイヌの正常 B 細胞および B 細胞性リンパ腫に対するリツキシマブの反応性を評価した研究 [33]では、リツキシマブはイヌ CD20 とは反応せず、イヌのリンパ腫治療に利用できないことが示された。リツキシマブに代表される抗ヒト CD20 モノクローナル抗体の多くが、第二細胞外領域の分子内ジスルフィド結合を含む領域を認識していることが知られており [34,35]、イヌにおいても CD20 を標的とした抗体製剤を考えた場合、CD20 分子内の唯一の大きな細胞外領域である第 2 細胞外領域を標的にすることになると推測される。

1991 年にベルギーの Boon T らによりヒトの悪性黒色腫に特異的なペプチド抗原が発見され

て以来[36]、ヒトでは腫瘍特異的な抗原の検索とその抗原を用いた免疫療法の開発が進められている。腫瘍由来ペプチドを使用した癌免疫療法の治療成績は必ずしも十分とは言えないが、前立腺癌を対象にして、患者由来の樹状細胞に前立腺酸性フォスファターゼペプチドを提示して投与する sipuleucel-T では、512 人の患者を対象とした試験が行われ、3 年生存率がプラセボ群と比較して 38%改善している[37]。また樹状細胞を使わず腫瘍に特異的なペプチド抗原を、アジュバントと共に投与するペプチドワクチンもリンパ腫、膀胱癌、膵癌、悪性黒色腫など、様々な腫瘍を対象に臨床試験が進められている[38-41]。これらのペプチドワクチンは HLA 型による適応症例の制限や、十分な治療効果を上げられないなど解決すべき課題も多いが、手術、放射線治療、化学療法に次ぐ新しい治療法として期待されている。またペプチドワクチンは、自己免疫を誘導するために効果が持続する可能性があり、さらに抗体医薬品に比べ安価になることが予想されるため、獣医領域でも比較的臨床応用が行いやすいと考えられる。

イヌで多く認められる B 細胞性リンパ腫では、多くの症例で化学療法により完全寛解に導くことができるが、その場合でも腫瘍細胞が残存しており、ほとんどの症例で再発が認められる[14,42]。本研究では化学療法により完全寛解導入した B 細胞性リンパ腫のイヌを対象に使用する、イヌ CD20 ペプチドワクチンの開発を目指した。合成したイヌ CD20 ペプチドをウサギへ投与することで、ペプチドの免疫原性の評価を行い、イヌ CD20 の細胞外領域を認識する抗血清の作製を試みた。またアジュバントとして $\gamma$ -PGA ナノ粒子を用い、イヌ CD20 ペプチドを健康犬および B 細胞性リンパ腫の症例に投与し、その効果や副作用を評価した。さらに将来的な治療用の抗イヌ CD20 イヌ化抗体作製のために、イヌ CD20 発現プラスミドを構築し、イヌ CD20 発現細胞を作製した。

## 材料と方法

### 1 イヌ CD20 エピトープを含むペプチドの合成

CD20 は 4 回膜貫通型の膜蛋白で、ヒトの治療用モノクローナル抗体は第二細胞外領域に存在するジスルフィド結合付近のエピトープを認識することが知られている[34,35]。これまで報告されているイヌ CD20 のアミノ酸配列[30]を参照し、第二細胞外領域の 29 アミノ酸残基 (Fig.1, NH<sub>3</sub>-APMPYVDIHNCDPANPSEKNSLSICYCGS-COOH) の合成を依頼し (ベックス, 東京)、分子内システイン結合を形成する純度 90%以上のペプチド (Dog-CD20) が得られた。このペプチドを免疫および測定に用いるため、Dog-CD20 1mg に対し、キャリア蛋白であるキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) 2mg、または卵白アルブミン (OVA) 2mg とジカルボン酸リンカーを介して結合し、それぞれ Dog-CD20-KLH および Dog-CD20-OVA とした。

### 2 抗イヌ CD20 抗血清の作製

イヌ CD20 ペプチドワクチンを臨床応用するためには、症例の腫瘍細胞における CD20 発現を迅速に解析して適応症例を決定する必要がある。しかし現在利用可能なヒトやマウスの抗 CD20 モノクローナル抗体でイヌ CD20 の細胞外領域を認識するものは知られていない[31]。そこで本研究では合成したペプチドを用い、抗イヌ CD20 抗血清の作製を試みた。

#### 2-1 ウサギへの免疫

Dog-CD20 のウサギへの免疫と抗体価の評価は、株式会社ベックスへ依頼した。雌の日本白色種ウサギに対し、dog-CD20-KLH を免疫源として、2 週間毎に計 5 回皮下投与して免疫した。初回投与時には完全フロイントアジュバントと共に dog-CD20-KLH 200 $\mu$ g を投与し、2~5 回目投与時には不完全フロイントアジュバントと共に dog-CD20-KLH 100 $\mu$ g を投与した。免疫開始前と投与開始 5 週間後の血清を採取し、ELISA 法で Dog-CD20 に対する抗体価を測定した。抗体価測定のため Dog-CD20-OVA (濃度 10  $\mu$  g/ml) を 96 穴プレートに吸着させ、洗浄後 1,000~128,000 倍で段階希釈したウサギ血清を添加し、反応させた。洗浄後に 2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体を加えて反応させ、Tetramethyl Benzidine (TMB) で反応させた後、1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えて反応を停止し、波長 450nm で吸光度を測定した。

#### 2-2 ウサギ抗血清のイヌ B 細胞に対する反応

dog-CD20-KLH で免疫したウサギ血清がイヌ B 細胞上の CD20 分子に反応するか検討した。臨床的に健常な犬 (雑種、未避妊雌) の頸静脈より 5ml を採血し、直ちに BD バキュティナ™ CPT™ 単核球分離用真空採血管 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) に全量加えた。8~10 回転倒混和後 1,800  $\times$  g で 15 分間比重遠心を行い、採取した単核球分画を、1.5ml マイクロチューブに分注した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-), 和光純薬工業, 大阪) に 1% のウシ胎児血清 (FetalClone II, サーマフィッシャーサイエンティフィック, 横浜) を添加した PBS-FBS を加えて 820  $\times$  g で 3 分間遠心し、洗浄した。ペレットにした単核球細胞に Dog-CD20 peptide-KLH で免疫したウサギの抗血清 50  $\mu$ l および 10 $\mu$ g/ml に希釈したマウス抗イヌ CD21 モノクローナル抗体 (Clone: CA2.1D6, AbD Serotec MorphoSys, Oxford, UK) 30  $\mu$ l を加えて浮遊させ、4 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。PBS-FBS で 1 回洗浄した後、10 $\mu$ g/ml に希釈し

たヤギ抗ウサギ IgG (H+L)-R-PE (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 30 $\mu$ l と、2.5 $\mu$ g/ml に希釈したフルオレセイン (FITC) 標識ヤギ抗マウス IgM+IgG+IgA (H+L)-F (ab')<sub>2</sub>フラグメント (Beckman Coulter, Brea, CA) 30 $\mu$ l を加えて浮遊させ、4 $^{\circ}$ C で30分間反応させた。PBS-FBS で4回洗浄後に PBS-FBS を1ml 加えて浮遊させた。調整した細胞液は、FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company) および付属のソフトウェア CellQuest Pro™を用いて、リンパ球と思われる分画の細胞20,000個についてフローサイトメトリ解析を行った。

### 3 健常犬に対する CD20 ペプチドワクチンの投与

健常犬に対するペプチドワクチンの投与を行い、その効果および副作用を検討した。

#### 3-1 対象犬

鹿児島大学附属動物病院で飼育する、約 15 歳齢、体重 22kg の未去勢雄の雑種犬を用いた。対象犬へのペプチドワクチン投与と評価については、鹿児島大学動物実験委員会の承認を受けている (承認番号 A10038 号)。

#### 3-2 CD20 ペプチドワクチンの投与

投与直前に Dog-CD20 -KLH を PBS (-) で 1mg/ml とし、この溶液 1ml に対しアジュバントとして疎水化  $\gamma$ -ポリグルタミン酸 ( $\gamma$ -PGA) ナノ粒子[43-48] (大阪大学大学院工学研究科, 明石満教授より分与) 10mg を加えて 1.5ml マイクロチューブに入れ、超音波洗浄機を用いて懸濁した。肩甲間の表皮をアルコール消毒し、25G 注射針 (トップ, 東京)、1ml ツベルクリン用シリンジ (テルモ, 東京) を用いて皮下へ注射した。投与は初回投与日から 2、6、10、14 週目に計 5 回行った (Fig.2 A)。

#### 3-3 評価項目

##### i 皮内試験および遅延型アレルギー反応 (DTH)

ペプチドに対する反応を見るためにワクチン投与前に皮内試験を行った。犬の側腹部を剃毛し、Dog-CD20 (2mg/ml) と、Dog-CD20 -KLH (2mg/ml) を、各 0.05ml ずつ剃毛した部位の皮内に注射した。投与は 27G2 段針 (トップ)、1ml ツベルクリン用シリンジを用いて行った。投与 15 分後の接種部の発赤、膨疹のサイズを計測した。また皮内試験 24 時間後に、接種部の発赤、硬結のサイズを計測し、遅延型アレルギー反応を評価した。

##### ii ペプチドワクチン投与犬の末梢血リンパ球サブセットの変化

初回投与日 (0 週目)、3 回目投与日 (6 週目)、5 回目投与日 (14 週目) の計 3 回のペプチドワクチン投与前に対象犬から血液を 5ml 採取し、前述の方法で単核球分画を採取した。1.5ml のマイクロチューブに分注し、PBS-FBS を加えて 820 $\times$ g で 3 分間遠心し、ペレットにした細胞に、イヌの白血球表面抗原に対する各種モノクローナル抗体を加えて浮遊させ、4 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。今回使用した抗体およびその濃度、添加量は以下のとおりである。マウス抗イヌ CD3 抗体 (25 $\mu$ g/ml) (Clone:CA17.2A12, AbD Serotec MorphoSys) 30 $\mu$ l、マウス抗イヌ CD4

抗体 (25 $\mu$ g/ml) (Clone:296712, R&D Systems, Minneapolis, MN) 100 $\mu$ l、マウス抗イヌ CD8 抗体 (10 倍希釈) (Clone:CA15.4G2, AbD Serotec MorphoSys) 60 $\mu$ l、マウス抗ヒト CD11c 抗体 (25 $\mu$ g/ml) (Clone:BU15, AbD Serotec MorphoSys) 30 $\mu$ l、マウス抗イヌ CD21 抗体 (10 $\mu$ g/ml) 30 $\mu$ l。反応後 PBS-FBS で洗浄し、2.5 $\mu$ g/ml に希釈した FITC 標識ヤギ抗マウス IgM+IgG+IgA(H+L)-F(ab')<sub>2</sub> フラグメントを 30 $\mu$ l ずつ加えて細胞を浮遊させ、4 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。PBS-FBS で 3 回洗浄後に PBS-FBS 1ml で浮遊させて、FACSCalibur および付属のソフトウェア CellQuest Pro™を用いて解析を行った。

### iii Dog-CD20 peptide に対する抗体価の測定

初回投与日 (0 週目)、2 回目投与日 (2 週目)、5 回目投与日 (14 週目) の計 3 回のペプチドワクチン投与前に対象犬から血清を採取し、イヌ CD20 ペプチドに対する抗体価を ELISA 法で評価した。PBS (-) で Dog-CD20-OVA または Dog-CD20-KLH を 1 $\mu$ g/ml に、卵白アルブミン (和光純薬工業) を 2 $\mu$ g/ml に希釈し、96 穴 ELISA 用プレート (ELISA 用プレート H, 住友ベークライト, 東京) に 100 $\mu$ l ずつの分注し、4 $^{\circ}$ C で一晩吸着させた。各ウェルを 0.05% の Tween20 (ナカライテスク, 京都) を含む PBS (PBS-Tween) 200 $\mu$ l で 3 回洗浄した。洗浄後 Neptune Block with Nonmammalian-Based Blocker (ImmunoChemistry Technologies, LLC, Bloomington, MN) を各ウェル 200 $\mu$ l ずつ添加し、室温で 4 時間ブロッキングを行った。PBS-Tween で 3 回洗浄し、対象犬の血清を PBS (-) で 20 倍、40 倍、60 倍、80 倍、100 倍、500 倍、2,500 倍、10,000 倍に希釈したものを各ウェル 100 $\mu$ l ずつ入れ、室温で 1 時間振とうして反応させた。PBS-Tween 200 $\mu$ l で 5 回洗浄し、PBS (-) で 50ng/ml に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗イヌ IgG(H+L) 抗体 (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) を各ウェル 100 $\mu$ l ずつ入れ、室温で 1 時間振とうして反応させた。PBS-Tween で 5 回洗浄し、SIGMAFAST™ OPD タブレット (シグマ アルドリッチ ジャパン, 東京) を用いて調整した基質液を各ウェル 200 $\mu$ l ずつ入れ、37 $^{\circ}$ C の遮光状態で反応させた。30 分後に 3mol/L に調整した塩酸 (ナカライテスク) を 50 $\mu$ l/well ずつ加え、マイクロプレートリーダー SpectraMax M2 (モレキュラーデバイス ジャパン, 東京) および解析ソフトウェア SoftMax Pro を用いて波長 492nm の吸光度を測定した。抗体価の測定はすべて 3 重試験で行った。

### iv 副作用

投与部位の搔痒や潰瘍形成がないかをワクチン投与日から 1 週間観察した。また投与後 30 分以内に呼吸困難や意識障害、全身性の膨疹や紅斑等のアナフィラキシー症状を呈することがないか観察した。

## 4 リンパ腫症例に対する CD20 ペプチドワクチンの投与

12 歳 9 カ月齢、体重 3.8kg の雌のマルチーズを対象症例とした。症例は臨床試験開始の 9 か月前に、鹿児島大学附属動物病院へ下顎および膝窩リンパ節の腫大を主訴に来院し、針吸引生検サンプルの細胞診で多数の異型リンパ球を認められていた。リンパ節吸引細胞を試料とした解析で、免疫グロブリン遺伝子にクローン性の再構成がみられ、B 細胞性リンパ腫と診断された。診

断後 UW-25 プロトコール[17]を基本にした多剤併用療法にて治療され、完全寛解期に至っていた。休薬期間中、オーナーが更なる治療を希望したため、治験内容を説明し、書面による同意の上、Dog-CD20 を使用した臨床試験を行った。臨床試験は、多剤併用プロトコールを終えた日から3カ月後に開始した。投与は前述と同じ方法で初回から3回目までの投与を隔週で行い、4,5回目の投与は一カ月毎に行う予定とした (Fig.2 B)。投与前には皮内試験を行い、一般状態や体表リンパ節の大きさ、全血球計算、血液生化学検査等をモニターした。また免疫前と4回目の投与前の血清を採取し、Dog-CD20 に対する抗体価を測定した。皮内試験、抗体価の測定は前述の健常犬に対する投与時と同様の方法で行った。副作用の評価のため、投与後30分以内に呼吸困難や意識障害、全身性の膨疹や紅斑といったアナフィラキシー症状を呈することがないか観察した。また、帰宅後に投与部位の搔痒や潰瘍形成がないかオーナーに観察を依頼した。

## 5 イヌ CD20 発現細胞の作製

イヌに対してペプチドワクチンを投与した際の CD20 に対する抗体産生の評価、およびイヌの細胞外領域を認識する抗イヌ CD20 抗体作製の免疫源として用いるために、リコンビナントイヌ CD20 分子を発現する細胞を作製した。

### 5-1 イヌ CD20 cDNA のクローニング

B 細胞性リンパ腫と診断された4歳齢雄のミニチュア・ダックスフントから胸水を採取し、PureLink™ RNA Mini kit (ライフテクノロジーズジャパン, 東京) 用い、キットの添付プロトコールに従って total RNA を抽出した。抽出した total RNA をテンプレートとして、ReverTra-Plus™ (東洋紡績, 大阪) を用いて、キットの添付プロトコールに従い逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を行った。Total RNA (0.24µg/ml) 7µl をテンプレートとして、キットに付属されている Oligo (dT-20) primer 5µl を加え、42°C 60 分間、85°C 5 分間で逆転写反応を行った。PCR 反応のためのプライマーは、これまで報告されているイヌ CD20mRNA 配列[30]を参考にして、F01 primer および R01 primer をデザインし、株式会社ベックスに合成を依頼した (Table.1)。F01 primer は開始コドンから5塩基上流のヌクレオチドを含み、方向性を保ってクローニングするため5'末端に cacc の4塩基を付加している。また R01 Primer は CD20 コーディング領域で終始コドンの1塩基上流までを含むようにした。DNA の増幅には Blend Taq® -Plus- (東洋紡績) を用いた。逆転写反応の産物 2µl をテンプレートに反応液 50µl として、94°C 2 分間で加温した後で、94°C 10 秒の熱変性、55°C 30 秒のアニーリング、72°C 60 秒の伸長反応を30サイクル行った。PCR 産物を1.5%のアガロースゲルで電気泳動し、トリス酢酸-EDTA 緩衝液 (TAE, 和光純薬工業) で10,000倍希釈した SYBR Safe DNA gel stain (ライフテクノロジーズジャパン) で染色後、青色 LED トランスイルミネーター (オプトコード, 東京) を用いて観察した。

### 5-2 イヌ CD20 発現プラスミドの作製

イヌ CD20 を Green Fluorescent Protein (GFP) との融合蛋白として発現させるため、プラスミド構築を行った。F01 primer と R01 primer を用いて PCR 法により増幅した DNA 断片を、



pENTR™D-TOPO® Cloning Kit (ライフテクノロジーズジャパン) を用い、添付プロトコールに従って、Gateway® Entry ベクターへライゲーションした。この反応液を用い、コンピテント細胞 One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (ライフテクノロジーズジャパン) を形質転換し、50µg/ml のカナマイシンを加えた Luria-Bertani (LB) プレートで選択した。形成されたコロニー10個について、50µg/ml のカナマイシンを加えた LB 液体培地で、37°C で培養後、Mini Plus™ Plasmid DNA Extraction System (Viogene Bio Tek Corporation, Taipei, Taiwan) でプラスミドを抽出し、pENTR™D-TOPO® Cloning Kit に付属している M13 Forward (-20) Primer と R01 Primer で、Blend Taq® -Plus- (東洋紡績) を用いて PCR 法によりスクリーニングを行った。反応条件は 94°C 2 分間で加温した後、94°C 10 秒、53°C 30 秒、72°C 60 秒で 30 サイクルとした。PCR 産物を泳動後に SYBR Safe DNA gel stain で染色し、陽性クローン (pENTR-CD20) を選択した。この pENTR-CD20 を用いてイヌ CD20 の C 末端に GFP を結合する、CD20-GFP 融合蛋白を発現するためのプラスミド構築を行った。発現ベクターとして、遺伝子導入領域の下流に GFP 遺伝子をコードする pcDNA-DEST47 (Fig.5-A, ライフテクノロジーズジャパン) を用いた。*E. coli* Expression System with Gateway™ Technology (ライフテクノロジーズジャパン) を用い、添付プロトコールに従って pENTR-CD20 と pcDNA-DEST47 の LR Recombination 反応を行い、イヌ CD20 遺伝子を pcDNA-DEST47 へ組み換えた。反応後、前述の方法で形質転換し、100µg/ml のアンピシリンを加えた LB プレートを用いて選択し、発現プラスミドの抽出を行った。PCR 法による陽性クローン pDEST-CD20 のスクリーニングは T7 Forward Primer と R01 Primer を用い、pENTR-CD20 と同様の反応条件で行った。次にイヌ CD20 の N 末端に GFP を結合する、CD20-GFP 結合蛋白を発現するプラスミドの構築を行った。発現ベクターとして、マルチクローニングサイト上流に GFP 遺伝子をコードする pCruz GFP-A (Fig.5-B, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を用いた。PCR のテンプレートとして pDEST-CD20 を用い、プライマーには開始コドンを含み、発現ベクターへのライゲーション時の読み枠を合わせるために 5'側に atcg を付加した F02 Primer と、イヌ CD20 mRNA の終始コドンを含む R02 Primer を用いた (Table.1)。DNA の増幅には KOD -Plus- (東洋紡績) を用い、反応条件は 94°C 2 分間で加温した後、98°C 10 秒、52°C 30 秒、68°C 60 秒で 30 サイクルとした。pCruz GFP-A を制限酵素 *EcoRV* (Promega, Madison, WI) により、37°C で 1 時間消化し、その後セルフライゲーションを防ぐため、37°C で 30 分間アルカリフォスファターゼ (TSAP, Promega) 処理を行い、74°C 15 分間で不活化した。このプラスミド 50ng と PCR 産物のモル比がプラスミド : PCR 産物 = 1 : 3 になるよう混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により精製した。その後 TA-Blunt Ligation Kit (ニッポンジーン, 東京) の添付プロトコールに従い 16°C 16 時間ライゲーション反応を行った。反応液を前述の方法で形質転換し、50µg/ml のカナマイシンを加えた LB プレートで選択後、発現プラスミドの抽出を行った。陽性クローン pCruz-CD20 のスクリーニングは T7 Forward Primer と R02 Primer を用いて前述の反応条件で行った。

### 5-3 塩基配列の決定

作製したプラスミドの塩基配列の決定は、北海道システムサイエンス株式会社 (北海道) に依

頼し、Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer および BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ライフテクノロジーズジャパン) を用いて、ダイターミネーター法で行われた。シークエンス用プライマーとして、pENTR-CD20 は M13 Forward (-20) Primer および イヌ CD20 コーディング領域に設計した F03 Primer (Table.1) を、pDEST-CD20 は T7 Forward Primer および F03 Primer を、pCruz-CD20 は pCruz GFP の GFP 遺伝子内に設計した F04 Primer (5'-agcaaagacccaacgagaa-3') および F03 Primer を用い、CD20 と GFP 遺伝子の結合部位を中心に片側のみ塩基配列を決定した。

#### 5-4 HEK293 細胞および NIH3T3 細胞への遺伝子導入

##### i 細胞培養

ヒト胎児腎細胞由来の HEK293 細胞 [49-51]は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団(東京) から分与を受けた (JCRB9068)。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 和光純薬工業) に 5%のウシ胎児血清および 1v/v%のペニシリン-ストレプトマイシン-ネオマイシン抗生物質混合液 (Penicillin-Streptomycin-Neomycin (PSN) Antibiotic Mixture (100×), ライフテクノロジーズジャパン) を加えて培養液として、25cm<sup>2</sup>の細胞培養フラスコ (Cell Culture Flask 25cm<sup>2</sup>, Plug Cup, SPL Life Sciences, Gyeonggi-do, Korea) を用い、5%CO<sub>2</sub> 37°Cで培養し、細胞がおおよそ 70~80% confluent となった時に継代した。継代時は培養液を廃棄し、0.5ml の TtypeLE Express (ライフテクノロジーズジャパン) を加え、5 分間 5%CO<sub>2</sub> 37°Cで静置した後で細胞を浮遊させ、新しい培養液で約 10 倍に希釈した。

##### ii トランスフェクション

HEK293 細胞を 6 穴培養プレート (6 well Cell Culture Plate, SPL Life Sciences Inc., Gyeonggi, Korea) で 50~70% confluent になるまで培養した。X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (ロシュ・ダイアグノスティックス, 東京) を用いて添付プロトコールに従い遺伝子導入した。すなわち 1.5ml マイクロチューブに DMEM を 200μl 入れ、プラスミド DNA を 2μg 加え、ピペッティングした。導入に用いたプラスミド DNA は、イヌ CD20 発現プラスミドとして pDEST-CD20 と pCruz-CD20、陽性コントロールとして pcDNA-DEST47 のキットに添付されている GFP-chloramphenicol acetyl transferase (CAT) 融合蛋白発現プラスミド pcDNA/GW-47/CAT、pCruz GFP のキットに含まれる lacZ 遺伝子が挿入された発現プラスミド pCruz GFP-L、陰性コントロールとして pMD20-T vector (タカラバイオ, 滋賀) を用いた。その後室温にした X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent を攪拌してチューブに 6μl 添加後、室温で 30 分間インキュベートした。この溶液をシャーレの各ウェルへ添加し、攪拌後に 5%CO<sub>2</sub> 37°Cで培養した。

#### 5-6 導入細胞におけるイヌ CD20 発現の評価

フローサイトメトリーにより、HEK293 細胞におけるリコンビナントイヌ CD20 分子の発現解析を行った。導入細胞はトランスフェクションの 48 時間後に、0.2ml の TtypeLE Express で 5 分間 5%CO<sub>2</sub> 37°Cで反応させた後、DMEM 1ml で浮遊させ細胞液とした。細胞液は

FACSCalibur および付属のソフトウェア CellQuest Pro™を用いて、生細胞と思われる分画の 20,000 個の細胞についてフローサイトメトリー解析を行った。

## 結果（本文）

### 1 イヌ CD20 ペプチドで免疫したウサギ血清のイヌ CD20 分子に対する反応

#### 1-1 イヌ CD20 ペプチドに対する抗体価

Dog-CD20-KLH で免疫したウサギにおいて、Dog-CD20 に対する抗体産生を評価するため、免疫前後のウサギ血清中の抗体価を ELISA 法で測定した（ベックスに依頼）。キャリアーとして用いた KLH に対する抗体の影響を考慮し、Dog-CD20-OVA に対する反応で抗体価を測定した。免疫前には血清の希釈倍率 1,000~128,000 倍で吸光度は 0.050 以下であった。これに対し免疫後には、血清の希釈倍率 1,000~4,000 倍で吸光度 2.500 以上であり、以下は希釈倍率依存的に減少し、128,000 倍においても吸光度は 0.333 であった（Fig.3）。以上の結果より、免疫したウサギにおいて Dog-CD20 に対する抗体が産生されていることが示された。

#### 1-2 ウサギ血清のイヌ B 細胞表面抗原に対する反応性

Dog-CD20-KLH で免疫したウサギ血清がイヌ B 細胞上発現している CD20 に反応するかを評価するため、健常犬の末梢血単核球を分離し、免疫したウサギの血清と反応させ、フローサイトメトリーで解析した（Fig.4A）。免疫したウサギ血清と反応したリンパ球は 0.5%（Fig.4B）であり、コントロールとして用いた免疫していないウサギの血清で染色した場合（0.7%）（Fig.4C）とほぼ同程度の陽性率であり、免疫したウサギ血清のイヌリンパ球に対する反応は認められなかった。また免疫したウサギ血清と抗イヌ CD21 抗体で二重染色した場合、血清と反応したリンパ球は 0.9%、血清と反応した CD21 陽性リンパ球は 0.4%であり、血清と B 細胞特異的な反応がみられなかった（Fig.4D）。このことから免疫したウサギ血清はイヌ B 細胞に発現する CD20 分子とは反応していないと考えられた。

