

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18443

研究課題名(和文) 腫瘍の低免疫原性獲得機構の解明とそれを標的としたがん治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategy for low immunogenic tumor

研究代表者

村岡 大輔(Daisuke, Muraoka)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：20608955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗免疫チェックポイント抗体が注目を集めているが、一部のがん患者では有効性が低いことが問題となっている。このような免疫療法の治療効果の低下と腫瘍の免疫原性に関する研究は多く行われているが、腫瘍局所に注目した研究は少ない。本研究において我々は、免疫チェックポイント阻害療法抵抗性の低免疫原性腫瘍では、TAMが未成熟状態であり且つ抗原提示能を有していないことを明らかにした。また、微粒粒子性抗原を尾静脈投与することでTAMへと抗原提示能を付与できること、およびそれに伴い細胞性免疫に対する感受性を飛躍的に上昇させ治癒へと導けることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recently, immune checkpoint inhibitors have been emerging as novel, effective modality for the treatment of cancer. However, these inhibitors have been proven to be effective only for a partial group of patients. Although the relationship between efficacy of checkpoint inhibitors and immunogenicity of tumor has been studied, these studies paid attention only for the induction of immune responses and do not pay attention to the mechanisms regulating the anti-tumor cellular immune responses in tumor site. In this study, we explored a mechanism underlying the resistance. We revealed that tumor-associated macrophages (TAMs) remained immature and did not exert antigen-presenting activity in the resistant tumor. A nanogel-based antigen delivery system enabled to selectively and efficiently deliver a long peptide antigen to TAMs. Administration of the nanogel:long peptide antigen induced antigen presentation in TAMs. This treatment resulted in the cure of resistant tumor.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：低免疫原性

1. 研究開始当初の背景

担癌個体の免疫系が認識する腫瘍特異的抗原の発見以来、これを標的とした癌免疫療法の開発が盛んに行われている。取り分け、がんワクチンや抗チェックポイント抗体など、宿主の腫瘍特異的免疫応答を惹起する治療法は注目を集め、そのいくつかはFDA承認を受けるに至る。しかしその一方、十分な成果が得られない臨床試験も数多く存在し、その理由の一つが標的腫瘍の免疫原性の低さとされる。腫瘍の免疫原性は、腫瘍の持つ抗原や担癌生体内の免疫抑制状態、そして主要組織適合複合体(MHC)の発現制御などにより決定されるが(Nat Rev Cancer, 2012 12:307-13.)、不明な点も多く、免疫原性の低い腫瘍を標的にした基礎研究および臨床開発は困難を極めていく。

2. 研究の目的

本申請研究では、既知の腫瘍抗原に対する細胞性免疫応答の解析により、低免疫原性の腫瘍として同定されるCMS5a腫瘍モデルを用い、その腫瘍浸潤リンパ球解析から腫瘍が低免疫原性を獲得する機構を理解すると共に、抗チェックポイント抗体などを用いて低免疫原性腫瘍に対する効果的な治療法の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 新生抗原特異的細胞性免疫応答の解析
CT26、CMS7 および CMS5a、CMS5a/NY-ESO-1 腫瘍を BALB/c マウスへと皮下移植した後、抗免疫チェックポイント抗体療法を施した(抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 GITR 抗体)。最終投与の 7 日後に脾臓由来リンパ球を回収し、各腫瘍細胞株が有する新生抗原候補ペプチドにて刺激をし、細胞内サイトカイン染色を行った。また、経時的に腫瘍サイズを測定し免疫チェックポイント抗体療法に対する感受性も検討した。

(2) 腫瘍局所における網羅的遺伝子発現解析

CT26、CMS7 および CMS5a、CMS5a/NY-ESO-1 腫瘍を BALB/c マウスへと皮下移植し、移植 7 日後に腫瘍を回収した。回収した腫瘍より、cDNA を作成し、DNA マイクロアレイ解析を行った。

