

令和元年9月12日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10541

研究課題名(和文) 同種異系反応に伴う免疫活性化機構の解明と新規標的分子の同定

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of immune activation and identification of novel target molecules associated with allogeneic reactions

研究代表者

山下 公大 (Yamashita, Kimihiro)

神戸大学・医学部附属病院・特命准教授

研究者番号：80535427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：同種異系反応を利用した腫瘍反応性T細胞の誘導を目的とした研究で、2つの計画を同時に進行させた。まず第一にallogeneic IgGと腫瘍細胞が免疫複合体を形成し、これを樹状細胞がin vitroで効率的に貪食し、強力な抗原提示能を発揮する機構を用いて、大腸癌に対する治療モデル作成を計画した。現在は、T細胞の活性化が十分でない。

第二に同種異系樹状細胞に抗原導入を行ったNKT細胞活性化ワクチンベクターを持ちいた方法である。同種同型樹状細胞を用いたワクチンベクターの確立に成功した。同種異系由来樹細胞は、肺転移モデルにおいて、効果を示すことが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤の台頭と共に、奏功症例の解析が進み、がんの発症に伴う遺伝子変異に起因する新生変異抗原(neoantigen)の存在が必要条件であることが示された。変異頻度の高い癌種にneoantigenが出現する傾向があるために、大腸癌に限った場合、Lynch症候群を中心としたミスマッチ修復機構の欠損を有する症例(MSI-H)に限られる。ただ、neoantigenの同定は煩雑であり、共通性の極めて低いものであり、困難となる。本研究は、neoantigenを同定せずとも免疫療法の機会を失さない、効果的なオーダーメイド治療の確立に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：We aimed to induce the tumor-reactive T cells using allogeneic reactions. To this end, we planned two projects simultaneously. At first, the mechanisms that allogeneic IgG and tumor cells form an immune complex, which is efficiently phagocytosed by dendritic cells in vitro and exerts a strong antigen presenting ability was reported. Using this system, we tried to establish a therapeutic model for colorectal cancer. Currently, we got the results that T cell activation is not sufficient. Second, we advanced induction of tumor-reactive T cells by NKT cell-activating allogeneic vaccine vectors composed of antigen-introduced allogeneic dendritic cells. We succeeded in establishing a vaccine vector using syngeneic dendritic cells. It is suggested that allogeneic dendritic cells show an effect in a lung metastasis model. We established a vaccine vector using allogeneic dendritic cells. It is suggested that allogeneic vaccine vector system showed an effect in a lung metastasis model.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 免疫細胞療法 NKT細胞 同種異型反応 T細胞 ネオ抗原

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抗腫瘍免疫応答の中心的役割を果たす腫瘍反応性 T 細胞を確保することが、がんの治療におけるゴールの一つである。獲得免疫の抗原特異性というシステムへの期待は、多数のがん抗原の同定とがんペプチドワクチンや樹状細胞ワクチンとして研究開発に向けられたが、共通抗原のワクチンの治療効果は極めて低いとされた。このため、我々は、単一抗原に依存しない免疫システム開発を目指して、同種異系 (allogeneic) 反応と抗腫瘍免疫に着目して研究を進めてきた。allogeneic 反応が腫瘍拒絶に関連すると考えられるため、セミアロジェニックな樹状細胞/腫瘍細胞融合ワクチンが肺転移モデルにおいて有効であることを示した (Yasuda T, Kamigaki T, et al. Cancer Immunol Immunother, 2007)。また、allogeneic 樹状細胞を用いた NKT 細胞を活性化する DC/Gal (dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide) 療法は同等以上の抗腫瘍効果があることを示した (Hasegawa H, Yamashita K, Kamigaki T, Kakeji Y, et al. Anticancer Res. 2014)。

