

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09147

研究課題名(和文)臓器特異的な免疫記憶誘導に着目した新たな癌免疫療法の試み

研究課題名(英文)A novel cancer immunotherapy focused on organ specific immune memory generation

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、同種異系樹状細胞を用いた腫瘍抗原情報を付加したNKT細胞活性化ワクチン治療による抗腫瘍効果を検証する研究である。電気穿孔法による腫瘍タンパク抗原を樹状細胞に導入し、 $\alpha$ -ガラクトシルセラミドを付加したNKT細胞活性化ワクチン(OVA-EP-galDC)を作成した。ワクチンは皮下接種腫瘍を完全に拒絶した。OT-1 CD8<sup>+</sup> T細胞を事前に移入し、抗原反応を増進することで、ワクチンがエフェクター期、メモリー期のいずれでも抗原特異的なCD8陽性T細胞を誘導した。ワクチンは皮膚における抗原特異的なCD8<sup>+</sup> T細胞の誘導を確認し、さらに抗原特異的なTRMの誘導も確認した。

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。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)：This study shows the potential of a novel dendritic cell vaccine therapy in antitumor immunity, in which bone marrow-derived dendritic cells are electroporated with an exogenous ovalbumin protein and simultaneously pulsed with  $\alpha$ -galactosylceramide. This strategy enhances the induction of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells specific for tumor-associated antigens through the activation of invariant natural killer T cells, natural killer cells, and intrinsic dendritic cells. Moreover, this strategy sustains antigen-specific antitumor T cell responses over time.

研究分野：消化器外科

キーワード：がんワクチン NKT細胞 腫瘍微小環境 大腸癌 レジデントメモリーT細胞 AIイメージサイトメトリ  
- 腫瘍浸潤リンパ球 肺転移

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌肺転移 Stage 大腸癌は全体の 18.8%、特に同時性肺転移 2.4%である(大腸癌研究会全国登録 2000-2004)。手術手技の向上で肺や肝の転移巣切除は治療効果を示したが、その効果は未だ十分でなく、生存期間の延長のためには、遠隔転移の完全なる制御が鍵を握る。臓器制御の手法として、がんワクチン療法が注目されており、NKT 細胞活性化ワクチンの臓器得意特異的作用に着眼し、臓器制御可能ながん免疫療法の構築を目指すものである。NKT 細胞はそのリガンドである  $\alpha$ -galactosylceramide(Gal)を樹状細胞(dendritic cell; DC)に付加して投与する方法(DC/Gal)により、獲得免疫系と自然免疫系を同時に発動する腫瘍免疫のマスター細胞であり、腫瘍抗原の同時投与により、腫瘍反応性 T 細胞が誘導されるまた、免疫チェックポイント阻害剤のブレイクスルーは、いくつかの免疫療法の成功の必要条件を明確にした。腫瘍内への T 細胞性免疫の誘導、腫瘍反応性 T 細胞の誘導、及びその維持である。では、T 細胞不応性腫瘍の腫瘍内への T 細胞の呼び込みに、何らかの刺激(治療)を契機に起こす、腫瘍細胞の特殊な細胞死である、免疫原性細胞死(Immunogenic cell death: ICD)及びNK 細胞-DC の活性化が重要であることが報告された。興味深いことに、NKT 細胞活性化ワクチンは、免疫チェックポイント阻害剤の効果発揮の条件を満たすツールであることがわかった。また、我々は電氣的穿孔法による、腫瘍タンパク抗原(モデル抗原である卵白アルブミン、ovalbumin: OVA)をそのまま樹状細胞に導入するシステムを開発し、新たな NKT 細胞活性化ワクチン(OVA-EP-galDC)を開発中である。実際のタンパク抗原を直接、ベクター内に導入が可能であり、実際、OVA-EP-gal DC は腫瘍反応性 CD8<sup>+</sup>T 細胞を誘導している。これらの抗腫瘍効果の検証を行い、肺転移に関する転移制御能を増強する。