## 2 健常犬に対するイヌ CD20 ペプチドワクチン投与試験

### 2-1 皮内試験、遅延型アレルギー反応（DTH）、副作用

対象犬の側腹部に Dog-CD20 および Dog-CD20-KLH を各 0.05ml ずつ皮内注射し、投与部の発赤や膨疹の様子を投与後 15 分後に計測した。初回のペプチドワクチン投与前（ワクチン未接種）には、Dog-CD20 投与部位で 1mm、Dog-CD20-KLH 投与部で 6mm の発赤を認め、膨疹は認めなかった（Fig.5A）。2 回目の投与以降には、Dog-CD20 投与部で 1~2mm の発赤を認め、膨疹は認めなかったのに対し、Dog-CD20-KLH 投与部では、1~5mm の発赤と 1~3mm の膨疹を認めた（Fig.5B）。遅延型アレルギー反応として、皮内試験の 24 時間後に投与部位の発赤や硬結を観察した。初回ペプチドワクチン投与前には Dog-CD20 の投与部に 1mm 発赤、Dog-CD20-KLH の投与部に 5mm の発赤を認め、ともに硬結は認めなかった。2 回目の投与以降には、Dog-CD20 投与部でほとんど反応がみられなかったのに対し、Dog-CD20-KLH 投与部では、1~2mm の発赤と 1~4mm の硬結を認めた。そのほかの副作用として、ペプチドワクチン投与後にアナフィラキシー症状を呈さないかを 30 分間観察し、また投与後 1 週間ワクチン投与部に明らかな搔痒や潰瘍形成がないかを観察した。その結果、いずれの投与時にも臨床的に明らかな副作用は観察されなかった（Table.2）。

## 2-2 イヌ CD20 ペプチドに対する抗体価

Dog-CD20-KLH で免疫した健常犬について、Dog-CD20 に対する抗体産生を評価するため、Dog-CD20-KLH、Dog-CD20-OVA および OVA をプレートに吸着させ、免疫前（0 週目）と免疫後（2、14 週目）の血清の抗体価を ELISA 法で測定した。Dog-CD20-KLH をプレートに吸着させた時において、免疫前の血清においても Dog-CD20-KLH に対して強い反応がみられ、キャリアー蛋白である KLH に対する非特異的な反応と考えられた。この影響を考慮して、免疫後の血清の吸光度から免疫前の血清の同じ希釈倍率の吸光度を引いた値（ $\Delta$ OD）を算出し結果を示した（Fig.6）。また測定した全吸光度データをその下に示した。Dog-CD20-KLH をプレートに吸着させた場合には、2、14 週目の血清の希釈倍率 100、500 倍で  $\Delta$ OD が 1.0 以上であり、以下 2,500 倍では 0.6 以上、10,000 倍では 0.1 以上と希釈倍率に依存して減少しており、Dog-CD20-KLH に対する抗体産生が示唆された。Dog-CD20-OVA または OVA をプレートに吸着させた時においても、血清との非特異的な反応を考慮して、免疫後の血清の吸光度から免疫前の血清の吸光度を引いた値（ $\Delta$ OD）を算出し結果を示した（Fig.7）。また測定した全吸光度データをその次頁に示した。OVA をプレートに吸着させた場合、血清希釈倍率にかかわらず  $\Delta$ OD は 0.2 以下であった。一方 Dog-CD20-OVA をプレートに吸着させた場合、2、14 週目両方の血清の希釈倍率 20~40 倍で  $\Delta$ OD は 0.2 を超えていた。KLH に対する反応と比較して弱い、Dog-CD20 に対する抗体産生が示唆された。

## 2-3 リンパ球サブセットの変化

健常犬へのイヌ CD20 ペプチドワクチン投与によるリンパ球サブセットの変化をフローサイトメトリーで解析した。ワクチン投与により B 細胞の除去が起きれば、CD21 陽性細胞が減少することが予想される[52]。フローサイトメトリーによる解析では、B 細胞に特異的に発現する CD21 陽性細胞は、ワクチン投与前には 8.3%であり、3 回目投与前（初回投与前から 6 週目）には 5.9%、5 回目投与前（初回投与前から 14 週目）には 7.9%であり、大きな変動は見られなかった（Fig.8 A-C）。CD3 陽性細胞は、ワクチン投与前には 85.4%であり、3 回目投与前には 86.6%、5 回目投与前には 92.1%（Fig8 D-F）、CD4 陽性細胞は、ワクチン投与前には 30.6%であり、3 回目投与前には 27.8%、5 回目投与前には 25.3%（Fig8 G-I）、CD8 陽性細胞は、ワクチン投与前には 35.5%であり、3 回目投与前には 43.5%、5 回目投与前には 54.4%であった（Fig8 J-L）。今回解析した 4 種類の表面抗原で、ペプチドワクチン投与によるリンパ球サブセットの変化は見られなかった。

## 3 リンパ腫症例に対するイヌ CD20 ペプチドワクチンの投与

### 3-1 皮内試験、副作用

ペプチドワクチンの投与は、0、2、4 週目に行った。5 回投与する予定であったが、9 週目に腫瘍の再発が確認されたため、4 回目以降の投与を中止した。皮内試験は、臨床試験を行った初回（0 週目）、3 回目（4 週目）のワクチン投与前、4 回目（9 週目、中止）に行った。初回のペプチドワクチン投与前は、Dog-CD20 投与部での反応は見られず、Dog-CD20-KLH 投与部で

15mm の発赤と膨疹を認めた。4 週目の両ペプチド投与部に発赤、膨疹は認められなかった。9 週目 Dog-CD20 投与部での反応は見られず、Dog-CD20-KLH 投与部で 17mm の発赤と膨疹を認めた。ペプチドワクチン投与後 30 分間のアナフィラキシー症状や、帰宅後にオーナーに観察を依頼したワクチン投与部の搔痒、潰瘍形成といった副作用はいずれも認められなかった (Table.3)。

### 3-2 イヌ CD20 ペプチドに対する抗体価

Dog-CD20-KLH で免疫したリンパ腫症例について、Dog-CD20 に対する抗体産生を評価するため、Dog-CD20-OVA および OVA をプレートに吸着させ、免疫前 (0 週目)、および 3 回免疫後 (9 週目) の血清の抗体価を ELISA 法で測定した。健常犬の場合と同様に、非特異反応の影響を考慮して、免疫後の血清の吸光度から免疫前の血清の同じ希釈倍率の吸光度を引いた値 ( $\Delta$ OD) を算出し結果を示した (Fig.9)。また測定した全吸光度データをその次頁に示した。OVA をプレートに吸着させた場合、血清希釈倍率にかかわらず  $\Delta$ OD は 0.2 以下であった。一方 Dog-CD20-OVA をプレートに吸着させた場合、9 週目では希釈倍率 20~2,500 倍で  $\Delta$ OD は 0.2 を超えており、Dog-CD20 に対する抗体産生が示唆された。

## 4 イヌ CD20 発現細胞の作製

### 4-1 イヌ CD20 遺伝子のクローニングと発現プラスミドの構築

リンパ腫の犬の胸水中の腫瘍細胞を材料として、イヌ CD20 の cDNA 遺伝子をクローニングし、哺乳類細胞発現ベクターへ遺伝子導入を行った。pENTR-CD20 のシーケンス解析により得られたイヌ CD20 のコーディング領域の塩基配列を Fig.10 に示した。本研究で決定したイヌ CD20 の塩基配列は、加納らが報告しているイヌ CD20 の塩基配列 (GenBank, AB210085) [30] と比較し、8 か所で 1 塩基置換が認められた。しかしこのうち 7 塩基については、Ensembl に登録されているイヌゲノムデータベース中の CD20 に相当する領域の配列 (ENSCAFT00000039220) [53]と一致していた。これら 8 塩基のうち、開始コドンから 70、230、592、601、818 番目の塩基置換は非同義置換であった。(p.Tyr70His、p.Cys230Tyr、p.Leu592Val、p.Ala601Tyr、p.Gly818Glu)。これら 8 塩基の置換は本研究のペプチドワクチンの標的とした第二細胞外領域 (EC2) には存在しなかった。O-および N-結合型糖鎖修飾部位として、N 末端から 19 番目のセリン (O-結合型糖鎖修飾)、140 番目のアスパラギン酸 (N-結合型糖鎖修飾) が予想されたが、それぞれ第 1 細胞内領域 (IC1) と第 3 膜貫通領域 (TM3) に存在することが予想され、糖鎖による修飾を受けた場合にも本研究で標的としたエピトープ (EC2) に対する影響はないものと考えられた。

作製した 2 種類のイヌ CD20 発現プラスミドのコンストラクトと塩基配列の一部を Fig.11 に示した。pDEST-CD20 では、発現ベクター-pcDNA-DEST47 に読み枠を合わせて、イヌ CD20 遺伝子を開始コドンの 5 塩基前から終始コドンの前まで挿入し、イヌ CD20 の 3'側にベクター由来の GFP 遺伝子を結合させ、CD20-GFP 融合蛋白として発現されるようにした (Fig.11 A)。pCruz-CD20 では、発現ベクター-pCruz GFP-A に読み枠を合わせて、イヌ CD20 遺伝子のコーディング領域をマルチクローニングサイトに挿入し、その 5'側にベクター由来の GFP 遺伝子を

結合させ、CD20-GFP 融合蛋白として発現されるようにした。この発現プラスミド構築後、塩基配列を決定したところ、イヌ CD20 コーディング領域の 3'末端から終始コドンを含む 8 塩基 (tccttaa)、3 アミノ酸残基が欠損していた。この欠損によりフレームシフトが生じ、CD20 の C 末端に 13 残基のアミノ酸が付加されることが予想された (Fig.11 B)。

#### 4-2 哺乳類細胞におけるイヌ CD20 分子の発現解析

作製した 2 種のイヌ CD20 発現プラスミドを HEK293 細胞に遺伝子導入し、イヌ CD20 融合 GFP の発現をフローサイトメトリーで解析した。陰性コントロールである pMD20-T vector を導入した場合の陽性率は 0.8% (Fig.12B)、陽性コントロールである哺乳類細胞 GFP 発現プラスミド pcDNA/GW-47/CAT と pCruz GFP-L を導入した細胞の陽性率はそれぞれ 29.7%、31.5% であった (Fig.12C,E)。一方、作製したイヌ CD20 発現プラスミド pDEST-CD20 および pCruz-CD20 を導入した細胞では、それぞれ陽性率 9.8%、71.1%であり、HEK293 細胞でのイヌ CD20-GFP 融合蛋白発現が示された (Fig.12D,F)。

## 考察

ヒトでは CD20 を標的としたリツキシマブなどのモノクローナル抗体が B 細胞型非ホジキンリンパ腫などの治療薬として用いられている[21-24]。イヌにおいても調べたすべての B 細胞性リンパ腫で CD20 が発現していたことが報告され、CD20 を標的とした治療が行える可能性が示唆されている[30,31]。ヒトで治療に用いられているモノクローナル抗体は細胞外領域を認識するが、これらの抗体はイヌ CD20 と反応せず、治療に用いることはできない[31,33]。

そこで B 細胞性リンパ腫の犬に対するイヌ CD20 を標的としたペプチドワクチン療法の開発を試みた。ペプチドワクチンによる腫瘍治療はリツキシマブなどの抗体医薬品と比較して、安価になることが予想され、経済的な視点から現実的な治療法に実施できる可能性がある。リツキシマブをはじめヒトの CD20 を認識するモノクローナル抗体の多くは第二細胞外領域のジスルフィド結合付近にエピトープがあることが分かっている[34]。これを参考にイヌ CD20 第二細胞外領域のジスルフィド結合を含む 29 アミノ酸残基のペプチド (Dog-CD20) を合成した。

Dog-CD20-KLH を完全および不完全フロイントアジュバントと共にウサギへ投与した実験では、イヌ CD20 ペプチドに対する抗体が産生されていることが示めされた。しかしフローサイトメトリーによる解析では、CD21 陽性のイヌ B 細胞との反応は認められず、細胞表面の CD20 を認識していないことが示めされた。その原因としては、今回合成した CD20 ペプチドと B 細胞上に発現している CD20 のコンフォーメーションの相違が関係していると考えられる。リツキシマブが認識するエピトープは、ヒト CD20 第 2 細胞外領域のジスルフィド結合が形成するループ構造の、170~173 番目のアミノ酸 (ANPS) を中心としてつくられる深いポケット状構造であることが分かっている[54]。またリツキシマブをはじめとする抗ヒト CD20 モノクローナル抗体が、CD20 発現細胞の細胞膜を破壊すると反応できなくなるという報告[34]や、一部の抗 CD20 抗体は結合のために、第 1 および第 2 細胞外領域の両方を必要とするとの報告[34,55]があり、エピトープとして CD20 の三次構造が重要であることが示唆されている。本実験で合成した Dog-CD20 はジスルフィド結合を形成しており、第 2 細胞外領域の 44 アミノ酸のうち 29 残基を含む比較的長いペプチドであるが、このペプチドでも誘導された抗体が、B 細胞上の CD20 に反応するという証拠は得られなかった。

健康犬およびリンパ腫症例に対してペプチドワクチン投与を行い、その効果と副作用について検討した。癌抗原は元来自己抗原であり、癌ワクチンとして効果的な免疫を惹起するためには強力なアジュバントが必要である。しかし強い炎症を起こす完全フロイントアジュバントなどを実際の臨床例へ投与することは現実的ではない。効果的に抗腫瘍免疫を得るためには、細胞性免疫の誘導が重要と考えられており、本研究では新しく開発された疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子をアジュバントとして用いた。疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子をイヌに用いた報告はないが、マウスにおいて樹状細胞を活性化して強い抗原特異的細胞性免疫を誘導できること[44]、マウス肝腫瘍モデルにおいて、癌抗原由来ペプチドを固定化した疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子ワクチンが安全にかつ有効な抗腫瘍効果を示したこと[48]などが報告されている。

ペプチドワクチンの投与は健康犬で 5 回、リンパ腫症例で 3 回行い、すべてにおいて全身的なアレルギー症状や投与部位局所の潰瘍形成や搔痒は見られず、今回の実験においては安全性に問題は見られなかった。継時的に行った皮内試験と遅延型アレルギー反応の評価では、健康犬お



よびリンパ腫症例ともに Dog-CD20-KLH に対する反応がみられたが、Dog-CD20 に対する反応はほとんど見られなかった。これらの実験により、少なくとも KLH に対する免疫反応が誘導されていることが示唆されたが、CD20 に対する反応を証明することはできなかった。

ペプチドワクチン投与後の抗体産生についても検討した。健常犬について、Dog-CD20-KLH に対する抗体価はペプチドワクチン投与後に顕著な上昇がみられた。キャリアー蛋白である KLH に対する反応を取り除くため、Dog-CD20-OVA に対する抗体価も評価したところ、投与後に抗体価の上昇がみられ、CD20 ペプチドに対する抗体産生が示唆された。リンパ腫症例でも同様にイヌ CD20 ペプチドに対する抗体価の上昇を認め、イヌに対して Dog-CD20-KLH の投与を行うことで、イヌ CD20 ペプチドに対する抗体を誘導できることが示唆された。しかし健常犬やリンパ腫症例のイヌで観察された CD20 ペプチドに対する抗体価は、それぞれ 40 倍と 2,500 倍であり、ウサギに免疫した場合の抗体価 128,000 倍以上と比較して著しく低かった。その理由としていくつかの可能性が考えられる。まず今回免疫に用いたペプチドはイヌ由来のアミノ酸配列であるため、イヌにおいては自己抗原として認識され、免疫寛容となっていた可能性がある。また、アジュバント疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子は細胞性免疫をより強く誘導するとされるが [44,48]、少なくともウサギで用いた完全または不完全フロイントアジュバントと比較して液性免疫の誘導効果が弱かった可能性も考えられた。さらに今回ワクチンを投与したイヌは、どちらも高齢（約 15 歳齢と 12 歳 9 カ月齢）であり、リンパ腫症例では化学療法を受けた後であるため、免疫能が低下していた可能性も考えられる。

ペプチドワクチンによる B 細胞除去が起きるかを観察するために、健常犬で免疫後の末梢血リンパ球サブセットの変化を評価したが、B 細胞の減少は見られず、ペプチドワクチン投与による B 細胞破壊は起きていないものと考えられた。またリンパ腫症例では CD20 ペプチドワクチンの投与期間中にリンパ腫の再発がみられている。実際の担癌例では免疫能が低下している症例も多いと思われ、今回行った方法よりも強力に免疫を誘導する手法の開発が必要であろう。

イヌ CD20 を標的とした免疫治療を行う場合、腫瘍細胞の CD20 の発現を迅速に解析する必要があり、CD20 の細胞外領域を認識するモノクローナル抗体は、治療の適応判定に有用と考えられる。またイヌ CD20 ペプチドワクチンで十分な治療効果が得られない場合には、ヒトの場合と同様にリツキシマブのような抗体医薬品の開発も考えられる。CD20 に対するイヌ化抗体作製のためには、まずイヌ CD20 に対するモノクローナル抗体の作製が必要である。ウサギでは Dog-CD20-KLH 投与により抗体価の上昇がみられたが、その血清はイヌ B 細胞と反応しなかった。データには示していないが、マウスでも同様な結果が得られており、ペプチド以外の方法で免疫する必要がある。そこで本研究ではイヌ CD20 の細胞外領域を認識するモノクローナル抗体作製の免疫源とするため、イヌ CD20 発現細胞の作製を試みた。イヌ CD20 cDNA をクローニングし、N 末端側および C 末端側に GFP を結合させた CD20-GFP 融合蛋白発現プラスミド pDEST-CD20 および pCruz-CD20 を構築し、ヒト胎児腎細胞由来の HEK293 細胞に導入することで、イヌ CD20-GFP 融合蛋白の発現を確認することができた。今回クローニングしたイヌ CD20 のコーディング領域の塩基配列を GenBank に報告されている配列 [30] と比較したところ、8 か所で 1 塩基置換が確認された。しかしこれらのうち 7 塩基については Ensembl に登録されている配列 [53] と一致しており、1 塩基多型であると推測している。8 か所の置換のうち 5 か所

が非同義置換であったが、すべての置換は第 2 細胞外領域には存在しないため、エピトープの抗原性に影響する可能性は低いと考えられた。今後イヌ CD20 発現細胞を使うことで、ペプチドワクチンを投与したイヌで産生された抗体の、細胞上 CD20 に対する反応を迅速に評価できるようになると推測された。またこの発現プラスミドを導入したマウスやラットの細胞を免疫源とすることで、イヌ CD20 の細胞外領域を認識するモノクローナル抗体の作製が可能であると考えられた。さらに作製した抗イヌ CD20 モノクローナル抗体の相補性決定領域のアミノ酸配列を参考に、治療用の抗イヌ CD20 イヌ化抗体の作製が行えることが考えられた。

これまで小動物の腫瘍を対象とした免疫療法で、十分な臨床成果を上げられた報告はない。今回試みた B 細胞性リンパ腫に対するイヌ CD20 を標的とした免疫療法の開発は、近年、人医領域で蓄積されている抗 CD20 抗体のエピトープや抗腫瘍免疫機構に関する多くのデータが参照可能であり、また対象となる症例も多いため臨床試験が行いやすいことから、小動物に対する新しい腫瘍治療のブレイクスルーになる可能性があると考えている。

## 引用文献

1. Ogilvie GK, Moore AS, 桃井康行 監訳. 2008. 犬の腫瘍 :インターズー, 東京.
2. Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JL. 2002. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract.* 43(6):240-246.
3. O'Brien DJ, Kaneene JB, Getis A, Lloyd JW, Rip MR, Leader RW. 1999. Spatial and temporal distribution of selected canine cancers in Michigan, USA, 1964-1994. *Prev Vet Med.* 42(1):1-15.
4. Gavazza A, Presciuttini S, Barale R, Lubas G, Gugliucci B. 2001. Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *J Vet Intern Med.* 15(3):190-195.
5. Reif JS, Lower KS, Ogilvie GK. 1995. Residential exposure to magnetic fields and risk of canine lymphoma. *Am J Epidemiol.* 141(4):352-359.
6. Tasca S, Carli E, Caldin M, Menegazzo L, Furlanello T, Gallego LS. 2009. Hematologic abnormalities and flow cytometric immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 210 cases (2002-2006). *Vet Clin Pathol.* 38(1):2-12.
7. Sözmen M, Tasca S, Carli E, De Lorenzi D, Furlanello T, Caldin M. 2005. Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. *J Vet Diagn Invest.* 17(4):323-330.
8. Gelain ME, Mazzilli M, Riondato F, Marconato L, Comazzi S. 2008. Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. *Vet Immunol Immunopathol.* 121(3-4):179-188.
9. Comazzi S, Gelain ME. 2011. Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *Vet J.* 188(2):149-155.
10. Wilkerson MJ, Dolce K, Koopman T, Shuman W, Chun R, Garrett L, Barber L, Avery A. 2005. Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Vet Immunol Immunopathol.* 106(3-4):179-196.
11. Gentilini F, Calzolari C, Turba ME, Bettini G, Famigli-Bergamini P. 2009. GeneScanning analysis of Ig/TCR gene rearrangements to detect clonality in canine lymphomas. *Vet Immunol Immunopathol.* 127(1-2):47-56.
12. Momoi Y, Nagase M, Okamoto Y, Okuda M, Sasaki N, Watari T, Goitsuka R, Tsujimoto H, Hasegawa A. 1993. Rearrangements of immunoglobulin and T-cell receptor genes in canine lymphoma/leukemia cells. *J Vet Med Sci.* 55(5):775-780.
13. Ponce F, Magnol JP, Ledieu D, Marchal T, Turinelli V, Chalvet-Monfray K, Fournel-Fleury C. 2004. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Vet J.* 167(2):158-166.
14. Dobson JM, Blackwood LB, McInnes EF, Bostock DE, Nicholls P, Hoather TM, Tom BD. 2001. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *J Small Anim Pract.*

42(8):377-384.

15. Starrak GS, Berry CR, Page RL, Johnson JL, Thrall DE. 1997. Correlation between thoracic radiographic changes and remission/survival duration in 270 dogs with lymphosarcoma. *Vet Radiol Ultrasound*. 38(6):411-418.
16. Rassnick KM, McEntee MC, Erb HN, Burke BP, Balkman CE, Flory AB, Kiselow MA, Autio K, Gieger TL. 2007. Comparison of 3 protocols for treatment after induction of remission in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med*. 21(6):1364-1373.
17. Garrett LD, Thamm DH, Chun R, Dudley R, Vail DM. 2002. Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med*. 16(6):704-709.
18. Kaiser CI, Fidel JL, Roos M, Kaser-Hotz B. 2007. Reevaluation of the University of Wisconsin 2-year protocol for treating canine lymphosarcoma. *J Am Anim Hosp Assoc*. 43(2):85-92.
19. Peruzzi D, Gavazza A, Mesiti G, Lubas G, Scarselli E, Conforti A, Bendtsen C, Ciliberto G, La Monica N, Aurisicchio L. 2010. A vaccine targeting telomerase enhances survival of dogs affected by B-cell lymphoma. *Mol Ther*. 18(8):1559-1567.
20. Henson MS, Curtsinger JM, Larson VS, Klausner JS, Modiano JF, Mescher MF, Miller JS. 2011. Immunotherapy with autologous tumour antigen-coated microbeads (large multivalent immunogen), IL-2 and GM-CSF in dogs with spontaneous B-cell lymphoma. *Vet Comp Oncol*. 9(2):95-105.
21. Hochster H, Weller E, Gascoyne RD, Habermann TM, Gordon LI, Ryan T, Zhang L, Colocci N, Frankel S, Horning SJ. 2009. Maintenance rituximab after cyclophosphamide, vincristine, and prednisone prolongs progression-free survival in advanced indolent lymphoma: results of the randomized phase III ECOG1496 Study. *J Clin Oncol*. 27(10):1607-1614.
22. Marcus R, Imrie K, Solal-Celigny P, Catalano JV, Dmoszynska A, Raposo JC, Offner FC, Gomez-Codina J, Belch A, Cunningham D, Wassner-Fritsch E, Stein G. 2008. Phase III study of R-CVP compared with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone alone in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 26(28):4579-4586.
23. Marcus R, Aultman R, Jost F. 2010. A quality-adjusted survival analysis (Q-TWiST) of rituximab plus CVP vs CVP alone in first-line treatment of advanced follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer*. 102(1):19-22.
24. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Lederlin P, Gisselbrecht C. 2002. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 346(4):235-242.
25. Bubien JK, Zhou LJ, Bell PD, Frizzell RA, Tedder TF. 1993. Transfection of the CD20

- cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca<sup>2+</sup> conductance found constitutively in B lymphocytes. *J Cell Biol.* 121(5):1121-1132.
26. Walshe CA, Beers SA, French RR, Chan CH, Johnson PW, Packham GK, Glennie MJ, Cragg MS. Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B cell antigen receptor signaling. 2008. *J Biol Chem.* 283(25):16971-16984.
  27. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. 1980. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol.* 125(4):1678-1685.
  28. Countouriotis A, Moore TB, Sakamoto KM. 2002. Cell surface antigen and molecular targeting in the treatment of hematologic malignancies. *Stem Cells.* 20(3):215-229.
  29. Anderson KC, Bates MP, Slaughenhaupt BL, Pinkus GS, Schlossman SF, Nadler LM. 1984. Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood* 63(6):1424-1433.
  30. Kano R, Inoie C, Okano H, Yamazaki J, Takahashi T, Watari T, Tokuriki M, Hasegawa A. 2005. Canine CD20 gene. *Vet Immunol Immunopathol.* 108(3-4):265-268.
  31. Jubala CM, Wojcieszyn JW, Valli VE, Getzy DM, Fosmire SP, Coffey D, Bellgrau D, Modiano JF. 2005. CD20 Expression in normal canine B cells and in canine non-Hodgkin lymphoma. *Vet Pathol.* 42(4):468-476.
  32. Coyle KA, Steinberg H. 2004. Characterization of lymphocytes in canine gastrointestinal lymphoma. *Vet Pathol.* 41(2):141-146.
  33. Impellizzeri JA, Howell K, McKeever KP, Crow SE. 2006. The role of rituximab in the treatment of canine lymphoma: an ex vivo evaluation. *Vet J.* 171(3):556-558.
  34. Teeling JL, Mackus WJ, Wiegman LJ, van den Brakel JH, Beers SA, French RR, van Meerten T, Ebeling S, Vink T, Sloodstra JW, Parren PW, Glennie MJ, van de Winkel JG. 2006. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J Immunol.* 177(1):362-371.
  35. Polyak MJ, Deans JP. 2002. Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure. *Blood* 99(9):3256-3262.
  36. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254(5038):1643-1647.
  37. Joniau S, Abrahamsson PA, Bellmunt J, Figdor C, Hamdy F, Verhagen P, Vogelzang NJ, Wirth M, Van Poppel H, Osanto S. 2011. Current Vaccination Strategies for Prostate Cancer. *Eur Urol.* [Epub ahead of print]????
  38. Oka Y, Tsuboi A, Oji Y, Kawase I, Sugiyama H. 2008. WT1 peptide vaccine for the treatment of cancer. *Curr Opin Immunol.* 20(2):211-220.
  39. Yamada A. 2011. Peptide-based cancer vaccine therapy for prostate cancer, bladder

- cancer, and malignant glioma. *Nihon Rinsho*. 69(9):1657-1661.
40. Yanagimoto H, Shiomi H, Satoi S, Mine T, Toyokawa H, Yamamoto T, Tani T, Yamada A, Kwon AH, Komatsu N, Itoh K, Noguchi M. 2010. A phase II study of personalized peptide vaccination combined with gemcitabine for non-resectable pancreatic cancer patients. *Oncol Rep*. 24(3):795-801.
  41. Schwartzentruer DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, Treisman J, Gailani F, Riley L, Conlon K, Pockaj B, Kendra KL, White RL, Gonzalez R, Kuzel TM, Curti B, Leming PD, Whitman ED, Balkissoon J, Reintgen DS, Kaufman H, Marincola FM, Merino MJ, Rosenberg SA, Choyke P, Vena D, Hwu P. 2011. gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med*. 364(22):2119-2127.
  42. Yamazaki J, Takahashi M, Setoguchi A, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. 2010. Monitoring of minimal residual disease (MRD) after multidrug chemotherapy and its correlation to outcome in dogs with lymphoma: a proof-of-concept pilot study. *J Vet Intern Med*. 24(4):897-903.
  43. Okamoto S, Yoshii H, Ishikawa T, Akagi T, Akashi M, Takahashi M, Yamanishi K, Mori Y. 2008. Single dose of inactivated Japanese encephalitis vaccine with poly(gamma-glutamic acid) nanoparticles provides effective protection from Japanese encephalitis virus. *Vaccine* 26(5):589-594.
  44. Wang X, Uto T, Akagi T, Akashi M, Baba M. 2008. Poly(gamma-glutamic acid) nanoparticles as an efficient antigen delivery and adjuvant system: potential for an AIDS vaccine. *J Med Virol*. 80(1):11-19.
  45. Uto T, Wang X, Akagi T, Zenkyu R, Akashi M, Baba M. 2009. Improvement of adaptive immunity by antigen-carrying biodegradable nanoparticles. *Biochem Biophys Res Commun*. 379(2):600-604.
  46. Okamoto S, Matsuura M, Akagi T, Akashi M, Tanimoto T, Ishikawa T, Takahashi M, Yamanishi K, Mori Y. 2009. Poly(gamma-glutamic acid) nanoparticles combined with mucosal influenza virus hemagglutinin vaccine protects against influenza virus infection in mice. *Vaccine* 27(42):5896-5905.
  47. Uto T, Akagi T, Hamasaki T, Akashi M, Baba M. 2009. Modulation of innate and adaptive immunity by biodegradable nanoparticles. *Immunol Lett*. 125(1):46-52.
  48. Yamaguchi S, Tatsumi T, Takehara T, Sasakawa A, Yamamoto M, Kohga K, Miyagi T, Kanto T, Hiramastu N, Akagi T, Akashi M, Hayashi N. 2010. EphA2-derived peptide vaccine with amphiphilic poly(gamma-glutamic acid) nanoparticles elicits an anti-tumor effect against mouse liver tumor. *Cancer Immunol Immunother*. 59(5):759-767.
  49. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol*. 36 (1): 59-74.

