

令和元年6月18日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10608

研究課題名(和文) XCR1+DCへ抗原を選択的に送達する新規がんペプチドワクチン戦略の開発

研究課題名(英文) A novel peptide vaccine therapy using in vivo antigen delivery to XCR1+DCs

研究代表者

勝田 将裕 (Katsuda, Masahiro)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50464673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CTL誘導能が高い樹状細胞サブセットであるXCR1+DCに選択的に抗原ペプチドを送達することが抗腫瘍効果の増強につながると考え、XCR1のリガンドであるXCL1およびovalbumin(OVA)由来のMHC class II抗原を連結させたmXCL1-OVAペプチドワクチンを設計した。mXCL1-OVAペプチドワクチンをpoly(I:C)と併用しマウスに投与すると強力にCTLを誘導し、OVA抗原を発現するマウス腫瘍細胞株(B16-OVA)皮下腫瘍モデルにおいて腫瘍増殖が協力的に抑制された。高いCTL誘導能を有するDCサブセットに選択的に抗原を送達する本システムの有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗原提示細胞は不均一な細胞集団であり、免疫応答活性化するばかりでなく抑制するサブセットも含まれる。すなわち、がん抗原由来エピトープペプチドをワクチンとして直接投与する従来の方法では抗原がすべての抗原提示細胞に送達され、抗腫瘍効果が制限されていた可能性が考えられる。最近、ケモカイン受容体XCR1を発現する樹状細胞サブセットXCR1+DCが強力なCTL誘導活性を示すことが明らかになったことに着目し、本研究ではこの樹状細胞サブセットに抗原を選択的に送達し、効率よく抗原特異的なCTLを誘導することで強力な抗腫瘍効果が誘導される新しいタイプのがんペプチドワクチン療法を開発、確立できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to generate selectively delivering antigen peptides to an XC chemokine receptor 1-expressing dendritic cell subset(XCR1+DC) that is notable for its exceptional ability to generate CTL response. To do that, we designed a vaccine(mXCL1-OVA peptide vaccine) that consisted of a murine XCR1 ligand(XCL1) and an ovalbumin(OVA)-derived MHC class II-restricted antigen. When co-injected with polyinosinic-polycytidylic acid(poly[I:C]), mXCL1-OVA peptide vaccine induced much greater amount of antigen-specific cytotoxic T cells(CTL) than either OVA protein plus poly(I:C) or OVA peptide plus poly(I:C). Furthermore, mXCL1-OVA peptide vaccine plus poly(I:C) showed more prominent antitumor effects against OVA-expressing melanoma(B16-OVA) than other vaccines with regard to growth inhibition. Thus, our results suggest that chemokine-directed antigen delivery to DC subsets with high CTL-inducing ability is a promising method for generating effective antitumor immunity.

研究分野：消化器外科学

キーワード：腫瘍免疫 がんワクチン ペプチド 樹状細胞 XCR1 XCL1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、immune checkpoint inhibitor の創薬をはじめ癌に対する免疫療法がその目覚ましい臨床効果から注目されている。我々は、がん細胞に特異的に発現するがん抗原由来のエピトープペプチドを同定し、消化器癌に対するペプチドワクチンを治療薬として開発してきた(Katsuda M et al, Nihon Rinsho, 2015)。しかし、がんペプチドワクチンにより、抗原特異的な免疫応答が認められ、一部の患者では生存期間の延長も報告されているものの、その効果は限定的と言わざるを得ない。がんワクチンの効果を担うのは、樹状細胞[Dendritic cell(DC)]を中心とした、抗原提示細胞と呼ばれる免疫担当細胞である。DCは、取り込んだ抗原ペプチドのMHC分子を介したT細胞に対する抗原提示により、抗原特異的な細胞障害性T細胞[cytotoxic T lymphocyte(CTL)]の分化誘導を効率よく行うことが出来るプロフェッショナルな抗原提示細胞とされる。近年、抗原提示細胞は不均一な細胞集団であり、免疫応答を活性化させるばかりでなく、逆にブレーキをかける機能を持ったサブセットも存在することがわかってきた。すなわち、従来のがんワクチンでは、これらの多様な抗原提示細胞のサブセットすべてに送達されることになり、抗腫瘍効果が制限されていた可能性が考えられる。