### 2. 研究の目的

本研究は、皮下接種型腫瘍に対し著効する NKT 細胞ワクチンベクター免疫療法に抵抗性を示す難治性転移性肺腫瘍に対し、レジデントメモリー T 細胞の誘導環境を利用して有効な腫瘍反応性メモリー T 細胞を成立させ、肺の臓器全体の転移制御を行う新規癌免疫療法のモデルを確立する。又、この際に機能する、レジデントメモリー様腫瘍浸潤 T 細胞の誘導機構を明らかにし、臓器別に制御する免疫療法の開発に応用する。

### 3. 研究の方法

計画：NKT 細胞活性化ワクチン腫瘍皮下接種予防モデルの確立と腫瘍免疫微小環境の解析  
抗原情報を導入した NKT 細胞活性化ワクチン(OVA-EP-galDC)の作成  
皮下接種モデルでの予防モデルの作成  
転移性肺腫瘍モデルにおける予防モデルの作成  
NKT 細胞活性化ワクチン投与による抗原特異的メモリー T 細胞誘導の検証  
NKT 細胞活性化ワクチン投与によるレジデントメモリー T 細胞誘導の検証

### 4. 研究成果

電氣穿孔法(Electroporation: EP 法)により腫瘍タンパク抗原(卵白アルブミン、Ovalbumin: OVA)を樹状細胞に導入し、 $\alpha$ -ガラクトシルセラミドを付加した NKT 細胞活性化ワクチン(OVA-EP-galDC)を作成した(図 1)。

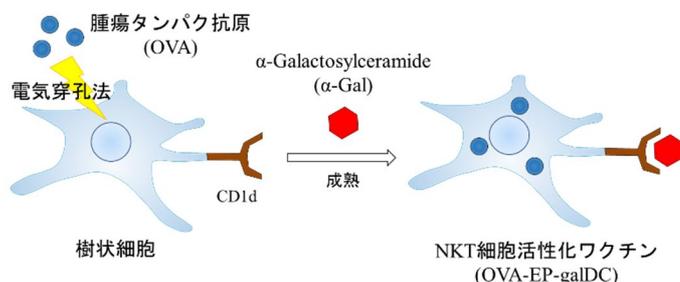


図 1. OVA-EP-galDC NKT 細胞活性化ワクチンのデザイン

蛍光色素でラベルした OVA を用いて、OVA-EP-galDC と OVA と樹状細胞を共培養し作成したワクチンを比較すると、OVA-EP-galDC は有意に高いシグナルを発生し( $P < 0.0001$ )、viability は保たれた( $P = 0.0531$ )。