50. Louis N, Eveleigh C, Graham FL. 1997. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* 233 (2): 423–429.
51. Iwai A, Takegami T, Shiozaki T, Miyazaki T. 2011. Hepatitis C virus NS3 protein can activate the Notch-signaling pathway through binding to a transcription factor, SRCAP. *PLoS One*. 6(6):e20718.
52. Cobbold S, Metcalfe S. 1994. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). *Tissue Antigens*. 43(3):137-154.
53. [http://asia.ensembl.org/Canis\\_familiaris/Gene/Summary?g=ENSCAFG00000010381;r=21:53902027-53913462](http://asia.ensembl.org/Canis_familiaris/Gene/Summary?g=ENSCAFG00000010381;r=21:53902027-53913462), CD20\_CANFA (ENSCAFG00000010381)
54. Du J, Wang H, Zhong C, Peng B, Zhang M, Li B, Huo S, Guo Y, Ding J. 2007. Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab. *J Biol Chem*. 282(20):15073-15080.
55. Uchiyama S, Suzuki Y, Otake K, Yokoyama M, Ohta M, Aikawa S, Komatsu M, Sawada T, Kagami Y, Morishima Y, Fukui K. 2010. Development of novel humanized anti-CD20 antibodies based on affinity constant and epitope. *Cancer Sci*. 101(1):201-209.

Fig.1

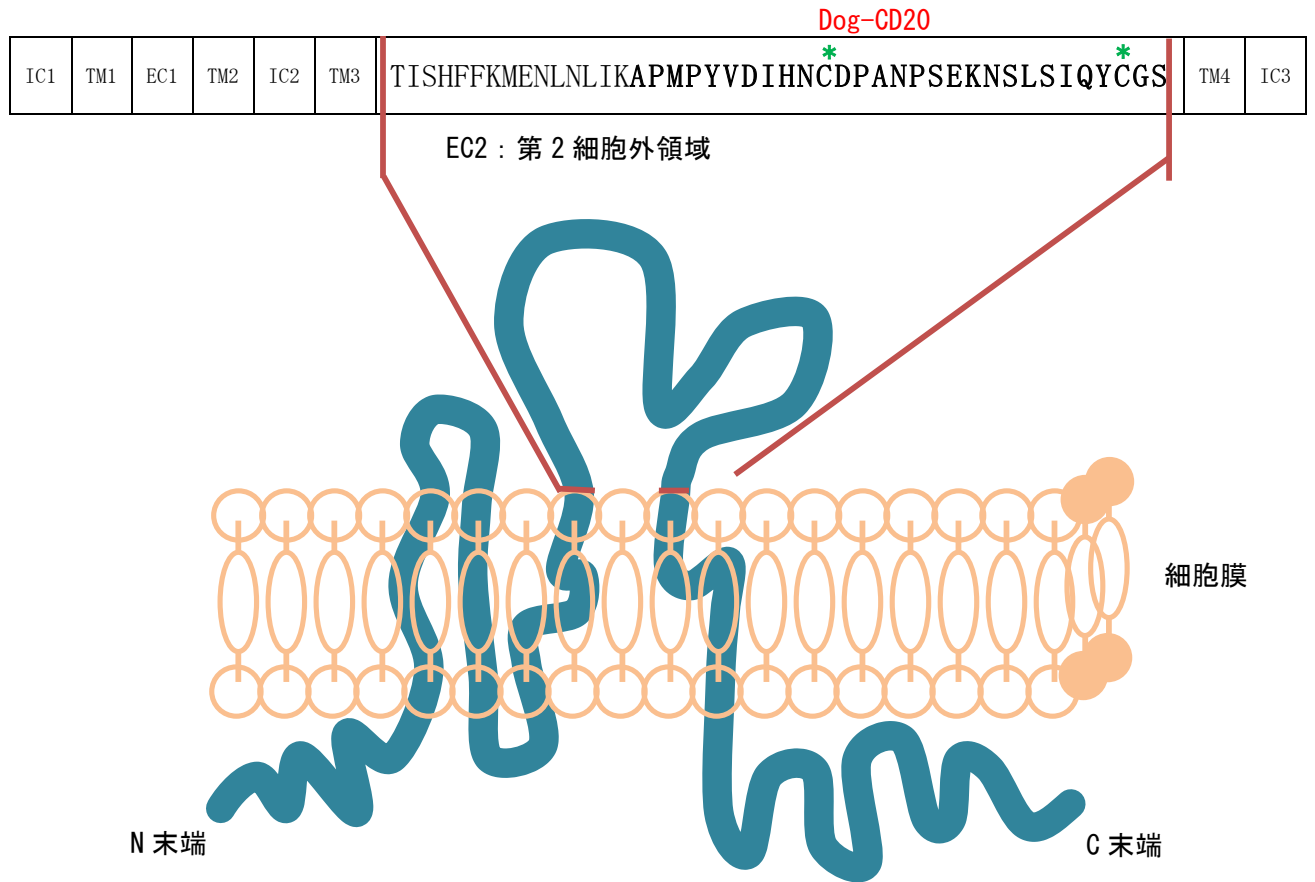


Fig.1 予想される犬の CD20 分子の構造を示した。ヒト CD20 は 4 回膜貫通型の糖鎖を含まない膜蛋白で、イヌ CD20 も同じ構造をとると推定される [30]。イヌ CD20 は 297 アミノ酸残基からなり、N 末端、C 末端ともに細胞内に存在している。3 つの細胞内領域 (IM1-3)、4 つの膜貫通領域 (TM1-4)、2 つの細胞外領域 (EC1-2) からなる。第二細胞外領域 (EC2) は 44 アミノ酸残基で構成され、この領域に含まれる 2 つのシステイン残基 (C) により分子内ジスルフィド結合 (\*-\* 間) が形成されることが予想される。



Fig.2

A.



B.

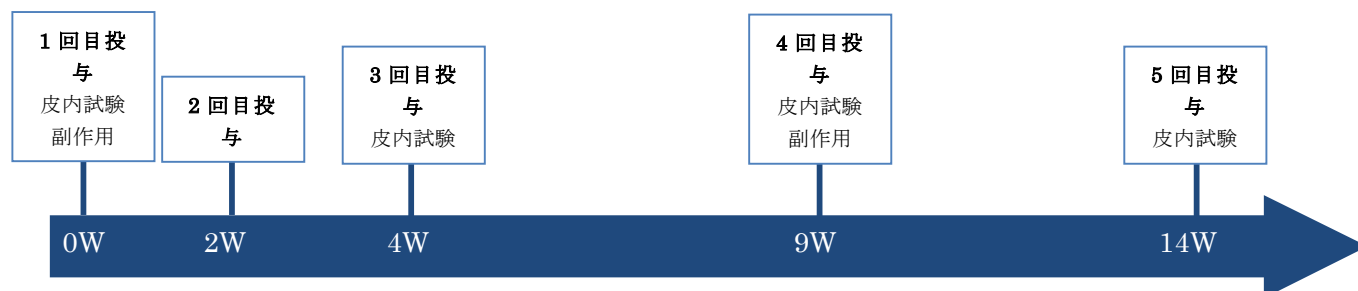


Fig. 2 (A) 健常犬におけるイヌ CD20 ペプチドワクチンの投与および評価計画を示した。ペプチドワクチンは Dog-CD20-KLH 1mg にアジュバントとして疎水化  $\gamma$ -ポリグルタミン酸 ( $\gamma$ -PGA) ナノ粒子 10mg を加え、PBS1ml で混濁したものを投与する。ワクチン投与直前には皮内試験を行い、投与 1 日後に皮内試験投与部で遅延型アレルギー反応 (DTH) を評価する。ワクチン投与後から 1 週間には、副作用の観察を行う。0、2、14 週目のワクチン投与直前には、抗 CD20 抗体価測定のための血液採取を行う。0、6、14 週目のワクチン投与直前には、末梢血 B 細胞の割合の変化をフローサイトメトリーにより評価する。(B) リンパ腫症例におけるイヌ CD20 ペプチドワクチンの投与および評価計画を示した。0、4、9、14 週目ワクチン投与直前には、健常犬と同様に皮内試験を行う。ワクチン投与後には、副作用の観察をオーナーに依頼する。1、9 週目の投与直前には、抗 CD20 抗体価測定のための血清採取を行う。

Fig.3

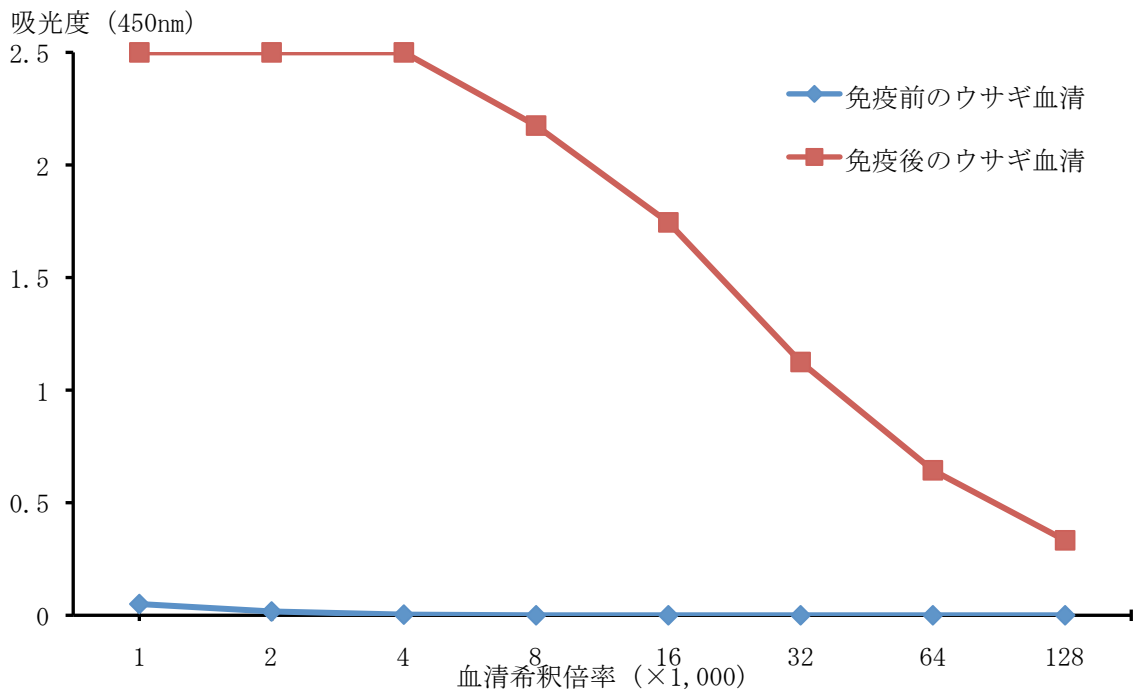


Fig.3 Dog-CD20-KLH で免疫したウサギ血清の Dog-CD20 に対する抗体価を ELISA 法により測定した。96 穴プレートに Dog-CD20-OVA を吸着させ、希釈した血清と反応させた。450nm の吸光度を縦軸に、血清希釈倍率を横軸に示した。Dog-CD20-KLH 投与前のウサギ血清（青線：◆）と、3 回目の Dog-CD20-KLH 投与から 1 週間後のウサギ血清（赤線：■）の各希釈倍率での吸光度の推移を示した。

Fig. 4

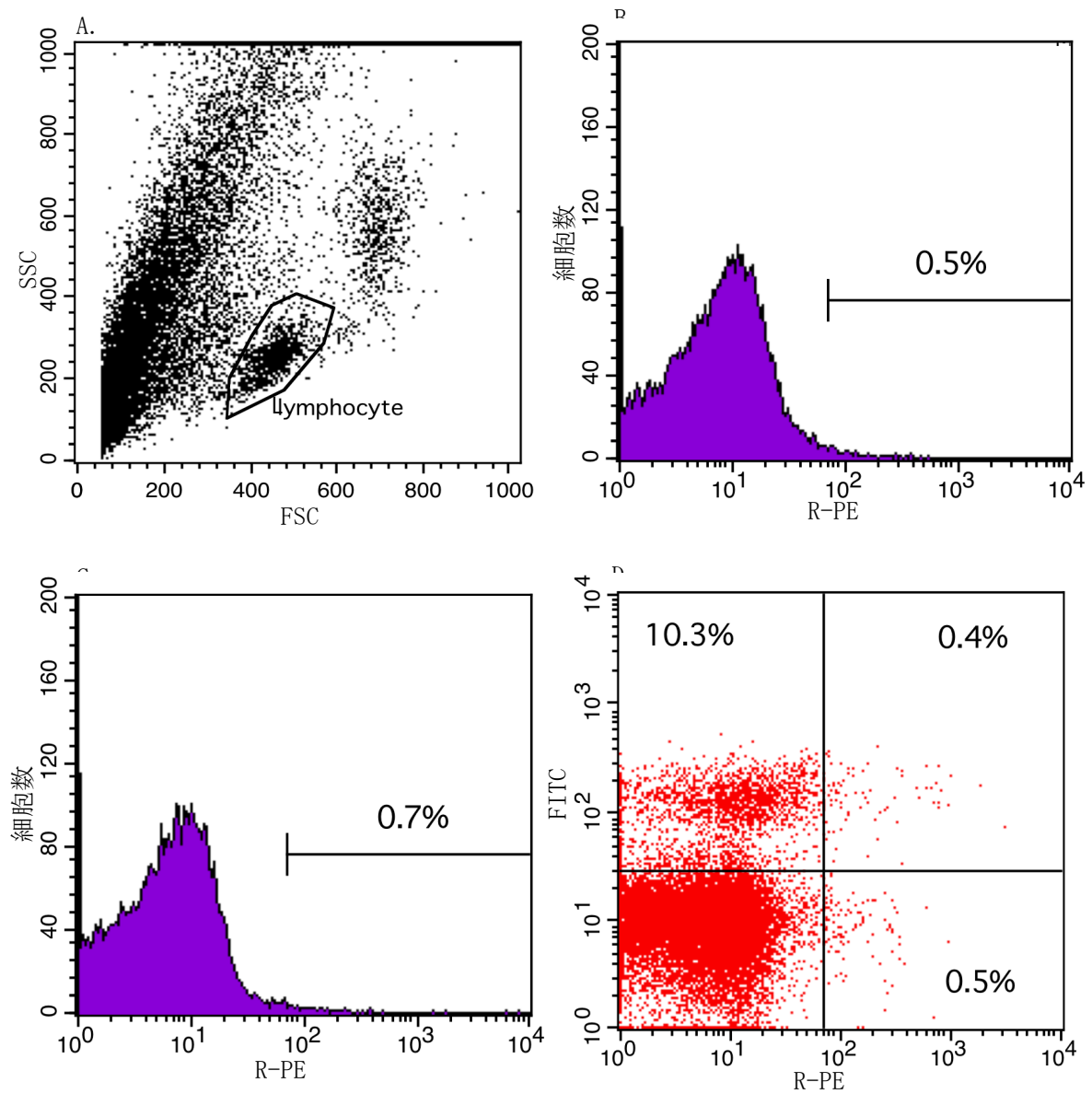
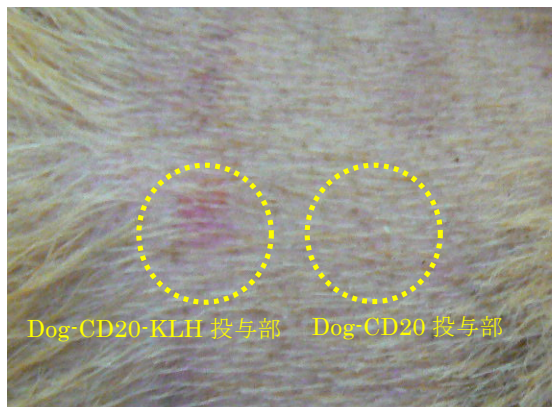


Fig. 4 Dog-CD20-KLH で免疫したウサギ血清のイヌ B 細胞に対する反応性をフローサイトメトリーで検討した。(A) ゲートをかいたリンパ球分画の細胞 20,000 個について検討を行った。(B) イヌ末梢血単核球と免疫したウサギ血清と反応させ、R-PE 標識抗ウサギ IgG 抗体で染色した。(C) イヌ末梢血単核球と免疫していないウサギ血清と反応させ、R-PE 標識抗ウサギ IgG 抗体で染色した。(D) イヌ末梢血単核球と免疫したウサギ血清との反応 (R-PE) および抗イヌ CD21 抗体との反応 (FITC) を示したドットプロット。

Fig. 5

A. 初回投与日の皮内試験



B. 2回目投与日の皮内試験

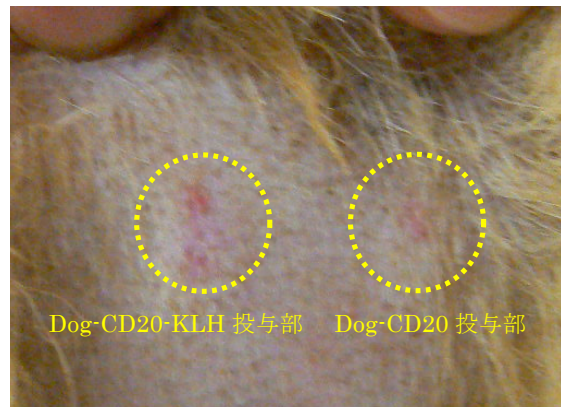


Fig. 5 健常犬におけるペプチドワクチン投与前に皮内にDog-CD20およびDog-CD20-KLHを投与し、その15分後の様子を示した。A：初回投与日の皮内試験の様子。左のDog-CD20-KLH投与部では6mmの発赤を認め、右のDog-CD20投与部では1mmの発赤を認めた。ともに膨疹はみられなかった。B：2回目投与日の皮内試験の様子。左のDog-CD20-KLH投与部では5mmの発赤と2mmの膨疹を認め、右のDog-CD20投与部では2mmの発赤を認め、膨疹はみられなかった。

Fig. 6

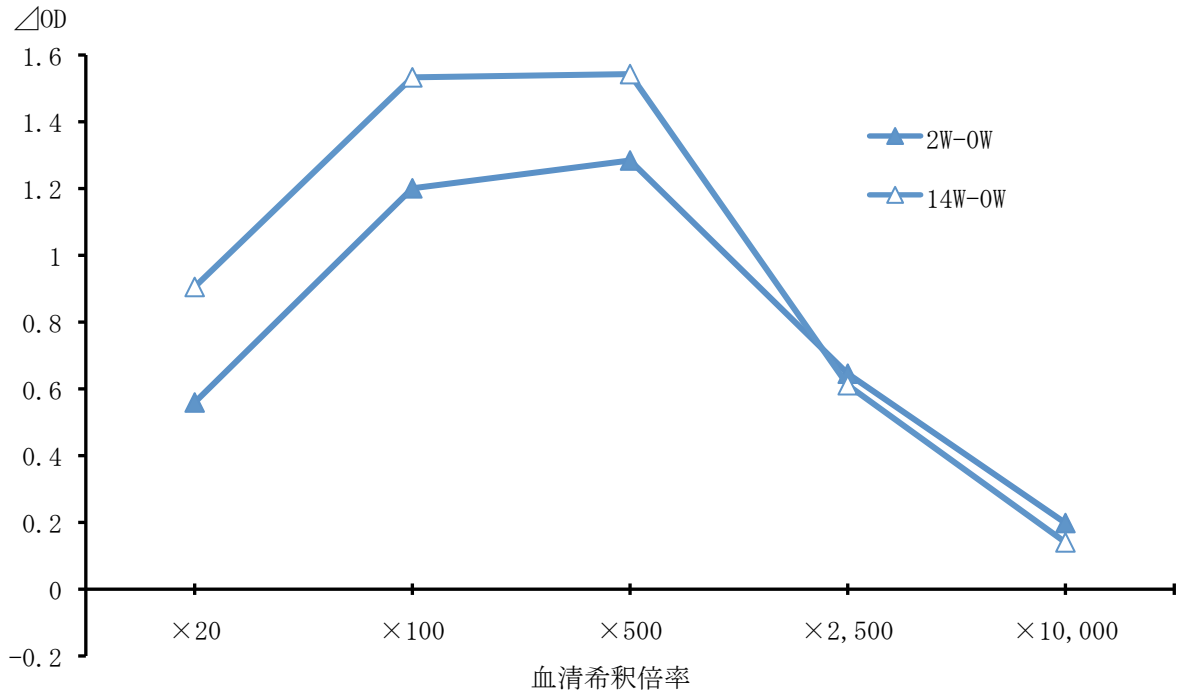


Fig. 6 Dog-CD20-KLH で免疫した健常犬血清の抗体価を ELISA 法により測定した。96 穴プレートに Dog-CD20-KLH を吸着させ、希釈した血清と反応させた。免疫後（2 および 14 週目）の吸光度から免疫前（0 週目）の吸光度を引いた  $\Delta$ OD を縦軸に、血清希釈倍率を横軸に示した。2 週目（▲）と 14 週目（△）の各血清希釈倍率における  $\Delta$ OD を示した。実験は 3 重試験で行い、各測定値を下表に示した。

Dog-CD20-KLH 抗原	× 20	× 100	× 500	× 2,500	× 10,000
0 週目	2.353	1.576	0.975	0.768	0.625
	2.519	1.630	0.999	0.701	0.534
	2.384	1.441	0.861	0.522	0.464
平均	2.418	1.549	0.945	0.664	0.541
標準偏差	0.072	0.080	0.060	0.104	0.066
2 週目	2.948	2.861	2.226	1.382	0.782
	2.941	2.642	2.203	1.299	0.692
	3.044	2.745	2.258	1.247	0.743
平均	2.977	2.749	2.229	1.309	0.739
標準偏差	0.047	0.089	0.022	0.056	0.037
14 週目	3.311	3.084	2.519	1.308	0.638
	3.291	2.994	2.445	1.227	0.659
	3.369	3.167	2.500	1.289	0.746
平均	3.324	3.082	2.488	1.275	0.681
標準偏差	0.033	0.071	0.031	0.034	0.047

Dog-CD20-KLH を ELISA 抗原とした健常犬血清の吸光度値

Fig. 7

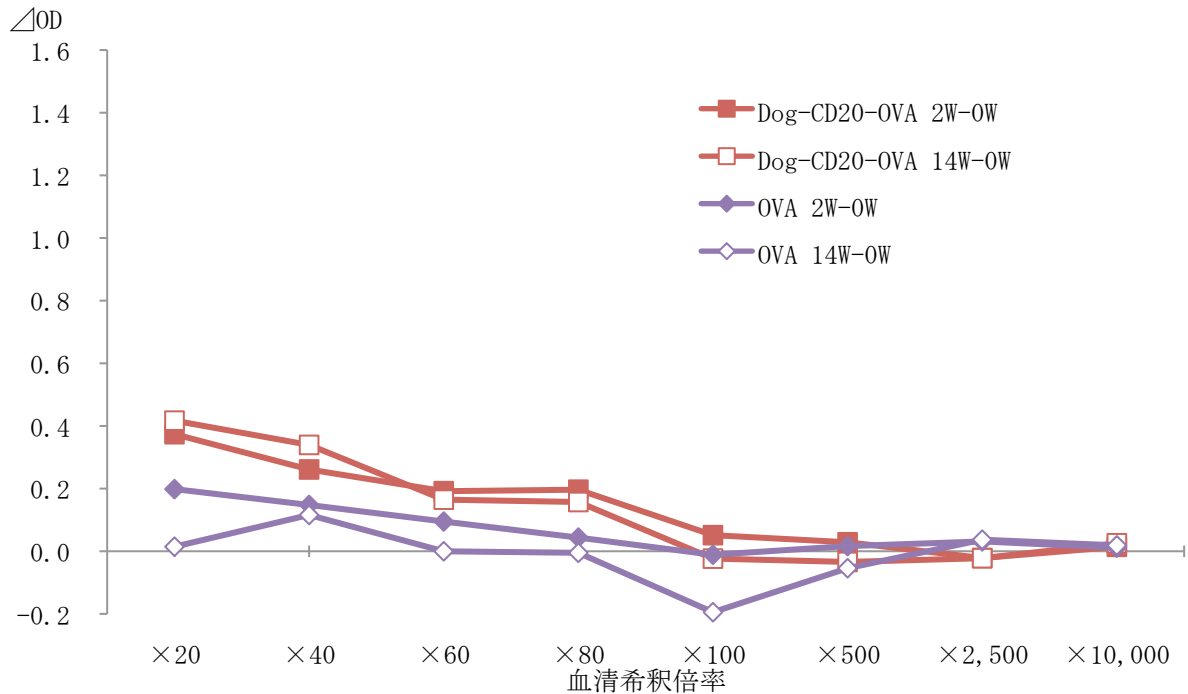


Fig. 7 Dog-CD20-KLH で免疫した健常犬血清の抗体価を ELISA 法により測定した。96 穴プレートに OVA または Dog-CD20-OVA を吸着させ、希釈した血清と反応させた。免疫後 (2 および 14 週目) の吸光度から免疫前 (0 週目) の吸光度を引いた  $\Delta OD$  を縦軸に、血清希釈倍率を横軸に示した。OVA をプレートに吸着させた場合の 2 週目 ( ◆ ) と 14 週目 ( ◇ ) の各血清希釈倍率における  $\Delta OD$ 、および Dog-CD20-OVA をプレートに吸着させた場合の 2 週目 ( ■ ) と 14 週目 ( □ ) の各血清希釈倍率における  $\Delta OD$  を示した。実験は 3 重試験で行い、各測定値を次頁の表に示した。

