

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K12806

研究課題名(和文)人工ネオエピトープを提示した疑似感染エクソソームを用いる抗腫瘍免疫治療の新戦略

研究課題名(英文) Novel strategy of anti-tumor immune therapy using pseudo-infection exosomes presenting artificial neoepitopes

研究代表者

小山 義之 (Koyama, Yoshiyuki)

大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・客員研究員

研究者番号：00162090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍関連抗原は一般に免疫原性が低いため、抗腫瘍免疫が成立しづらい。我々は、結核菌抗原、ESAT-6を人工抗原として腫瘍に導入し、免疫システムを刺激して活性化させることを試みた。ESAT-6遺伝子の腫瘍への導入は、担癌マウスにおいて顕著な抗腫瘍効果を示した。さらにESAT-6抗原を含む細胞外小胞(EVs)を調製し、これが樹状細胞を成熟させて高い抗腫瘍効果を示すことを見出した。また、細胞のウイルスセンサーが微生物の共通要素を検出して免疫を活性化する機構を模倣して、アデノウイルス由来の低分子核酸「VA-RNA I」を含んだEVsを調製し、そのインターフェロンの分泌誘導機能、抗腫瘍効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年がん免疫治療への期待が高い。しかし腫瘍抗原は一般に免疫原性が低く、抗腫瘍細胞性免疫が成立しづらいために免疫治療の効果は得られにくいことががん免疫治療の大きな壁となっている。一方ウイルスの感染に対しては細胞性免疫が効率よく誘導される。本研究は、微生物感染に対する免疫応答を模倣した新しい抗腫瘍免疫治療システムを提示するものである。さらに、患者本人の細胞から得る細胞外小胞を用いた本治療法は、安全性の高い新たな抗腫瘍治療戦略として実用化の可能性は高い。抗原性の弱い腫瘍に対する治療法として提案するこれらの手法は、行き詰まった現在のがん免疫治療を推進させるブレイクスルーとしてその意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Tumor-associated antigens generally have low immunogenicity, making it difficult to establish antitumor immunity. We attempted to introduce the gene of the tuberculosis antigen ESAT-6 into tumors to stimulate and activate the immune system. The introduction of the ESAT-6 gene showed significant anti-tumor effects in tumor-bearing mice. Furthermore, we prepared extracellular vesicles (EVs) containing ESAT-6 antigens and found that they effectively mature dendritic cells, leading to high anti-tumor effects in mice tumor models. Additionally, mimicking the mechanisms where the pattern recognition receptors recognize the viral RNAs and activate immune responses, we constructed a novel antitumor strategy using adenovirus-derived small RNA, VA-RNA I, and confirmed its potent interferon-inducing- and tumor-suppressive-effects.

研究分野：抗腫瘍免疫治療

キーワード：がん免疫治療 ESAT-6 細胞外小胞 VA-RNA インターフェロン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ガンは世界中で死因の上位を占める人類の大きな脅威の一つであり、治療薬などの目覚ましい進歩にもかかわらず生存率の著明な改善には至っていない。一方近年免疫療法が注目され、広く行われるようになり、一部の症例では高い効果が報告されている。しかし、その奏効率は低く、免疫チェックポイント治療などにおいても効果の全く無い症例は数多い。

腫瘍に対して免疫システムが有効に働くためには、攻撃ターゲットとなる腫瘍関連抗原(TAAs)の存在が必須であるが、TAAsは一般に免疫原性が低く、抗腫瘍免疫が誘導されにくい。

このような、抗原性の弱い腫瘍に対する治療法の開発が、現在ガン免疫治療の非常に重要な課題となっている。

(2) TAAsの免疫原性の低さを補うために、我々は、結核菌の強い抗原であるESAT-6タンパクを人工抗原として腫瘍に導入することを試みてきた。ESAT-6の遺伝子をコードしたプラスミドDNA(pDNA(ESAT))を担癌マウスに投与すると、抗腫瘍細胞性免疫が活性化されて著しい治療効果が得られること、さらに、pDNA(ESAT)を導入した培養腫瘍細胞から得られる細胞外小胞(EVs)も同等の免疫活性化作用・抗腫瘍効果を持つことを見出し報告してきた(図1)。

