

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07045

研究課題名（和文）がんワクチン株の解析から独自定義する免疫原性細胞死と生体内がんワクチン戦略

研究課題名（英文）Identification of vaccine immunogenic factors for in situ cancer vaccine strategy

研究代表者

赤澤 隆（Akazawa, Takashi）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター（研究所）・その他部局等・がん創薬部主任研究員

研究者番号：80359299

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）：本課題は、近年注目される「免疫原性細胞死（Immunogenic Cell Death）」と、申請者の独自研究「がんワクチン株の生体内挙動：自然退縮から免疫誘導」との共通点を検証し、がんワクチンを成功させるキー因子の同定と治療応用「生体内がんワクチン(in situ vaccine)戦略」の開発を目的とした。当初計画には「抗がん剤スクリーニング」や「適応患者の診断法開発」を含めていたが、「がん細胞中のマイクロRNA-Xがワクチン原性を制御するキー因子である」ことを見出し、その性質と発現制御について検討を進めた。本成果はマイクロRNA制御による新規がんワクチン戦略として次課題へ発展させている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：免疫原性細胞死の研究は、細胞レベルの検討が先行し、個体レベル（動物実験）の免疫応答が十分に理解されていない。本課題では、樹立がんワクチン株と動物実験モデルを中心に検討を進めており、他の研究者と異なる着眼で免疫原性細胞死を検証し、新しい発見が得られている。

社会的意義：免疫原性細胞死の理解は、「生体内ワクチン戦略（免疫応答性の高い「がん細胞死」を生体内で誘導する）」を実現させるために必須のステップである。理論上、生体内ワクチン戦略と免疫チェックポイント阻害剤との併用は、「免疫療法」の治療効果を飛躍的に向上させることが期待されるため、社会的意義・貢献も高いと考えている。

研究成果の概要（英文）：This project aims to identify the key factors of cancer vaccines and apply them for “in situ vaccine strategy” as a novel therapy.

The study was advanced by analyzing the commonalities between “Immunogenic Cell Death (ICD) in cancer field” and “Our original research: In vivo behavior of cancer vaccine strains, spontaneous regression, leads to immune responses.”

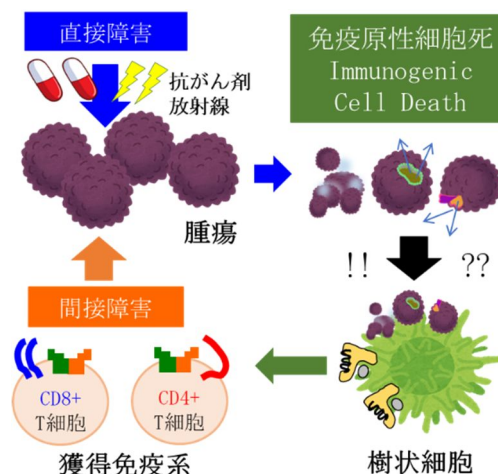
The initial plan included “screening of anticancer drugs as immunogenic cell death inducer, and etc.” However, we found that “microRNA-X in cancer cells work as a key factor regulating vaccinogenicity.” Then we mainly studied its function and regulation of expression. These results were developed into the next project as a novel cancer vaccine strategy by microRNA regulation, and the research is still ongoing.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 がんワクチン 免疫原性細胞死 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤や放射線に晒されたがん細胞は、抗がん剤の作用機序・時間経過・腫瘍微小環境によって様々な細胞死の形態をとる。ある種の抗がん剤で処理されたがん細胞は高い免疫原性を持つ細胞死形態をとり、獲得免疫系の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導して、免疫系による間接的な抗がん効果を発揮する。間接応答ではあるが、持続的かつ特異的な応答として、強力な抗がん効果をもたらす。この免疫系の活性化にはがん抗原を T 細胞に抗原提示する「樹状細胞」の役割が注目され、がん死細胞と樹状細胞の相互作用が免疫原性細胞死 (Immunogenic Cell Death, ICD) の重要イベントとして考えられていた (右図)