そこで、がん細胞を殺す機能を持ったCTLを誘導する活性の強いDCサブセットに、がんワクチンを選択的に送達させることができれば、非常に有効な抗腫瘍免疫を誘導できると考えられる。CTL誘導活性の強いDCサブセットとして、ケモカイン受容体XCR1を発現するDCサブセット(XCR1+DC)が同定されている(Dorner BG. et al, Immunity.2009, Yamazaki C et al, J Immunol.2013)。すなわち、XCR1+DCに抗原を送達させることができれば、有効な抗腫瘍免疫を誘導することが期待される。

一方、がん抗原ペプチドと免疫アジュバントによりCTLを誘導し抗腫瘍免疫を増強できることが、我々を含む複数の研究者により示されている(Nava-Parada P et al, Cancer Res. 2007, Wood C et al, Lancet 2008, Kenter GG et al, N Engl J Med. 2009, Katsuda M et al, Int J Oncol. 2011, Arens R et al, Semin Immunol. 2013)。今回我々が注目したXCR1+DCは、マウス・ヒトともにToll-like receptor3 (TLR3)を特異的に発現していることが示されている(Radford KJ et al, Hum Vaccin Immunother, 2013)。従って、XCR1+DCに選択的に抗原をターゲットする本治療戦略は、TLR3 agonist をアジュバントとして併用することにより抗原提示されたXCR1+DCを選択的に成熟化し、効率的な抗原特異的CTLを強力に誘導する相乗効果が期待される。さらに近年、PD-1、PD-L1、CTLA-4 やLAG3、Tim-3といった免疫チェックポイント分子がCTL、DCや腫瘍細胞に発現し、抗腫瘍免疫における免疫応答の現場で免疫逃避を誘導することが明らかとなった(Barber DL et al, Nature, 2006)。この発見を基に、抗腫瘍免疫の抑制を抑制するコンセプトで免疫チェックポイント阻害剤が新たな癌治療薬として開発され、既に抗CTLA-4抗体や抗PD-1抗体は創薬され臨床応用されている。免疫チェックポイント分子に対する抗体が抗癌治療に有効であることから、免疫応答のブレーキを解除することの重要性が認識されつつあり、新たな免疫チェックポイント分子に対する阻害剤の開発もすすめられている。一方、免疫チェックポイント分子の阻害だけでは効果が限定的であることも明らかとなっており、難治癌を克服するにはさらなる工夫が必要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、我々が従来開発してきた腫瘍抗原由来のエピトープペプチドを用いたがんペプチドワクチン療法の問題点を克服するために、XCR1+DCに選択的に抗原を送達するDDS機能を付与した次世代型ワクチンとして、XCR1のリガンドであるXCL1と癌抗原ペプチドを融合させたがんワクチン(XCL1-ペプチド連結ワクチン)を新規開発する。

XCR1の発現パターン、およびXCR1+DCの機能的特性は、ヒト、マウスにおいて共通して認められる。そこで、まずマウスのがんモデルで、XCL1-ペプチド連結ワクチンの効果を検証し、ワクチン効果の分子基盤を解明する。次に、ヒトXCR1+DCの解析を進め、ヒトがん抗原ペプチドを用いて、臨床応用を目指す。本研究により理論的にはあらゆる腫瘍抗原ペプチドをXCR1+DCに送達できるシステムの構築を目指す。当教室では、網羅的遺伝子解析により膀胱癌の浸潤規定遺伝子として膀胱癌特異タンパクMUC16とmesothelinを同定した(Shimizu A et al, Cancer Sci 103: 739-46, 2012)。そこで本研究では、MUC16とmesothelin由来のペプチドを用いて、XCR1+DCへの選択的送達による新規がんペプチドワクチン療法の確立を目指す。

さらに、XCR1+DCに選択的に発現するTLR3に対するagonistを併用することで抗腫瘍効果を効率よく増強することを明らかにする。加えて、この新規ワクチンとアジュバントによる癌微小環境での免疫チェックポイント分子の発現を解析し、適切な免疫チェックポイント阻害剤と併用するpre-clinicalな検討を詳細に施行することで、既存の治療法を凌駕する複合免疫療法の新規治療戦略を構築する。