Dog-CD20-OVA 抗原	×20	×40	×60	×80	×100	×500	×2,500	×10,000
0 週目	1.058	0.889	0.759	0.823	0.789	0.538	0.414	0.334
	1.001	0.755	0.814	0.783	0.868	0.574	0.411	0.315
	0.838	0.869	0.800	0.809	0.900	0.591	0.415	0.336
平均	0.966	0.838	0.791	0.805	0.852	0.567	0.413	0.329
標準偏差	0.093	0.059	0.023	0.017	0.047	0.022	0.002	0.009
2 週目	1.411	1.094	0.922	0.900	0.883	0.642	0.400	0.361
	1.302	1.083	1.022	1.020	0.915	0.559	0.396	0.322
	1.304	1.119	1.003	1.085	0.913	0.587	0.378	0.345
平均	1.339	1.099	0.982	1.001	0.904	0.596	0.392	0.343
標準偏差	0.051	0.015	0.043	0.077	0.015	0.034	0.009	0.016
14 週目	1.410	1.180	0.862	0.916	0.840	0.543	0.413	0.348
	1.388	1.211	0.996	0.932	0.824	0.534	0.367	0.363
	1.350	1.140	1.008	1.039	0.823	0.524	0.394	0.351
平均	1.383	1.177	0.955	0.962	0.829	0.533	0.391	0.354
標準偏差	0.025	0.029	0.066	0.054	0.008	0.008	0.019	0.006

Dog-CD20-OVA を ELISA 抗原とした健常犬血清の吸光度値

OVA 抗原	×20	×40	×60	×80	×100	×500	×2,500	×10,000
0 週目	0.865	0.550	0.501	0.548	0.800	0.504	0.264	0.296
	0.607	0.493	0.580	0.651	0.802	0.456	0.337	0.304
	0.789	0.670	0.683	0.592	0.827	0.491	0.347	0.331
平均	0.754	0.571	0.588	0.597	0.810	0.484	0.316	0.311
標準偏差	0.108	0.074	0.075	0.042	0.012	0.020	0.037	0.015
2 週目	1.153	0.741	0.731	0.619	0.790	0.488	0.348	0.339
	0.857	0.690	0.645	0.647	0.763	0.531	0.352	0.315
	0.847	0.726	0.673	0.655	0.842	0.482	0.342	0.312
平均	0.952	0.719	0.683	0.640	0.798	0.500	0.347	0.322
標準偏差	0.142	0.021	0.036	0.015	0.033	0.022	0.004	0.012
14 週目	0.815	0.663	0.542	0.550	0.604	0.440	0.345	0.320
	0.683	0.715	0.599	0.600	0.624	0.411	0.357	0.326
	0.808	0.682	0.623	0.625	0.618	0.439	0.356	0.342
平均	0.768	0.687	0.588	0.592	0.615	0.430	0.353	0.329
標準偏差	0.061	0.022	0.034	0.031	0.008	0.014	0.005	0.009

OVA を ELISA 抗原とした健常犬血清の吸光度値

Fig. 8

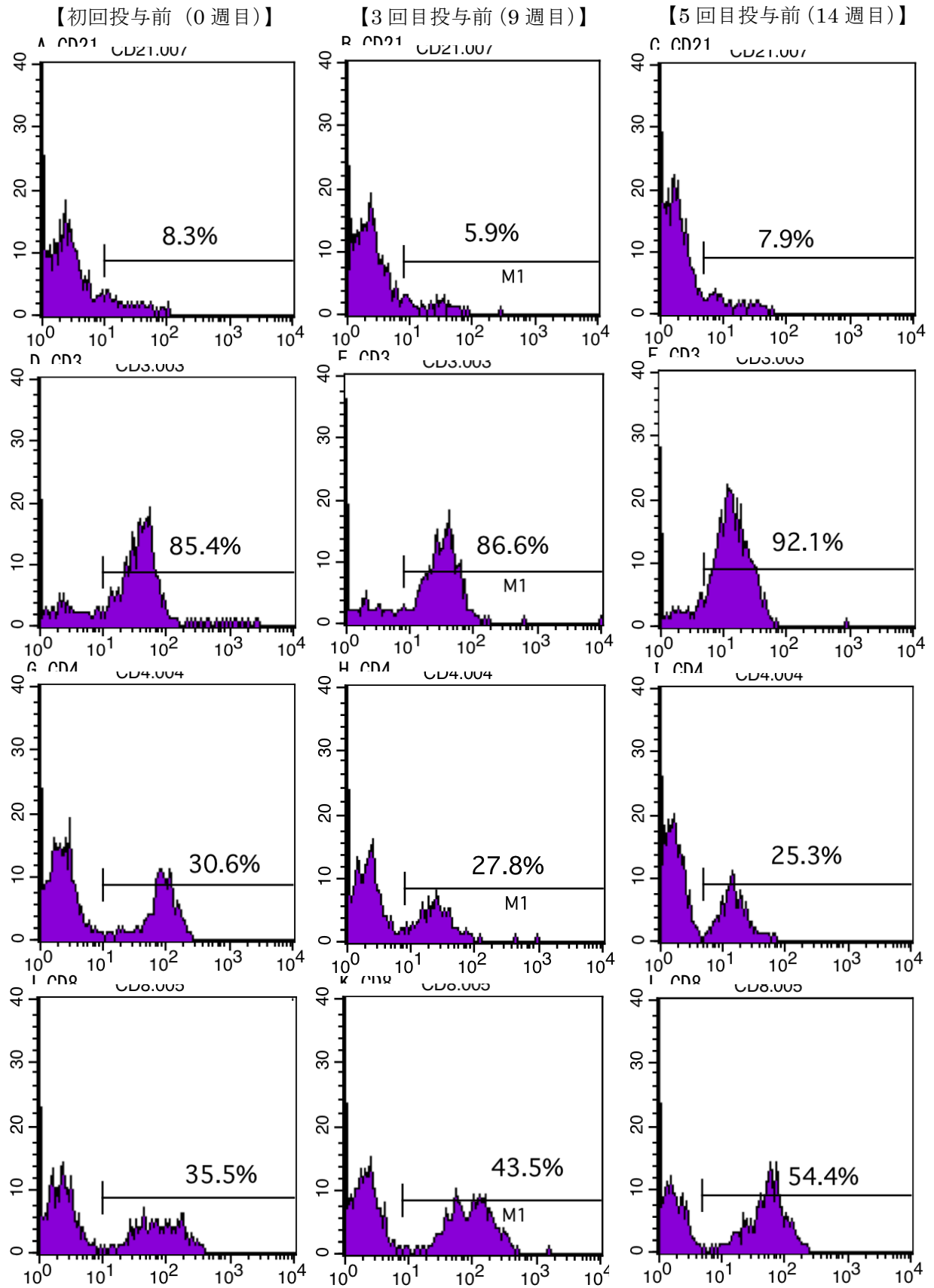




Fig. 8 健康犬にペプチドワクチンを投与した時のリンパ球サブセットの変化を評価した。1、3、5回目（0、6、14週目）のペプチドワクチン投与直前に末梢血単核球を分離し、イヌリンパ球をフローサイトメトリーで解析した。それぞれのヒストグラムでは縦軸に細胞数を、横軸に FITC の蛍光強度を示した。0、6、14週目のリンパ球分画における CD21 陽性細胞の割合を A、B、C に、0、6、14週目のリンパ球分画における CD3 陽性細胞の割合を D、E、F に、0、6、14週目のリンパ球分画における CD4 陽性細胞の割合を G、H、I に、0、6、14週目のリンパ球分画における CD8 陽性細胞の割合を J、K、L に示した。

Fig. 9

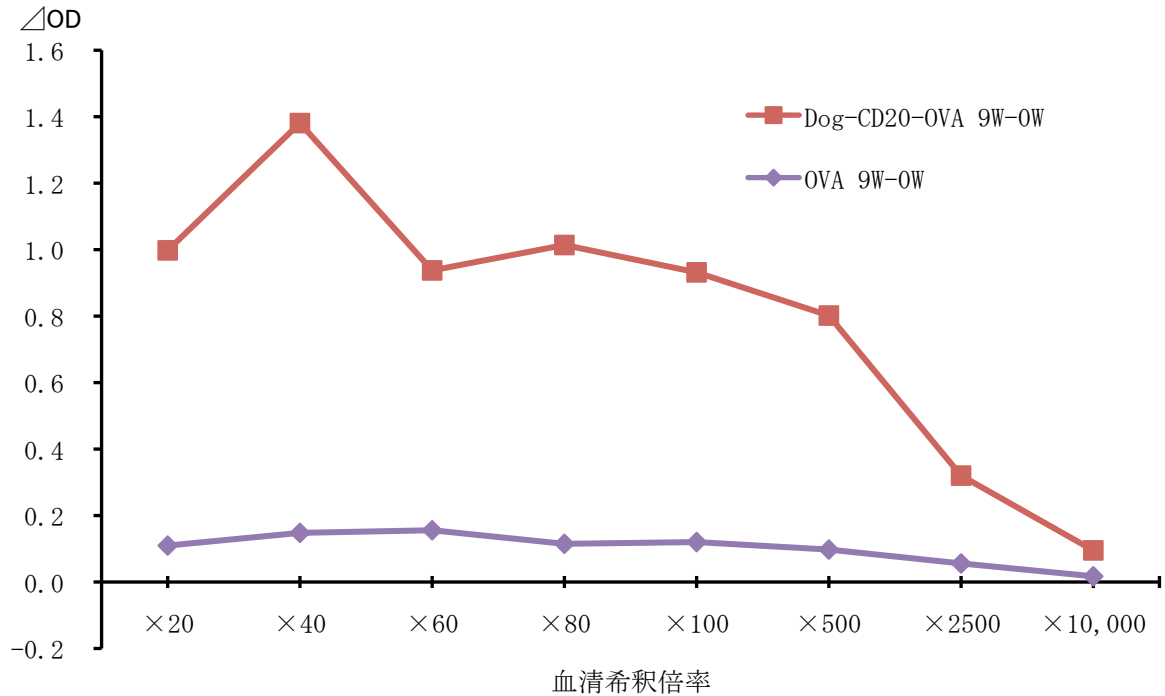


Fig. 9 Dog-CD20-KLH で免疫したリンパ腫症例の血清抗体価を ELISA 法により測定した。96 穴プレートに OVA または Dog-CD20-OVA を吸着させ、希釈した血清と反応させた。免疫後（9 週目）の吸光度から免疫前（0 週目）の吸光度を引いた  $\Delta$ OD を縦軸に、血清希釈倍率を横軸に示した。OVA をプレートに吸着させた場合（◆）と、Dog-CD20-OVA をプレートに吸着させた場合（■）の各血清希釈倍率における  $\Delta$ OD を示した。実験は 3 重試験で行い、各測定値を次頁の表に示した。

Dog-CD20-OVA 抗原	× 20	× 40	× 60	× 80	× 100	× 500	× 2,500	× 10,000
0 週目	0.663	0.587	0.508	0.497	0.415	0.260	0.216	0.169
	0.669	0.584	0.533	0.484	0.404	0.299	0.190	0.168
	0.637	0.562	0.472	0.477	0.388	0.258	0.187	0.157
平均	0.656	0.578	0.504	0.486	0.402	0.272	0.197	0.165
標準偏差	0.014	0.011	0.025	0.008	0.011	0.019	0.013	0.005
9 週目	1.464	1.803	1.370	1.466	1.256	1.134	0.509	0.258
	1.705	2.027	1.386	1.425	1.347	1.053	0.507	0.256
	1.793	2.045	1.570	1.609	1.399	1.035	0.536	0.265
平均	1.654	1.959	1.442	1.500	1.334	1.074	0.518	0.260
標準偏差	0.139	0.110	0.090	0.079	0.059	0.043	0.013	0.004

Dog-CD20-OVA を ELISA 抗原としたリンパ腫症例の血清の吸光度値

OVA 抗原	× 20	× 40	× 60	× 80	× 100	× 500	× 2,500	× 10,000
0 週目	0.520	0.431	0.377	0.379	0.328	0.218	0.152	0.135
	0.529	0.422	0.386	0.365	0.313	0.221	0.159	0.136
	0.489	0.417	0.343	0.367	0.286	0.196	0.152	0.139
平均	0.513	0.424	0.369	0.370	0.309	0.212	0.154	0.136
標準偏差	0.017	0.006	0.018	0.006	0.018	0.011	0.003	0.002
9 週目	0.648	0.564	0.553	0.440	0.438	0.309	0.214	0.159
	0.606	0.591	0.501	0.469	0.411	0.318	0.200	0.152
	0.613	0.560	0.519	0.547	0.437	0.301	0.216	0.150
平均	0.622	0.571	0.524	0.485	0.429	0.310	0.210	0.154
標準偏差	0.018	0.014	0.021	0.045	0.013	0.007	0.007	0.004

OVA を ELISA 抗原としたリンパ腫症例の血清の吸光度値

Fig. 10

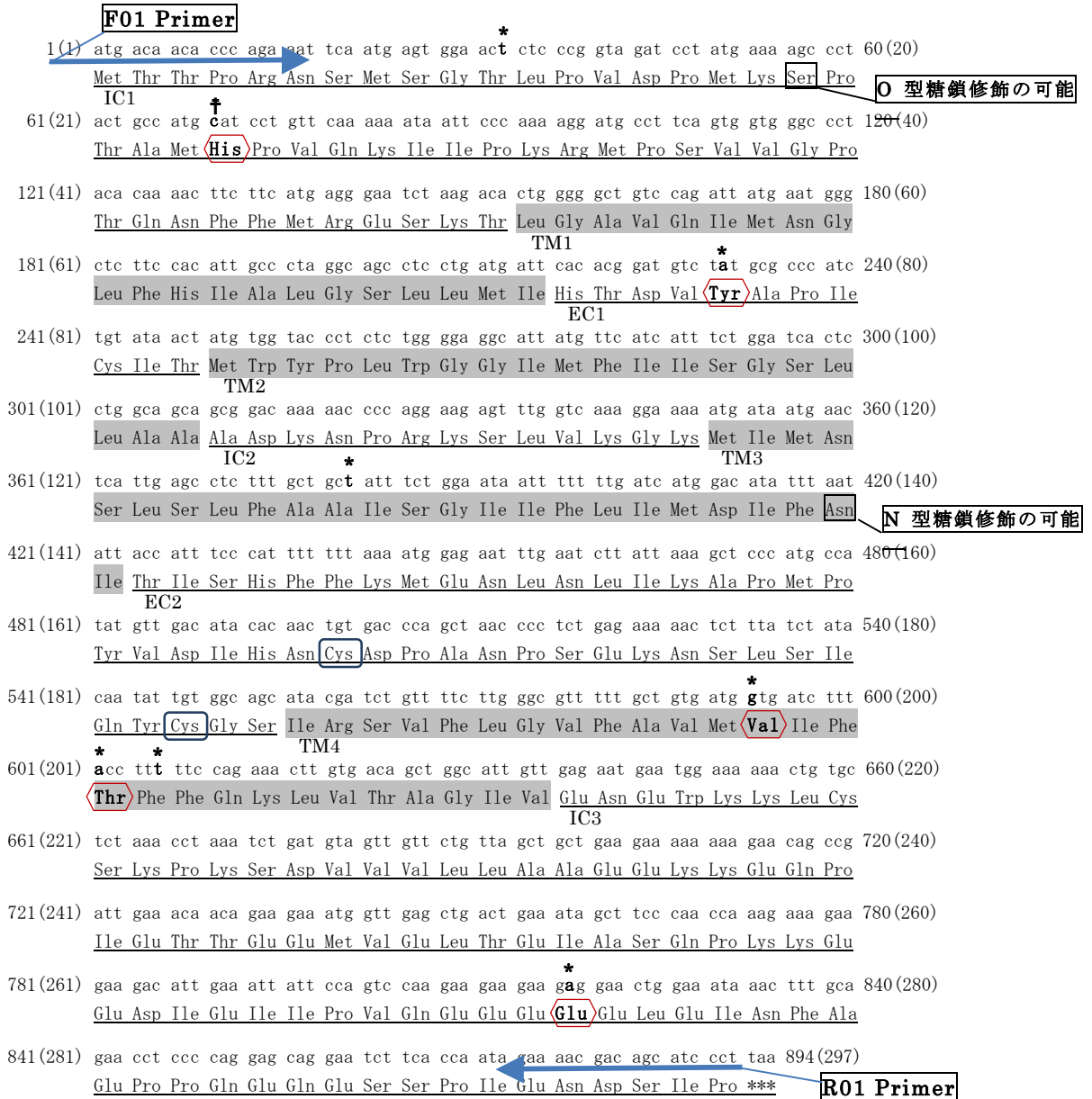
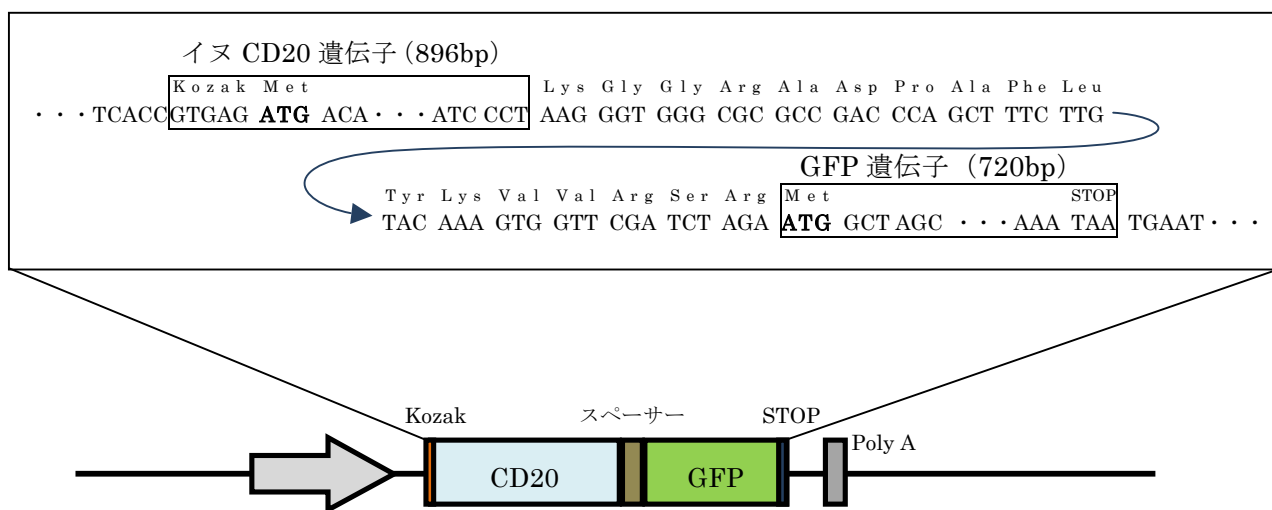


Fig. 10 イヌのリンパ腫細胞から作製した cDNA を鋳型にイヌ CD20 遺伝子を増幅し、pENTR/D-TOPO プラスミドに挿入した。pENTR-CD20 の塩基配列と予想されるアミノ酸配列を示した。イヌ CD20 遺伝子の増幅に用いたプライマー F01 Primer と R01 Primer をそれぞれ矢印で示した。ヒト CD20 の構造からイヌ CD20 の構造を予想し、細胞内領域を“IC1-3”、膜貫通領域を“TM1-4”、細胞外領域を“EC1-2”で示した。N-および O-結合型糖鎖修飾の可能性のある部位を“□”で示した。ヒトと同様に第二細胞外領域 (EC2) に分子内ジスルフィド結合を形成することが予想される 2 つのシステイン残基を“Cys”で示した。イヌ CD20 の cDNA 配列として GenBank に登録されている配列 (AB210085) [30] と異なる塩基を“\*または†”で示し、Ensembl に登録されている配列 (ENSCAFT00000039220) [53] と異なる塩基を“†”で示した。これらの中で非同義置換となるアミノ酸を“◇”で示した。

A. Fig. 11



B.

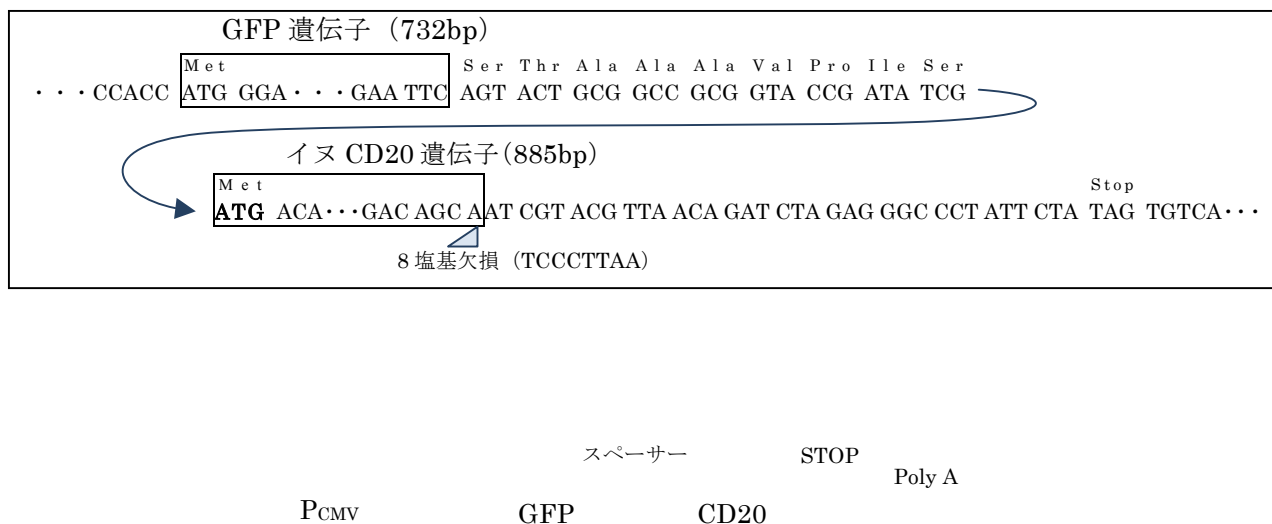


Fig. 11 作製したイヌ CD20 哺乳類細胞発現プラスミドのコンストラクトを示した。(A) pDEST-CD20 であり、CMV プロモーター (P<sub>CMV</sub>) の下流に Kozak 配列とそれに続くイヌ CD20 遺伝子を挿入し、3' 側にあるベクター由来 GFP 遺伝子との融合蛋白として発現するように構築した。

(B) pCruz-CD20 であり、CMV プロモータの下流にベクター由来の GFP 遺伝子が存在し、その 3' 側にイヌ CD20 遺伝子を挿入し、融合蛋白として発現するように構築した。挿入したイヌ CD20 遺伝子の 3' 末端では終始コドンを含む 8 塩基 (tcccttaa) が欠損しており、これによりイヌ CD20 の 3 アミノ酸残基が欠損し、フレームシフトによりイヌ CD20 の C 末端に 13 残基のアミノ酸が付加されることが予想された。

Fig. 12

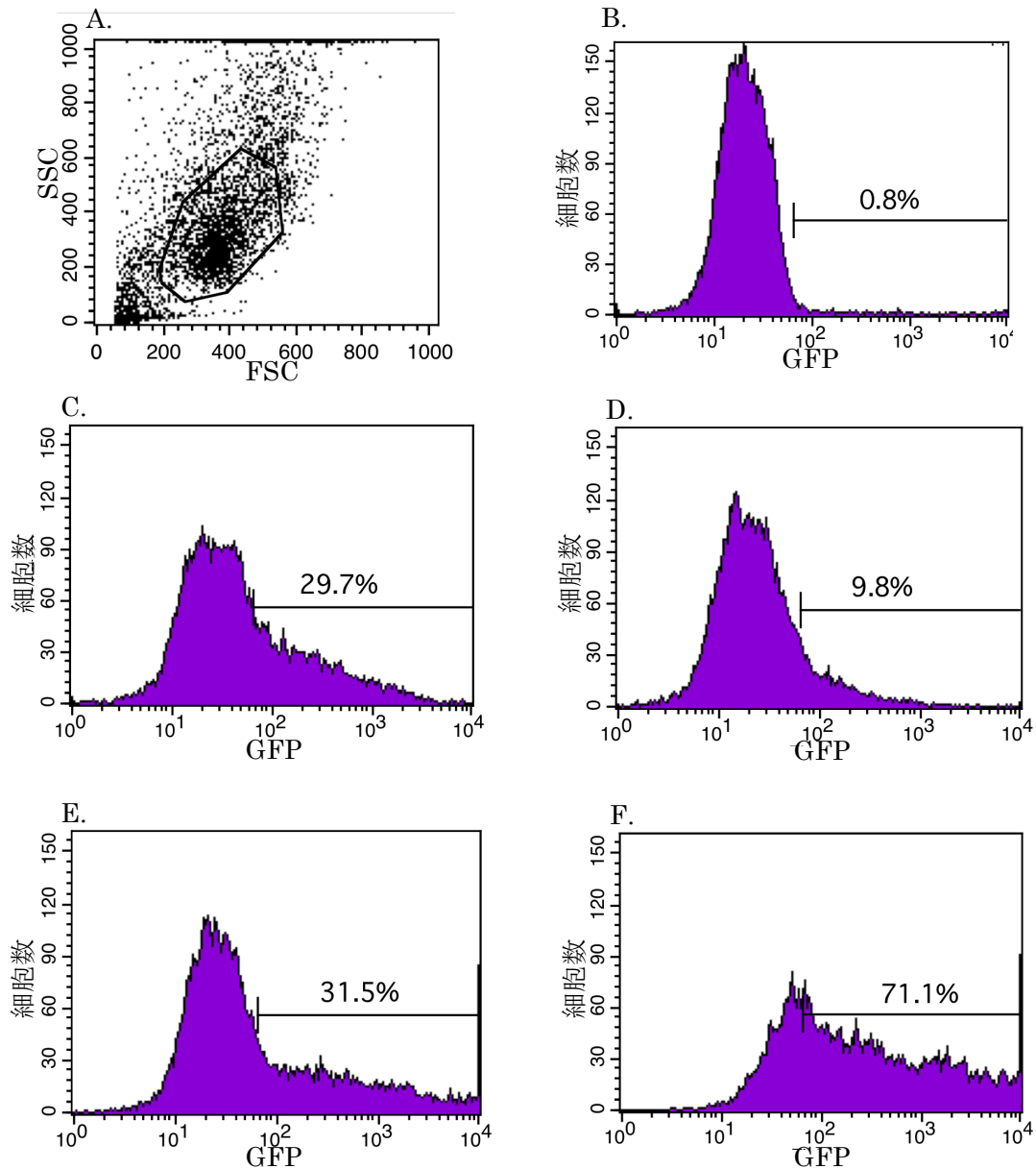


Fig. 12 pDEST-CD20 および pCruz-CD20 を導入した HEK293 細胞における、リコンビナントイヌ CD20 分子の発現を解析した。導入細胞をトランスフェクションの 48 時間後にトリプシン処理し、培養液で浮遊させ、生細胞分画の細胞 20,000 個についてフローサイトメトリーで解析した。(A) 陰性コントロールである pMD20-T vector を導入した細胞の、前方散乱光 (FSC) /側方散乱光 (SSC) のドットプロットであり、生細胞分画にゲートをかいた。(B) 陰性コントロールである pMD20-T vector を導入した細胞のヒストグラム。(C) 陽性コントロールである pcDNA/GW-47/CAT を導入した細胞のヒストグラム (D) pDEST-CD20 を導入した細胞のヒストグラム。(E) 陽性コントロールである pCruz GFP-L を導入した細胞のヒストグラム。(F) pCruz-CD20 を導入した細胞のヒストグラム。

