

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09086

研究課題名(和文) XCR1陽性樹状細胞への選択的送達によるユビキチン融合がんワクチンの新戦略

研究課題名(英文) The novel strategy of ubiquitin-fusion cancer vaccine through the specific delivery to XCR1+ Dendritic cells

研究代表者

宮澤 基樹 (Miyazawa, Motoki)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90549734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン(Ub)融合腫瘍抗原をXCR1陽性樹状細胞(DC)へ選択的に送達させることで効率的に細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を誘導し、抗腫瘍効果を増強することを目的とした。ヒトDCを安定的に確保するため健常人末梢血単核球(PBMC)よりiPSCを分化誘導させた。腫瘍抗原メソセリン(MSLN)をiPS樹状細胞に遺伝子導入した。Ub-MSLN融合遺伝子導入も同様に行った。これらを用いてPBMCから特異的CTLを誘導し細胞傷害活性を解析した。Ub-MSLN融合遺伝子導入iPSCはMSLN単独と比較して強力な細胞傷害活性をもつCTLが誘導できた。XCR1DCへの選択的送達は今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Ub融合がんワクチンを用いたプロテアソーム系での腫瘍抗原の分解亢進および強力なCTL誘導についての結果を報告した。現在、がんに対する治療戦略として免疫チェックポイント阻害療法(ICI)が確立され広く臨床応用されている。しかし、ICI単独治療はがん特異的細胞傷害性リンパ球(CTL)が十分誘導されていないがん患者に対しては効果が乏しい。本研究はこのような患者群に対してがんに対する特異的CTLを効率的に誘導する新たな治療戦略であり、将来的にはICIとの併用によってより癌免疫治療の効果を高める新規治療へとつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in enhancing the anti-tumor effect of XCR1 by conjugating tumor antigens to XCL1, the XCR1 ligand. On the other hand, we have succeeded in enhancing the anti-tumor effect by linking the tumor antigen to the proteolytic signal, ubiquitin. In the present study, based on the results of these two fundamental studies, we aimed to develop a novel method to selectively deliver ubiquitin-fused tumor antigens to XCR1-positive dendritic cells to induce CTLs. First, iPSC dendritic cells(iPSCDC) were used to stably secure human dendritic cells for the experiments. The iPSCDC were gene-transfected with human mesothelin (MSLN) and ubiquitin-MSLN fusion gene. We demonstrated that ubiquitin-MSLN fusion gene-transfected iPSCDC induced MSLN-specific CTLs with superior cytotoxicity compared to MSLN alone. XCL1 gene linked to the ubiquitin-fused MSLN, however, had difficulty in work. We reported this study results obtained as iPSCDC vaccine therapy using the ubiquitin proteasome system.