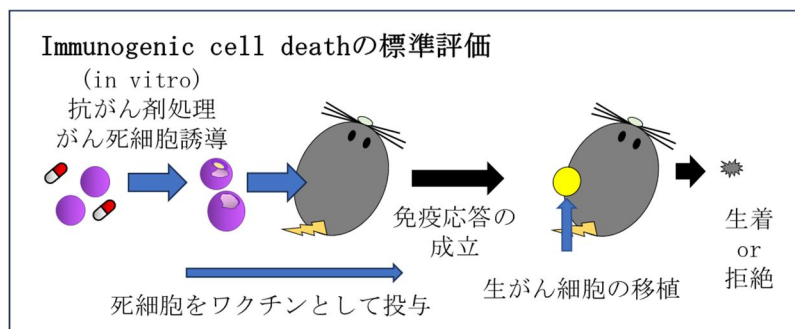
現在では、「死細胞が放出する樹状細胞活性化因子 (シグナル)」について詳細な解析が進み、死細胞が「樹状細胞に発見されるため」の ATP (Find me signal)、「樹状細胞に貪食されるため」の

Calreticulin (Eat me signal)、「樹状細胞を活性化させるため」の、HMGB1, type 1 IFN (Danger signal)等が明らかとなった。これらの 3signals/4 因子は、ICD を機能的に説明可能なため、in vitro 実験において、ICD の定義に近い形で評価に利用された (右図)。



元来、in vivo 免疫応答の誘導 (動物実験)こそが唯一無二の ICD 判定・評価方法であり、Gold-standard 実験が存在する。すなわち、免疫原性細胞死を誘導したがん細胞を正常マウスに

ワクチンとして投与すると、がん細胞に対する免疫を獲得するため、追加移植した親株がん細胞を拒絶する (右図)。しかし、近年では in vivo 評価することなく、in vitro 実験「死細胞が放出する樹状細胞活性化因子の有無」のみで ICD を議論する論文が増えたため、定義と解釈が混沌に陥った。



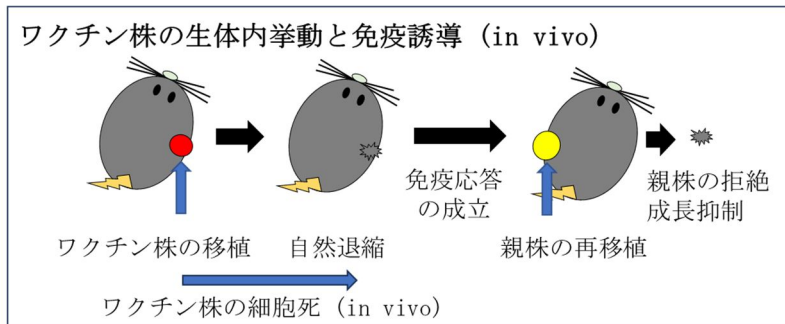
2. 研究の目的

免疫原性細胞死の研究は細胞レベルの解析が先行し、様々な定義やキー因子が提唱された。しかし、多くの研究が、最終的な免疫応答を個体レベルで検証しておらず、机上論で免疫応答と紐づけしたため、細胞~個体レベルの総合的な解析がない状態であった。ならば、in vivo における免疫原性細胞死とは何か? 定義となる因子は何か? 既存研究とは別の視点で捉えて解析することを考えた。免疫原性細胞死の理解は、新しい免疫療法として、生体内がんワクチン戦略の基盤となりうる。すなわち、生体内で免疫原性の高い細胞死を誘導することにより、免疫細胞にワクチン抗原として利用させ、免疫応答を誘導することである。理論上、免疫チェックポイント阻害剤との相性が良く、併用療法で飛躍的な治療効果の向上が期待される。

3. 研究の方法

申請者は、これまでの「がん免疫・ワクチン・アジュバント」に関する研究から、興味深い実験試料を得た。マウスの腫瘍移植モデルで汎用される細胞株から、特定分子の発現を基に分離した株は、移植後に自然退縮 (生体内で細胞死する) して、親株に対する免疫を成立させるワクチ