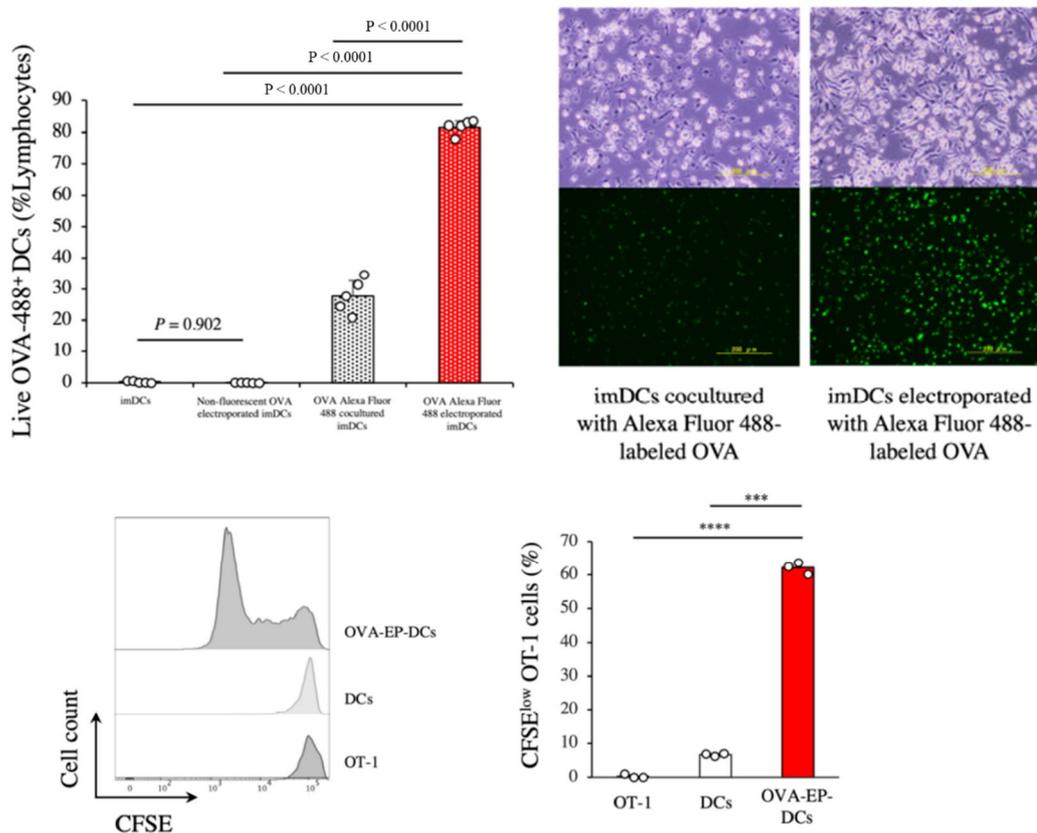


図 2. OVA のエレクトロポレーションによる導入効率

次に OVA 特異的 T 細胞受容体のみをもつ OT-1 マウス由来の CD8<sup>+</sup>T 細胞と OVA-EP-galDC を共培養することで抗原特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞が効率的に増殖することを示した(図 2)。

OVA-EP-galDC の *in vivo* での腫瘍予防効果の検証を行った。OVA-EP-galDC を接種後に腫瘍皮下接種(EG7)を行い、腫瘍が完全に拒絶されることを示した(図 3)。

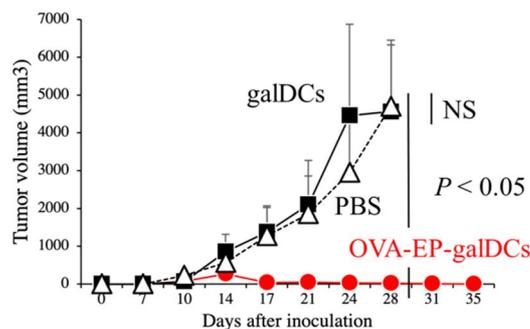


図 3. 腫瘍予防モデルにおける抗腫瘍効果

また、抗 CD8 抗体で CD8<sup>+</sup>T 細胞を枯渇させると抗腫瘍効果は失われた。以上より予防モデルにおいて CD8<sup>+</sup>T 細胞は重要であることが示唆された。興味深いことに、NK 細胞の枯渇させる anti-asialo GM1 抗体の投与により、抗腫瘍効果の減弱を認めた。これは、CD8<sup>+</sup>T 細胞のプライミングにおいて、NK 細胞の活性化が関連していることを示し、興味深い結果となった(図 4)。

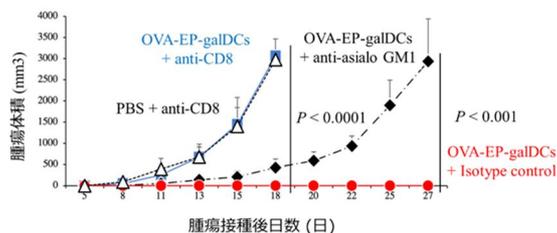


図 4. 腫瘍予防モデルにおける CD8<sup>+</sup>T 細胞の貢献

転移性肺腫瘍モデル(B16-OVA)において、OVA-EP-DC/Gal は対照群のPBS 群と比較して生存期間を延長した( $P < 0.05$ )。しかし、galDC に対する優位性を示すことができない結果となった(図5)。