(3) 腫瘍局所マクロファージ (TAM) のフェノタイプ解析

CT26、CMS7 および CMS5a、CMS5a/NY-ESO-1 腫瘍を BALB/c マウスへと皮下移植し、移植 7 日後に腫瘍より回収し TAM (CD45 陽性、CD11b 陽性、F4/80 陽性細胞) のフェノタイプ解析を行った。MHC クラス II、CD80、CD86、PD-L1、CD40 発現を評価した。

(4) TAM の抗原提示能の解析

CMS5a および CMS5a/NY-ESO-1 腫瘍を

BALB/c マウスへと皮下移植し、移植 7 日後に腫瘍由来 CD11b 陽性細胞を精製した。9m 特異的 TCR 発現遺伝子操作マウスである DUC18 マウスより CD8 陽性細胞を回収し CFSE ラベルを施した。両細胞を共培養した後、フローサイトメトリーにて解析を行った。

(5) 微粒子性抗原の尾静脈投与による TAM への抗原送達と抗原提示能の付与

CMS5a 腫瘍を BALB/c マウスへと皮下移植し 7 日後に CHP:長鎖ペプチドワクチン (LPA) を尾静脈投与した。その後、TAM によるワクチンの取り込みおよび抗原提示能の変化を解析した。

(6) 微粒子性抗原の尾静脈投与と細胞移入療法の併用による抗腫瘍効果の検討

CMS5a および CMS5a/NY-ESO-1 腫瘍を BALB/c マウスへと皮下移植し、移植 7 日後に CHP:長鎖ペプチドワクチン (LPA) を尾静脈投与し、TAM によるワクチンの取り込み、および抗原提示能の変化について検討した。

4. 研究成果

(1) CMS5a 腫瘍モデルは免疫原性の高い抗原を有さない

各腫瘍モデルにおける新生抗原に対する細胞性免疫応答を検討した。その結果、CT26 および CMS7 では新規新生抗原に対する細胞性免疫応答が確認されたのに対し、CMS5a では観察されなかった。また、抗免疫チェックポイント阻害療法に対する感受性も他の腫瘍モデルと比して CMS5a 腫瘍モデルでは著しく低い事が明らかになった(図1)。

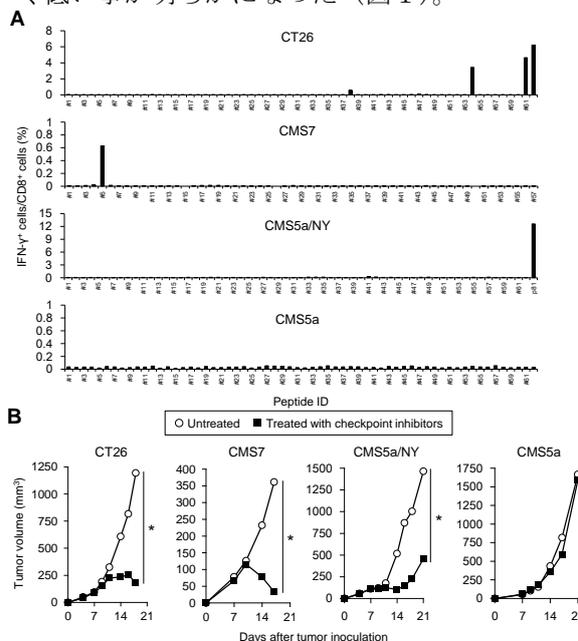


図1
A) 各腫瘍担癌モデルにおける、新生抗原特異的細胞性免疫応答を検討した結果、CMS5a 腫瘍モデルは免疫原性の高い抗原を発現しておらず、低免疫原性であることが確認された。