3. 研究の方法

マウスXCL1とOVA由来抗原ペプチドを融合させたXCL1-OVAペプチド連結ワクチン

(mXCL1-OT-I)を作成する。

本学で確立されているXCL1-ペプチド連結ワクチンの効果の解析を進めるうえで有用な遺伝子改変マウスを用いて、mXCL1-OT-Iの抗腫瘍効果におけるXCR1およびXCR1+ DC依存性、XCR1+ DCへの選択的送達、XCR1シグナルによるXCR1+ DCの抗腫瘍活性増強を検討する。

免疫チェックポイント阻害剤併用による相乗効果を検討する。

4. 研究成果

マウス XCL1(mXCL1)クローニングベクターを用いて、XCL1 の配列に続いて OVA257-264 ペプチドと FLAG tag の配列を含むオリゴ DNA を設計し、「XCL1-OVA peptide-FLAG」 plasmid DNA を 293T 細胞に transfection した後に FLAG 抗体を用いて精製することで、マウス XCL1 と卵白アルブミン(OVA)由来の抗原ペプチド(OT-I)を融合させた XCL1-OVA ペプチド連結ワクチン (mXCL1-OT-I)を作成した。

この mXCL1-OT-I のマウスにおける抗腫瘍効果の検討では、OT-I ペプチド、OVA タンパクに 比較して、mXCL1-OT-I を 免疫アジュバント(TLR3 アゴニスト、poly(I:C))と共にマウスに投与した場合に、投与後 7 日目の抗原特異的 IFN- γ 産生の誘導が顕著に認められた。また、OVA 発現腫瘍細胞株(メラノーマ細胞株 B16-OVA)の接種前に、mXCL1-OT-I と poly(I:C)を 1 週間間隔で 2 回投与した場合に、顕著な腫瘍縮小効果も認められた。このことより、XCL1-ペプチド連結ワクチンの有効性が示唆された。さらに、腫瘍接種前のワクチン投与実験を種々の用量で比較確認し、至適投与量を確認した。また、TLR3 の agonist である poly(I:C)を XCL1-ペプチド complex と併用することで抗腫瘍効果が増強した。腫瘍接種後の投与でも同様に抗腫瘍効果増強がみられた。

さらに、XCL1 ペプチド連結ワクチン投与による T 細胞への効果を検証するために、抗原特異的な T 細胞に(CTL)において、免疫チェックポイント分子 PD-1 の表現型の変化を解析したところ、ワクチン接種後に誘導される CTL では PD-1 の発現増強を認め、ホメオスタティックな免疫抑制機序が働いていると考えられた。実際、抗 PD-1 抗体を併用投与することで、抗腫瘍効果に関する相乗効果が得られた。

また、mXCL1-OT-I による抗腫瘍効果の分子基盤の解明に取り組んだ。XCR1+ DC を欠失する遺伝子改変マウスとして、XCR1 の遺伝子座にジフテリア毒素受容体(DTR)と蛍光タンパク venus の融合タンパクをコードする遺伝子をノックインしたマウス(XCR1-DTRvenus マウス)を使用した。以上の遺伝子改変マウス皮下腫瘍モデルにおける mXCL1-OT-I の腫瘍縮小効果がワイルドタイプと比べて完全にキャンセルされたことから、mXCL1-OT-I の抗腫瘍効果は XCR1 + DC に依存していることが明らかとなった。

さらに、mXCL1-OT-I が XCR1+ DC へ選択的に送達されていることを、蛍光ラベルした mXCL1-OT-I 投与後に mXCL1-OT-I を取り込んだ細胞を免疫組織染色、FACS で同定することにより明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

yuki mizumoto, masahiro katsuda, motoki miyazawa, yuji kitahata, atsushi miyamoto, mikihiro nakamori, toshiyasu ojima, kenji matsuda, hiroki yamaue, koji tamada, tsuneyasu kaisho, hiroki yamaue; In Vivo Antigen Delivery to Dendritic Cells-A Novel Peptide Vaccine for Cancer Therapy. *gan to kagaku ryouho* 45(10) 1469-1471, 2018

Masahiro Katsuda and Hiroki Yamaue; Cancer vaccine therapy based on peptides. *Trends in immunotherapy* 1 10-18, 2017