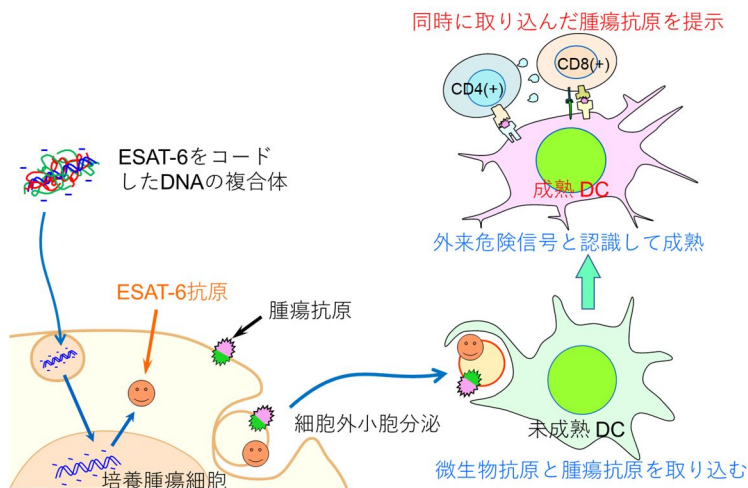


図1 結核菌抗原 ESAT-6 遺伝子を導入した培養腫瘍細胞から得られる細胞外小胞による抗腫瘍免疫活性化

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、ヒトの臨床に応用可能な「抗原性の弱い腫瘍に対しても効果的に抗腫瘍細胞性免疫を惹起する細胞外小胞製剤」を開発することにある。具体的には、抗原性の高い結核菌抗原、「ESAT-6」を含んだ細胞外小胞、ESAT-EVsを調製し、その人工抗原としての免疫活性化機能、ならびに抗腫瘍効果を調べ、抗腫瘍免疫治療薬としての可能性を検討する。さらに新たな戦略として、細胞内核酸センサーRIG-Iを刺激して免疫を活性化するウイルス由来の低分子核酸、「VA-RNAI」を内包した細胞外小胞、VA-EVsを作成し、その免疫誘導機能を詳細に調べる。これらの結果から、このような「微生物由来成分を含有する細胞外小胞」を用いて疑似感染状態を作成し、抗腫瘍免疫を活性化する免疫活性化システムの可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 微生物抗原「ESAT-6」を含んだ細胞外小胞(ESAT-EVs)の調製

pDNA(ESAT)、ポリエチレンイミン(PEI)からなる二元複合体、およびこれにさらにコンドロイチン硫酸(CS)を加えた三元複合体を調製し、それぞれ培養 B16 メラノーマ細胞に導入して、分泌された細胞外小胞、ESAT-EVsを培養上清から採取・単離した。

(2) ESAT-EVsの解析

ESAT-EVsをTim-4固定化プレートに固定化した後、rabbit anti-ESAT-6 antibody、およびFITC-labeled goat anti-rabbit IgG antibodyを順に加え、蛍光強度からESAT-6エピトープの量を定量した。

ESAT-EVsのサイズおよびその分布はナノサイトを用いて評価した。

(3) ESAT-EVsの免疫活性化機能

マウス骨髄から採取し、GM-CSFを加えて分化・培養した細胞からautoMACSを用いてCD11c陽性細胞のみを単離することで、混在する細胞のない純粋な樹状細胞(DCs)を得た。得られたDCsにESAT-EVsを加えてさらに一晚培養し、CD86陽性細胞の数をFACSで定量した。

(4) ESAT-EVsの抗腫瘍効果

培養 B16 細胞を C57BL/6 マウスに移植してシンジェネティック担癌マウスモデルを作成した。腫瘍が確立した後 ESAT-EVs を中三日で三回腫瘍内投与し、腫瘍サイズの変化を経時的に測定

した。

(5) アデノウイルス由来核酸「VA-RNA I」を内包した細胞外小胞 (VA-EVs) の調製
VA-RNA I の遺伝子をコードしたプラスミド DNA、pDNA(VA-RNA)を調製し、培養 B16 細胞に導入して、分泌された細胞外小胞、VA-EVs を採取・単離した。

(6) VA-EVs のインターフェロン(IFN)誘導機能
VA-EVs を培養マクロファージに加え、一晚培養後、上澄み中の IFN- α および IFN- β の濃度を ELISA で測定した。

(7) VA-EVs の抗腫瘍効果
C57BL/6 マウスに B16 細胞を移植したシンジェネックモデルマウスに、腫瘍確立後 VA-EVs を腫瘍内に一回投与して腫瘍サイズの変化を測定した。

