

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07286

研究課題名(和文) 真に奏功する「がん細胞ワクチン」の開発を目指した基盤研究

研究課題名(英文) Fundamental research on effective whole-tumor-cell vaccine

研究代表者

和田 はるか (WADA, Haruka)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：70392181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は偶然見出した4T1亜株(4T1-S)がX線照射後に顕著なワクチン効果をもたらすことを見出している。その親株にあたる4T1-Aとの発現遺伝子の差分解析により、ワクチン奏効因子を抽出し、無効ワクチンを有効化できないか検討した。ワクチン有効株でX線照射後に高発現する因子を15個抽出した。上位3遺伝子を4T1-Aに導入してワクチン実験を行ったところ効果が増強した。一方、弱いワクチン効果を有するCT26細胞に上位3遺伝子を導入しワクチン実験を行ったところ、全個体で完全なワクチン効果がみられた。従ってがん種や個体によっては上位3遺伝子のみの導入でもワクチン効果の発現に有効に働くことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞ワクチンは抗原同定の必要がなく、理論上はすべての患者に有効な可能性のあるワクチンであるため期待は非常に大きかった。しかしがん細胞ワクチンは有効性に乏しく、現在では着目されることはほとんどなくなっている。この状況下、我々はワクチン有効である4T1-S、4T1-Aの発見と解析により、無効ワクチン細胞を有効化する因子を同定した点で学術的意義がある。同定した因子を元に全がん細胞ワクチンを開発できれば、再発予防療法の選択肢が広がることとなる。従ってがん患者にとって福音となり、社会的にも意義がある。

研究成果の概要(英文)：We have found that a sub-strain of 4T1 (4T1-S), which was discovered by chance, produces a remarkable vaccine effect after X-irradiation. We investigated whether the vaccine response factors could be selected by comparable analysis of gene expression between 4T1-S and its parent strain, 4T1-A, and whether the ineffective vaccine could be converted to an effective vaccine. We found 15 factors that were highly expressed after X-irradiation in the vaccine effective strain. The top three genes were transfected into 4T1-A and the vaccine effect was analyzed, and the effect was enhanced. On the other hand, when the top 3 genes were introduced into CT26 cells with weak vaccine effect and vaccine experiments were performed, complete vaccine effect was observed in all individuals. Therefore, it is clear that the introduction of only the top three genes is effective for the the vaccine effect in some cancer types and individuals.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：がん細胞ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

がん治療において、個体免疫系の作用によりがんの治療を目指す免疫療法が近年非常に注目されている。患者から得られたがん細胞やがん抗原ペプチドを用いて行うがんワクチンは、期待の大きいがん免疫療法の一つであるが、残念ながら十分な効果を示した例はほとんど認められない (Rosenbergら, Nat Med, 2004)。その原因として、がんワクチン奏功メカニズムの理解が十分ではないことが挙げられる (Xi Wuら, Cancer Let, 2013, Yaredら, Nat Med, 2013)。

我々は最近、がんワクチン効果において非常に興味深い特徴をもつがん細胞亜株を見出した (Abe, Wadaら, Hum Cell, 2016)。BALB/cマウス乳がん細胞株4T1をX線照射処理の後、BALB/cマウスに“がん細胞ワクチン”として接種し、その2週間後に生きた4T1細胞を移植してワクチン効果を判定する実験を行った。ATCCより入手した一般的な4T1細胞株 (以下、4T1-A) にワクチン効果はみられなかったが、我々が偶然見出した4T1亜株 (4T1-Sapporo株、以下4T1-S) は、顕著なワクチン効果を発揮した。尚、4T1-Aと4T1-Sとの間でワクチン効果の交差性はなかった。また、Nudeマウスでは4T1-Sのワクチン効果は見られないことから、4T1-Sは最終エフェクター細胞としてはT細胞依存的にがんワクチン効果を発揮することが判明し、既に報告してきた (Human cell, 2016)。我々は、この両細胞株の差異を解析することにより真に奏功するがんワクチンを開発することができると考え、継続して解析を行ってきた。我々は、その解析の中で更に複数の大変興味深い現象を見出した。

**4T1-Sワクチンが奏功する機序は何であるのか。無効ながん細胞ワクチンはどうしたら有効化できるのか。**この2点が本研究課題の核心をなす学術的「問い」である。これまでの研究で得られた知見を手掛かりにしてがん細胞ワクチンの奏功機序を分子レベルで明らかにし、究極的には真に奏功するがん細胞ワクチンの開発を現実のものにしたい。