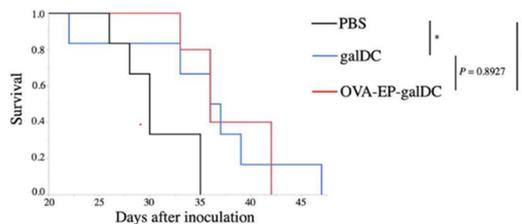


図5. 肺転移モデルに対するワクチンの治療効果

肺転移に対して、OT-1 細胞を移入して、治療を行うモデルを作成し、現在、データの解析中であるが、著明な制御効果が期待できる成果を得ているが、詳細の検討が必要であり、今後の研究として、継続する。

OVA-EP-galDC 投与により抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導を認めた(図6.A)。  
しかし OVA を導入していない galDC においても OVA-EP-galDC と同等の脾臓内への抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導を認めたため、OT-1 CD8<sup>+</sup>T 細胞を事前に投与することで、抗原反応を増進した。ワクチン接種後 7 日目に解析すると、OVA-EP-galDC は OT-1 CD8<sup>+</sup>T 細胞事前投与にて、対照群と比較して OVA 特異的 T 細胞やメモリー前駆細胞を効率的に誘導できた(図6.A)。

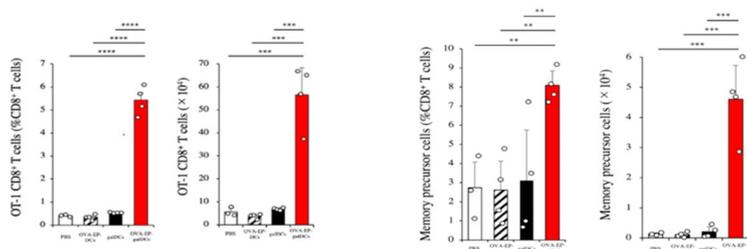
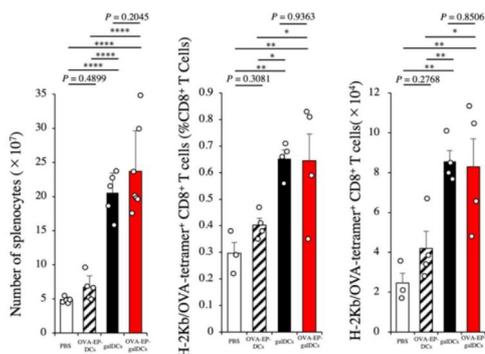


図6.A. エフェクター期における脾臓抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導



B. メモリー期における脾臓抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導

次に長期免疫の検討のためワクチン接種後 50 日目に解析すると、OVA-EP-galDC は対照群と比較し、抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞を脾に誘導し、高い腫瘍反応性(INF- $\gamma$  産生能)が確認できた。OVA-EP-galDC が抗原特異的な長期メモリーT 細胞の効率的な誘導したことを示した(図6.B)。

OVA-EP-galDC は皮膚における抗原特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導を確認し、さらに抗原特異的なレジデントメモリーT 細胞(T<sub>RM</sub>)の誘導も確認した。

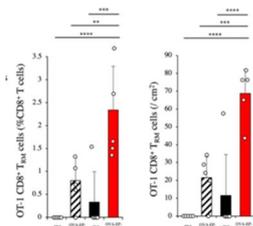


図7. 皮下腫瘍摂取時の皮膚での T<sub>RM</sub> の誘導

ヒト大腸癌組織における  $T_{RM}$  の検出  
 大腸癌肺転移における  $T_{RM}$  検出に先だって、二重染色による大腸癌組織染色を行った。  
 CD103+CD8+T 細胞の染色性を確認し、大腸癌組織の免疫染色で検出可能に条件の最適化を行った (図 8)。