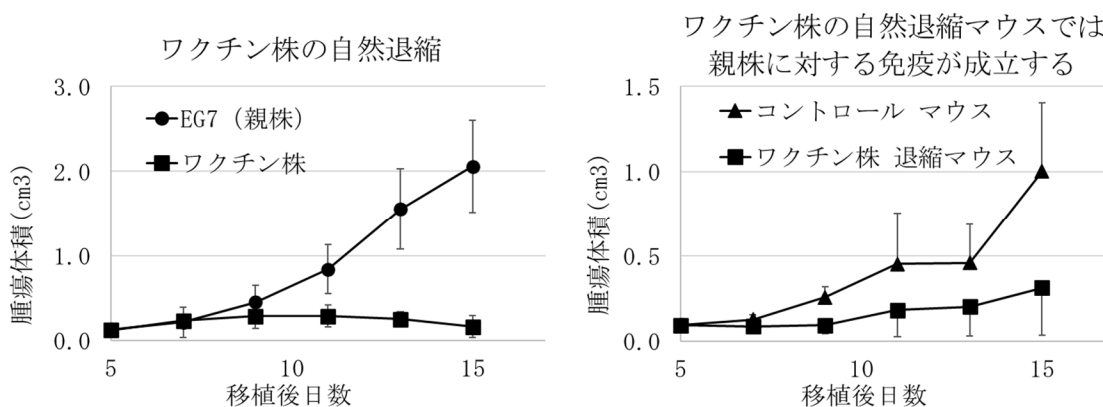
ン株様の性質を有していた(右図)。このワクチン株の生体内での挙動は、まさに免疫原性細胞死に相応するものであり、これまでのICDに関する知見とワクチン株の共通点を探索することにより、免疫原性細胞死の理解を深めることとなる。



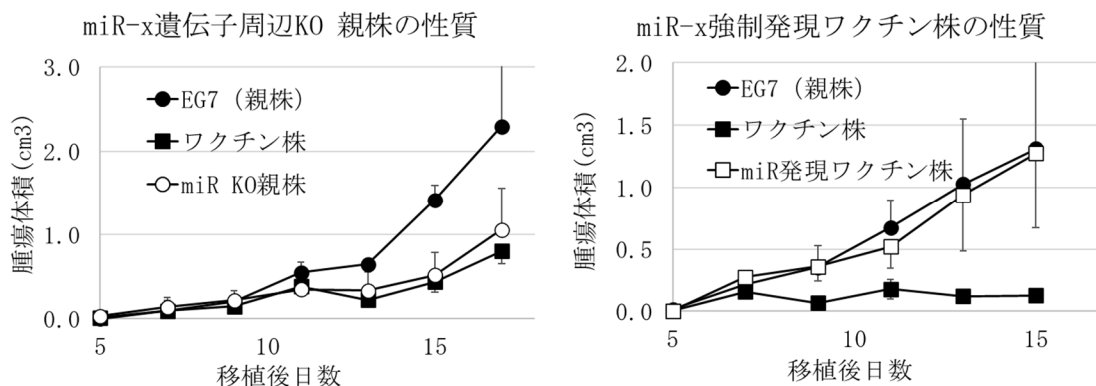
この親株とワクチン株のマイクロアレイ比較解析および発現量と機能性を基に、新規 Immunogenic factors 3 候補 (次点 7 候補) を抽出した。さらに、各候補因子を遺伝子編集による KO 細胞の作製、遺伝子導入による過剰発現株の作製へと進め、マウス移植モデルにおいて機能実証実験を進め、免疫原性キー因子の同定を試みた。

4. 研究成果

ワクチン株は移植後、生体内で自然退縮・殺傷される(下図左)。また、ワクチン株自然退縮マウスに親株を再移植すると、親株には拒絶・成長抑制が認められ(下図右)、がん免疫応答を獲得したことが予想された。また、T細胞系が欠損したヌードマウスではワクチン株は自然退縮せず、親株と同等に増殖したことから(データ非表示)、T細胞系の免疫が腫瘍の退縮に関与することが予想される。



