

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07782

研究課題名(和文) non-canonical抗原提示経路を介して抗腫瘍効果を発揮するRNAワクチン

研究課題名(英文) RNA vaccine that exerts antitumor effect via non-canonical antigen presentation pathway

研究代表者

伊藤 正紀 (ITO, MASAKI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：80297366

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)：我々が同定したnon-canonical抗原提示経路(ER-Golgi非依存性経路)を経るように抗原の運命を指定することができる、「Artificial Designed Sequence (ADS)」ペプチド配列構造、がん細胞ネオエピトープ、pseudouridineを埋め込んだRNAワクチンをin vitro 転写システムを用いて作製した。RNAワクチンの免疫賦活化能力をネオエピトープ認識特異的TCRを持つレポーターT細胞を用いて定量的に評価し、non-canonical抗原提示経路で処理される事によって、RNAワクチンが効率良く細胞性免疫誘導を發揮できる事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型コロナウイルス感染症の世界的パンデミックが起これ、様々な抗原に対して迅速にワクチン製造が可能なRNAワクチンの有効性が実証された。しかしながら、現状のRNAワクチンは抗原の全長mRNAを用いており、今後さらにワクチン効力の改善が求められる。我々の開発しているnon-canonical抗原提示経路を経て抗原提示するワクチンは、RNAワクチンに新たな機能を付与する事が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have identified an "Artificial Designed Sequence (ADS)" peptide sequence structure that specifies the fate of the antigen to go through the non-canonical antigen presentation pathway (ER-Golgi independent pathway). This ADS and neoepitope of cancer cells were incorporated into the framework of mRNA to prepare an RNA vaccine by implanting a cap analog structure, pseudouridine, and poly-A tail into mRNA using an in vitro transcription system. The immunostimulatory ability of the RNA vaccine was quantitatively evaluated using reporter T cells with neoepitope recognition-specific TCR. It was clarified that the ADS-containing RNA vaccine can efficiently exert cell-mediated immunity induction.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：RNAワクチン ワクチン がん ネオエピトープ ネオアンチゲン 抗原提示経路

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤(ICB: Immune-checkpoint blockade)の登場により、腫瘍免疫の概念にパラダイムシフトが起きた。即ち、免疫チェックポイント抑制を解除する事により、腫瘍免疫が再活性化され、がんを治療できる事が証明された。さらに、遺伝子変異により生じる新生抗原(ネオアンチゲン)由来のネオエピトープが腫瘍免疫の標的となっている事も明らかとなった。ICBによって治療効果が見られる患者(レスポンドー)は未だ2割程度あり、ネオエピトープを標的とした新たながん治療法の開発が求められている。すでに、ネオエピトープペプチドががんワクチンによるがん治療効果が報告されている。(Ott PA *et al.* Nature. 547(7662):217-221, 2017) ネオエピトープのペプチド配列は個人により異なるため、抗原の個別化が必要となり、ワクチンの作製労力、コスト、時間を考慮すると、がんワクチンの主流は今後、ペプチドワクチンから、RNA ワクチンに移行すると考えられる。

ネオエピトープを標的とした個別化 RNA がんワクチンの開発競争が激化している。RNA ワクチンの免疫誘導能力の効率化のために、RNA の安定性、形質転換効率、発現効率などの改良が進められているが、RNA ワクチン翻訳後のタンパク質の抗原提示経路の最適化には、これまでほとんど注意が払われていなかった。

RNA ワクチンに関してはRNA の安定性、形質転換効率、翻訳効率、MITD-domain (MHC class I trafficking signal domain)の結合による抗原提示経路の制御など、RNA ワクチンは様々な改良がなされている。(Sahin U *et al.* Nature Jul 13;547 (7662):222-226, 2017) しかしながら、抗原提示経路は未だ不明な点が多く、抗原提示経路を制御する観点からの RNA ワクチンの開発は、免疫誘導能を大きく増強する事が期待できる。

効率よい腫瘍免疫の誘導には、抗原が non-canonical 抗原提示経路 (ER-Golgi 非依存性経路) で処理されることが必要である。我々はこれまでの研究から、この non-canonical 抗原提示経路を経るよう抗原の運命を指定することができる、「Artificial Designed Sequence (ADS)」ペプチド配列構造の同定に成功した。この ADS を RNA ワクチンに組み込む事により RNA ワクチンの免疫誘導能力の増強効果が期待される。

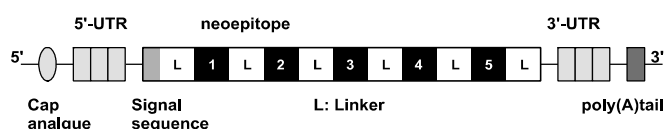
2. 研究の目的

ADS とがん細胞のネオエピトープなどを、RNA ワクチンの枠組みに組み込み RNA ワクチンを作製する。RNA ワクチンの免疫賦活化能力を in vitro、in vivo の両面から定量的に評価し、ネオエピトープが non-canonical 抗原提示経路で処理される事によって、腫瘍免疫能力を増大させ、強力に抗腫瘍効果を発揮できる事を明らかにする。