## 2. 研究の目的

がん治療において、免疫療法に対する期待が非常に高まっている。がん細胞ワクチンは期待される免疫療法の一つであるが、現状としてその効果は限定的である。我々は最近、X線照射するのみで「がん細胞ワクチン」としての効果を生揮するという興味深いがん細胞株4T1-Sを見出し報告した。しかし、なぜ一般的ながん細胞ワクチンが奏功しないのか、なぜこのがん細胞ワクチンが奏功するのかについては不明なままである。継続した解析の中で、我々はがん細胞ワクチンの奏功メカニズムを明らかにできる可能性を示唆する実験結果を得た。本研究では申請者ら独自の実験結果を手掛かりとして、がん細胞ワクチンの奏功機序を明らかにするとともに無効ながん細胞ワクチンを有効化することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) ワクチン有効株と無効株の同定

4T1-Sの親株にあたる4T1-Aにてワクチン実験を行ったところ、4T1-Aはワクチン無効株であることが判明した。本項では4T1-S、Aに加え、他のがん細胞株にてもワクチン実験を行い、ワクチン有効株と無効株を複数同定する。

### (2) ワクチン有効化因子を同定する

ワクチン有効株、無効株におけるX線照射後の遺伝子発現を差分解析し、ワクチン有効化にか

かわる遺伝子を同定する。

(3) 同定した因子によるワクチン無効株の有効化

同定した因子をワクチン無効株に導入し、有効化できるかを試みる。

#### 4. 研究成果

(1) ワクチン有効株と無効株の同定

他の複数のがん細胞株にてワクチン実験を行ったところ、ワクチン無効株を 4T1-A に加え 2 株、ワクチン有効株を 4T1-S に加え 2 株同定した。

(2) ワクチン有効化因子を同定する

上記で同定した細胞株を RNAseq 解析した結果、X 線照射後の有効株群で FPKM>2 であり、無効株よりも 2 倍以上で有意差をもって高発現する遺伝子が 15 個抽出された。