4. 研究成果

(1) ESAT-EVs の調製とその抗腫瘍効果

ESAT-EVs の調製とその解析

先行する研究において、pDNA(ESAT)を培養 B16 メラノーマ細胞に導入すると、ESAT-6 エピトープを含んだ細胞外小胞 (ESAT-EVs) が得られること、また得られた ESAT-EVs は顕著な腫瘍増殖抑制効果を持つことを見出した。

本研究では ESAT-EVs に含まれる ESAT-6 エピトープを定量し、ESAT-EVs 作成に適した条件を検討した。

B16 細胞に pDNA/PEI 二元複合体を加えた系と pDNA/PEI/CS 三元複合体を用いた系では、どちらも直径約 150 nm の EVs がほぼ同数得られた。

一方、pDNA/PEI 二元複合体で得た EVs は、1 粒子当たり約 12 個の ESAT-6 エピトープを持つのに対して、pDNA/PEI/CS 三元複合体を用いた系では約二倍多い 24 個のエピトープを含む EVs が得られ、遺伝子導入によるエピトープ含有 EVs の作成には三元複合体がより適していることが分かった (図 2)。

ESAT-EVs の免疫活性化機能

先行研究において、マウス骨髄から GM-CSF を用いて分化培養した DCs に ESAT-EVs を加えてインキュベートすると、高い抗腫瘍効果を持つ活性化 DCs が得られることを見出した。

一方、マウス骨髄から分化培養した細胞には DCs 以外にマクロファージも含まれる。そのため、DCs の活性化が ESAT-EVs による直接の作用なのか、それともマクロファージを介したものが不明であった。

そこで本研究では、autoMACS を用いて DCs のみを単離したものに ESAT-EVs を加えて培養し、活性化状態を調べた。

ESAT-EVs とインキュベート後の DCs の CD86 の発現を FACS で解析したところ、ESAT-EVs を加えた DCs では有意に多くの細胞が CD86 を発現していることが確認された (図 3)。

このような効果は、ESAT-6 の遺伝子を導入していない B16 細胞から得た Control EVs には見られず、ESAT-EVs に含まれる ESAT-6 抗原、あるいはそのエピトープによって樹状細胞が直接刺激され、活性化することが示唆された。

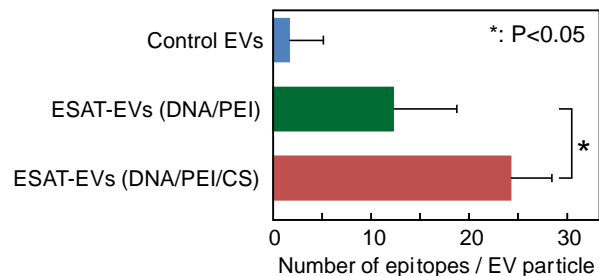


図 2 ESAT-EVs に含まれる ESAT-6 エピトープ数

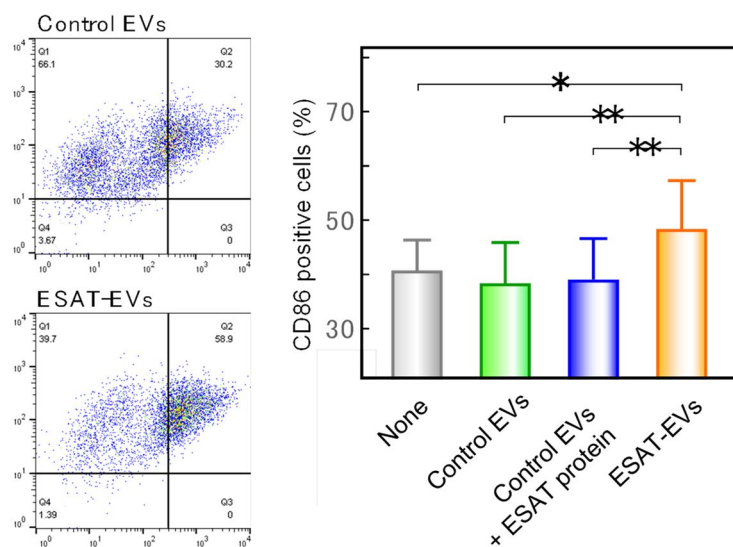


図 3 autoMACS で単離した DCs に対する ESAT-EVs の活性化機能

ESAT-EVs の抗腫瘍効果

ESAT-EVs を投与した担癌モデルマウスでは、著しい腫瘍増殖の抑制が再現性良く観察され、このような人工抗原を含んだ EVs が高い抗腫瘍機能を持つことが確認された。

