



# Combination of p53-DC vaccine and rAd-p53 gene therapy induced CTLs cytotoxic against p53-deleted human prostate cancer cells in vitro

Saito, Hiroki

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2018-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7159号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007159>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



## 学位論文の内容要旨

### Combination of p53-DC vaccine and rAd-p53 gene therapy induced CTLs cytotoxic against p53-deleted human prostate cancer cells in vitro

p53 樹状細胞ワクチンと p53 アデノウイルスベクターの併用による、p53 欠損前立腺癌細胞株に対する細胞傷害性 T 細胞の誘導

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
バイオロジクス探索研究分野  
(指導教員：白川 利朗 教授)

斉藤 大樹

#### [背景]

樹状細胞は抗原提示細胞の一種で取り込んだ抗原情報により特異的な T 細胞応答を誘導することが知られている。近年、この樹状細胞を用いたワクチン療法が世界各地で行われており、樹状細胞を活性化させるために様々な抗原タンパク(ペプチドや cell lysate など)が用いられている。本研究では樹状細胞の活性化に p53 遺伝子を組み込んだアデノウイルス(Ad-p53)を用いた。p53 遺伝子は正常細胞における発現は限定的で癌細胞においては過剰発現するものが多い。樹状細胞に Ad-p53 を感染させ p53-DC ワクチンを作製し、本ワクチンを用いて誘導した p53 特異的 CTL の細胞傷害性を種々の前立腺癌細胞株で検討した。

#### [方法]

対象癌細胞株の p53 発現の確認

前立腺細胞株(PC-3、LNCaP、C4-2B)および子宮頸癌細胞株(CaSki)を対象とした。各癌細胞株の p53 の発現を PCR 法及び蛍光免疫染色法で確認した。

遺伝子組換えアデノウイルス

本研究ではワクチン抗原に p53 遺伝子を組み込んだアデノウイルス(Ad-p53)を用いた。Ad-p53 はアデノウイルスの E1 領域に当たる部分にヒト wild type p53 遺伝子全長を挿入したものである。また陰性コントロールとして LacZ 遺伝子を組み込んだ Ad-LacZ を使用した。

樹状細胞の分離及び培養

樹状細胞は健康人の末梢血より遠心分離法により単核球を分離し 2 時間静置後接着細胞のみを IL-4 (500U/ml)、GM-CSF (1000U/ml)添加培地で 6 日間培養し誘導した。その後 Ad-p53 または Ad-LacZ を 48 時間感染させ p53-DC、LacZ-DC とした。樹状細胞のフェノタイプの確認はフローサイトメトリー法にて行った。

特異的 CTL の誘導

末梢血中から単核球を分離し 24 時間静置後非接着細胞のみを回収した。その後 p53-DC、または LacZ-DC との共培養を IL-2、IL-7 添加培地にて行い p53 特異的 CTL の誘導を行った (p53-CTL または LacZ-CTL)。培地の交換は 3 日毎に行った。

p53 特異的 CTL の細胞傷害性の検討

p53 欠失細胞株である PC-3、p53 発現細胞株である LNCaP、C4-2B、CaSki に対して 1:1、5:1、10:1 で p53-CTL、LacZ-CTL を 6 時間共培養し cytotox 96 を用いて細胞傷害性の検討を行った。

Ad-p53 を感染させた p53 欠失細胞株に対する p53 特異的 CTL の細胞傷害性の検討

p53 欠失細胞株である PC-3 に対して p53 特異的 CTL との共培養の 24 時間前に Ad-p53 を感染させ p53 を強制発現させた状態で 1:1、5:1、10:1 で p53-CTL、LacZ-CTL を 6 時間共培養し cytotox 96 を用いて細胞傷害性の検討を行った。

#### p53 特異的 CTL の perforin の発現量

ELISA において p53CTL より発現された perforin 量の定量をおこなった。

#### 24 時間地点での Ad-p53 の細胞毒性

24 時間時点における Ad-p53 による細胞毒性を Almar Blue 法にて検討した。

#### [結果]

##### p53 の発現の確認

p53 の発現の結果を PCR 法、蛍光免疫染色法にて行った結果 PC-3 は陰性、C4-2B、LNCaP、CaSki は陽性であった。

#### 樹状細胞への誘導確認

樹状細胞への誘導の確認をフローサイトメトリー法にて行った。その結果 p53-DC、LacZ-DC のいずれにおいても樹状細胞のマーカーである CD11c、CD86、HLA-DR の発現率の上昇が培養前と比較して確認された。