(3) 同定した因子によるワクチン無効株の有効化

上位 3 遺伝子について 4T1-A に遺伝子導入 (4T1-A Tg) してワクチン実験を行ったところ効果の増強がみられた。そこで上位 10 個の遺伝子をクローニングし、遺伝子導入後ワクチンしたところ、既にワクチン効果の増強がみられている上位 3 個の遺伝子を導入した株に比べワクチン効果が劣り、対照 4T1-A と腫瘍発生までの期間および生存期間に差がなかった。10 遺伝子導入では各遺伝子発現レベルが 3 遺伝子導入時に比べ低く、ワクチン効果の減弱につながったと考えられた。一方、弱いワクチン効果を有する CT26 細胞に上位 3 遺伝子を導入しワクチン実験を行ったところ、全個体で完全なワクチン効果がみられた。従ってがん種や個体によっては上位 3 遺伝子だけの導入でもワクチン効果の発現に有効に働くことが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nanumi Han, Hye Yoon Jang, Naoki Hama, Takuto Kobayashi, Ryo Otsuka, Haruka Wada, Ken-ichiro Seino.	4. 巻 2
2. 論文標題 An optimized protocol for patient-derived xenograft in humanized mice to evaluate the role of IL-34 in immunotherapeutic resistance.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100460 ~ 100460
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hama Naoki, Kobayashi Takuto, Han Nanumi, Kitagawa Fumihito, Kajihara Nabeel, Otsuka Ryo, Wada Haruka, Lee Hee-kyung, Rhee Hwanseok, Hasegawa Yoshinori, Yagita Hideo, Baghdadi Muhammad, Seino Ken-ichiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Interleukin-34 Limits the Therapeutic Effects of Immune Checkpoint Blockade	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101584 ~ 101584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101584	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kajihara Nabeel, Kitagawa Fumihito, Kobayashi Takuto, Wada Haruka, Otsuka Ryo, Seino Ken-ichiro	4. 巻 27
2. 論文標題 Interleukin-34 contributes to poor prognosis in triple-negative breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 1198 ~ 1204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12282-020-01123-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Han Nanumi, Anwar DeInur, Hama Naoki, Kobayashi Takuto, Suzuki Hidefumi, Takahashi Hidehisa, Wada Haruka, Otsuka Ryo, Baghdadi Muhammad, Seino Ken-ichiro	4. 巻 40
2. 論文標題 Bromodomain-containing protein 4 regulates interleukin-34 expression in mouse ovarian cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 25-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-020-00129-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Haruka Wada, Yuhei Shibata, Yurika Abe, Ryo Otsuka, Nanami Eguchi, Yoshimi Kawamura, Kaori Oka, Muhammad Baghdadi, Tatsuya Atsumi, Kyoko Miura, and Ken-ichiro Seino.	4. 巻 9
2. 論文標題 Flow cytometric identification and cell-line establishment of macrophages in naked mole-rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takuto Kobayashi, Muhammad Baghdadi, Nanumi Han, Tomoki Murata, Naoki Hama, Ryo Otsuka, Haruka Wada, Manabu Shiozawa, Tomoyuki Yokose, Yohei Miyagi, Atsushi Takano, Yataro Daigo, Ken-ichiro Seino.	4. 巻 42
2. 論文標題 Prognostic value of IL-34 in colorectal cancer patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 169-175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiraku Endo, Naoki Hama, Muhammad Baghdad, Kozo Ishikawa, Ryo Otsuka Haruka Wada, Hiroshi Asano, Daisuke Endo, Yosuke Konno, Tatsuya Kato, Hidemichi Watari, Akiko Tozawa, Nao Suzuki, Tomoyuki Yokose, Atsushi Takano, Hisamori Kato, Yohei Miyagi, Yataro Daigo, Ken-ichiro Seino.	4. 巻 32
2. 論文標題 Interleukin-34 expression in ovarian cancer: A possible correlation with disease progression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 175-186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Muhammad Baghdadi, Kozo Ishikawa, Sayaka Nakanishi, Yosuke Kameda, Yui Umeyama, Hiraku Endo, Haruka Wada, Bjarne Bogen, Satoshi Yamamoto, Keisuke Yamaguchi, Ikumi Kasahara, Hiroshi Iwasaki, Makoto Ibata, Hideki Goto, Shuichiro Takahashi, Takanori Teshima, Ken-ichiro Seino.	4. 巻 3
2. 論文標題 A role for IL-34 in osteolytic disease of multiple myeloma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 541-551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2018020008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Haruka Wada, Nabeel Kajihara, Ken-ichiro Seino
2. 発表標題 Dying but not dead cancer cells exert cell-based cancer vaccine effect
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田はるか、清野研一郎
2. 発表標題 腫瘍開始細胞は炎症環境を形成し免疫細胞を老化させて抗腫瘍応答の低下を導くことで免疫健全個体における腫瘍発生を許容させる
3. 学会等名 日本免疫治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田はるか、清野研一郎
2. 発表標題 和田はるか. 腫瘍開始細胞は炎症環境を形成し免疫細胞を老化させて抗腫瘍応答の低下を導くことで免疫健全個体における腫瘍発生を許容させる
3. 学会等名 第17回日本免疫治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Haruka Wada, Toru Kondo, and Ken-ichiro Seino.
2. 発表標題 Tumor-initiation via macrophage senescence.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田はるか、清野研一郎
2. 発表標題 腫瘍開始細胞は炎症環境を形成し免疫細胞を老化させて抗腫瘍応答の低下を導くことで免疫健全個体における腫瘍発生を許容させる
3. 学会等名 第17回日本免疫治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田はるか、ムハンマドバグダーディー、近藤亨、清野研一郎
2. 発表標題 がん幹細胞はそれ自身が原炎症性細胞であり微小環境に免疫老化及び免疫抑制をもたらすことで健全動物における造腫瘍能を担保する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田はるか、村田智己、大塚亮、森口徹夫、ムハンマドバグダーディー、近藤亨、清野研一郎
2. 発表標題 がん幹細胞はそれ自身が原炎症性細胞であり微小環境に免疫老化及び免疫抑制をもたらすことで健全動物における造腫瘍能を担保する
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruka Wada, Baghdadi Muhammad, and Ken-ichiro Seino
2. 発表標題 Tumor-initiating cell induce immuno-hyporesponsiveness following cellular senescence to macrophages
3. 学会等名 第38回札幌国際がんシンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruka Wada, Muhammad Baghdadi, and Ken-ichiro Seino
2. 発表標題 Tumor-initiating cell induce immuno-hyporesponsiveness following cellular senescence to macrophages guarantee its tumorigenesis
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田はるか、安宅司、田中睦乃、Baghdadi Muhammad、清野研一郎
2. 発表標題 がん細胞ワクチンの効果発揮には死細胞でなく「死にゆく」細胞が重要である
3. 学会等名 第22回 日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruka Wada, Muhammad Baghdadi, Testuo Moriguchi, Toru Kondo, and Ken-ichiro Seino
2. 発表標題 Tumor initiating cell in immunocompetent animal defined by immunological features
3. 学会等名 第77回 日本癌学会・総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗腫瘍組成物及びその製造方法	発明者 清野研一郎、和田はるか	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、P 2 1 H U 0 4	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野  
<https://seinolab.wixsite.com/seinolab/home-1>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	清野 研一郎  (Ken-ichiro Seino)		
研究協力者	バグダーディー ムハンマド  (Muhammad Baghdadi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------