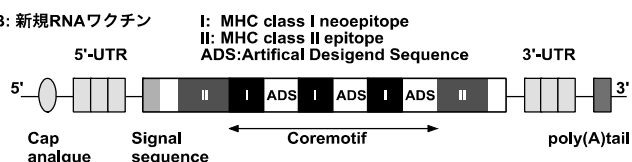
3. 研究の方法

従来型 RNA ワクチン(A)は、ネオエピトープをリンカー(グリシン・セリンポリペプチド)でタンデムに結合したものである。5種類の異なるネオエピトープを含んでいる。

A: 従来型 RNA ワクチン



B: 新規 RNA ワクチン



新規 RNA ワクチン(B)は、MHC class I ネオエピトープと ADS (Artificial Designed Sequence) 配列が三回繰り返す構造のコアモチーフと、2つの MHC class II エピトープから構成される。コアモチーフ構造が、non-canonical 抗原提示経路 (ER-Golgi 非依存性経路) を

経て強力に抗原提示するために必須である。(Ito M, Shiba K *et al.* PLoS One. 9(10):e110425, 2014) ネオアンチゲンエピトープと ADS 配列を組み込んだ DNA 配列を作製、Pseudouridin-5' - Triphosphate と *in vitro* 転写システムを用いて RNA ワクチンを作製、樹状細胞に形質導入、抗原特異的 T 細胞を用いて RNA ワクチンの免疫誘導能力を検証した。

4 . 研究成果

がん遺伝子 Wilms Tumor1(WT1)を標的抗原として選択した。HLA-A*24 拘束性 WT1 エピトープ (CMTWNQMNL) に変異を導入した修飾型 M235Y ペプチド配列 (CYTWNQMNL) をネオアンチゲンエピトープとして新規 RNA ワクチン用 DNA plasmid コンストラクトを作製した。始に、DNA plasmid を 293 細胞に軽質導入し、細胞内での人工蛋白質抗原の発現を調べた。その結果、大腸菌で人工蛋白質を合成する時と異なり、発現が低い事がわかった。そこで、シグナル配列を導入した結果、発現の向上が見られた。次に、新規 RNA ワクチン用 DNA plasmid から、*in vitro* 転写システムを用いて cap analog 構造、Pseudouridine、poly-A tail を mRNA に埋め込んだ RNA ワクチンを作製した。HLA-A*24 を有する PBMC (末梢血単核球) から、樹状細胞 (抗原提示細胞) を樹立、RNA ワクチンを形質導入した。HLA-A*24 拘束性 WT1 エピトープ (CMTWNQMNL) を認識する T 細胞レセプター (TCR) をもち、TCR シグナルが活性化されると緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現し細胞の免疫原性を評価できるレポーター T 細胞 (Morimoto S., *et al.* Oncotarget. 9(75):34132-34141, 2018)を用いて、RNA ワクチンの抗原提示能力を評価した。その結果、RNA ワクチンの導入により WT1 特異的抗原提示が増強される事が明らかとなった。

さらに、卵白アルブミン(OVA)抗原由来マウス class I H2-Kb 拘束性エピトープペプチド配列 (SIINFEKL) を組み込んだ RNA ワクチンを作製し、マウス樹状細胞株(DC2.4)に形質導入し、OVA 特異的 TCR をもつ T 細胞株 (RF33.70) を用いて、TCR シグナル活性化指標である IL-2 産生能を指標として RNA ワクチンの抗原提示能を評価した。その結果、OVA 特異的抗原提示が起こる事が確認された。これらの結果から、ADS(Artificial Designed Sequence)配列構造を持つ RNA ワクチンの有効性が明らかとなった。

当初の計画では、マウスに RNA ワクチンを投与して、*in vivo* での新規 RNA ワクチンの効果検証を行う予定であったが、*in vitro* での RNA ワクチンの機能検証に時間を要し、本研究期間内には *in vivo* 効果検証が行えなかった。今後、ネオアンチゲンエピトープをマウスがん細胞で検出されているネオアンチゲンにまで展開し、マウスを用いた新規 RNA ワクチンの有用性を継続して検討して行く予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊藤正紀、小井戸薫雄、芝清隆
2. 発表標題 Induction of Wilms tumor 1 (WT1)-specific cytotoxic lymphocytes by artificial antigen vaccine
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2019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
研究分担者	小井戸 薫雄 (KOIDO SHIGEO) (70266617)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	

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