

令和 2 年 9 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19401

研究課題名（和文）画期的がん治療法としての“吸う”がんワクチンの開発

研究課題名（英文）Towards the development of intrapulmonary vaccine for cancer

研究代表者

吉岡 靖雄（Yoshioka, Yasuo）

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授（常勤）

研究者番号：00392308

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：現在、“免疫の力でがんを治す”、所謂、がん免疫療法の台頭も相俟って、ワクチンでがんの治療を試みるがんワクチンが注目されている。本研究では、樹状細胞選択的に結合し、抗がん免疫を強く誘導可能な機能性ペプチドを用い、経肺投与によるがんワクチンの開発に資する基盤研究を推進した。目標に達する成果は得られなかったものも、本研究で得られた成果を基盤として研究を継続することで、新たなワクチン技術を構築可能になるものと期待している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザに対する経鼻ワクチンは海外で既に使用されており、粘膜ワクチンによる感染症ワクチンの開発は世界規模で進められている。しかし、経肺ワクチンにより粘膜面のがんを効率的に治療しようとする発想はこれまで盲点であり、本研究を継続することで、新たな治療戦略に向けた基礎治験が得られるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In the present project, we tried to develop intrapulmonary vaccine system for cancer vaccine. Although we did not reach the goal, we believe that our system will not only provide novel vaccine system for cancer but may also shed light on a novel tool for directing the biodistribution of drugs to specific cell types, such as immune cells.

研究分野：医療薬学

キーワード：機能性ペプチド ワクチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「科学技術イノベーション総合戦略 2017」において、健康長寿社会の実現に向けて、「革新的ながん治療薬の創出に向けたがん研究」が重点課題として挙げられている。即ち、本邦における死亡原因 1 位のがんは、多くの治療法が存在するものの、未だ根治不能な病と言っても過言ではなく、新たな概念に基づく治療法の開発が急務となっている。本観点では、免疫チェックポイント阻害剤が、がん組織の免疫抑制状態を解除することで、これまでに無い奏効率を示すことも相俟って、“免疫の力でがんを治す”、所謂、がん免疫療法に注目が集まっている。特に、ワクチンでがんの治療を試みる「がんワクチン」は、がん特異的な免疫活性を高めることで、免疫チェックポイント阻害剤との相乗効果も期待され、革新的ながん治療法になり得るものと注目され続けている。一方で、治療効果が認められない例も多数存在しており、その主要因として、がん細胞特異的に高発現する抗原蛋白質に乏しいこと、抗原を投与しても、免疫応答の始動に最も重要な樹状細胞に取込まれにくく、免疫応答が誘導されにくいこと、がん免疫の中心を担う細胞傷害性 T 細胞を誘導するためにアジュバントが必須であるものの、未だ、適切なアジュバントに乏しいことが挙げられる。さらに、がんによる死亡数の第 1 位～3 位は肺がん、大腸がん、胃がんといった粘膜面のがんであるものの、末梢の免疫細胞は粘膜組織に移行しにくいことが示されつつあり、「がんワクチンによりがん細胞特異的な免疫応答が誘導されたとしても、粘膜面のがんには効きにくい」といった致命的かつ根本的な課題が浮上している。即ち、現状の注射型ワクチンでは、肺・大腸・胃などの粘膜面に、がん排除に必須の細胞傷害性 T 細胞を誘導できないため、改良を重ねても効果に限界があると考えられる。