勝田将裕, 山上裕機; 膵癌に対する樹状細胞ワクチンの開発と治験. *ファルマシア* 53 979-983, 2017

勝田将裕, 宮澤基樹, 山上裕機; 免疫チェックポイント阻害薬と他の免疫療法の併用は邪道か王道か? *腫瘍内科* 19(1) 17-22, 2017

その他、主論文投稿中。

[学会発表](計8件)

勝田将裕, 宮澤基樹, 水本有紀, 中森幹人, 中村公紀, 尾島敏康, 早田啓治, 北谷純也, 北畑裕司, 宮本篤, 山上裕機; 実臨床における胃癌 Nivolumab 治療の限界を踏まえた新規がんワクチン併用複合免疫療法の展望. 第 119 回日本外科学会定期学術集会 2019 年

masahiro katsuda, motoki miyazawa, mikihiro nakamori, masaki nakamura, manabu kawai, toshiyasu ojima, yuji kitahata, yuki mizumoto, atsushi miyamoto, hiroki yamaue; current status and future perspectives of cancer vaccine therapy for pancreatic cancer. the 73rd general meeting of the japanese society of gastroenterological surgery, 2018

Masahiro Katsuda, Motoki Miyazawa, Yuji Kitahata, Yuki Mizumoto, Ojima, Atsushi Miyamoto and Hiroki Yamaue; がんワクチン創薬を目指して 第6回 日本免疫・細胞治療学会 学術総会 2017年

勝田将裕、宮澤基樹、北畑裕司、水本有紀、宮本 篤、中森幹人、中村公紀、川井 学、尾島敏康、山上裕機; 消化器癌に対するがん免疫療法の現状と展望 . 第45回和歌山悪性腫瘍研究会 2017年

Masahiro Katsuda, Motoki Miyazawa, Yuji Kitahata, Yuki Mizumoto, Mikihiro Nakamori, Masaki Nakamura, Toshiyasu Ojima, Keiji Hayata, Ayako Tsumura and Hiroki Yamaue; Development of therapeutic cancer peptide vaccine for the patients with gastrointestinal cancer in Wakayama Medical University. 19th annual meeting of CSCO, 2016

Masahiro Katsuda, Motoki Miyazawa, Yuji Kitahata, Yuki Mizumoto, Mikihiro Nakamori, Masaki Nakamura, Toshiyasu Ojima, Keiji Hayata, Ayako Tsumura and Hiroki Yamaue; The challenges and prospects to develop therapeutic cancer vaccines against gastro-intestinal cancer. The 71st General Meeting of the Japanese Society of Gastrointestinal Surgery, 2016

勝田将裕、宮澤基樹、中森幹人、中村公紀、川井 学、尾島敏康、廣野誠子、岡田健一、北畑裕司、山上裕機; 近未来へ向けての消化器癌に対するがんワクチン療法の開発 . 第44回和歌山悪性腫瘍研究会 2016年

勝田将裕、宮澤基樹、中森幹人、中村公紀、川井 学、尾島敏康、廣野誠子、辻 俊明、北畑裕司、水本有紀、宮本 篤、山上裕機; 消化器癌に対するがんワクチンの現状と展望 . 第50回制癌剤適応研究会 2017年

〔図書〕(計2件)

勝田将裕; へるす出版、消化器外科 癌免疫カンファレンスルーム 第9回 樹状細胞ワクチンとペプチドワクチン療法 2018年

勝田将裕、山上裕機; 技術情報協会 がんワクチン療法の研究動向と今後の可能性. 先端治療技術の実用化と開発戦略 109-113 2017年

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 山上 裕機

ローマ字氏名: YAMAUE Hiroki

所属研究機関名: 和歌山県立医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 20191190

研究分担者氏名: 松田 健司

ローマ字氏名: MATSUDA Kenji

所属研究機関名: 和歌山県立医科大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 30398458

研究分担者氏名: 尾島 敏康

ローマ字氏名: OJIMA Toshiyasu

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：60448785

研究分担者氏名：宮澤 基樹

ローマ字氏名：MIYAZAWA Motoki

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：90549734

(2)研究協力者

研究協力者氏名：改正 恒康

ローマ字氏名：KAISHO Tsuneyasu

研究協力者氏名：邊見 弘明

ローマ字氏名：HEMMNI Hiroaki

研究協力者氏名：水本 有紀

ローマ字氏名：MIZUMOTO Yuki

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。