Table. 1 本研究で設計したプライマーの塩基配列

プライマー名	配列	位置*	備考
<b>pENTR-CD20 作製用プライマー</b>			
F01 Primer	5' -cacctgagatgacaacaccagaaa-3'	-5-17	クローニングの方向性を保つために5'側にcaccを付加した
R01 Primer	5' -agggatgctgctgcttttcta-3'	891-872	終始コドンの1残基上流から始まるリバープライマー
<b>pCruz-CD20 作製用プライマー</b>			
F02 Primer	5' -atcgatgacaacaccagaaattca-3'	1-21	コドンの読み枠を合わせるために5'側にatcgを付加した
R02 Primer	5' -ttaaggatgctgctgcttttctat-3'	894-871	終始コドンから始まるリバープライマー
<b>シーケンス用プライマー</b>			
F03 Primer	5' -gtagttgttctgtagctgctg-3'	679-700	
F04 Primer	5' -agcaaagacccaacgagaa-3'		pCruz GFP-A の GFP 遺伝子中の配列

\* Fig. 10 に示したイヌ CD20 の塩基配列の開始コドンの最初の塩基 (a) を 1 とした。

Table. 2 健常犬における皮内試験、遅延型アレルギー反応（DTH）、副作用の結果

		1 回目 (0 週 目)	2 回目 (2 週 目)	3 回目 (6 週目)	4 回目 (10 週 目)	5 回目 (14 週 目)
<b>皮内試験</b>						
Dog-CD20	発赤	1mm	2mm	1mm	2mm	1mm
	膨疹	なし	なし	なし	なし	なし
Dog-CD20-KLH	発赤	6mm	5mm	4mm	1mm	2mm
	膨疹	なし	2mm	3mm	1mm	1mm
<b>遅延型アレルギー反応</b>						
Dog-CD20	発赤	1mm	1mm	なし	1mm	なし
	硬結	なし	なし	なし	なし	なし
Dog-CD20-KLH	発赤	5mm	1mm	2mm	1mm	1mm
	硬結	なし	4mm	3mm	2mm	3mm
<b>副作用</b>						
掻痒		なし	なし	なし	なし	なし
潰瘍形成		なし	なし	なし	なし	なし
アナフィラキシー症状		なし	なし	なし	なし	なし



Table.3 リンパ腫症例における皮内試験、副作用の結果

ペプチドワクチン投与		1回目 (0週目)	2回目 (2週目)	3回目 (4週目)	4回目 (9週目)
<b>皮内試験</b>					
Dog-CD20	発赤	なし	実施せず	なし	なし
	膨疹	なし	実施せず	なし	なし
Dog-CD20-KLH	発赤	15mm	実施せず	なし	17mm
	膨疹	15mm	実施せず	なし	17mm
<b>副作用</b>					
掻痒		なし	なし	なし	ワクチン中止
潰瘍形成		なし	なし	なし	ワクチン中止
アナフィラキシー症状		なし	なし	なし	ワクチン中止

## 第2章：イヌのメラノーマ特異抗原 Melan-A、TRP-2 を標的としたワクチン療法

### <要旨>

イヌの口腔内メラノーマは悪性の挙動を示すことが多く、転移率も高い。近年治療として、腫瘍特異的な免疫療法が盛んに研究されている。本研究では、ペプチドワクチン、DNA ワクチンに注目し、イヌでの臨床応用に向けた基礎的研究を行った。免疫治療のターゲットとして、イヌのメラノーマで高率に発現し、ヒトやマウスで細胞性免疫の標的にされる Melan-A、TRP-2

(tyrosinase-related protein 2) を選択した。はじめにイヌの治療用ペプチドワクチンの作製を行った。Melan-A、TRP-2 についてヒトの HLA 拘束性のペプチド配列を参考に、イヌで相同な領域付近で免疫用ペプチドをそれぞれ合成した。これら 2 つのペプチドにキャリアーとして KLH を付加し、ウサギおよび老齢犬に投与した。老齢犬への投与の際には、新規に開発された疎水化  $\gamma$ -ポリグルタミン酸ナノ粒子をアジュバントとして用いた。その結果、ウサギおよび老齢犬で投与したペプチドに対する抗体産生が認められたが、細胞性免疫誘導の証拠は認めなかった。今回使用したペプチドワクチンをプロトタイプとして、今後ペプチド配列の改良を重ね新規のアジュバントとの併用を試みることで、メラノーマ症例に対してより有効なワクチン開発を進めることができると考えられた。DNA ワクチンの作製では、口腔内メラノーマ組織から cDNA を作製し、EBNA-1 を含む発現プラスミドにイヌ Melan-A、TRP-2 遺伝子を挿入した。発現プラスミド内の遺伝子配列を解析したところ、Melan-A は報告されているイヌの配列と完全に一致した。イヌ TRP-2 の mRNA の報告がないためゲノムデータベースからの予測配列を参考にしたが、予測上の TRP-2 遺伝子の開始コドンがヒトの開始コドンと異なっており、ヒトのアミノ酸配列と比較して N 末端に 31 残基のアミノ酸が付加される構造となった。データベース上の配列と比較して、今回クローニングしたイヌ TRP-2 には 1 塩基の非同義置換がみられ、機能性ドメインとは関係のない領域でリジンからアルギニンへの置換が認められた。Melan-A、TRP-2 遺伝子発現プラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションしたところ、免疫染色で Melan-A、TRP-2 ともに、導入細胞の細胞質が染色され、両蛋白の発現が認められた。また、ウェスタンブロットでは、Melan-A はヒトと同様に 21-23KDa 付近にバンドを認め、二量体を形成していると考えられた。一方、イヌ TRP-2 は 70-85KDa 付近にバンドを認めた。ヒトと同じくアミノ酸配列から予測された分子量よりも大きく、糖鎖付加されていることが推測された。また、Melan-A、TRP-2 ともに 2 本のバンドが検出され、糖鎖付加による多型であると推測した。今回構築した発現プラスミドは実際に Melan-A、TRP-2 を発現し、糖鎖も付加されるため、DNA ワクチンとして応用できる可能性があると考えられた。

## 序論

イヌのメラノーマは口腔内、皮膚、眼に好発する。特に口腔内メラノーマは悪性腫瘍が多く、局所浸潤や遠隔転移が認められる[36]。治療としては可能な場合は外科手術や腫瘍の局所コントロールを目的とした放射線治療が行われるが、遠隔転移のある症例では全身的な治療が考慮される。イヌのメラノーマに対する全身的な治療としては白金製剤を用いた化学療法が報告されているが、奏効率は28%程度で、転移性メラノーマでの治療効果はあまり期待できない[5,38]。そのため以前から免疫療法の有用性が検討されてきた。これまでイヌのメラノーマに対して、非特異的な免疫療法としてヒトインターロイキン2 (IL-2)[29]、不活化された *Corynebacterium parvum* 菌体成分[26]、免疫賦活物質とされるリボソーム封入ムラミルペプチド-ホスファチジルエタノールアミンの投与[27]などが報告されている。しかし非特異免疫療法は症例のもつ自然免疫を増強する目的で行われているが、一般に奏効率は高くない。近年、腫瘍特異抗原を標的にした免疫療法が盛んに研究されており、腫瘍特異抗原を標的とすることで、より特異的に腫瘍細胞を攻撃することができると期待されている。特にメラノーマは腫瘍抗原の同定も進んでおり、抗原特異的な免疫療法の対象として、ヒトでも臨床試験が多く実施されている[9,33,35,42-44,46,51]。ヒトのメラノーマの腫瘍特異抗原として、これまでチロシナーゼ、gp-100、Melan-A、チロシナーゼ関連蛋白 (TRP-1、TRP-2) などが報告されている[57]。これらはすべてメラニン細胞の色素産生に関連する蛋白と考えられているが、イヌで免疫療法の標的抗原として汎用されるためには、イヌのメラノーマ腫瘍細胞で高率に発現していることが必要である。Melan-A はメラノソーム、小胞体に存在するポリペプチドで[40]、この蛋白の役割は未だ不明であるが、イヌのメラノーマの診断のための免疫組織化学マーカーとしても頻用されており、イヌの口腔内メラノーマの92.6%で検出されている[37]。TRP-2 はチロシナーゼ関連蛋白の一つで、哺乳類において色素生成のコントロールを担っている[17]。TRP-2 はイヌの非色素性メラノーマで Melan-A よりも高頻度に検出されることが報告されている[8]。一方、チロシナーゼや gp-100 はイヌのメラノーマでは検出率は高くない[37]。そのため本研究では Melan-A と TRP-2 を標的蛋白として研究を進めることにした。

ヒトでは Melan-A、TRP-2 をモチーフにした合成ペプチドを MHC class I に提示させ、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) をエフェクターとする腫瘍免疫を誘導させる研究が行われている[7,10,21,22,63]。しかし、ヒトでのペプチドワクチンの臨床試験結果を複数収集した研究報告では、腫瘍退縮が認められたのは2.9%であった[45]。イヌのメラノーマ症例に対する Melan-A、TRP-2 を標的にした臨床試験の報告はないが、一般に癌のペプチドワクチンは、自己抗原であり、かつ免疫原性が弱く十分な免疫を誘導するために解決すべき課題は多い。イヌで臨床的な有用なペプチドを開発するためには、より強い抗原性をもつエピトープの検索や、免疫誘導のためのアジュバントが必要と考えられる。ヒトでは腫瘍のペプチドワクチンのアジュバント候補として Montanide、QS-21、MF-59 を用いた臨床試験が行われており、メラノーマ、大腸がん、リンパ腫などに対して臨床試験が行われている[39,49,53,66]。本研究では、新しいアジュバントとして疎水化  $\gamma$ -ポリグルタミン酸 ( $\gamma$ -PGA) ナノ粒子[31,32,58,59,65,67]を用いて研究を行った。 $\gamma$ -PGA は水溶性合成されるポリアミノ酸の生分解性高分子で、様々な化学修飾が可能である。今回用いた  $\gamma$ -PGA は疎水性アミノ酸を導入した分散安定性の高いナノ粒子で、効率よく安定的に抗原タンパク質を表面に保持できる特徴を有している。イヌにおける使用例はないが、マウスにおいてヒト免疫不全ウイルスワクチンなどのアジュバントとして使用され、IFN- $\gamma$  産生 T 細胞および抗原特異的抗体の誘導が認められ

ている[65]。

DNA ワクチンは特異的免疫療法の一つで、標的抗原を発現する遺伝子を接種し生体内で抗原を発現させることで、その蛋白に対する免疫応答を惹起する。DNA ワクチンにより CTL の誘導が可能で[12,16,52]、従来のワクチンと比べて大量調整が容易かつ安価である。ヒトでは、前立腺癌やメラノーマ、子宮頸癌、肺癌などを対象にした臨床試験が行われており、生体内で抗原特異的 CTL を誘導したが、これまでのところ有意に腫瘍を退縮させたという報告はない[14]。イヌのメラノーマに対する DNA ワクチンも報告されている。その研究ではヒトのチロシナーゼ遺伝子を利用した異種ワクチンが用いられており、腫瘍が転移した症例でも延命効果が示唆されている。プラスミド型の DNA ワクチンは一般に筋注されることが多いが、プラスミド DNA は生体内分解酵素やエンドソーム内で分解されるため、プラスミド単独で投与した場合の遺伝子導入・発現効率は極めて低く、効果を得るための克服すべき課題と考えられる[13]。DNA の細胞内への取り込みを高めるため、リポソーム封入遺伝子などの使用が試みられており、導入効率の改善や液性、細胞性免疫の増強が認められている[13]。本研究では細胞へ取り込まれた後、遺伝子を効率的に発現させるための EBNA-1 遺伝子を持つ発現ベクターを用いた。EBNA-1 挿入プラスミドは細胞内に導入されると、細胞の染色体外に安定に維持され、細胞増殖時に複製されて娘細胞に分配される。したがって、発現持続性があり安定した発現細胞を作成しやすいとされる。

今回の研究では、メラノーマの特異的免疫療法として Melan-A、TRP-2 に注目し、DNA ワクチン、ペプチドワクチンの作成を試みた。DNA ワクチンについては、イヌの腫瘍組織から Melan-A、TRP-2 の cDNA をクローニングし、発現プラスミドを作成した。このプラスミドを培養細胞に導入し、蛋白レベルでの発現に成功した。また、ペプチドワクチンについては Melan-A、TRP-2 のエピトープ部位と想定される合成ペプチドを作成し、ウサギとイヌへ投与し、免疫誘導や副作用の評価を行った。

## 材料と方法

### I イヌの Melan-A、TRP-2 の遺伝子クローニング

鹿児島大学附属動物病院に来院し、口腔内メラノーマと診断された 15 歳齢、避妊雌、雑種犬から、治療を目的に外科的に摘出された組織を用いた。組織を約 5mm の立体形に切断し、生理食塩水で洗浄した。その後、RNA 抽出用キット (mirVana™miRNA Isolation Kit、life technologies、Carlsbad、CA) に添付されている Lysis/Binding Buffer 1.5ml に混和し、氷上でホモジナイザー-AHG-160A を用いて細胞をホモジナイズし、3,000rpm で 15 分間遠心後、RNA 抽出まで上清 300  $\mu$ l を  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。保存した上清を用い、最終的に 100  $\mu$ l になるように Elution Solution で Total RNA を抽出し、使用まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。Total RNA 濃度は分光光度計 NanoDrop (ND-1000、Nano Drop Technologies、Wilmington、DE) を用いて測定し、抽出した Total RNA 300ng をテンプレートとして、ReverTra-Plus™ (東洋紡績、大阪) を用いて、キットの添付プロトコールに従い付属している Oligo (dT-20) primer を加え、 $42^{\circ}\text{C}$  60 分間、 $85^{\circ}\text{C}$  5 分間で逆転写反応を行った。この反応液を鋳型として、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 反応を行った。PCR に使用したプライマーを Table 1 に示した。Melan-A についてはイヌの mRNA の塩基配列データ (Gene Bank Accession No: XM\_848155) を参考にした。TRP-2 についてはイヌの mRNA のデータが報告されていないため、イヌのゲノムから予測される mRNA の配列 (Gene Bank Accession No: XM\_542639) を参考にし、株式会社ベックス (東京) にプライマー合成を依頼した。Melan-A のフォワードプライマー F01 primer は開始コドン atg を含み、その 5' 側に翻訳の開始の位置づけのためコザック配列 gccacc を付加した。さらにその 5' 側に、発現ベクターへのクローニングのために制限酵素 *SaI* I で認識される配列 gtcgac を付加した。また、リバープライマー R01 primer は終始コドンを含み、クローニングのため制限酵素 *Bam* H I に認識される ggatcc を付加した。また、TRP-2 も同様に F02 primer、R02 primer をデザインした。DNA の増幅には、Blend Taq KOD -plus- (東洋紡績、大阪) を用い、逆転写反応の産物 2  $\mu$ l を用いて、Table 2 の組成で反応を行った。PCR 産物を 1.5% のアガロースゲルで電気泳動し、10,000 倍希釈した SYBR Safe DNA gel stain (life technologies) で染色後、青色 LED トランスイルミネーター (オプトコード、東京) を用いて観察した。

### II イヌ Melan-A、TRP-2 発現プラスミドの作成

Melan-A または TRP-2 の PCR 産物 2  $\mu$ l を用い TOPO TA Cloning Kits (life technologies、Carlsbad、CA) を利用して、添付のプロトコールに従い、クローニングベクター pCR®2.1-TOPO® へライゲーション反応を行った。この反応液を用いて、コンピテント細胞 (NEB 10-beta Competent E.coli High Efficiency: NEW ENGLAND BioLabs、Ipswich、MA) を形質転換し、アンピシリンを加えた Luria-Bertani (LB) プレートで選択した。形成されたコロニーについて、アンピシリンを加えた LB 液体培地で、 $37^{\circ}\text{C}$  で培養後、プラスミド抽出キット (Plasmid DNA Purification NucleoSpin® Plasmid QuickPure: MACHEREY-NAGEL、Düren、Germany) を用いてプラスミドを抽出した。抽出したプラスミド DNA をテンプレートとして、Melan-A については、F01 primer-R01 primer、TRP-2 については F02 primer-R02 primer を用いて Table 2 の条件で PCR を行い、インサート配列のスクリーニングを行った。PCR 産物を 1.5% のアガロースゲルで電気泳動し、10,000 倍希釈した SYBR Safe DNA gel stain (life technologies) で染色後、陽性クローンをそれぞれ選択し、プラスミド

を pCR-dog-Melan-A、pCR-dog-TRP-2 とした。

この pCR-dog-Melan-A、pCR-dog-TRP-2 を用いて、発現プラスミドの構築を行った。発現ベクターには、プラスミドが細胞分裂中の娘細胞に分配される EBNA-1 を含む Episomal 型ベクターである pEBMulti-Neo (Wako、大阪)を用いた。制限酵素 *Sal* I、*Bam*H I (NEW ENGLAND BioLabs)を用いて pCR-dog-Melan-A、pCR-dog-TRP-2 を、37°C で 60 分間消化した。反応液を 1.5%アガロースゲルで電気泳動を行い、SYBR Safe DNA gel stain で可視化後、各々の遺伝子を含む DNA 断片を含むゲルを切り出した。Gel/PCR DNA Isolation System (VIOGENE、New Taipei City、Taiwan)の添付プロトコールに従って、ゲルから DNA 断片を抽出精製後、発現ベクターpEBMulti-Neo とのライゲーションに用いた。pEBMulti-Neo を *Sal* I および *Bam*H I で 37°C、60 分間消化し、熱失活性アルカリフォスファターゼ TSAP (プロメガ株式会社、東京)を加え、37°C 15 分静置し脱リン酸化した後、74°C で 15 分加熱し、TSAP を失活させた。その後常法どおりフェノールクロロホルムで精製し、エタノール沈殿を行った。Melan-A と TRP-2 遺伝子を含む DNA 断片と、消化、精製した pEBMulti-Neo を DNA Ligation kit (Takara、滋賀)を用いて、添付プロトコールに従い、ライゲーション反応を行った。反応後、前述の方法で NEB 10-beta Competent E.coli (High Efficiency)を形質転換し、100  $\mu$ g/ml のカナマイシンを加えた LB プレートを用い、形質転換した大腸菌コロニーを選択した。形成されたコロニーを、カナマイシンを加えた LB 培地で増殖後、DNA を抽出し、陽性クローンのスクリーニングを PCR 反応で行った。プライマーは Melan-A については pEBMulti-Neo の F03 primer と R01 primer を、TRP-2 については pEBMulti-Neo の F03 primer と R03 primer を用い、94°C 2 分で加温後、98°C の熱変性、48.8°C のアニーリング、68°C 1 分 30 秒の伸長反応を 30 サイクル行った。得られた陽性クローンからプラスミド抽出し、pEB-dog-Melan-A、pEB-dog-TRP-2 とした。このクローンについて北海道システムサイエンス株式会社 (北海道) に依頼し、F03 primer および R03 primer を用い、塩基配列を決定した。

### III HEK293 細胞への遺伝子導入

ヒト胎児腎細胞由来の HEK293 細胞[15,19,25]は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 (東京) から分与を受けた (JCRB9068)。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM、Wako、大阪)に 5%のウシ胎児血清 (FetalClone<sup>®</sup>II、Thermo SCIENTIFIC、横浜) および 1%のペニシリンーストレプトマイシン-ネオマイシン抗生物質混合液 (life technologies、Carlsbad、CA) を加えて培養液として、25cm<sup>2</sup>の細胞培養フラスコ (Cell Culture Flask 25cm<sup>2</sup> Plug Cap、SPL Life Sciences、Gyeonggi-do、Korea) を用い、5%CO<sub>2</sub> 37°C で培養し、細胞がおおよそ 70~80% confluent となった時に継代した。継代の際には培養液を捨てた後、0.5ml の TlypeLE<sup>™</sup> Express (life technologies) を加え、5 分間 5%CO<sub>2</sub> 37°C で静置した後、細胞を浮遊させ、新しい培養液で約 10 倍に希釈した。

### IV 導入細胞におけるイヌ Melan-A および TRP-2 発現解析

#### i 免疫染色による解析

HEK293 細胞をチャンバースライド (LAB-TEK、Thermo SCIENTIFIC、Rockford、IL) で 50~70% confluent になるまで培養した。X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics Japan、東京) を用いて添付プロトコールに従い、発現プラスミド pEB-Melan-A と pEB-TRP-2 を HEK293 細胞に導入した。24 時間培養後、培養液を取り除き、チャンバースライドを

4℃の冷アセトン (Wako、大阪)で 15 分間固定した。内因性ペルオキシダーゼを活性阻害するため、0.03% 過酸化水素水に 5 分間浸し VECTASTAIN UNIVERSAL Quick KIT (VECTOR LABORATORIES、Burlingame、CA)を用いて添付プロトコールに従って、ABC 法による免疫染色を行った。ブロッキングにはキットに添付されている馬の血清を用いた。一次抗体として Melan-A の解析にはマウス抗ヒト Melan-A モノクローナル抗体 (CloneA103、Dako、Glostrup、Denmark)をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-)) で 50 倍希釈したものを使用し、TRP-2 の解析にはヤギ抗ヒト TRP-2 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA)を PBS(-)で 100 倍希釈したものを用いた。二次抗体としてキットに添付されているビオチン標識ユニバーサル二次抗体を用い、付属のストレプトビジン・ペルオキシダーゼ複合体と反応後、HistoMark<sup>®</sup> ORANGE (Kirkegaard Perry Laboratories、Gaithersburg、MD)を用いて添付プロトコールに従い基質液を作成し、20 分間反応させた。その後添付されている Construct Green を用い対比染色を行った。

## ii ウェスタンブロットによる解析

HEK293 細胞を 6 穴培養プレート (WATOSON、神戸)で 50~70% confluent になるまで培養した。X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics) を用いて添付プロトコールに従い、HEK293 細胞に発現プラスミド pEB-Melan-A および pEB-TRP-2、陰性コントロールとして pEBMulti-Neo の発現ベクターを遺伝子導入した。遺伝子導入後、細胞を 24 時間培養し、培養液を取り除き、PBS (-)で 2 回洗浄した。細胞溶解液 (M-PER<sup>®</sup>Mammalin Protein Extraction Reagent、Thermo SCIENTIFIC)を 1 ウェルあたり 300  $\mu$ l 加え、5 分振とう後、細胞溶解液を 1.5ml エッペンチューブに回収し、14,000 $\times$ g で 10 分間遠心し、その上清を等量の 2 $\times$ sample buffer (0.125 M Tris-HCL バッファー (pH6.8)、4 % (w/v) SDS 溶液、10 % (w/v)スクロース、0.01 % (w/v) BPB、10 % (w/v) 2-メルカプトエタノール) と混合しウェスタンブロットに用いた。常法に従い、Melan-A の蛋白発現解析には 15%分離ゲル、TRP-2 の解析には 12%分離ゲルを作成し[23]、SDS-PAGE に使用した。泳動槽には MODEL AE-8450(ATTO、東京)を用い、ゲル 1 枚当たり 20mA の定電流約 300V で 90 分間泳動した。泳動後、転写装置 (NA-1512、日本エイドー、東京)を用いて 60 分間、100mA で Immobilon-P membrane (Millipore、Billerica、MA)への転写を行った。ウェスタンブロットの一次抗体には免疫染色の際に用いた同じ抗体を用い、それぞれスキムミルクで 200 倍に希釈し、37℃で静置してメンブレンと 90 分間反応させた。その後メンブレンを 0.05%Tween20 添加 PBS (PBS-Tween20) で 5 分ずつ 3 回洗浄した。二次抗体として Melan-A 抗体に対してはペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (MP Biomedicals LLC、Morgan Irvine、CA)、TRP-2 抗体に対してはペルオキシダーゼ標識ウシ抗ヤギ IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)を、それぞれスキムミルクで 50,000 倍に希釈し、37℃で静置してメンブレンと 60 分間反応させた。PBS-Tween20 で 5 分ずつ 3 回洗浄後、発光を ECL Prime Western Blotting Detection System (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社、東京)を用い、FluorChem FC2 (AlphaInnotech、Santa Clara、California)にて撮影した。

## V イヌ Melan-A および TRP-2 抗原ペプチドの合成

イヌの Melan-A、TRP-2 に対して免疫反応を誘起させることを目的として、ヒトのペプチドワクチンで用いられているペプチドのエピトープ部位を参考に[28,34,41,61,62]、イヌの相同領域についてペプチド合成を行った。ペプチドの水溶性を高めるため、親水性のアミノ酸を末端に配置し、Melan-A を

標的としたペプチドについてはコンジュゲートとの結合用にスパーサーと、システイン残基を導入した (Table 3)。また TRP-2 を標的としたペプチドについては、抗原性があると予測されるペプチドの N 末端側にもとの配列に存在する C を合わせ、それぞれ Dog-Melan-A、Dog-TRP-2 とした。ペプチド合成は、株式会社ベックス (東京) に純度 90%以上で合成を依頼し、このペプチドに加え、免疫用にキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) をコンジュゲートさせた Dog-Melan-A-KLH および Dog-TRP-2-KLH、卵白アルブミン (OVA) をコンジュゲートした Dog-Melan-A-OVA、Dog-TRP-2-OVA の製作を依頼した。

## VI イヌ Melan-A および TRP-2 合成ペプチドによる免疫誘導

### i 合成ペプチドのウサギへの投与と評価

Dog-Melan-A、Dog-TRP-2 のウサギへの免疫と抗体価の測定は、株式会社ベックスへ依頼した。1羽の雌の日本白色種ウサギに対し、Dog-Melan-A-KLH、Dog-TRP-2-KLH を免疫源として、2週間毎に計5回皮下投与して免疫した。初回投与時には完全フロイントアジュバントに Dog-Melan-A-KLH、Dog-TRP-2-KLH 各 200 $\mu$ g を混合して投与した。2~5回目投与時には不完全フロイントアジュバントを用い Dog-Melan-A-KLH、Dog-TRP-2-KLH 各 100 $\mu$ g を混合して投与した。免疫開始前および投与開始から5週間後に血清を採取し、ELISA法で Dog-Melan-A、Dog-TRP-2 に対する抗体価を測定した。抗体価の測定は ELISA法で行われた。Dog-Melan-A、Dog-TRP-2 を 96穴プレートに吸着させ、洗浄後 1,000~128,000倍で段階希釈したウサギ血清を加え反応させた。洗浄後に2次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体を加えて反応させ、Tetramethyl Benzidine (TMB) を加えて発色させた後、1Mの H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えて反応を停止し、波長 450nm で吸光度を測定した。