鼻・肺などにワクチンを噴霧する粘膜ワクチン(経肺ワクチンなど)は、粘膜面に免疫誘導できない注射型ワクチンとは異なり、投与部位の粘膜面は勿論のこと、遠隔の粘膜面を含む全身レベルで免疫応答を誘導可能であり、感染症に対する次世代型ワクチンとして期待されている。事実、インフルエンザに対する経鼻ワクチン(フルミスト)は海外で既に使用されており、粘膜ワクチンによる感染症ワクチンの開発は世界規模で進められている。しかし、現状の粘膜ワクチンは、病原体に対する抗体産生を目指したものであり、効率的かつ安全に、がん排除に必須の細胞傷害性 T 細胞を粘膜面に誘導しようとする試みは存在しない。一方で近年、副作用の危険性を伴う特殊なアジュバントを用いた条件ではあるものの、経肺ワクチンにおいて、脾臓などの末梢免疫組織のみならず、肺でも細胞傷害性 T 細胞を誘導し得ることが示されつつある。本事実、適切なアジュバントを用いることで、「現在の注射型ワクチンよりも効果的な、経肺投与によるがんワクチン(経肺がんワクチン<吸うがんワクチン>)」を開発できる可能性を強く明示するものである。しかし、この「新しいコンセプトに基づくがんワクチン開発」の仮説を検証した例は世界的にも皆無である。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、ファージ表面提示法を駆使した“機能性ペプチド・蛋白質の創製技術の開発”を約 15 年間推進し、多くの技術的・知識的基盤を蓄積してきた。さらに近年、7 アミノ酸からなる約 10 億種類のランダムペプチドを表面提示したファージライブラリを用い、樹状細胞選択的結合能を有する機能性ペプチドの同定に成功している。そこで本研究では、申請者が独自開発した機能性ペプチドを用い、経肺投与による“経肺がんワクチン”の開発に向けた基礎研究を実施した。

3. 研究の方法

抗原として、ニワトリ卵白アルブミンの MHC クラス 1 エピトープである SL8 及び、SL8 と機能性ペプチドの融合ペプチドである SL8-Pep を用いた。なお、機能性ペプチドは 1 個連結したものをを用いている(別のプロジェクトでは、複数個連結したものも使用している)。また、コントロールペプチドと SL8 の融合ペプチドである SL8-Con も用いた。アジュバントとしては CpG 核酸を用いた。SL8 特異的な細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞(CTL)の評価は、SL8 と MHC クラス 1 の複合体であるテトラマーを用いたアッセイおよび、脾臓や所属リンパ節中の免疫細胞を SL8 で再刺激した際の IFN- γ 産生を指標に評価した。抗腫瘍効果は、マウスリンパ腫由来 EL4 細胞に OVA を強制発現させた E.G7-OVA 腫瘍細胞をマウス腹部に移植し、腫瘍体積を経日的に測定することで評価した。抗原提示の評価には、B3Z 細胞を用いた。B3Z 細胞は、MHC クラス 1 と SL8 の複合体を認識する TCR を持ち、MHC クラス 1 と SL8 の複合体を認識することで IL-2 を産生する細胞である。すなわち、B3Z 細胞より産生された IL-2 を評価することで、樹状細胞の抗原提示能を評価できる。各種ペプチドと CpG の相互作用は、ポリアクリルアミド電気泳動により評価した。ペプチドの樹状細胞への結合・取り込みについては、蛍光修飾された CpG (Alexa488-CpG) と各ペプチドを混合して樹状細胞に添加し、Alexa488-CpG の蛍光強度を評価することで評価した。

4. 研究成果

まず、我々が同定した機能性ペプチドによる細胞性免疫誘導能を、注射型ワクチンで評価した。各ペプチドと CpG をマウス耳介部に単回投与し、投与から 7 日後に、マウス頸部リンパ節中の SL8 特異的な CTL をテトラマーアッセイにより評価した。その結果、SL8 と CpG の共投与群及び SL8-Con と CpG の共投与群では、CTL の誘導が全く認められなかった一方で、SL8-Pep と CpG の共投与群においては、有意な CTL の誘導が認められた。また、SL8 と CpG 共投与群、SL8-Pep と

CpG 共投与群の所属リンパ節細胞を SL8 で再刺激した結果、SL8-Pep と CpG 共投与群において、SL8 と CpG 共投与群と比較して、IFN- γ の有意な産生が認められた。次に、SL8 と機能性ペプチドを化学結合させずに、CpG と共投与したところ、CTL の誘導は認められなかった。次に、SL8-Pep と CpG を共投与して CTL による抗腫瘍効果を評価した。その結果、コントロール群及び SL8 と CpG の共投与群では、マウスの腫瘍体積に変化が認められなかった。一方で、SL8-Pep と CpG 共投与群においては、投与後 7、8 日後（腫瘍移植から 12、13 日後）から腫瘍の成長抑制が認められ、腫瘍完全拒絶マウスが認められるなど、強い腫瘍の成長抑制が認められた。そこで、機能性ペプチドが樹状細胞の抗原提示に与える影響を評価した。マウス骨髄由来樹状細胞に各種ペプチドを添加後、B3Z 細胞と共培養し、上清中の IL-2 を評価した。その結果、SL8-Con を添加した群と比較して、SL8-Pep を添加した群において有意な IL-2 の産生が認められた。また、いずれの群においても、副刺激分子の発現亢進は観察されなかった。