#### p53 発現細胞株に対する細胞傷害性の検討

cytotox96 を用いて細胞傷害性の検討をおこなった。その結果 p53 発現細胞株において p53 特異的 CTL (p53-CTL) は陰性コントロールである LacZ-DC と共培養した LacZ-CTL に比較して優位に高い細胞傷害性を示した。

#### p53 欠失細胞株に対する細胞傷害性の検討

p53 欠失細胞株である PC-3 への p53-CTL の細胞傷害性は認められなかった。Ad-p53 によって p53 を強制発現させた PC-3 に対する p53-CTL の細胞傷害性は LacZ-CTL と比較して優位に高かった。

#### p53 特異的 CTL の perforin 量の定量

p53-CTL からの perforin 量の定量を行うと p53 欠失株との共培養では LacZ-CTL と有意な差がなかったのに対し、p53 発現細胞株との共培養においては有意に増量することを確認した。

#### 24 時間地点での Ad-p53 の細胞毒性

24 時間時点においては Ad-p53 における細胞毒性は認められなかったため、Ad-p53 に感染した PC-3 の細胞毒性は p53-CTL のみによるものと考えられる。

#### [考察]

p53 遺伝子は正常細胞の発現は限定的であり、多くの癌細胞において過剰発現していることが知られている。p53-DC ワクチンはこのような p53 発現癌に対して、p53 特異的な CTL を誘導することから有効な治療法になり得ると考えられる。

本研究においても p53 発現癌細胞株に対して有意に高い細胞傷害性を示しており、また perforin の発現量に関しても有意に高いことから Ad-p53 により p53 の抗原情報を獲得した DC が抗原提示を行い CTL が p53 特異的な CTL へと分化したと考えられる。

また、癌細胞の中には今回の PC-3 のように p53 が欠失あるいは発現しない p53 陰性癌細胞も存在する。p53 陰性の癌が対象の場合でも、Ad-p53 遺伝子治療との併用により強制的に p53 を発現させることで p53-DC ワクチンの対象とできることが本研究結果から示唆された。Ad-p53 遺伝子治療と p53-DC ワクチン療法の併用療法は、多くの癌に対して有望な治療法になり得ると考えられる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2783 号	氏 名	齊藤 大樹
論文題目 Title of Dissertation	<p>Combination of p53-DC vaccine and rAd-p53 gene therapy induced CTLs cytotoxic against p53-deleted human prostate cancer cells in vitro</p> <p>p53 樹状細胞ワクチンと p53 アデノウイルスベクターの併用による、p53 欠損前立腺癌細胞株に対する細胞傷害性 T 細胞の誘導</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 林 祥 剛 Chief Examiner</p> <p>副 査 西 尾 久 英 Vice-examiner</p> <p>副 査 藤 = 郁 夫 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