### ii 合成ペプチドのイヌへの投与と評価

鹿児島大学附属動物病院で飼育する、約16歳齢、体重20kgの去勢雄の雑種犬に対し、ペプチドワクチンの投与を行い、その効果および副作用を検討した。

Dog-Melan-A-KLH、Dog-TRP-2-KLH をそれぞれ PBS (-) で 1mg/ml に調整し、この溶液 1ml に対しアジュバントとして疎水化  $\gamma$ -ポリグルタミン酸 ( $\gamma$ -PGA) ナノ粒子 (大阪大学大学院工学研究科、明石満教授より分与) 10mg を加えて 1.5ml マイクロチューブに入れ混和後、マイクロチューブを超音波洗浄機 US-4R (アズワン株式会社、大阪) を用いて 10分間懸濁した。この溶液 2ml を 25G 注射針 (トップ、東京)、2.5ml シリンジ (テルモ、東京) を用いアルコール消毒した肩甲間の皮下に注射した。投与は初回投与日から 2、6、10週目に計4回行った (Fig.5)。

### ii (A) …皮内試験および遅延型アレルギー反応 (DTH)

ペプチドに対する免疫反応を見るために皮内試験を行った。イヌの側腹部の皮膚を剃毛し、Dog-Melan-A (2mg/ml)、Dog-TRP-2 (2mg/ml)、Dog-Melan-A-KLH (2mg/ml)、Dog-TRP-2-KLH (2mg/ml) をそれぞれ各 0.05ml ずつ皮内に注射した。投与は 27G2 段針 (トップ)、1ml ツベルクリン用シリンジ (テルモ) を用いて行った。投与 15分後に接種部の発赤、膨疹のサイズを計測した。また皮内試験 24時間後に、接種部の発赤、硬結のサイズを計測した。評価は 0、2、6、10週目の計4回ペプチド投与前に行った。



## ii (B) … 副作用

投与部位の掻痒や潰瘍形成等、皮膚の異常の有無を試験期間中観察した。また投与から 30 分間、呼吸困難、意識障害、全身性膨疹や紅斑等アナフィラキシー症状の有無を観察した。

## VII イヌ Melan-A、TRP-2 由来ペプチドに対する抗体価の測定

初回投与日 (0 週目)、2 回目投与日 (2 週目)、3 回目投与日 (6 週目)、4 回目投与日 (10 週目)の計 4 回のペプチド投与前および 12 週目の計 5 回、対象犬から血清を採取し、イヌメラノーマ抗原 Melan-A、TRP-2 に対する抗体価を ELISA 法で評価した。卵白アルブミンを結合させた Dog-Melan-A-OVA、Dog-TRP-2-OVA を PBS(-) でそれぞれ 1 $\mu$ g/ml に調整し、96 穴 ELISA 用プレート (ELISA 用プレート H、住友ベークライト、東京) に 100 $\mu$ l ずつ分注し、4 $^{\circ}$ C で一晩吸着させた。各ウェルを PBS-Tween20 で 3 回洗浄後 Neptune Block with Nonmammalian-Based Blocker

(ImmunoChemistry Technologies, LLC, Bloomington, MN) を各ウェル 200 $\mu$ l ずつ添加し、室温で 2 時間ブロッキングを行った。PBS-Tween20 で 3 回洗浄後、対象犬の血清を PBS (-) で 20 倍~2,560 倍まで希釈し、各ウェル 100 $\mu$ l ずつ加え、室温で 1 時間振とうして反応させた。PBS-Tween で 5 回洗浄し、PBS (-) で 50ng/ml に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗イヌ IgG(H+L) 抗体 (BECKMAN COULTER Brea, CA) を各ウェル 100 $\mu$ l ずつ入れ、室温で 1 時間振とうして反応させた。PBS-Tween20 で 5 回洗浄後、SIGMAFAST™ OPD タブレット、過酸化尿素/バッファーのタブレット (シグマ アルドリッチ ジャパン、東京) を用いて基質液を調整し、各ウェル 200 $\mu$ l ずつ加え、37 $^{\circ}$ C の遮光状態で反応させた。1 時間後に 3M に調整した塩酸 (ナカライテスク) を 50 $\mu$ l/well ずつ加え反応を停止させ、マイクロプレートリーダー iMark™ Microplate Absorbance Reader (BIO RAD, Hercules, CA) を用いて波長 490nm の吸光度を測定した。抗体価の測定は二重試験で行い、平均値を各サンプルの吸光度とした。

## VIII 遺伝子組み換え実験および動物実験に関して

遺伝子組み換え実験計画の承認は鹿児島大学動物実験委員会の承認を受けた (承認番号 24046 号)。実験は遺伝子組み換え生物等の規制による生物の多様性の確保に関する法律および実験安全管理規制等を遵守して行った。また対象犬へのペプチドワクチン投与と評価については、鹿児島大学動物実験委員会の承認を受けた (承認番号 A10038 号)。

## 結果

### I イヌ Melan-A、TRP-2 の塩基配列と分子構造の解析

口腔内メラノーマのイヌの腫瘍細胞を材料として、イヌ Melan-A、TRP-2 の mRNA のクローニングを行った。発現ベクターに組み込まれた Melan-A および TRP-2 の cDNA の塩基配列をそれぞれ Fig.1、Fig.2 に示した。Melan-A の遺伝子配列は報告されているイヌの Melan-A 遺伝子 (Gene Bank Accession No: XM\_848155) の配列と 100%一致した。TRP-2 についてはイヌの mRNA の報告がデータベースに存在せず、ゲノムの塩基配列から予測される mRNA の塩基配列 (Gene Bank Accession No: XM\_542639) のみ利用可能であった。今回クローニングした cDNA はこの配列と比較し、開始コドンから 1625 番目のアデニンがグアニンに置換されたため、541 番目のアミノ酸がリジンからアルギニンへの非同義置換があると推測された。本研究では Gene Bank で予測されている開始コドンを参考に発現プラスミドを作成した。ヒトの mRNA では今回クローニングした配列の開始コドンから 32 番目のメチオニンが開始コドンとされている。一方今回クローニングしたイヌ TRP-2 とヒト TRP-2 の cDNA を比較したところ、32 番目のメチオニン以降の翻訳領域について遺伝子レベルで 76%、アミノ酸レベルで 84% の相同性がみられた。またヒト TRP-2 に存在する epidermal growth factor-like region (EGF 様部位)、チロシナーゼ CuA 結合部位、チロシナーゼ CuB 結合部位が保存されており、ほぼ同じ位置に膜貫通領域が存在することが示された [6,20]。

### II イヌ Melan-A および TRP-2 遺伝子の導入と発現解析

#### i 免疫染色

作製したイヌ Melan-A、TRP-2 発現プラスミド pEB-dog-Melan-A、pEB-dog-TRP-2 を HEK293 細胞に遺伝子導入し、免疫染色にて遺伝子の発現解析を行った。陰性コントロールであるトランスフェクションを行っていない HEK293 細胞と比較して、pEB-dog-Melan-A をトランスフェクションした HEK293 細胞では主に細胞質が染色され、Melan-A の発現が認められた。また、pEB-dog-TRP-2 でも同様に、トランスフェクションした HEK293 細胞の細胞質が染色され、TRP-2 の発現が認められた (Fig.3)。

#### ii ウェスタンブロット

Melan-A、TRP-2 発現プラスミド pEB-dog-Melan-A、pEB-dog-TRP-2 をそれぞれトランスフェクションした HEK293 細胞を用いて Melan-A および TRP-2 の発現をウェスタンブロットにより解析した。塩基配列から予測される分子量は Melan-A は 13KDa、TRP-2 は 62KDa である。pEB-dog-Melan-A 導入細胞では、21-23KDa 付近に 2 本のバンドが検出された (Fig.4)。ヒトメラノーマ細胞株を用いたウェスタンブロットでは約 20-24KDa の位置にバンドが検出されている [11]。pEB-dog-TRP-2 導入細胞では 70-85KDa 付近に 2 本のバンドが検出された (Fig.4)。ヒトの TRP-2 遺伝子をトランスフェクションした HEK293 では TRP-2 は糖鎖付加の影響でウェスタンブロットでは 75KDa のバンドとして検出されており今回のほぼ同じ大きさのバンドが観察された [56]。

### III イヌ Melan-A、TRP-2 由来ペプチドに対するウサギ血清の抗体価

Dog-Melan-A-KLH、Dog-TRP-2-KLH で免疫したウサギの血清中の Melan-A、TRP-2 に対する

抗体価を ELISA 法で測定した (株式会社ベックスに依頼)。Melan-A については、免疫前には血清のすべての希釈倍率 1,000~128,000 倍で吸光度は 0.050 以下であった。これに対し免疫後 (5 週目) には血清中の希釈倍率 1,000~4,000 倍で吸光度は 2.100 以上であり、以下は希釈倍率依存的に減少し、128,000 倍においても吸光度は 0.520 であった。TRP-2 については、免疫前には血清中の希釈倍率 1,000~128,000 倍で吸光度は 0.033 以下であった。これに対し免疫後には血清中の希釈倍率 1,000~4,000 倍で吸光度は 0.400 以上であり、以下は希釈倍率依存的に減少した。以上の結果より、ウサギにおいて免疫したペプチド Dog-Melan-A、Dog-TRP-2 に対する抗体が産生されていることが示された (Fig.6,7)。

#### IV イヌ Melan-A、TRP-2 由来ペプチドに対するイヌ血清の抗体価

Dog-Melan-A-KLH、Dog-TRP-2-KLH で免疫したイヌについて、Dog-Melan-A、Dog-TRP-2 に対する抗体産生を評価するため、Dog-Melan-A-OVA、Dog-TRP-2-OVA をプレートに吸着させ、免疫前と免疫後の血清の抗体価を ELISA 法で測定した。免疫前の血清において 20~160 倍の比較的濃い希釈倍率において Dog-Melan-A-OVA、Dog-TRP-2-OVA に対する反応が見られた。これは標的ペプチドまたはキャリアー蛋白の OVA に対する非特異反応と考えられた。2、6、10、12 週目と時間経過に従って、吸光度の上昇が認められた (Fig. 8,9)。OVA に対する非特異反応を考慮し、最も吸光度が高かった免疫後 12 週目の血清について吸光度から免疫前の血清の同じ希釈倍率の吸光度を引いた値 ( $\Delta$ OD) を算出した。Dog-Melan-A-OVA を標的抗原としてプレートに吸着させた場合には 20、40、80 倍において  $\Delta$ OD は 1.0 以上であり、80 倍以降では希釈倍率に依存して  $\Delta$ OD が減少しており、Dog-Melan-A-OVA に対する抗体産生が示唆された。Dog-TRP-2-OVA を標的抗原としてプレートに吸着させた場合も 20、40、80 倍において  $\Delta$ OD は 1.0 以上であり、80 倍以降では希釈倍率に依存して減少しており、Dog-TRP-2-OVA に対する抗体産生が示唆された。

#### V イヌ Melan-A、TRP-2 由来ペプチドを投与した際の皮内試験、遅延型アレルギー反応 (DTH) および副作用

イヌの側腹部に Dog-Melan-A、Dog-Melan-A-KLH および Dog-TRP-2、Dog-TRP-2-KLH を各 0.05ml ずつ皮内注射し、投与部の発赤や膨疹の様子を投与から 15 分後に観察した。初回のペプチドワクチン投与前 (ワクチン未接種) に行った皮内試験で、Dog-Melan-A 投与部位で 6mm の発赤と膨疹、Dog-Melan-A-KLH 投与部で 2mm の発赤を認めた。Dog-TRP-2、Dog-TRP-2-KLH には反応が認められなかった (Fig.10)。2 回目の投与以降には、いずれの投与部位にも発赤や膨疹などは認めなかった。また遅延型アレルギー反応はすべての投与で認めなかった。また各回投与から 1 週間、ワクチン接種部位に明らかな掻痒や潰瘍形成がないかを観察した。その結果、いずれの投与時にも臨床的に明らかな副作用は観察されなかった。そのほかの副作用として、ペプチドワクチン投与後にアナフィラキシー症状を呈さないかを 30 分間観察したが、異常は見られなかった。

## 考察

ヒトではメラノーマ特異抗原 Melan-A、TRP-2 を標的にした臨床試験がすでに行われているが[45]、イヌでの報告はまだない。しかし、イヌのメラノーマにおいて Melan-A、TRP-2 の発現率は高く、これらをターゲットとするワクチンはメラノーマ症例に対して広く応用できると期待される。そこで本研究ではイヌ Melan-A、TRP-2 を標的とした DNA ワクチン、ペプチドワクチンの開発を試みた。

今回発現プラスミドに組み込んだイヌ Melan-A の遺伝子配列は Gene Bank に登録されている遺伝子配列と一致した。また、TRP-2 も SNP と思われる 1625 番のアデニンからグアニンの置換を除き塩基配列は一致していた。この置換の結果、541 番目のアミノ酸の、リジンからアルギニンへの置換が予測された。TRP-2 の報告されている機能性ドメインとは関係のない領域での置換であった。今回クローニングしたイヌ TRP-2 はチロシナーゼと同様の、EGF 様部位、金属イオン結合部位、膜貫通領域などを保持し、ヒトやマウスの TRP-2 分子の構造が類似していた[6,20]。しかし、Gene Bank 上で検索可能であった予測上のイヌの TRP-2 遺伝子の開始コドンはヒトの TRP-2 のそれと異なっており、ヒトやマウスには相同する位置に開始コドンが見られないことから、実際のイヌの TRP-2 遺伝子はヒトと同じ位置から翻訳される可能性が高い。本研究では予測上のイヌ TRP-2 塩基配列を参考に発現プラスミドを構築したため、ヒト TRP-2 に比べ、N 末端に 31 残基のアミノ酸が付加されると推測される。

Melan-A、TRP-2 遺伝子発現プラスミドをトランスフェクションした細胞の免疫染色では、Melan-A、TRP-2 ともに、陽性細胞の細胞質が染色されていた。ヒトやマウスのメラノーマ細胞の免疫染色では、Melan-A はメラノソームや小胞体に[40]、TRP-2 も同様にトランスゴルジネットワークを経て最終的にメラノソームに集積すると言われている[30]。今回の免疫染色の結果では、局在について詳細な解析を行っていないが、報告されるヒトやマウスでの Melan-A、TRP-2 の局在と矛盾のない結果であった。

塩基配列から予測される Melan-A の分子量は 13KDa であるが、遺伝子導入細胞のウェスタンブロットでは、21-23KDa 付近にバンドが検出された。これはヒトのメラノーマ細胞で報告されている Melan-A のバンドとほぼ同一であり、Melan-A の二量体と考えられている[11]。また、2 本のバンドが検出されたのは、Melan-A はヒトのアミノ酸配列では N 結合型糖鎖が付加される位置を認めない一方で、イヌの Melan-A では N 結合型糖鎖部位が認められており (Fig.1)、糖鎖付加を受けた影響と推測している。TRP-2 の予測される分子量は 62KDa であるがウェスタンブロットでは 70-85KDa 付近に 2 本のバンドが検出された。TRP-2 は、ヒトでは 6 か所の N 結合型糖鎖付加部位が認められており、イヌでも同様に 6 ヶ所認められている (Fig.2)。ヒトでは糖鎖付加により 75KDa のバンドが検出されることから[56]、TRP-2 の 2 本のバンドも糖鎖付加による多型と推測している。今回発現させた TRP-2 はヒトやマウスの TRP-2 に比べて N 末端にアミノ酸が付加されており、これにより発現蛋白の機能や局在などが変化する可能性があるが、この発現プラスミドを導入した細胞では実際にこれまで報告されているヒト TRP-2 蛋白と矛盾のない発現が見られ、免疫療法の免疫源として機能すると考えられた。したがって、この発現プラスミドは DNA ワクチンとして応用できる可能性があると考えている。

Melan-A、TRP-2 について、ヒトでは MHC-class I 拘束性の合成ペプチドをエピトープとした臨床試験が行われている[1,9,24,48,62]。本研究ではヒトの免疫療法で用いられている Melan-A、TRP-2

のペプチド配列を参考に[50,61]、イヌで相同な領域付近で免疫用ペプチドを作成した。これら2つのペプチドにキャリアーとして KLH を付加させたものをウサギや老齢犬に投与したところ、投与したペプチドに対する抗体産生が認められた。

一般に癌抗原は自己抗原であり、ワクチンとして用いる際には強力なアジュバントが必要である。しかし実際の臨床例に対する応用を考えた時に完全フロイントアジュバントなどの使用は強い炎症など副作用を引き起こす可能性があり、現実的ではない。本研究では、将来的な臨床応用を考慮し、まだイヌでの報告はないが、強力な免疫誘導が期待され、かつため安全な生体内で吸収される疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子をアジュバントとして用いた。投与によるアレルギー反応等、有害事象は認められず、接種したウサギやイヌで抗体価の上昇が見られたが、皮内試験などでは、細胞性免疫の誘導を示唆する結果は得られなかった。十分な細胞性免疫が得られなかった理由として、いくつかの原因が挙げられる。第一に免疫に用いたペプチドの問題がある。今回、使用したペプチドはイヌのアミノ酸配列をもとに作成したため、イヌでは免疫寛容になっている可能性がある。また、Dog-Melan-A はペプチドの親水性を保つことを目的として、報告されているヒトの抗原ペプチドのアミノ酸配列から C 末端のバリリン V を除いて合成している。今回用いたペプチドはヒトの HLA-A0201 拘束性のペプチドを参考にしているが[7,10,21,22,63]、イヌ MHC 拘束性については検討していない。また、バリリンを除いたペプチドがイヌ MHC と結合し、効果的に T 細胞レセプターに提示されるかは不明である。ヒトやマウスでは Melan-A、TRP-2 ペプチドワクチンを用いた研究でエピトープ部位の位置を変更もしくはアミノ酸置換をすることで、ペプチドの MHC 結合親和性を増し、T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生が上昇することが報告されている[28,54,60]。第二にアジュバントの問題がある。疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子はマウスにおいて樹状細胞に取り込まれて免疫応答を高めるが[64]、イヌでの研究がなく、今回使用したペプチドのナノ粒子への吸着率等も検討していないため、十分に機能していない可能性がある。ヒトでの臨床試験では Montanide、QS-21、MF-59 などのアジュバントが試みられており[39,49,53,66]、今後イヌでも有効なアジュバントを模索、比較していく必要があるだろう。第三に、今回研究に用いたイヌは約 16 歳の老齢犬であり、元来免疫能が低下していることも考えられる。しかし、担癌犬は免疫能が低下している老齢犬であることが多く、このようなイヌに対しても効果的なペプチドやアジュバントの探索が必要である。

DNA ワクチンはペプチドワクチンと異なり、生体内で抗原を発現させるため、ペプチドワクチンよりも持続性がある。イヌのメラノーマに対する DNA ワクチンの臨床試験では、異種であるヒトのチロシナーゼ遺伝子発現プラスミドが投与されている。しかし標的としているチロシナーゼはイヌメラノーマでは発現率が低いことが知られている。転移のある症例でも生存率の上昇を認めているため[2,3]、ヒトの臨床試験と比べても有望であるが、症例数が少ないため、より多くの症例を用いた厳密なコントロールスタディにより効果を慎重に判断していく必要があるだろう。

一般に DNA ワクチンが機能するためには遺伝子が導入されて発現することが必要であり、免疫を維持させるためには繰り返しの投与や持続的な発現が必要だと思われる。今回その点を改善するために持続的に発現される EBNA-1 を持つベクターを用いたが、実際のプラスミドワクチンの投与の際には導入効率が最も問題になると予測される[4]。発現効率を上げるためには、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、ワクシニアウイルスなどのウイルスベクターの使用が効果的であるが、バイオハザードの問題から現状では獣医療での利用へのハードルは高い。一方で、癌の免疫療法ではすべての細胞に遺伝子導入する必要はなく、一部の組織で標的抗原が発現できれば良いと考えられる。そのため、遺伝子

発現プラスミドをリポソーム等で封入し、導入効率を改善することで、液性、細胞性免疫を増強できる可能性がある[18]。DNA ワクチンについてもペプチドワクチンと同様に、免疫応答を高めるため工夫が研究されており、IL-2、GM-CSF 遺伝子との併用、マンノース被覆型リポソームの利用などが研究されている[47,55]。有望なターゲット遺伝子とアジュバントが開発されれば、イヌでも同様の方法を用いることで、効果的に免疫を誘導することができるだろう。

特異的免疫療法は理想的な状況では腫瘍だけを選択的に攻撃でき、癌治療の切り札になる可能性がある。しかし現時点では生体内での十分な抗腫瘍効果を得るために克服すべき課題が多く残されている。本研究ではイヌのメラノーマに対する Melan-A、TRP-2 を標的とする DNA ワクチン応用の可能性を示すことができた。イヌのメラノーマに対する抗原特異的免疫療法について、臨床的な結果を示した報告は少ないが、現状では進行したメラノーマに対して有効な治療法も知られていない。倫理的な問題等があるが、今後は臨床試験へ進み、イヌのメラノーマ症例に対するワクチンの開発、また、人医領域の癌ワクチン研究の発展に繋がることを期待したい。

## 参考文献

- [1] Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski KM, Bhardwaj N, Pineiro L, Steinman R, Fay J. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 2001. 61 (17): 6451–6458.
- [2] Bergman PJ, McKnight J, Novosad A, Charney S, Farrelly J, Craft D, Wulderk M, Jeffers Y, Sadelain M, Hohenhaus AE, Segal N, Gregor P, Engelhorn M, Riviere I, Houghton AN, Wolchok JD. Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial. *Clin. Cancer Res.* 2003. 9 (4):1284-1290.
- [3] Bergman PJ, Camps-Palau MA, McKnight JA, Leibman NF, Craft DM, Leung C, Liao J, Riviere I, Sadelain M, Hohenhaus AE, Gregor P, Houghton AN, Perales MA, Wolchok JD. Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center. *Vaccine* 2006.24 (21):4582-4585.
- [4] Bolhassani A, Yazdi SR. DNA immunization as an efficient strategy for vaccination. *Avicenna J. Med. Bioech.* 2009. 1 (2):71-88.
- [5] Boria PA, Murry DJ, Bennett PF, Glickman NW, Snyder PW, Merkel BL, Shlittler DL, Mutsaers AJ, Thomas RM, Knapp DW. Evaluation of cisplatin combined with piroxicam for the treatment of oral malignant melanoma and oral squamous cell carcinoma in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2004. 224 (3):388-394.
- [6] Cassady JL, Sturm RA. Sequence of the human dopachrome tautomerase-encoding TRP-2 cDNA. *Gene* 1994. 143 (2):295-298.
- [7] Castelli C, Storkus WJ, Maeurer MJ, Martin DM, Huang EC, Pramanik BN, Nagabhushan TL, Parmiani G, Lotze MT. Mass spectrometric identification of a naturally processed melanoma peptide recognized by CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1995. 181 (1): 363-368.
- [8] Choi C, Kusewitt DF. Comparison of tyrosinase-related protein-2, S-100, and Melan A immunoreactivity in canine amelanotic melanomas. 2003. *Vet. Pathol.* 40 (6):713-718.
- [9] Cormier JN, Salgaller ML, Prevette T, Barracchini KC, Rivoltini L, Restifo NP, Rosenberg SA, Marincola FM. Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunized with a peptide from MART-1/Melan A. *Cancer J. Sci. Am.* 1997. 3 (1):37–44.
- [10] Coulie P, Brichard V, Van Pel A., Wolfel T, Schneider J, Traversari C, Mattei S, De Plaen E, Lurquin C, Szikora J, Renauld J. Boon TA. New gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* 1994. 180 (1): 35-42.
- [11] De Mazière AM, Muehlethaler K, van Donselaar E, Salvi S, Davoust J, Cerottini JC, Lévy F, Slot JW, Rimoldi D. The melanocytic protein Melan-A/MART-1 has a subcellular localization distinct from typical melanosomal proteins. *Traffic* 2002. 3 (9):678-693.
- [12] Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 1997. 15: 617-648.
- [13] Eschenburg G, Stermann A, Preissner R, Meyer HA, Lode HN. DNA vaccination: using the patient's immune system to overcome cancer. *Clin. Dev. Immunol.* 2010. 2010:169484
- [14] Fioretti D, Iurescia S, Fazio VM, Rinaldi M. DNA vaccines: developing new strategies against cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010. 2010:174378
- [15] Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 1977. 36 (1): 59-74.
- [16] Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Ann. Rev. Immunol.* 2000. 18: 927-974.
- [17] Hearing VJ, King RA. Determinants of skin color : melanocytes and melanization. In: Levine N, ed. *Pigmentation and Pigmentary Abnormalities.* CRC, New York, NY, 1993 : 3-32.
- [18] Ishii N, Fukushima J, Kaneko T, Okada E, Tani K, Tanaka S, Hamajima K, Xin K, Kawamoto S, Koff W, Nishioka K, Yasuda T, Okuda K. Cationic liposomes are a strong adjuvant for a DNA vaccine of human immunodeficiency virus type-1. *AIDS. Res. Hum. Retroviruses* 1997. 13 (16): 1421-1428.
- [19] Iwai A, Takegami T, Shiozaki T, Miyazaki T. Hepatitis C virus NS3 protein can activate the Notch-signaling pathway through binding to a transcription factor, SRCAP. *PLoS One.* 2011. 6 (6): e20718

- [20] Jackson IJ, Chambers DM, Tsukamoto K, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Hearing V. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *EMBO J.* 1992. 11 (2):527-535.
- [21] Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH., Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, Miki T, Rosenberg SA. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994. 91 (9): 3515-3519.
- [22] Kawakami Y, Robbins PF, Wang RF, Parkhurst M, Kang X, Rosenberg SA. The use of melanosomal proteins in the immunotherapy of melanoma. *J. Immunother.* 1998. 21 (4): 237-246.
- [23] Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970. 227: 680-685.
- [24] Lotze MT, Shurin M, Esche C, Tahara H, Storkus W, Kirkwood JM, Whiteside TL, Elder EM, Okada H, Robbins P. Interleukin-2: developing additional cytokine gene therapies using fibroblasts or dendritic cells to enhance tumor immunity. *Cancer J. Sci. Am.* 2000. 6: S61-S66.
- [25] Louis N, Eveleigh C, Graham FL. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* 1997. 233 (2): 423-429.
- [26] MacEwen EG, Patnaik AK, Harvey HJ, Hayes AA, Matus R. Canine oral melanoma: comparison of surgery versus surgery plus *Corynebacterium parvum*. *Cancer Invest.* 1986. 4 (5):397-402.
- [27] MacEwen EG, Kurzman ID, Vail DM, Dubielzig RR, Everlith K, Madewell BR, Rodriguez CO Jr, Phillips B, Zwahlen CH, Obradovich J, Rosenthal RC, Fox LE, Rosenberg M, Henry C, Fidel J. Adjuvant therapy for melanoma in dogs: results of randomized clinical trials using surgery, liposome-encapsulated muramyl tripeptide, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin. Cancer Res.* 1999. 5 (12):4249-4258.
- [28] McWilliams JA, McGurran SM, Dow SW, Slansky JE, Kedl RM. A modified tyrosinase-related protein 2 epitope generates high-affinity tumor-specific T cells but does not mediate therapeutic efficacy in an intradermal tumor model. *J. Immunol.* 2006. 177 (1):155-161.
- [29] Moore AS, Theilen GH, Newell AD, Madewell BR, Rudolf AR. 1991. Preclinical study of sequential tumor necrosis factor and interleukin 2 in the treatment of spontaneous canine neoplasms. *Cancer Res.* 1991. 51 (1):233-238.
- [30] Negroiu G, Dwek RA, Petrescu SM. The inhibition of early N-glycan processing targets TRP-2 to degradation in B16 melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 2003. 278 (29):27035-27042.
- [31] Okamoto S, Yoshii H, Ishikawa T, Akagi T, Akashi M, Takahashi M, Yamanishi K, Mori Y. Single dose of inactivated Japanese encephalitis vaccine with poly(gamma-glutamic acid) nanoparticles provides effective protection from Japanese encephalitis virus. *Vaccine* 2008. 26 (5):589-594.
- [32] Okamoto S, Matsuura M, Akagi T, Akashi M, Tanimoto T, Ishikawa T, Takahashi M, Yamanishi K, Mori Y. Poly(gamma-glutamic acid) nano-particles combined with mucosal influenza virus hemagglutinin vaccine protects against influenza virus infection in mice. *Vaccine* 2009. 27 (42):5896-5905.
- [33] Panelli MC, Wunderlich J, Jeffries J, Wang E, Mixon A, Rosenberg SA, Marincola FM. Phase 1 study in patients with metastatic melanoma of immunization with dendritic cells presenting epitopes derived from the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100. *J. Immunother.* 2000. 23 (4):487-498.
- [34] Parkhurst MR, Fitzgerald EB, Southwood S, Sette A, Rosenberg SA, Kawakami Y. Identification of a shared HLA-A\*0201-restricted T-cell epitope from the melanoma antigen tyrosinase-related protein 2 (TRP2). 1998. *Cancer Res.* 58 (21):4895-4901.
- [35] Phan GQ, Touloukian CE, Yang JC, Restifo NP, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Seipp CA, Freezer LJ, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. Immunization of patients with metastatic melanoma using both class I- and class II-restricted peptides from melanoma-associated antigens. *J. Immunother.* 2003. 26 (4):349-356.
- [36] Proulx DR. Melanoma: Cutaneous, Digital, Oral *In: Cote E, ed. (長谷川篤彦 監訳). CLINICAL VETERINARY ADVISOR. インターズー, 東京, 2010:1182-1184.*
- [37] Ramos-Vara JA, Beissenherz ME, Miller MA, Johnson GC, Pace LW, Fard A, Kottler SJ. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. *Vet. Pathol.* 2000. 37 (6):597-608.