(2) VA-EVs の調製とその抗腫瘍効果

VA-EVs の調製

アデノウイルスが感染した細胞内ではウイルス DNA から小分子核酸「VA-RNA I」が転写産生される。VA-RNA I は細胞内のウイルス RNA センサーである RIG-I に結合して I 型 IFN の分泌を強く導く (図 4)。I 型 IFN はマクロファージを活性化し、効率よく細胞性免疫を誘導することから、VA-RNA I の腫瘍組織内への導入は様々な機序でのガン治療への効果が期待される。

そこで、VA-RNA I をコードしたプラスミド DNA、pDNA(VA-RNA)を合成し、培養細胞に導入することで、VA-RNA I を内包した細胞外小胞 VA-EVs を調製し、これを用いたガン治療の可能性を検討した。

pDNA(VA-RNA)を培養 B16 メラノーマ細胞に導入し、培養上清から得られた EVs、VA-EVs を様々な培養細胞に加えたところ、有意に高い IFN- α および IFN- β の分泌が認められた。このことから、VA-EVs は VA-RNA I を含有すること、さらに VA-EVs は I 型 IFN の分泌を誘導する機能を持つことが確認された。

VA-EVs の抗腫瘍効果

VA-EVs を、B16 細胞担持シンジエネティック担癌モデルマウスに一回腫瘍内投与した。pDNA(VA-RNA)を導入していない細胞から得られた Control EVs は全く抗腫瘍効果を示さなかったが、VA-RNA I を含有する VA-EVs は著しい抗腫瘍効果を示した (図 5)。

さらに、プレリミナリーな実験において、VA-EVs は ESAT-EVs と共投与することで、それぞれ単独よりもさらに高い腫瘍増殖抑制効果を持つことが示された。

以上の結果から、このような微生物由来の強い抗原、あるいはウイルスセンサーを刺激する成分を含んだ EVs は抗腫瘍免疫治療における免疫活性化の新しい戦略として有用であることが示唆された。