図1つづき

B) 各腫瘍担癌モデルにおける、免疫チェックポイント療法に感受性を検討し、CMS5a 腫瘍モデルは免疫チェックポイント療法に対して抵抗性であることが確認された。

(2) CMS5a の腫瘍局所は非炎症状態である
各腫瘍モデルの腫瘍局所の情報を収集すべく、腫瘍局所の網羅的遺伝子発現解析をおこなった。その結果、CT26 および CMS7 腫瘍モデルに比較して、CMS5a 腫瘍モデルでは、腫瘍局所における炎症性サイトカインなどの遺伝子群の発現が著しく低いことが明らかになった。

(3) CMS5a の TAM は非活性化状態である
各腫瘍モデルにおける腫瘍局所マクロファージに注目し検討を行った。その結果、他の腫瘍モデルと比して、CMS5a の TAM は未成熟であることが明らかになった (図2)。

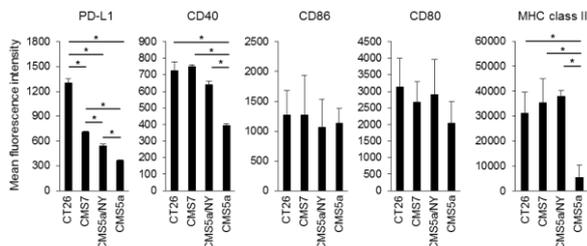


図2

各腫瘍担癌モデルにおける TAM のフェノタイプを比較した。他の腫瘍に比して、CMS5a 腫瘍モデルの TAM は PD-L1、CD40、MHC クラス II の発現が低い未成熟タイプであることが確認された。

(4) CMS5a の TAM は腫瘍由来抗原を提示しない

CMS5a 腫瘍の TAM が抗原提示能を有するのかを検討した。その結果、CMS5a/NY-ESO-1 腫瘍由来 TAM に比して、CMS5a の TAM は腫瘍抗原を提示していない事が明らかになった (図3)。

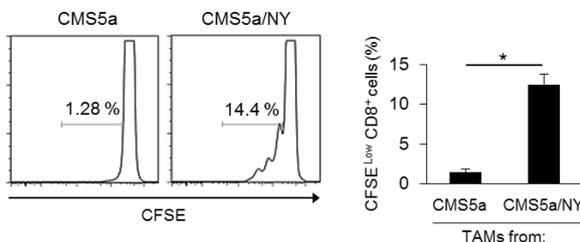
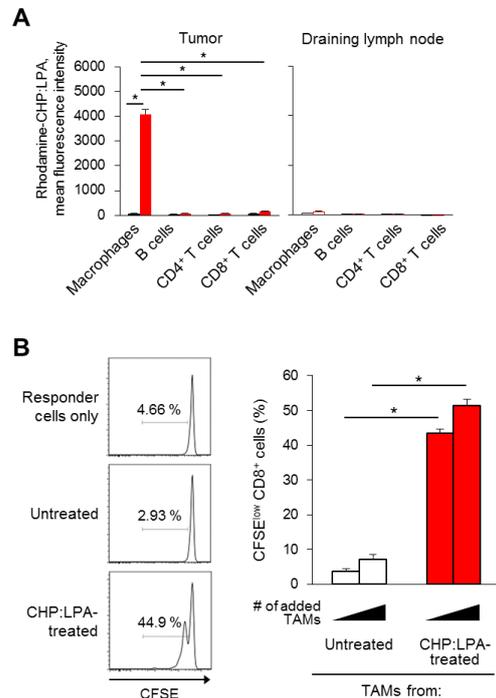


図3

CMS5a 腫瘍モデルにおける TAM の抗原提示能を検討した。CMS5a/NY-ESO-1 由来 TAM に比して、CMS5a 腫瘍由来の TAM は抗原提示能を示さないことが確認された。