以前より、アジュバントと抗原の間には、相互作用があると考えられている。その代表例が、アジュバントが活性を示すメカニズムとして知られている depot 効果である。depot 効果とは、アジュバントによって抗原が補足されることで、抗原が投与部位に留まり、時間をかけて徐放されることで、継続的に免疫細胞が抗原刺激を受けるため、アジュバント活性を示すというものである。そこで、ペプチドと CpG 間の相互作用について評価し、その後、その相互作用が樹状細胞に与える影響について評価した。その結果、SL8、SL8-Con と CpG を混合したサンプルでは、相互作用がないと考えられた。一方で、SL8-Pep と CpG を混合したサンプルにおいては、CpG 単独サンプルと比較して、CpG の移動度の低下が認められた。この結果から、SL8-Pep は CpG と相互作用して複合体を形成することが示唆された。次に、この複合体形成が樹状細胞への結合性に及ぼす影響を評価した。まず 4 条件下において、Alexa488-CpG と SL8、SL8-Con の共添加群では、Alexa488-CpG 単独添加群と比較して同程度の蛍光強度だったのに対して、SL8-Pep と Alexa488-CpG 共添加群では、蛍光強度が高く、樹状細胞への結合性が向上することが示された。次に、この結合が樹状細胞の取り込みに及ぼす影響を評価するため、37 条件下において、各ペプチドと Alexa488-CpG を混合して添加し、1、2、4 時間後における Alexa488-CpG の蛍光強度を評価した。なお、細胞内に取り込まれた CpG のみを評価するため、トリパンブルーを用いてクエンチング処理（細胞表面上の蛍光を消光）をした。その結果、SL8-Pep と Alexa488-CpG 共添加群において、Alexa488-CpG 単独添加群と比較して、蛍光強度が高く、取り込み量の増加が認められた。一方で、SL8、SL8-Con と Alexa488-CpG の共添加群においては、取り込み量の増加は認められなかった。このことから、SL8-Pep と CpG の複合体は樹状細胞に強く結合し、多く取り込まれることが明らかとなった。次に、CpG の取り込み量増加が、樹状細胞のサイトカイン産生および共刺激分子の発現に影響を与えると考え、各ペプチドと CpG を 37 条件下で共添加し、24 時間後に上清中のサイトカイン産生および共刺激分子の発現を評価した。その結果、結合性及び取り込みの結果と同様に、SL8-Pep と CpG の共添加群において、他のペプチドと CpG の共添加群と比べて、IL-12 の有意な産生が認められた。また、共刺激分子である CD80/CD86 においても、SL8-Pep と CpG の共添加群において、他のペプチドと CpG の共添加群と比べて、有意な発現上昇が認められた。次に、複合体形成によって、ペプチド及び CpG の体内動態が変化する可能性を考えた。一般的に、投与部位から血中へ移行するかあるいは所属リンパ節へ移行するかは、その投与された物の分子量などにより規定されることが知られている。そこで、SL8-Pep と Alexa488-CpG を混合して、マウス耳介部に単回投与し、4、24 時間後における頸部リンパ節中の樹状細胞、T 細胞、B 細胞画分における Alexa488-CpG の蛍光強度を評価した。その結果、4 時間後においては、いずれの細胞画分においても、Alexa488-CpG 投与群と、SL8-Pep と Alexa488-CpG 共投与群で蛍光強度に差は認められなかったものの、24 時間後においては、樹状細胞画分において SL8-Pep と Alexa488-CpG の共投与群で、蛍光強度が高い傾向が認められた。このことから、SL8-Pep と CpG を混合することで、CpG のリンパ節への移行性が向上し、樹状細胞に選択的に取り込まれていることが示唆された。また、*in vivo* において、この体内動態の変化が及ぼす影響を評価するため、SL8-Pep と CpG をマウス耳介部に単回投与し、血漿中及び頸部リンパ節中のサイトカイン産生を評価した。その結果、SL8-Pep と CpG を混合し投与した群において CpG 単独投与群に比べてリンパ節中で高いサイトカイン産生が認められた。一方で、血漿中のサイトカイン産生においては、リンパ節中のサイトカイン産生とは異なり、SL8-Pep と CpG を混合し投与した群において CpG 単独投与群と比較し、サイトカイン産生の低下が認められた。以上の結果から、CTL の誘導メカニズムとして、機能性ペプチドによる抗原送達と複合体形成によるサイトカイン産生増加及び共刺激分子発現上昇が考えられた。