今回は、他家の報告より、129S1 マウス由来 IgG をアロジェニックな IgG として、同種異系 (BALB/c マウスや C57Bl/6 マウス) 由来腫瘍細胞とが免疫複合体 (Immuno-complex; IC) を形成し、これを樹状細胞が *in vitro* で効率的に貪食し、強力な抗原提示能を発揮することが明らかとなった (Carmi Y, et al. Nature, 2015)。このシステムを用いて、樹状細胞の活性化機構を明らかにし、ヒト大腸癌組織に対する治療モデルを作成する。

### 2. 研究の目的

同種異型免疫反応 (allogeneic reaction) を用いて、腫瘍反応性 T 細胞を誘導すること。

### 3. 研究の方法

計画(1): allogeneic IgG 付加腫瘍細胞を容易に貪食する樹状細胞による T 細胞の活性化

マウスモデルでの治療モデルの作成

ヒト大腸癌細胞株とヒト血清による allogeneic IgG 抗体バンクの作成

ヒト大腸癌組織での PDTX モデルでの治療効果判定

マウスモデルでの樹状細胞活性化タンパクの解析

計画(2): 腫瘍タンパク抗原を導入した  $\alpha$ -ガラクトシルセラミドを用いた、同種異型由来 NKT 細胞活性化ワクチンベクターの開発

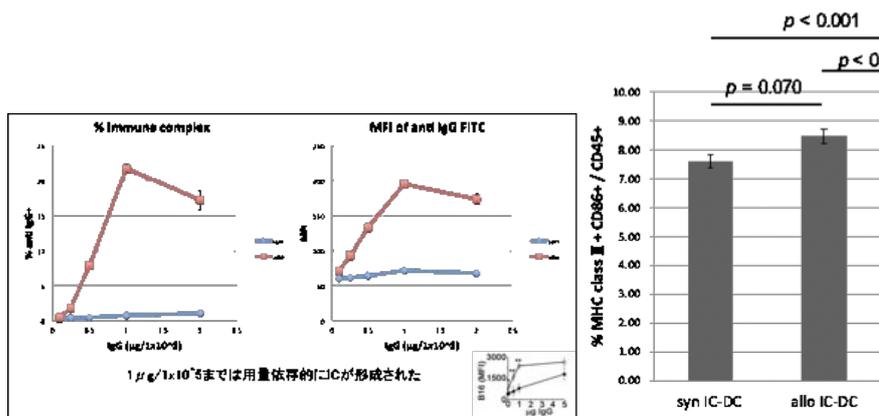
マウス OVA を導入した NKT 細胞活性化ワクチンベクターの開発

マウス OVA を導入した同種異型由来 NKT 細胞活性化ワクチンベクターの開発

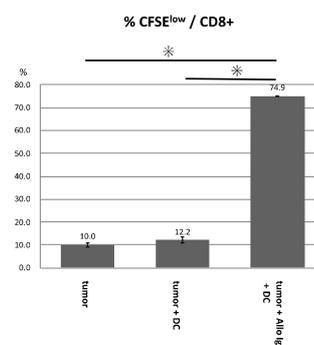
### 4. 研究成果

-1 IC の形成  $1 \mu\text{g}/1 \times 10^5$  までは用量依存的に IC が形成された。

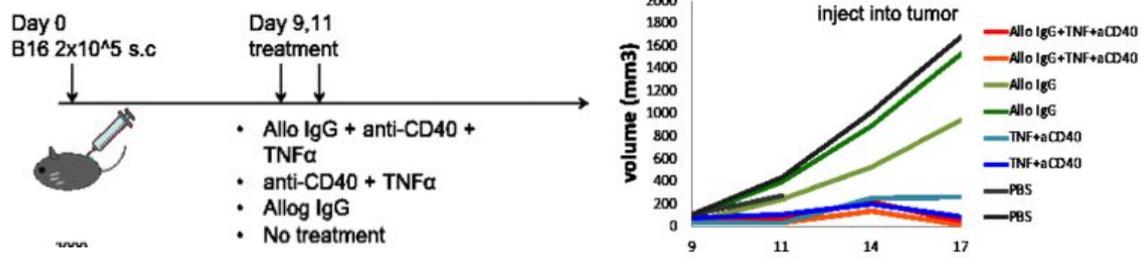
-2 DC の成熟化 DC の成熟化が確認された。樹状細胞の成熟化のマーカーとして MHC-II, CD80, CD86 を用いて評価し、成熟化が進んだ DC を確認することができた。