(5) 微粒子性抗原の尾静脈投与は TAM に抗原を送達し抗原提示能の付与する

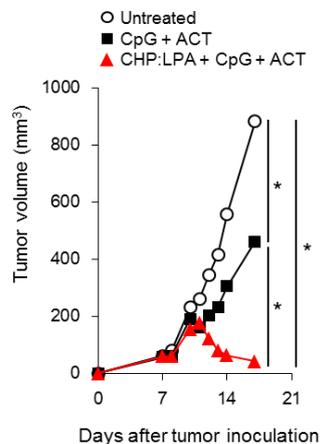
微粒子性抗原を尾静脈投与することにより、抗原提示能を付与できるか否かを検討した。その結果、微粒子性抗原を尾静脈投与は TAM に抗原を送達し抗原提示能を付与することがあきらかになった。



A) 微粒子性抗原の尾静脈投与により TAM へ抗原が送達されるかを検討した。

B) 微粒子性抗原の尾静脈投与により TAM へと抗原提示能が付与されるかを検討した。

(6) 微粒子性抗原の尾静脈投与と細胞移入療法の併用は抗腫瘍効果を誘導する
腫瘍局所マクロファージの抗原提示が腫瘍の細胞性免疫に対する感受性を規定するか否かを検討した。その結果、微粒子性抗原の尾静脈投与と細胞移入療法を併用することにより、CMS5a 腫瘍の完全退縮が導かれることを明らかにした。



CMS5a 腫瘍担癌 7 日後に、微粒子性抗原の尾静脈投与および細胞移入療法を併用し、腫瘍サイズを計測した。微粒子性抗原尾静脈投与ワクチンと細胞移入療法により低免疫原性腫瘍である CMS5a の完全退縮が導かれることを確認した。

おわりに

以上の結果より、低免疫原性腫瘍に対する治療戦略として、微粒子性抗原を用い TAM に抗原提示能を付与することで、腫瘍の細胞性免疫に対する感受性を飛躍的に上昇させ強力な治療効果が誘導されたと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

Daisuke Muraoka, Naozumi Harada, Naohiro Seo, Keisuke Fujii, Mitsuhiro Komura, Rui Yamaguchi, Seiya Imoto, Satoru Miyano, Hideo Yagita, Kazunari Akiyoshi, and Hiroshi Shiku. Antigen Delivery Targeting Tumor-Infiltrating Macrophages Leads to Eradication of Tumor Highly Resistant to Immune Checkpoint Inhibitors AACR Tumor Immunology and Immunotherapy (Boston) 2016 年 10 月

Daisuke Muraoka, Naohiro Seo, Naozumi Harada, Keisuke Fujii, Mitsuhiro Komura, Rui Yamaguchi, Seiya Imoto, Satoru Miyano, Hideo Yagita, Kazunari Akiyoshi, and Hiroshi Shiku. Antigen delivery to tumor macrophages leads to the cures of resistant to immune checkpoint blockade tumor 第 75 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2016 年 10 月

村岡大輔. "変異抗原の免疫原性は腫瘍局所における炎症反応を誘導し免疫チェックポイント療法に対する応答性を規定する 第 20 回日本がん免疫学会総会 (大阪) 2016 年 7 月

Daisuke Muraoka, Naohiro Seo, Naozumi Harada, Mitsuhiro Komura, Rui Yamaguchi, Seiya Imoto, Satoru Miyano, Hideo Yagita, Hiroshi Shiku.

腫瘍局所の炎症度と抗チェックポイント抗体の治療効果は新生抗原の免疫原性に依存する 第 74 回 日本癌学会学術総会 (名古屋) 2015 年 10 月

Daisuke Muraoka, Naohiro Seo, Tae Hayashi, Chisaki Hyuga-Amaiike, Naozumi Harada, Hiroshi Shiku. Signal-transducing Adaptor Protein-2 enhances the STAT3 signaling and prevents exhaustion of the Long-term Memory T Cells. がん免疫療法・マクロファージ国際会議 (東京) 2015 年 7 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

村岡 大輔 (MURAOKA DAISUKE)

静岡県立大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：20608955