- [38] Rassnick KM, Ruslander DM, Cotter SM, Al-Sarraf R, Bruyette DS, Gamblin RM, Meleo KA, Moore AS. Use of carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27cases(1989-2000). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2001. 218 (9):1444-1448.
- [39] Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.* 2009.30 (1):23-32.
- [40] Rimoldi D, Muehlethaler K, Salvi S, Valmori D, Romero P, Cerottini JC, Levy F. 2001. Subcellular localization of the melanoma-associated protein Melan-AMART-1 influences the processing of its HLA-A2-restricted epitope. *J. Biol. Chem.* 2001. 276 (46):43189-43196.
- [41] Romero P, Valmori D, Pittet MJ, Zippelius A, Rimoldi D, Lévy F, Dutoit V, Ayyoub M, Rubio-Godoy V, Michielin O, Guillaume P, Batard P, Luescher IF, Lejeune F, Liénard D, Rufer N, Dietrich PY, Speiser DE, Cerottini JC. Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumorreactive CTL in human melanoma. 2002. *Immunol. Rev.* 188: 81-96.
- [42] Rosenberg SA, Zhai Y, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Seipp CA, Einhorn JH, Roberts B, White DE. Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998. 90 (24):1894-1900.
- [43] Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Restifo NP, Haworth LR, Seipp CA, Freezer LJ, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE. Inability to immunize patients with metastatic melanoma using plasmid DNA encoding the gp100 melanoma-melanocyte antigen. *Hum. Gene Ther.* 2003. 14 (8):709-714.
- [44] Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Topalian SL, Sherry RM, Restifo NP, Wunderlich JR, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, Gritz L, Panicali DL, White DE. Recombinant fowlpox viruses encoding the anchor-modified gp 100 melanoma antigen can generate antitumor immune responses in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2003. 9 (8):2973-2980.
- [45] Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* 2004. 10 (9): 909-915.
- [46] Salgaller ML, Marincola FM, Cormier JN, Rosenberg SA. Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res.* 1996. 56 (20):4749-4757.
- [47] Sasaki S, Fukushima J, Arai H, Kusakabe KI, Hamajima K, Ishii N, Hirahara F, Okuda K, Kawamoto S, Ruysschaert JM, Vandenbranden M, Wahren B, Okuda K. Human immunodeficiency virus type 1 specific immune responses induced by DNA vaccination are greatly enhanced by mannan-coated diC14-amidine. *Eur. J. Immunol.* 27 (12): 3121-3129.
- [48] Schadendorf D, Nestle FO. Autologous dendritic cells for treatment of advanced cancer: an update. *Recent Results Cancer Res.* 2001. 158 :236-248.
- [49] Schaed SG, Klimek VM, Panageas KS, Musselli CM, Butterworth L, Hwu WJ, Livingston PO, Williams L, Lewis JJ, Houghton AN, Chapman PB. T-cell responses against tyrosinase 368-376(370D) peptide in HLA\*A0201+ melanoma patients: randomized trial comparing incomplete Freund's adjuvant, granulocyte macrophage colony-stimulating factor, and QS-21 as immunological adjuvants. *Clin. Cancer Res.* 2002. 8 (5):967-972.
- [50] Schreurs MW, Eggert AA, de Boer AJ, Vissers JL, van Hall T, Offringa R, Figdor CG, Adema GJ. Dendritic cells break tolerance and induce protective immunity against a melanocyte differentiation antigen in an autologous melanoma model. *Cancer Res.* 2000. 60 (24):6995-7001.
- [51] Schwartzentruber DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, Treisman J, Gailani F, Riley L, Conlon K, Pockaj B, Kendra KL, White RL, Gonzalez R, Kuzel TM, Curti B, Leming PD, Whitman ED, Balkissoon J, Reintgen DS, Kaufman H, Marincola FM, Merino MJ, Rosenberg SA, Choyke P, Vena D, Hwu P. gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2011. 364 (22):2119-2127.
- [52] Shedlock DJ, Weiner DB. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2000. 68 (6): 793-806.

- [53] Tagawa ST, Cheung E, Banta W, Gee C, Weber JS. Survival analysis after resection of metastatic disease followed by peptide vaccines in patients with Stage IV melanoma. *Cancer* 2006. 106 (6):1353-1357.
- [54] Tang Y, Lin Z, Ni B, Wei J, Han J, Wang H, Wu Y. An altered peptide ligand for naïve cytotoxic T lymphocyte epitope of TRP-2(180-188) enhanced immunogenicity. *Cancer Immunol. Immunother.* 2007. 56 (3):319-329.
- [55] Toda S, Ishii N, Okada E, Kusakabe KI, Arai H, Hamajima K, Gorai I, Nishioka K, Okuda K. HIV-1-specific cell-mediated immune responses induced by DNA vaccination were enhanced by mannan-coated liposomes and inhibited by anti-interferon-gamma antibody. *Immunology* 1997. 92 (1):111-117.
- [56] Tsukamoto K, Jackson IJ, Urabe K, Montague PM, Hearing VJ. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPA chrome tautomerase. *EMBO J.* 1992. 11(2):519–526.
- [57] Turk MJ, Wolchok JD, Guevara-Patino JA, Goldberg SM, Houghton AN. Multiple pathways to tumor immunity and concomitant autoimmunity. *Immunol. Rev.* 2002. 188: 122–135.
- [58] Uto T, Akagi T, Hamasaki T, Akashi M, Baba M. Modulation of innate and adaptive immunity by biodegradable nanoparticles. *Immunol. Lett.* 2009. 125 (1):46-52.
- [59] Uto T, Wang X, Akagi T, Zenkyu R, Akashi M, Baba M. Improvement of adaptive immunity by antigen-carrying biodegradable nanoparticles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. 379 (2):600-604.
- [60] Valmori D, Fonteneau JF, Lizana CM, Gervois N, Liénard D, Rimoldi D, Jongeneel V, Jotereau F, Cerottini JC, Romero P. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL *in vitro* by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J. Immunol.* 1998. 160 (4):1750-1758.
- [61] van Elsas A, van der Burg SH, van der Minne CE, Borghi M, Mourer JS, Melief CJ, Schrier PI. Peptide-pulsed dendritic cells induce tumoricidal cytotoxic T lymphocytes from healthy donors against stably HLA-A\*0201-binding peptides from the Melan-A/MART-1 self antigen. 1996. *Eur. J. Immunol.* 1996. 26 (8): 1683-1689.
- [62] Wang F, Bade E, Kuniyoshi C, Spears L, Jeffery G, Marty V, Groshen S, Weber J. Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin. Cancer Res.* 1995. 5 (10): 2756-2765.
- [63] Wang RF, Appella E, Kawakami Y, Kang X, Rosenberg SA. Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1996. 184 (6): 2207-2216.
- [64] Wang X, Uto T, Sato K, Ide K, Akagi T, Okamoto M, Kaneko T, Akashi M, Baba M. Potent activation of antigen-specific T cells by antigen-loaded nanospheres. *Immunol. Lett.* 2005. 98 (1): 123–130.
- [65] Wang X, Uto T, Akagi T, Akashi M, Baba M. Poly(gamma-glutamic acid) nanoparticles as an efficient antigen delivery and adjuvant system: potential for an AIDS vaccine. *J. Med. Virol.* 2008. 80 (1):11-19.
- [66] Wong CP, Okada CY, Levy R. TCR vaccines against T cell lymphoma: QS-21 and IL-12 adjuvants induce a protective CD8+ T cell response. *J. Immunol.* 1999. 162 (4):2251-2258.
- [67] Yamaguchi S, Tatsumi T, Takehara T, Sasakawa A, Yamamoto M, Kohga K, Miyagi T, Kanto T, Hiramatsu N, Akagi T, Akashi M, Hayashi N. EphA2-derived peptide vaccine with amphiphilic poly(gamma-glutamic acid) nanoparticles elicits an anti-tumor effect against mouse liver tumor. *Cancer Immunol. Immunother.* 2010. 59 (5):759-767.

**Table 1. Melan-A および TRP-2 の増幅、塩基配列決定に使用したプライマー**

プライマー名	配列	位置*1	備考
<b>Melan-A 増幅用プライマー</b>			
F01 Primer	5'- <u>ctcgac</u> <u>gccaccatgccaagagaa</u> gaggctcacttcac-3'	1-27	開始コドン(下線)を含み、その 5'側に コザック配列 <u>gccacc</u> 、そのさらに上流 に <u>SalI</u> を付加している
R01 Primer	5'- <u>ggatcc</u> tcatttaagcacctcttggc attctca-3'	381-355	終始コドン(下線)の 3' 側に <u>BamH</u> を付加している
<b>TRP-2 増幅用プライマー</b>			
F02 Primer	5'- <u>ctcgac</u> <u>gccaccatgcaggctcaag</u> agctcaagagtggga-3'	1-27	開始コドン(下線)を含み、その 5'側に コザック配列 <u>gccacc</u> 、そのさらに上流 に <u>SalI</u> を付加している
R02 Primer	5'- <u>ggatcc</u> tctctagaggaaggcagca gatctcta-3'	1671-1645	終始コドン(下線)の 3' 側に <u>BamH</u> を付加している
<b>シーケンス用プライマー</b>			
F03 Primer	5'-ccatgttcatgccttcttc-3'		pEBMulti-Neo MCS の上流の配列
R03 Primer	5'-ccacaactagaatgcagtga-3'		pEBMulti-Neo MCS の下流の配列

\*1...プライマーの位置は、想定される開始コドン(下線のアデニン)からの番号

**Table 2. Melan-A および TRP-2 遺伝子の増幅のための PCR 法**

試薬名	量
蒸留水	32 $\mu$ l
10 $\times$ PCR Buffer for Blend taq	5 $\mu$ l
2mM dNTP	5 $\mu$ l
25mM MgSO <sub>4</sub>	3 $\mu$ l
Forward primer(10pmol/l)	1 $\mu$ l
Reverse primer(10pmol/l)	1 $\mu$ l
テンプレート DNA	2 $\mu$ l
KOD-Plus	1 $\mu$ l
計	50 $\mu$ l

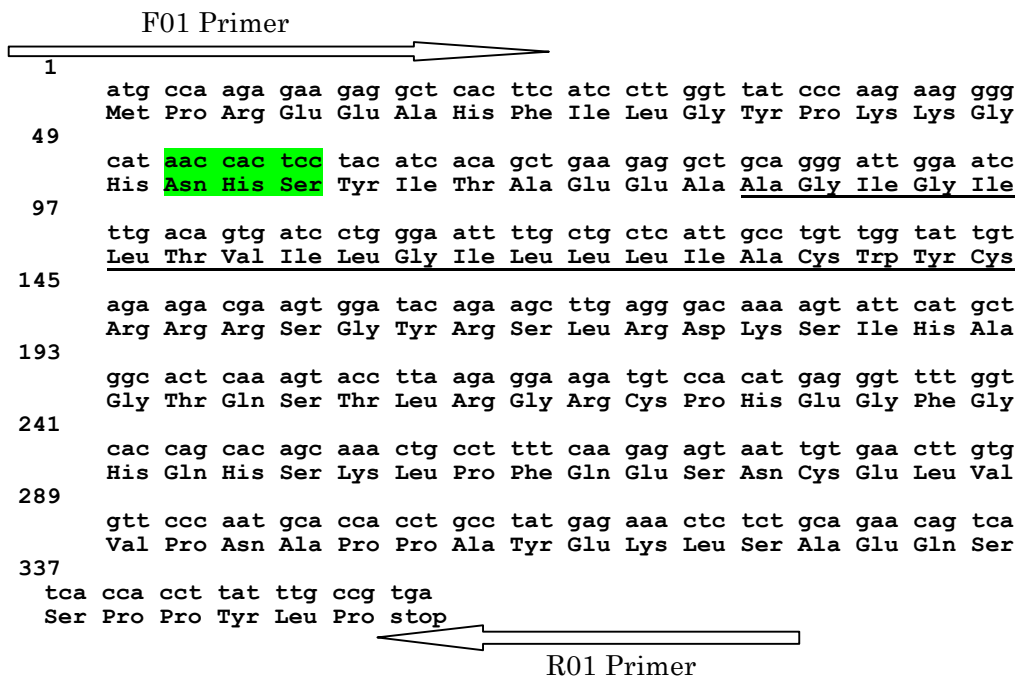
PCR プロトコール	温度	時間
1. 最初の熱変性	94.0°C	2 分
2. 熱変性	98.0°C	10 秒
3. アニールング: Melan-A	63.1°C	30 秒
: TRP-2	65.6°C	30 秒
4. 伸長反応	68.0°C	1 分 30 秒

上記 2-4 を 30 サイクル

**Table 3. 免疫のために作成したペプチドのアミノ酸配列**

ペプチド名	アミノ酸配列	備考
Dog-Melan-A	C-(スペーサー)-EAAGIGILT(26-34*1)	イヌの Melan-A <sub>27-34</sub> のペプチドにコンジュゲート作成のためスペーサーとシステインを導入。KLH、OVA を結合させた Dog-Melan-A-KLH、Dog-Melan-A-OVA も作成。
Dog-TRP-2	CSIYDFFVWLH(179-189)	イヌ TRP-2 <sub>179-189</sub> のアミノ酸配列。KLH、OVA をコンジュゲートした Dog-TRP-2-KLH、Dog-TRP-2-OVA も作成。

\*1...本実験で構築したプラスミドの開始コドンのメチオニンから数えたアミノ酸残基の位置



**Fig.1** イヌ Melan-A 遺伝子の塩基配列と予測されるアミノ酸配列

イヌのメラノーマ組織から作製した cDNA を鋳型に Melan-A 遺伝子を増幅し、pEBMulti-Neo プラスミドに挿入した。挿入した遺伝子の塩基配列と予測されるアミノ酸配列を示した（端の数字は開始コドンからの塩基の位置を示している）。イヌ Melan-A 遺伝子を増幅に用いたプライマー F01 Primer と R01 Primer をそれぞれ図中に矢印で示した。網掛け部分は N 型糖鎖付加の可能性がある配列を示している。下線部は予測される膜貫通領域を示している。

F02 Primer

1  
 atg cag gct caa gag ctc aag agt gga aga gga gaa ggg cag gat agg  
 Met Gln Ala Gln Glu Leu Lys Ser Gly Arg Gly Glu Gly Gln Asp Arg

49  
 atc agg gag tgg aaa gca aga ggg agc tct cct gct gat aaa gcc atg  
 Ile Arg Glu Trp Lys Ala Arg Gly Ser Ser Pro Ala Asp Lys Ala Met

97  
 agc cct ctt ggg tgg ggg ctt gtg ctc tgt tgt ctg ggt ggt gga ctc  
 Ser Pro Leu Gly Trp Gly Leu Val Leu Cys Cys Leu Gly Gly Gly Leu

145  
 cta cct gga gcc tgg gca cag ttt ccc cgg gtc tgc atg acc gtg gac  
 Leu Pro Gly Ala Trp Ala Gln Phe Pro Arg Val Cys Met Thr Val Asp

193  
 aac ctg atg gcc aag gag tgc tgc ccg ccg ctg ggt ctg gag cca gcc  
 Asn Leu Met Ala Lys Glu Cys Cys Pro Pro Leu Gly Leu Glu Pro Ala

241  
 aac atc tgc ggc tct cag gag ggc cgg ggc cag tgc atg gag gtg caa  
 Asn Ile Cys Gly Ser Gln Glu Gly Arg Gly Gln Cys Met Glu Val Gln

289  
 act gac gcc agg ccc tgg agt ggc ccc tat gtc ctg cgg aac cag gat  
 Thr Asp Ala Arg Pro Trp Ser Gly Pro Tyr Val Leu Arg Asn Gln Asp

337  
 gac cga gaa ggg tgg cca agg aaa ttc ttc cac cgg acc tgc caa tgc  
 Asp Arg Glu Gly Trp Pro Arg Lys Phe Phe His Arg Thr Cys Gln Cys

385  
 aca gga cat tat ggt ggc tac aac tgt gga gtt tgc aag ttt ggc tgg  
Thr Gly His Tyr Gly Gly Tyr Asn Cys Gly Val Cys Lys Phe Gly Trp

433  
 acc ggc cat gac tgc aat cag agg aaa gct cgg gtt att cgg aag aat  
 Thr Gly His Asp Cys Asn Gln Arg Lys Ala Arg Val Ile Arg Lys Asn

481  
 atc cat tcc ttg act cct gag gag agg gag caa ttc ttg gag gcc tta  
 Ile His Ser Leu Thr Pro Glu Glu Arg Glu Gln Phe Leu Glu Ala Leu

529  
 gac ctt gca aag aac acg aca cac ccg gac tac gtg atc acc aca caa  
 Asp Leu Ala Lys Asn Thr Thr His Pro Asp Tyr Val Ile Thr Thr Gln

577  
 cac tgg ctc ggc ctg ctt ggg ccc aac ggg acc cag cca cag atc gcc  
 His Trp Leu Gly Leu Leu Gly Pro Asn Gly Thr Gln Pro Gln Ile Ala

625  
aac tgc agc att tat gat ttc ttt gta tgg ctc cat tat tac tct gtt  
Asn Cys Ser Ile Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu His Tyr Tyr Ser Val

673  
 agg gat act tta tta gga cca ggg cgc cca tac aag gcc ata gac ttc  
 Arg Asp Thr Leu Leu Gly Pro Gly Arg Pro Tyr Lys Ala Ile Asp Phe

721  
 tca cac caa ggt cct gcc ttt gtt acc tgg cac cgg tac cat ttg ttg  
 Ser His Gln Gly Pro Ala Phe Val Thr Trp His Arg Tyr His Leu Leu

769  
 tgg ctg gaa agg gat ctc cag caa ctt atc ggc aac gaa tcc ttt gct  
 Trp Leu Glu Arg Asp Leu Gln Gln Leu Ile Gly Asn Glu Ser Phe Ala

817  
 ttg ccc tac tgg aac ttt gct act ggg agg aat gat tgt gat gtg tgc  
 Leu Pro Tyr Trp Asn Phe Ala Thr Gly Arg Asn Asp Cys Asp Val Cys

865  
 aca gac cag ctt ctt ggg gca gcg aga caa gat gat cca act cta att  
 Thr Asp Gln Leu Leu Gly Ala Ala Arg Gln Asp Asp Pro Thr Leu Ile

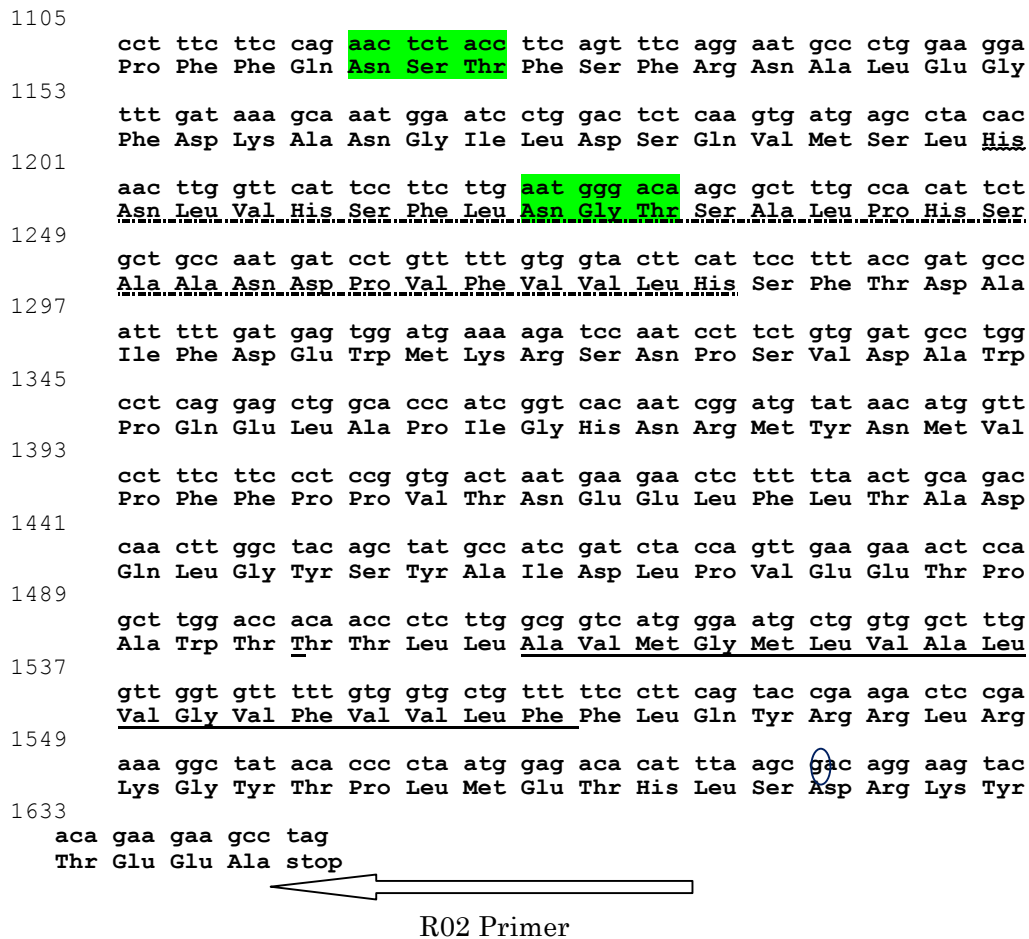
913  
 agt gag aac tca aga ttc tcc aac tgg gaa att gtc tgt gat agc cta  
 Ser Glu Asn Ser Arg Phe Ser Asn Trp Glu Ile Val Cys Asp Ser Leu

961  
 gat gat tat aac cgc cgg gtc acc ctg tgt aac ggg acc tat gaa ggc  
 Asp Asp Tyr Asn Arg Arg Val Thr Leu Cys Asn Gly Thr Tyr Glu Gly

1009  
 ctg tta aga aga aat caa gtg gga cta aac agt gag aaa ttg cca act  
 Leu Leu Arg Arg Asn Gln Val Gly Leu Asn Ser Glu Lys Leu Pro Thr

1057  
 tta aaa gac ata caa gat tgt ctg tct ctc aag aag ttt gac agc ccc  
 Leu Lys Asp Ile Gln Asp Cys Leu Ser Leu Lys Lys Phe Asp Ser Pro

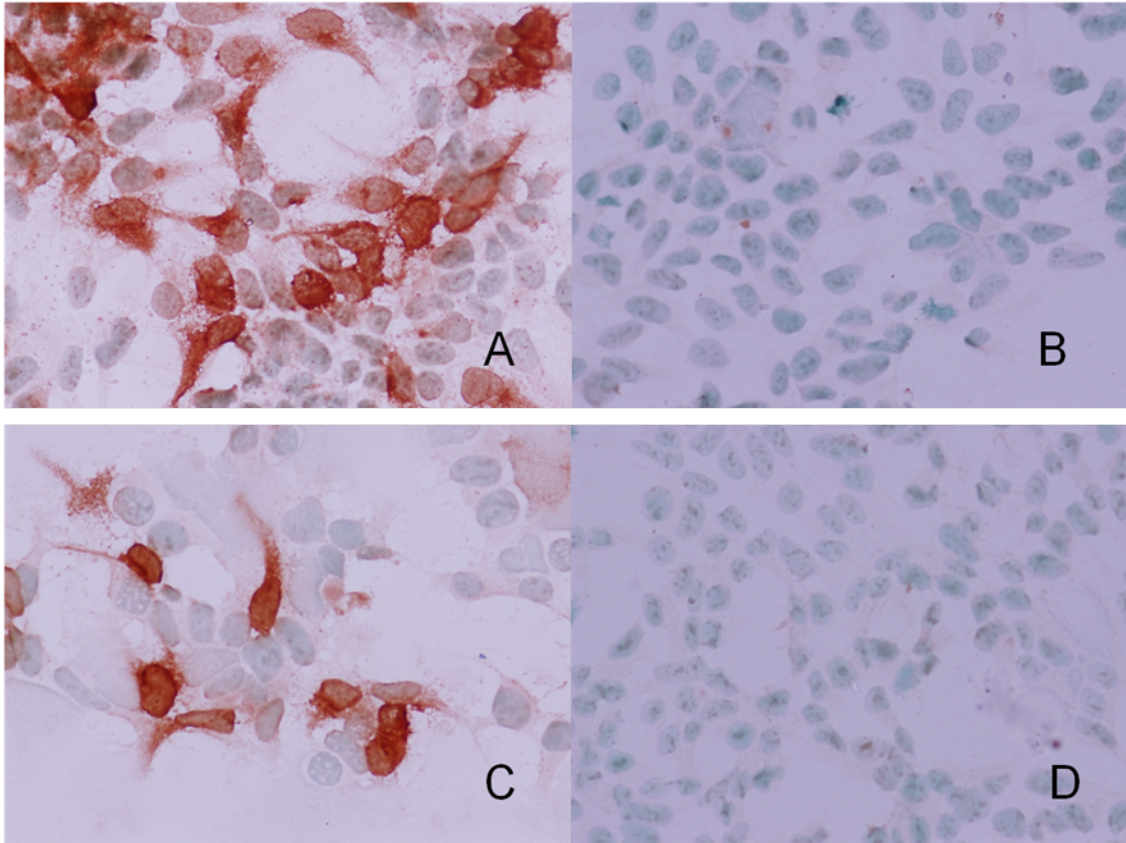
(continued)