申請者は培養細胞ベースで親株とワクチン株の比較解析を進め、最終的に候補因子としてマイクロ RNA (miR) の1つを同定した(miR-xと呼ぶ)。成熟したmiRは細胞内で検出される非常に短いRNA断片で、他のmRNAに結合することで、蛋白質の翻訳を阻害する。親株からmiR-x近傍の遺伝子をCRISPR-CAS9システムで欠損させると、ワクチン株と同様に退縮し(下図左)、ワクチン株にmiR-xを強制発現させると、親株と同様に生着し、腫瘍を形成した(下図右)。これらの結果は、miR-xがワクチン原性に関与することを強く示唆するものであった。



本研究は、次課題「生体内がん細胞の死傷過程に現れるワクチン起点応答と関連マイクロRNAの制御戦略」として採択して頂き、研究を発展させることができた。miR-xの発現レベルが、がん細胞の免疫・ワクチン原性に影響するため、miR制御に基づいた新規がんワクチン戦略の開発へと展開させていく計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 S*, Yuba E*, Akazawa T*, Wijewardana V, Kakihara Y, Azuma A, Hagimori K, Kanegi R, Hatoya S, Inoue N, Inaba T, Sugiura K. (*co-1st authors)	4. 巻 40
2. 論文標題 Potent adjuvant effect elicited for tumor immunotherapy by a liposome conjugated pH-sensitive polymer and dendritic cell-targeting Toll-like-receptor ligand. Vaccine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 1448-1457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vaccine.2022.01.048.	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 Ikezawa K, Ekawa T, Hasegawa S, Kai Y, Takada R, Yamai T, Fukutake N, Ogawa H, Akazawa T, Mizote Y, Tatsumi K, Nagata S, Asukai K, Takahashi H, Ohkawa K, Tahara H	4. 巻 10
2. 論文標題 Establishment of organoids using residual samples from saline flushes during endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration in patients with pancreatic cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endosc Int Open	6. 最初と最後の頁 E82-E87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/a-1713-3404	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 Kawachi H, Kunimasa K, Kukita Y, Nakamura H, Honma K, Kawamura T, Inoue T, Tamiya M, Kuhara H, Nishino K, Mizote Y, Akazawa T, Tahara H, Kumagai T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Atezolizumab with bevacizumab, paclitaxel and carboplatin was effective for patients with SMARCA4-deficient thoracic sarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 799-806
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2217/imt-2020-0311	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤澤隆、溝手雄、井上徳光、杉浦喜久弥、田原秀晃.
2. 発表標題 Dying tumor cells in vivo might be used as sources of tumor antigens: the potential of in situ vaccination strategy
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊駿一、弓場英司、赤澤隆、鳩谷晋吾、金城綾二、稲葉俊夫、杉浦喜久弥
2. 発表標題 樹状細胞の活性と機能を特異的に増強するアジュバントによる腫瘍免疫治療効果の検討
3. 学会等名 第165回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池澤 賢治、江川 智哉、長谷川 慎一郎、甲斐 優吾、高田 良司、山井 琢陽、福武 伸康、小川久貴、赤澤 隆、溝手 雄、辰己久美子、高橋 秀典、大川 和良、田原 秀晃
2. 発表標題 EUS-FNA針洗浄液を用いた膵癌オルガノイドの樹立
3. 学会等名 日本膵臓学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江川 智哉、池澤 賢治、長谷川 慎一郎、甲斐 優吾、高田 良司、山井 琢陽、小川久貴、赤澤 隆、溝手 雄、辰己 久美子、高橋 秀典、大川 和良、田原 秀晃
2. 発表標題 EUS-FNA針洗浄液からのヒト膵腫瘍細胞三次元培養技術の確立
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田 陽一郎、半澤 健、溝手 雄、赤澤 隆、田原 秀晃、宮本 泰豪、谷口 直之
2. 発表標題 腫瘍内低酸素環境において糖鎖の品質管理機構は小胞体ストレスを誘導するかもしれない
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2021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	杉浦 喜久弥 (Sugiura Kikuya) (30171143)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授 (24403)	

	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	田原 秀晃 (Tahara Hideaki)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター (研究所)・研究所 がん創薬部・部長 (84409)	
研究 協力者	溝手 雄 (Mizote Yu)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター (研究所)・研究所 がん創薬部・研究員 (84409)	
研究 協力者	井上 徳光 (Inoue Norimitsu)	和歌山県立医科大学・医学部・分子遺伝学 (24701)	

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