-3 T 細胞の活性化 作成した IC を用いて T 細胞の活性化を確認した。この結果は IC による T 細胞の増殖・分裂を示す。



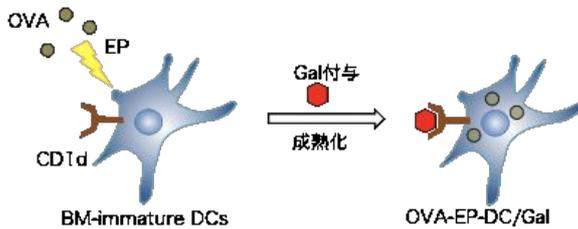
-4 In vivo で TNF + CD40b による抗腫瘍効果の相乗効果 右図の実験では、明らかな相乗効果を認めなかった。



計画(2) マウス OVA を導入した NKT 細胞活性化ワクチンベクターの開発

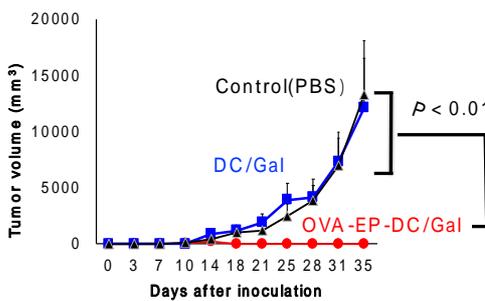
OVA を電気穿孔法で樹状細胞に導入したワクチンベクターの開発

OVA-EP-DC/Gal : C57BL/6 マウス骨髄由来樹状細胞 に電気穿孔法(electroporation, EP)で Ovalbumin(OVA)を導入し、成熟後、Gal を付与したベクター。

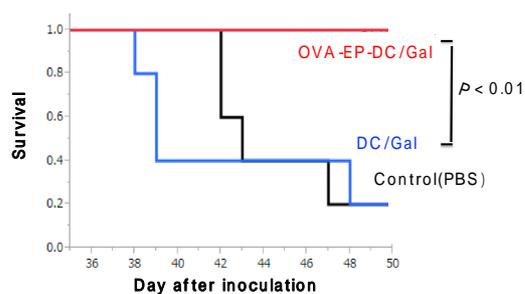


皮下接種の予防モデルにおける腫瘍量を示す。OVA-EP-DC/Gal にて完全に拒絶できることに成功した。また、消失した腫瘍は再発することなく、長期間に渡り、維持され、生存した。

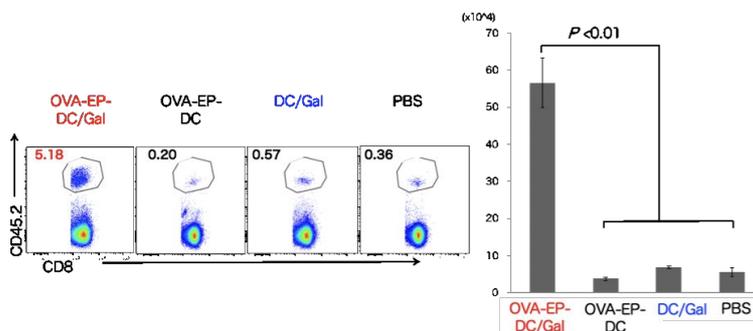
Tumor volume



Survival time



上記のごとく、腫瘍に対し、腫瘍皮下接種マウスでは完全に拒絶した。



抗原特異的 CD8+T 細胞の活性化が可能であることを示した。その他、NK 細胞の活性化の効果、記憶細胞の樹立の効果などを確認している (unpublished data)。