要旨

樹状細胞は抗原提示細胞の一種で取り込んだ抗原情報により特異的な T 細胞応答を誘導することが知られている。近年、この樹状細胞を用いたワクチン療法が世界各地で行われており、樹状細胞を活性化させるために様々な抗原タンパク(ペプチドや cell lysate など)が用いられている。本研究では樹状細胞の活性化に p53 遺伝子を組み込んだアデノウイルス(Ad-p53)を用いた。p53 遺伝子は正常細胞における発現は限定的で癌細胞においては過剰発現するものが多い。樹状細胞に Ad-p53 を感染させ p53-DC ワクチンを作製し、本ワクチンを用いて誘導した p53 特異的 CTL の細胞傷害性を種々の前立腺癌細胞株で検討した。方法としては、前立腺細胞株(PC-3、LNCaP、C4-2B)および子宮頸癌細胞株(CaSki)を対象とした。各癌細胞株の p53 の発現を PCR 法及び蛍光免疫染色法で確認した。ワクチン抗原に p53 遺伝子を組み込んだアデノウイルス(Ad-p53)を用いた。Ad-p53 はアデノウイルスの E1 領域に当たる部分にヒト wild type p53 遺伝子全長を挿入したものである。また陰性コントロールとして LacZ 遺伝子を組み込んだ Ad-LacZ を使用した。樹状細胞は健康人の末梢血より遠心分離法により単核球を分離し 2 時間静置後接着細胞のみを IL-4 (500U/ml)、GM-CSF (1000U/ml)添加培地で 6 日間培養し誘導した。その後 Ad-p53 または Ad-LacZ を 48 時間感染させ p53-DC、LacZ-DC とした。樹状細胞のフェノタイプの確認はフローサイトメトリー法にて行った。末梢血中から単核球を分離し 24 時間静置後非接着細胞のみを回収した。その後 p53-DC、または LacZ-DC との共培養を IL-2、IL-7 添加培地にて行い p53 特異的 CTL の誘導を行った (p53-CTL または LacZ-CTL)。培地の交換は 3 日毎に行った。p53 欠失細胞株である PC-3、p53 発現細胞株である LNCaP、C4-2B、CaSki に対して 1:1、5:1、10:1 で p53-CTL、LacZ-CTL を 6 時間共培養し cytotox 96 を用いて細胞傷害性の検討を行った。p53 欠失細胞株である PC-3 に対して p53 特異的 CTL との共培養の 24 時間前に Ad-p53 を感染させ p53 を強制発現させた状態において 1:1、5:1、10:1 で p53-CTL、LacZ-CTL を 6 時間共培養し cytotox 96 を用いて細胞傷害性の検討を行った。ELISA において p53CTL より発現された perforin 量の定量をおこなった。24 時間時点における Ad-p53 による細胞毒性を Almar Blue 法にて検討した。

p53 の発現検索を PCR 法、蛍光免疫染色法にて行った結果 PC-3 は陰性、C4-2B、LNCaP、CaSki は陽性であった。樹状細胞への誘導の確認をフローサイトメトリー法にて行い、p53-DC、LacZ-DC のいずれにおいても樹状細胞のマーカーである CD11c、CD86、HLA-DR の発現率の上昇が培養前と比較して確認された。cytotox96 を用いて細胞傷害性の検討をおこない、p53 発現細胞株において p53 特異的 CTL (p53-CTL) は陰性コントロールである LacZ-DC と共培養した LacZ-CTL に比較して優位に高い細胞傷害性を示した。p53 欠失細胞株である PC-3 への p53-CTL の細胞傷害性は認められなかった。Ad-p53 によって p53 を強制発現させた PC-3 に対する p53-CTL の細胞傷害性は LacZ-CTL と比較して優位に高かった。

p53-CTLからのperforin量の定量を行うとp53欠失株との共培養ではLacZ-CTLと有意な差がなかったのに対し、p53発現細胞株との共培養においては有意に増量することを確認した。24時間時点においてはAd-p53における細胞毒性は認められなかったため、Ad-p53に感染したPC-3の細胞毒性はp53-CTLのみによるものと考えられる。

p53遺伝子は正常細胞の発現は限定的であり、多くの癌細胞において過剰発現していることが知られている。p53-DCワクチンはこのようなp53発現癌に対して、p53特異的なCTLを誘導することから有効な治療法になり得ると考えられる。p53発現癌細胞株に対して有意に高い細胞傷害性を示しており、またperforinの発現量に関しても有意に高いことからAd-p53によりp53の抗原情報を獲得したDCが抗原提示を行いCTLがp53特異的なCTLへと分化したと考えられる。また、癌細胞の中にはPC-3のようにp53が欠失あるいは発現しないp53陰性癌細胞も存在する。p53陰性の癌が対象の場合でも、Ad-p53遺伝子治療との併用により強制的にp53を発現させることでp53-DCワクチンの対象とできることが本研究結果から示唆された。Ad-p53遺伝子治療とp53-DCワクチン療法の併用療法は、多くの癌に対して有望な治療法になり得ると考えられる。

本研究は、p53-DCワクチン療法について、p53-DCワクチン療法と癌細胞障害性との関係を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったAd-p53遺伝子治療併用することによりp53陰性癌細胞に強制的にp53を発現させることでp53-DCとの特異的な相互作用をすることを確認した。p53-DCワクチン療法の新たな応用の可能性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。