**Fig.2 イヌ TRP-2 遺伝子の塩基配列および予測されるアミノ酸配列**

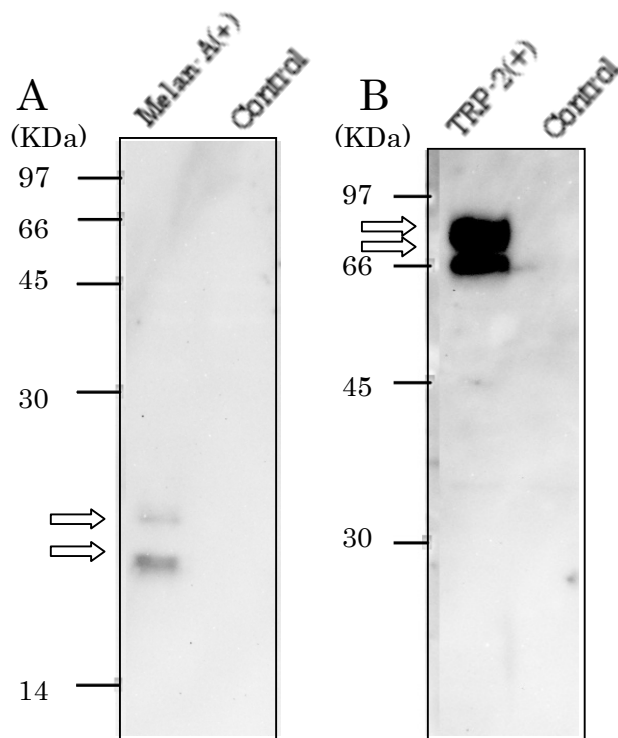
イヌのメラノーマ組織から作製した cDNA を鋳型にイヌ TRP-2 遺伝子を増幅し、pEBMulti-Neo プラスミドに挿入した。挿入した遺伝子の塩基配列と予想されるアミノ酸配列を示した。(端の数字は開始コドンからの塩基の位置を示している)。遺伝子の増幅に用いたプライマーをそれぞれ図中に矢印で示した。図中 atg はヒトの TRP-2 の mRNA (Gene Bank Accession No: AJ000503) で予測されている開始コドンと相同部位を示している。報告されているイヌの予測 mRNA と比較して、gac で示した 1625 番目のアデニンがグアニンに置換されて gac となった。図中の網掛けは N 型糖鎖付加の可能性がある位置を、破線部位 --- は EGF-like/Cys-rich 部位を示している。点線 ..... はチロシナーゼ CuA 結合部位を、一点鎖線 ..... はチロシナーゼ CuB 結合部位を示している。下線部 \_\_\_\_\_ は予測される膜貫通領域を示している。





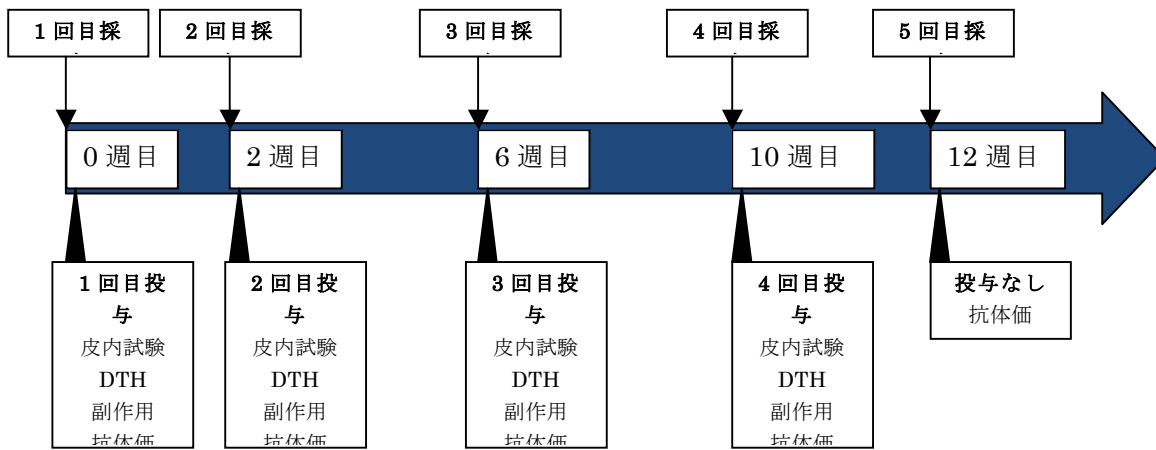
**Fig.3** 発現プラスミドを導入した HEK293 細胞での Melan-A および TRP-2 蛋白の発現

HEK293 細胞に発現プラスミドを導入し、ABC 法による免疫染色を行った。A) pEB-dog-Melan-A を導入した HEK293 細胞で、細胞質が茶色に染まる陽性細胞が多数散見された。B) pEBMulti-Neo のみを導入した HEK293 細胞で、同様の染色を行ったコントロール。C) pEB-dog-TRP-2 を導入した HEK293 細胞で、細胞質が茶色に染まる陽性細胞が認められた。D) pEBMulti-Neo のみを導入した HEK293 細胞で、同様の染色を行ったコントロール。



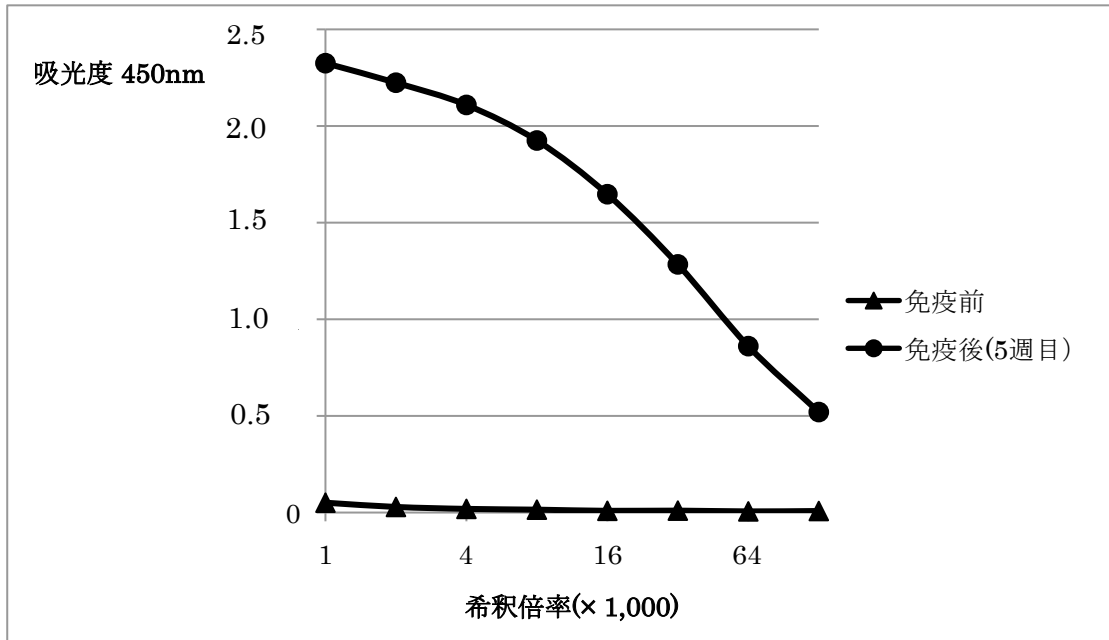
**Fig.4** 発現プラスミドを遺伝子導入した HEK293 細胞でのウェスタンプロット解析

(A) Melan-A 発現プラスミド導入細胞での Melan-A の蛋白発現：左のレーンは pEB-dog-Melan-A を導入した細胞で、21-23KDa 付近に 2 本のバンドが認められた (矢印)。右のレーンはコントロールとして pEBMulti-Neo を導入した細胞で、バンドは検出されなかった。(B) TRP-2 発現プラスミド導入細胞での TRP-2 の蛋白発現：左のレーンは pEB-dog-TRP-2 を導入した細胞で、70-85KDa 付近に 2 本のバンドが認められた (矢印)。右のレーンはコントロールとして pEBMulti-Neo のみを導入した細胞で、バンドは検出されなかった。



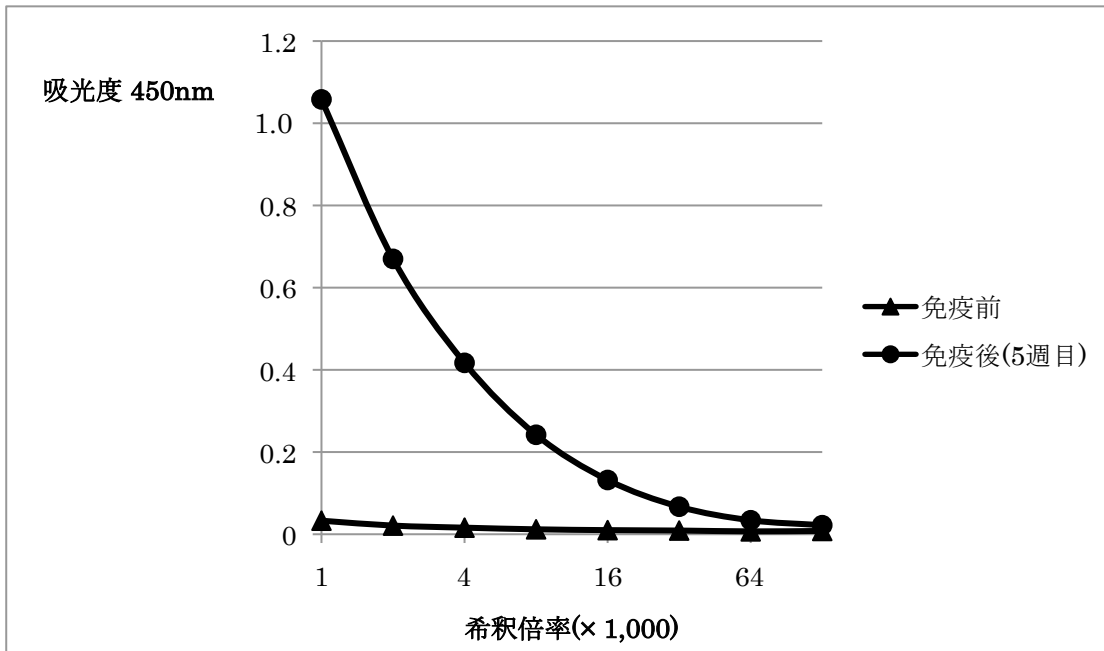
**Fig.5** イヌにおけるイヌ Melan-A、TRP-2 ペプチドワクチンの投与および評価計画

ペプチドワクチンとして Dog-Melan-A-KLH、Dog-TRP-2-KLH 各 1mg にアジュバントとして疎水化  $\gamma$ -ポリグルタミン酸 ( $\gamma$ -PGA) ナノ粒子 10mg ずつ加え、PBS に混濁したものを投与した。ワクチン投与直前には皮内試験を行い、投与1日後に皮内試験投与部位で遅延型アレルギー反応 (DTH) を評価した。0、2、6、10、12 週目のワクチン投与直前に、抗 Melan-A、TRP-2 の抗体価測定のために血液を採取した。



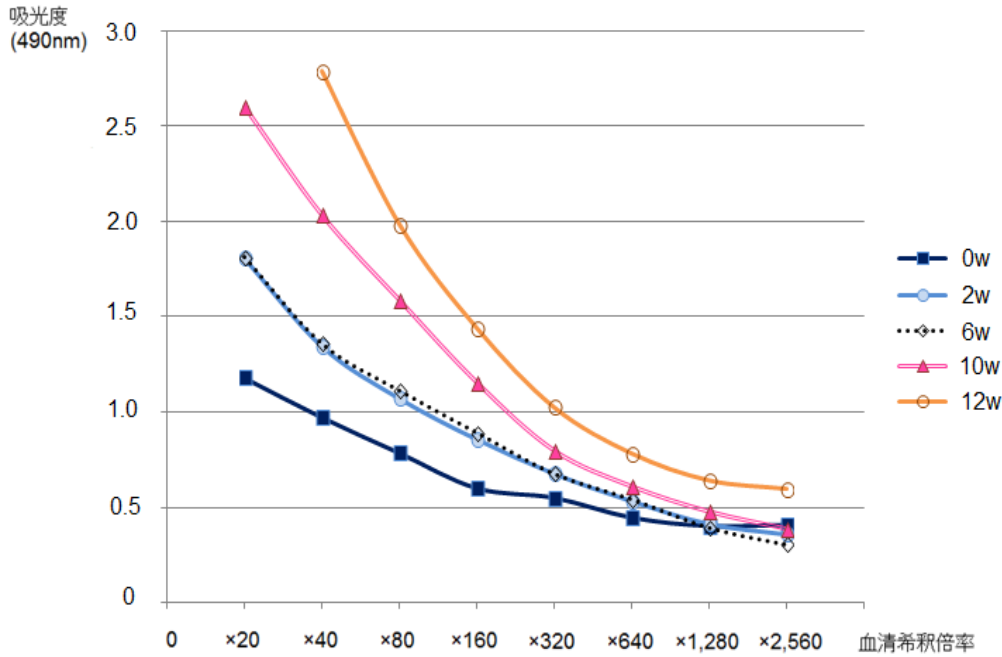
**Fig.6 Dog-Melan-A-KLH で免疫したウサギ血清の Dog-Melan-A に対する抗体価**

96 穴プレートに Dog-Melan-A を吸着させ、希釈した血清と反応させた。450nm での吸光度を縦軸に、血清希釈倍率を横軸に示した。Dog-Melan-A-KLH 投与前のウサギ血清と、Dog-Melan-A-KLH 投与から 5 週間後のウサギ血清の各希釈倍率での吸光度の推移を示した。



**Fig.7 Dog-TRP-2-KLH で免疫したウサギ血清の Dog-TRP-2 に対する抗体価**

96 穴プレートに Dog-TRP-2 を吸着させ、希釈した血清と反応させた。450nm での吸光度を縦軸に、血清希釈倍率を横軸に示した。Dog-TRP-2-KLH 投与前のウサギ血清と、Dog-TRP-2-KLH 投与から 5 週間後のウサギ血清の各希釈倍率での吸光度の推移を示した。

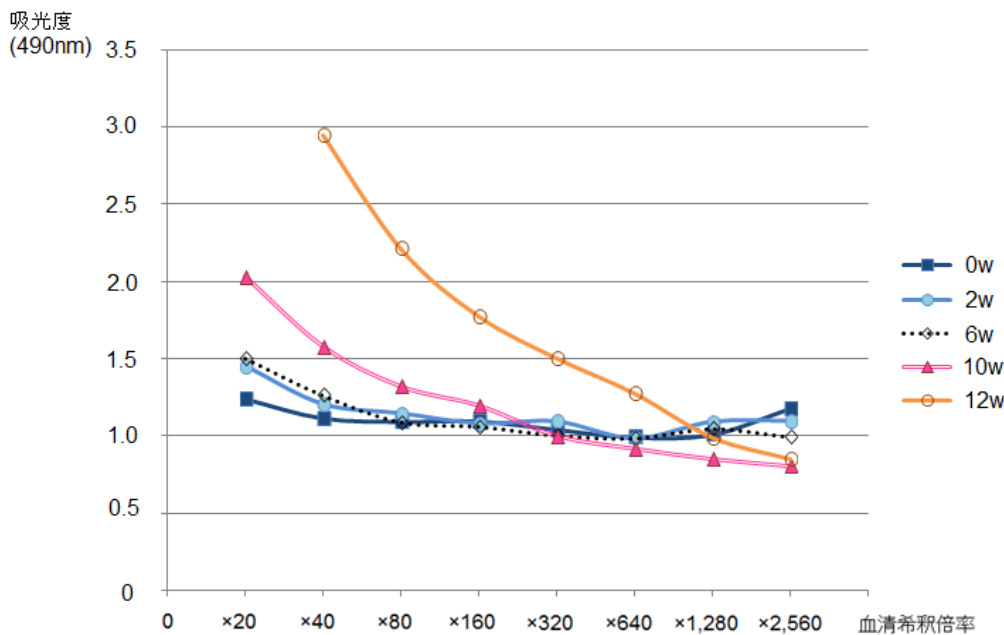


**Fig.8 Dog-Melan-A-KLH で免疫したイヌの血清抗体価の経時的推移**

96 穴プレートに Dog-Melan-A-OVA を吸着させ、希釈した血清と反応させた。吸光度を縦軸に、血清希釈倍率を横軸に示した。ワクチン接種前(0w)と比較して、ワクチン接種後(2-12w)では吸光度の上昇が認められた。各希釈倍率での吸光度を下の表に示した。図中には二重試験の平均値を示している。

Dog-Melan-A-OVA に対するイヌ血清の反応 (吸光度)								
血清の希釈倍率	×20	×40	×80	×160	×320	×640	×1,280	×2,560
0 週目	1.256	0.969	0.819	0.579	0.571	0.490	0.463	0.416
	1.103	0.974	0.749	0.618	0.525	0.398	0.336	0.396
平均	1.180	0.972	0.784	0.599	0.548	0.444	0.400	0.406
2 週目	1.753	1.329	1.022	0.845	0.646	0.512	0.421	0.347
	1.859	1.359	1.119	0.867	0.705	0.550	0.402	0.366
平均	1.806	1.344	1.070	0.856	0.676	0.531	0.412	0.357
6 週目	1.677	1.329	1.070	0.872	0.627	0.532	0.403	0.296
	1.942	1.386	1.153	0.911	0.725	0.554	0.385	0.314
平均	1.810	1.358	1.112	0.892	0.676	0.543	0.394	0.305
10 週目	2.533	1.990	1.586	1.160	0.790	0.635	0.479	0.383
	2.673	2.080	1.594	1.156	0.811	0.591	0.483	0.399
平均	2.603	2.035	1.590	1.158	0.801	0.613	0.481	0.391
12 週目	>3.5	2.701	1.913	1.399	0.987	0.763	0.645	0.576
	>3.5	2.876	2.060	1.487	1.067	0.809	0.644	0.625
平均	>3.5	2.789	1.987	1.443	1.027	0.786	0.645	0.601
ΔOD*1	>2.3	1.817	1.203	0.844	0.479	0.342	0.245	0.195

\*1…OVA に対する非特異反応を考慮し、最も吸光度が高かった免疫後 12 週目の血清について吸光度から免疫前の血清の同じ希釈倍率の吸光度を引いた値

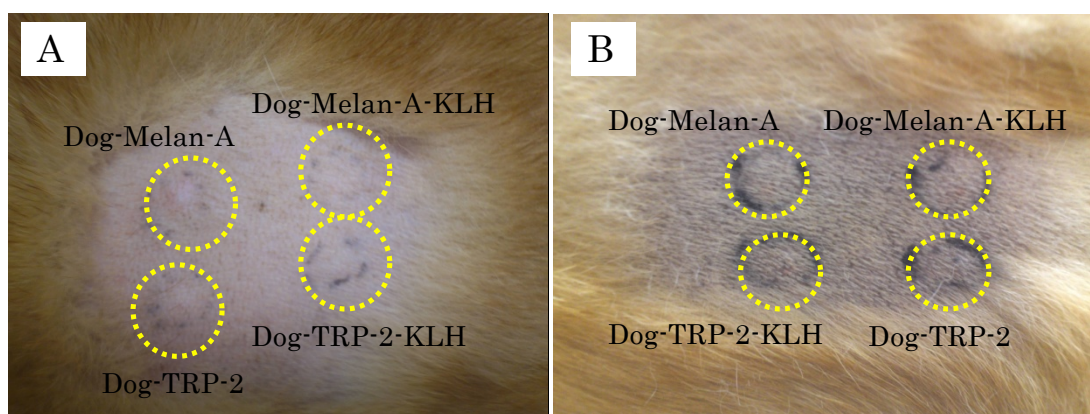


**Fig.9 Dog-TRP-2-KLH で免疫したイヌの血清抗体価の経時的推移**

96 穴プレートに Dog-TRP-2-OVA を吸着させ、希釈した血清と反応させた。吸光度を縦軸に、血清希釈倍率を横軸に示した。ワクチン接種前(0w)と比較して、2 週目(2w)と 6 週目(6w)では抗体価に変化は認めなかったが、10、12 週目(10、12w)では吸光度の上昇が認められた。各希釈倍率での吸光度を下の表に示した。図中には二重試験の平均値を示している。

Dog-TRP-2-OVA に対するイヌ血清の反応 (吸光度)								
血清の希釈倍率	x20	x40	x80	x160	x320	x640	x1280	x2560
0 週目	1.254	1.161	1.132	1.116	1.068	1.033	1.073	1.210
	1.226	1.071	1.056	1.078	1.019	0.953	0.950	1.148
平均	1.240	1.116	1.094	1.097	1.044	0.993	1.012	1.179
2 週目	1.416	1.218	1.174	1.159	1.083	0.879	0.953	1.011
	1.494	1.202	1.127	1.013	1.114	1.101	1.241	1.196
平均	1.455	1.210	1.151	1.086	1.099	0.990	1.097	1.104
6 週目	1.429	1.212	1.085	1.117	1.094	1.040	1.193	1.142
	1.576	1.315	1.097	1.009	0.917	0.935	0.903	0.848
平均	1.503	1.264	1.091	1.063	1.006	0.988	1.048	0.995
10 週目	2.022	1.593	1.319	1.245	0.995	0.935	0.812	0.894
	2.039	1.566	1.325	1.152	1.011	0.906	0.895	0.722
平均	2.031	1.580	1.322	1.199	1.003	0.921	0.854	0.808
12 週目	>3.5	2.871	2.127	1.598	1.472	1.298	0.978	0.853
	>3.5	3.028	2.300	1.957	1.540	1.260	1.008	0.855
平均	>3.5	2.950	2.214	1.778	1.506	1.279	0.993	0.854
$\Delta OD^{*1}$	>2.2	1.834	1.120	0.681	0.463	0.286	-0.018	-0.325

\*1...OVA に対する非特異反応を考慮し、最も吸光度が高かった免疫後 12 週目の血清について吸光度から免疫前の血清の同じ希釈倍率の吸光度を引いた値



**Fig.10 イヌにおける皮内試験**

イヌにおいてペプチドワクチン投与前に Dog-Melan-A、Dog-Melan-A-KLH、Dog-TRP-2、Dog-TRP-2-KLH を皮内投与し、その 15 分後の様子を撮影した。A：初回投与日の皮内試験の様子。Dog-Melan-A 投与部位で 6mm、Dog-Melan-A-KLH 投与部で 2mm の発赤を認め、Dog-Melan-A では膨疹も認めた。TRP-2 および Dog-TRP-2-KLH には反応が認められなかった。B：2 回目投与日の皮内試験の様子。ペプチドに対する反応は認められなかった。



### 第3章 犬の肥満細胞腫における KIT の発現

#### <要旨>

KIT は、*c-kit* 遺伝子によりコードされるⅢ型の受容体チロシンキナーゼであり、細胞の分化・増殖を誘導する。犬の肥満細胞腫の *c-kit* 遺伝子の変異が報告されており、このような症例ではチロシンキナーゼ阻害薬が有効である確率が高いため臨床現場では治療効果の予測に *c-kit* 遺伝子変異検査が行われている。しかし、現在、検査センターでは検体の保存上の問題により DNA レベルでの遺伝子変異を検査しているため、変異を持つ遺伝子アレルが蛋白として発現しているかは不明である。そこで今回、犬の肥満細胞腫を中心とした臨床検体を用いてフローサイトメトリーにより蛋白レベルでの KIT の発現を解析した。まず、抗体の反応性を解析するため、過去の報告をもとに 2 種類の抗 *c-kit* モノクローナル抗体を用いて犬の 3 種類の肥満細胞腫由来の細胞株における KIT の発現をフローサイトメトリーにより解析した。モノクローナル抗体 2B8 を用いた場合には VIMC 細胞、CMMC 細胞とわずかに反応し、HRMC 細胞では KIT の反応は確認できなかった。一方、モノクローナル抗体 ACK45 を用いた場合には、VIMC 細胞および CMMC 細胞では KIT の発現がみられ、HRMC 細胞では KIT の発現はみられなかった。また、この KIT の発現はリアルタイム PCR により解析した *c-kit* mRNA の発現とよく一致した。この結果よりモノクローナル抗体 ACK45 を使用して、鹿児島大学附属動物病院に来院した犬 19 頭（肥満細胞腫 10 例、悪性黒色腫 4 例、リンパ腫 3 例、白血病 1 例、軟部組織肉腫 1 例）から針吸引生検で採取した臨床検体を用い、KIT の発現をフローサイトメトリーで解析した。その結果、肥満細胞腫の 10 例中 5 例で KIT の発現がみられたが、他の 5 例では KIT の発現がみられなかった。悪性黒色腫、リンパ腫、軟部組織肉腫では KIT の発現はみられなかったが、CD34 陽性白血病の 1 例では KIT が発現していた。肥満細胞腫の変異として最も頻度の高い exon11 の挿入変異をもたない肥満細胞腫の 4 例でイマチニブの投与を行った。KIT を発現している 3 例のうち 1 例はイマチニブ投与により部分寛解を得られたが、他の 2 例では治療効果はみられなかった。KIT を発現していない 1 例でもイマチニブの投与で一時的な腫瘍の縮小がみられた。

今回、フローサイトメトリーにより犬の KIT の発現を迅速に解析することができた。この解析は少量の FNA サンプルで迅速に行うことができる。DNA レベルの *c-kit* 遺伝子変異検査に加えて、フローサイトメトリーによる KIT の発現の解析により KIT を標的とした分子標的療法への反応性をより正確に予測することができるようになると考えている。また、*c-kit* 遺伝子に変異がなくても KIT 蛋白を発現している細胞に対するチロシンキナーゼ阻害薬の有効性やイマチニブが KIT 以外のチロシンキナーゼを介して作用するか今後検討していく必要があると思われる。

## <総括>

本研究では以下のことが明らかになった。

- ・ 疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子は犬に対して安全だと思われる。またペプチドと共にアジュバントとして投与することで抗体産生を誘導する。
- ・ しかし、癌治療に有効な免疫誘導を証明することはできなかった。
- ・ 将来癌治療に用いることができるイヌ CD20, melam-A, TRP-2 のほ乳類細胞発現プラスミドを作成した。
- ・ イヌ TRP-2 の cDNA 配列を明らかにした。
- ・ 犬の肥満細胞腫における細胞表面 KIT をモノクローナル抗体により解析する系を確立し、KIT が肥満細胞腫の半分程度で発現していることを明らかにした。