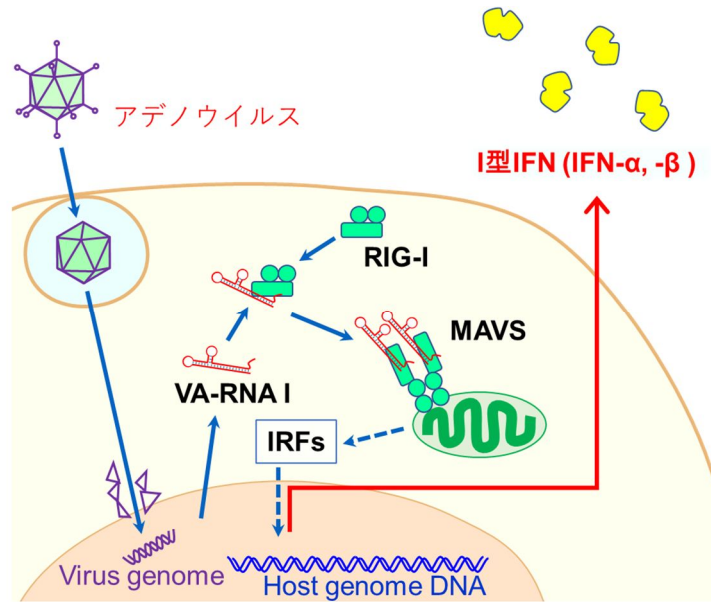


図 4 アデノウイルス感染細胞における VA-RNA I の産生と IFN の発現誘導

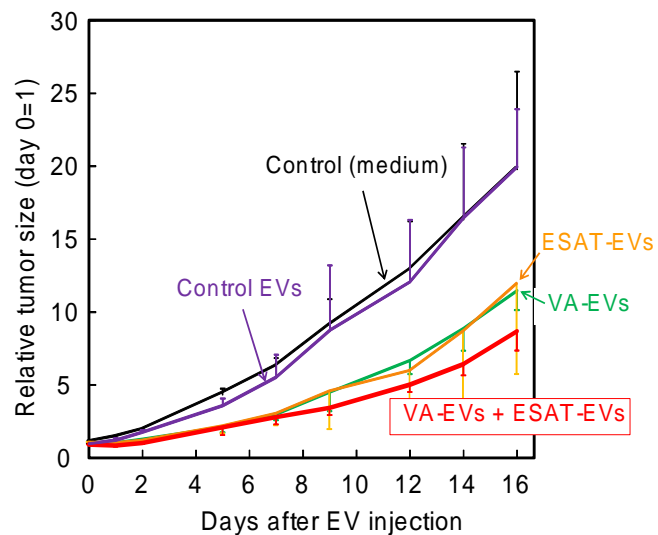


図 5 VA-EVs の抗腫瘍効果および ESAT-EVs との協奏効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ito Tomoko, Yamaguchi Shingo, Soga Daisuke, Ueda Keisuke, Yoshimoto Takayuki, Koyama Yoshiyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Water-Absorbing Bioadhesive Poly(Acrylic Acid)/Polyvinylpyrrolidone Complex Sponge for Hemostatic Agents	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 755 ~ 755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bioengineering9120755	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 Ito Tomoko, Yamaguchi Shingo, Soga Daisuke, Yoshimoto Takayuki, Koyama Yoshiyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Preparation of a Bioadhesive Poly(Acrylic Acid)/Polyvinylpyrrolidone Complex Gel and Its Clinical Effect on Dental Hemostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gels	6. 最初と最後の頁 462 ~ 462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/gels8080462	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 Wang Li-Ping, Wang Hua-Jie, Hou Xue-song, Raza Ali, Koyama Yoshiyuki, Ito Tomoko, Wang Jin-Ye	4. 巻 113
2. 論文標題 Preparation of stretchable composite film and its application in skin burn repair	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 104114 ~ 104114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmbbm.2020.104114	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 該当する
1. 著者名 Ito Tomoko, Sugiura Kikuya, Hasegawa Aya, Ouchi Wakana, Yoshimoto Takayuki, Mizoguchi Izuru, Inaba Toshio, Hamada Katsuyuki, Eriguchi Masazumi, Koyama Yoshiyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Microbial Antigen-Presenting Extracellular Vesicles Derived from Genetically Modified Tumor Cells Promote Antitumor Activity of Dendritic Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 57 ~ 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13010057	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小山 義之、伊藤 智子、善本 隆之、溝口 出
2. 発表標題 デノウイルス由来のIFN誘導因子「VA-RNA」を内包した 細胞外小胞の調製とその抗腫瘍効果
3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小山 義之、伊藤 智子、杉浦 喜久弥、善本 隆之、溝口 出
2. 発表標題 アデノウイルス由来の小分子核酸「VA-RNA」を内包した細胞外小胞の IFN誘導機能と抗腫瘍効果
3. 学会等名 日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小山 義之、伊藤 智子、溝口 出、善本 隆之、杉浦 喜久弥、長谷川 綾、大内 若菜、稲葉 俊夫
2. 発表標題 腫瘍溶解性ウイルスを模した癌免疫治療の新戦略
3. 学会等名 第85回インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小山 義之、伊藤 智子、善本 隆之、溝口 出
2. 発表標題 疑似感染細胞が分泌する細胞外小胞による免疫誘導機能
3. 学会等名 第8回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小山 義之、伊藤 智子、善本 隆之、溝口 出
2. 発表標題 アデノウイルスの免疫活性化機能を模倣した癌免疫治療の新戦略
3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会第20回シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小山義之、伊藤智子、江里口正純、善本 隆之、溝口 出、杉浦 喜久弥、長谷川 綾、大内 若菜、稲葉 俊夫
2. 発表標題 微生物抗原を提示した細胞外小胞の腫瘍免疫治療、感染予防・治療ワクチンへの応用
3. 学会等名 第7回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小山義之、溝口出、善本隆之、伊藤 智子
2. 発表標題 インターフェロン誘導機能を持つアデノウイルス由来の小分子核酸「VA-RNA」の細胞外小胞によるデリバリーとその抗腫瘍効果
3. 学会等名 第39回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小山義之、伊藤 智子
2. 発表標題 微生物感染に学ぶ抗腫瘍免疫遺伝子治療の新戦略
3. 学会等名 会等名 遺伝子・デリバリー研究会第21回夏期セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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