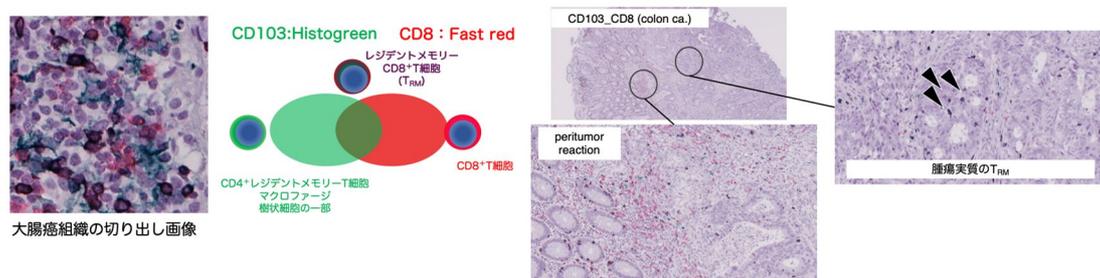


図 8. 二重免疫染色による  $T_{RM}$  の検出

#### AI イメージサイトメトリーによる $T_{RM}$ の検出と定量化

大腸癌における TIME の構成細胞や組織構造の高精度検出を実現するため、大腸癌術後の標本を用いて、上記の条件で二重染色を行い、virtual slide を作成した。それらを、リンパ球、マクロファージ、間質細胞、癌細胞、CD8 + 細胞等を、AI に対し、アノテーション作業を行い、精度のある検出が可能となった。

今後、免疫染色における染色の程度と細胞形態をアノテーションすることで、より高度なデータ集積が可能となる。また、さらなる症例の集積により、迅速に高い客観性を有する術前治療のバイオマーカーの開発に活かせるように解析を行っている。

以上のように NKT 細胞活性化ワクチンの開発によるレジデントメモリーT 細胞の検出に成功し、肺転移モデルの治療をおこなっている段階である。

大腸癌手術標本を用いた細胞検出のための AI イメージサイトメトリーの開発に成功し、肺転移症例の解析を行なっている段階である。

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 1件）

1. 著者名 Watanabe A	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 Vaccine Based on Dendritic Cells Electroporated with an Exogenous Ovalbumin Protein and Pulsed with Invariant Natural Killer T Cell Ligands Effectively Induces Antigen-Specific Antitumor Immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 171-188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14010171	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Watanabe A
2. 発表標題 Antigen specific antitumor effect induced by antigen - electroporated, natural killer T cell ligand - loaded dendritic cells
3. 学会等名 AACR（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Watanabe A
2. 発表標題 Antigen specific antitumor effect induced by antigen - electroporated, natural killer T cell ligand - loaded dendritic cells
3. 学会等名 AACR（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 阿川杏介
2. 発表標題 NKT 細胞ワクチンベクターの抗原特異的 T 細胞の活性化
3. 学会等名 第41回 癌免疫外科研究会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Yamashita Kimihiro
2. 発表標題 Antitumor effect of a tumor protein electroporated - dendritic cell vaccine vector for invariant natural killer T cel
3. 学会等名 The 74th General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterological Surgery
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 山下公大
2. 発表標題 タンパク抗原を導入した NKT 細胞活性化樹状細胞ワクチンベクターの 抗腫瘍効果
3. 学会等名 第 40 回 癌免疫外科研究会
4. 発表年 2019年～2020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	井上 茂亮 (Inoue Shigeaki) (30582209)	神戸大学・医学研究科・特命教授  (14501)	
研究分担者	藤田 貢 (Fujita Mitugu) (40609997)	近畿大学・医学部・准教授  (34419)	
研究分担者	眞庭 謙昌 (Maniwa Yoshimasa) (50362778)	神戸大学・医学研究科・教授  (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	掛地 吉弘  (Kakeji Yoshihiro)  (80284488)	神戸大学・医学研究科・教授    (14501)	
研究分担者	高村 史記  (Takamura Shiki)  (90528564)	近畿大学・医学部・講師    (34419)	

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