マウス OVA を導入した同種異型由来 NKT 細胞活性化ワクチンベクターの開発  
さらに上記の OVA-EP-DC/Gal (syngeneic DC: synDC) に対し、BALB/c 由来 DC (allogeneic DC: alloDC) を用いた OVA-EP-alloDC/Gal での治療で一定の効果が得られた。現在、この効果について検討している。

## 5 . 主な発表論文等

1 西 将康、山下 公大、長谷川 寛、田中 智子、有本 聡、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、押切 太郎、角 泰雄、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘、 $\alpha$ -galactosylceramide 付加細胞投与による NKT 細胞活性化を介した抗腫瘍免疫療法、Cytometry research、査読有、Vol.27、2017、pp.7-12、[https://doi.org/10.18947/cytometryresearch.27.1\\_7](https://doi.org/10.18947/cytometryresearch.27.1_7)

2 山下 公大、長谷川 寛、藤田 貢、西 将康、田中 智子、有本 聡、中村 哲、鈴木 知志、神垣 隆、掛地 吉弘、Host CD40 Is Essential for DCG Treatment Against Metastatic Lung Cancer、Anticancer Res、査読有、Vol.36、2016、pp.3659-3665  
<http://ar.iiarjournals.org/content/36/7/3659.full>

3 山下 公大、有本 聡、西 将康、田中 智子、藤田 貢、福岡 英志、杉田 裕、中川 暁男、長谷川 寛、鈴木 知志、掛地 吉弘、Application of iNKT Cell-targeted Active Immunotherapy in Cancer Treatment、Anticancer Res、査読有、Vol.38、2018、pp.4233-4239  
<http://ar.iiarjournals.org/content/38/7/4233.full>

〔学会発表〕(計 5 件)

1 西 将康、山下 公大 腫瘍抗原導入 DCG を用いた抗腫瘍免疫活性化の検討、第 27 回日本サイトメトリー学会学術集会、2017.6.11、神戸国際会議場(兵庫県)

2 西 将康、山下 公大、腫瘍抗原導入 DCG を用いた抗原特異的な抗腫瘍免疫活性化、第 38 回癌免疫外科研究会、2017.5.25、倉敷アイピースクエア(岡山県)

3 長谷川 寛、山下 公大、 $\alpha$ -galactosylceramide による NKT 細胞活性化と肝傷害、第 26 回日本サイトメトリー学会学術集会、2016.7.23、九州大学医学部百年講堂 中ホール (福岡県)

4 西 将康、山下 公大、Allogeneic DCG 療法を用いた NKT 細胞の活性化に伴う抗腫瘍降下の検討、第 71 回日本消化器外科学会総会、2016.7.15、アスティとくしま(徳島県)

5 Arimoto A, Nishi M, Yamashita K, Sugita Y, Fukuoka E, Tanaka T, Kamigaki T, Takimoto R, Kakeji Y  
Electroporation as a feasible method for antigen delivering into vectors loaded with NKT cell ligand. AACR annual meeting 2018, April 14-18, 2018, McCormick Place North/South Chicago, Illinois

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### 1) 研究分担者

研究分担者氏名:神垣 隆  
ローマ字氏名:KAMIGAKI, Takashi  
所属研究機関名:神戸大学  
部局名:医学部附属病院  
職名:客員教授  
研究者番号(8 桁):20372641

研究分担者氏名:岡田 誠治 ローマ字氏名:OKADA, Seiji  
所属研究機関名:熊本大学  
部局名:学内共同両施設など  
職名:教授  
研究者番号(8 桁): 50282455

研究分担者氏名:掛地 吉弘 ローマ字氏名:KAKEJI, Yoshihiro  
所属研究機関名:神戸大学  
部局名:医学部附属病院  
職名:教授 研究者番号(8 桁):80284488

研究分担者氏名:藤田 貢 ローマ字氏名:FUJITA, Mitsugu  
所属研究機関名:近畿大学  
部局名:医学部  
職名:准教授  
研究者番号(8 桁):40609997

### (2) 研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。