これまでの検討では、SL8 を抗原ペプチドとして用いてきた。次に、SL8 以外の抗原として、メラノーマ由来のがん抗原である gp100 由来ペプチドを用いた融合ペプチド gp100-Pep を用いて同様に検討した。しかし予想に反し、この融合ペプチドでは、CpG との相互作用が認められず、CpG と共投与しても gp100 特異的な CTL は誘導されないという結果が得られた。すなわち、CpG との相互作用がなかった場合には、CTL が誘導されないことが示された。本研究では、機能性ペプチドを 1 個、抗原ペプチドに連結させた融合ペプチドを用いて検討を進めてきた。一方で我々は、本機能性ペプチドを用いた感染症ワクチンの開発を別プロジェクトとして進めており、その研究過程で、本機能性ペプチドは、1 個では抗原送達能力に乏しく、3 個連結させる必要があることが、明らかとなってきた。即ち、本検討で用いた SL8-Pep と CpG による SL8 特異的な CTL の誘導には、機能性ペプチドによる抗原送達ではなく、SL8-Pep と CpG との複合体形成が重要であ

ると考えられた。さらに、その複合体形成も、抗原ペプチドの種類により、形成されないケースも存在することが明らかとなった。そこで、これら問題を克服するため、機能性ペプチドを3個、SL8もしくはgp100に連結した融合ペプチドを合成し、CpG存在下もしくは非存在下でのCTL誘導を評価した。その結果、興味深いことに、いずれの抗原ペプチドを用いた融合ペプチドにおいても、CpG非存在下ですら、CTLが誘導されることが、テトラマーアッセイ、IFN-gamma産生誘導能評価により明らかとなった。さらに、CpGを共投与することで、CTL誘導は顕著に増加することが明らかとなった。以上の結果から、機能性ペプチドを3個連結させた場合には、抗原送達効率が向上することで、アジュバント非存在下でもCTLを誘導可能であると考えられる。そこで、本融合ペプチドを経鼻・経肺投与し、肺組織におけるCTL誘導を評価した。しかし、肺組織および肺関連リンパ節におけるCTL誘導の評価に手間取ってしまい、未だ明確な結果が得られていない。現在、本研究を継続しており、結果を得次第、成果を公表する予定である。一方で、本機能性ペプチド(3個連結)と、モデル抗原由来のMHCクラス2ペプチドとの融合ペプチドについて、経鼻・経肺投与後の免疫応答を評価している。アジュバントとしては、経鼻・経肺ワクチンにおいて実験レベルで汎用される、STINGアゴニストであるc-di-GMPを用いた。その結果、MHCクラス2ペプチドとアジュバントを経鼻・経肺投与しても、全く免疫応答が誘導されない一方で、融合ペプチドとアジュバントを経鼻・経肺投与することで、強力な免疫応答が誘導されることが示された。即ち、本機能性ペプチドが経鼻・経肺投与における抗原送達担体として有望であることが示された。以上、現段階では、本機能性ペプチドとの融合ペプチドを経鼻・経肺投与することで、CTLが効率的に誘導されるかは定かでないものの、その可能性を示すことは出来たかと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamoto Y, Tamiya S, Shibuya M, Nakase I, Yoshioka Y.	4. 巻 March 21
2. 論文標題 Peptides with the multibasic cleavage site of the hemagglutinin from highly pathogenic influenza viruses act as cell-penetrating via binding to heparan sulfate and neuropilins.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.03.068.	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三里一貴、金井優紀、青枝大貴、福田道子、吉岡靖雄
2. 発表標題 1.独自創成した樹状細胞標的化ペプチドの免疫誘導メカニズムの解析
3. 学会等名 第34回日本DDS学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉岡靖雄
2. 発表標題 2.Development of a cancer vaccine by using dendritic cell-targeting peptide
3. 学会等名 The 45th Naito Conference
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----