研究分野：Cancer immunotherapy

キーワード：Cancer vaccine Ubiquitin mesothelin dendritic cell vaccine

## 1. 研究開始当初の背景

がんに対する新しい治療戦略として免疫チェックポイント阻害療法 (immune checkpoint inhibitor : ICI) が確立され広く臨床応用されたことで、がんに対する免疫療法が注目されている。ICI は、生体内に存在する CTL に発現する免疫チェックポイントである CTLA-4 や PD-1/PD-L1 といった抗腫瘍免疫に対する「ブレーキ機構」を解除するメカニズムであり、がん治療のパラダイムシフトを引き起こした治療法である。しかし、ICI 単独治療では無効な症例が少なからず存在する。すなわち、がん特異的 CTL が十分誘導されていない患者では ICI は無効であり、このような患者群ではがんに対する特異的 CTL を効率的に誘導する工夫が求められる。当教室では、がんに対する特異的 CTL を誘導し攻撃性を高める治療戦略としてがんワクチンを開発してきたが(勝田 日本臨牀 2015)、その生存期間延長効果は限定的で創薬に至っていない。世界に目を向けても、2010 年に前立腺癌に対するワクチン療法として Provenge が認可されて以降、FDA の承認を受けたがんワクチンは存在しない。申請者らはその主因をがん患者の生体内で抗がん効果を発揮するだけの十分な CTL が誘導されていないことにあるとし(Katsuda Trends in Immunotherapy 2017)、この問題を克服すべく、2つの観点から基礎研究を行ってきた。まず、優れた cross-presentation 能力をもち、がん特異的 CTL 誘導活性を有する DC サブセットであるケモカイン受容体 XCR1 陽性 DC (XCR1<sup>+</sup>DC) に着目した。DC には免疫応答を活性化させるサブセットばかりでなく、逆にブレーキをかける機能を持ったサブセットも存在するが、XCR1<sup>+</sup>DC はマウスでもヒトでもがんに対する CTL を強力に誘導するが報告されている。(Yamazaki J Immunol 2013, Shimizu J Immunol 2013, Eickhoff Cell 2015, Kitano PNAS 2016)。申請者らは XCR1 の特異的なリガンドである XCL1 に腫瘍抗原を連結させることにより、腫瘍抗原が XCR1<sup>+</sup>DC に選択的に送達され、有効な抗腫瘍免疫が誘導できると仮説した。これまでの研究で、マウス XCL1 (mXCL1) と OVA 抗原由来ペプチド (OT-1) を融合させた mXCL1-ペプチド連結ワクチン (mXCL1-OT-1) を作製し、OT-1 ペプチド、OVA タンパクと比較して、mXCL1-OT-1 をマウスに投与した場合に OVA 特異的 CTL の誘導が顕著に認められた。また、マウス腫瘍モデルにおいて OVA 発現腫瘍細胞株 (B16-OVA) に対する抗腫瘍効果を検討したところ、mXCL1-OT-1 で最も強い抗腫瘍効果が認められた興味深いことに、XCL1 連結ワクチンで誘導された CTL は経時的に疲弊し抗腫瘍効果が減弱したが、疲弊 CTL では PD-1 の発現が増強しており、XCL1 連結ワクチンと ICI を併用することは理想的な治療戦略であることが示唆された(水本 British Journal of Cancer 2020)。一方、2つ目の観点として申請者らは CTL へと分化する CD8<sup>+</sup>T 細胞に対する抗原提示が DC 内の Ub-プロテアソーム経路を介していることに注目し、プロテアソームによる蛋白分解のシグナルである Ub を膀胱腫瘍抗原遺伝子 Mesothelein (MSLN) と融合させ、DC に遺伝子導入することで、効率的に抗腫瘍免疫を誘導する基礎研究を進めてきた(平成 20 年度・平成 26 年度科学研究費助成事業採択課題)。この研究は腫瘍抗原遺伝子導入 DC ワクチン(尾島 Int J Cancer 2006, 宮澤 Cancer Lett. 2011) から発展したもので、結果として Ub-腫瘍抗原融合遺伝子導入 DC ではプロテアソームによる腫瘍抗原の分解亢進と抗原提示能の増強を認めた。そこで、本研究ではこれまで進めてきた2つの基盤的研究を踏まえた新規治療戦略として、XCL1 連結ワクチンに Ub を融合させることで、Ub-XCL1 連結腫瘍抗原を選択的に XCR1<sup>+</sup>DC へと誘導し、抗腫瘍効果を飛躍的に増強させることを発案した。本研究は、XCR1<sup>+</sup>DC への選択的な抗原送達に加え、DC 内で Ub-プロテアソーム系へと効率的に導くことで、DC の抗原提示能力を最大限増強させ効率的な CTL 誘導を実現する、他に類をみない手法を用いる革新的研究となりうる。さらに臨床応用を見据えると、XCR1<sup>+</sup>DC への選択的送達による Ub 融合がんワクチンと ICI の併用は、ICI 不応患者に対する有望な治療戦略といえる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は Ub 融合がん抗原を XCR1<sup>+</sup>樹状細胞に選択的に送達する新規がんワクチンのシステムを構築することである。Ub 融合がんワクチンを用いたプロテアソーム系での腫瘍抗原の分解亢進と XCL1 連結腫瘍抗原ペプチドによる XCR1<sup>+</sup>樹状細胞への選択的抗原送達を融合させた本研究は生体内の腫瘍抗原ワクチンの動態を制御し、かつてない効率的な腫瘍免疫誘導を実現できる極めて特色のある研究といえる。また、臨床応用に関して、XCR1<sup>+</sup>DC および Ub の機能的特性はマウスとヒトで共通しており、このシステムと ICI と併用は ICI 不応例に対する新規治療法となりうる。さらに、連結抗原として免疫原性の高い neoantigen 搭載することも可能であり、創造性に富んだ次世代型複合免疫療法の主力となりうる戦略である。

## 3. 研究の方法

(1) がんワクチンに用いる腫瘍抗原は膀胱癌や胃癌で高発現し、免疫原性が高い MSLN を用いることとした。DC への Ub-MSLN 融合遺伝子導入にあたって、アデノウイルスベクター (AxCAUb-MSLN) を使用した(宮澤 Cancer Letters 2011, 富永 Gene Therapy 2023)。Ub 遺伝子は monoUb をヒト PBMC の whole DNA から TA cloning した。また、実験に用いる安定的にヒト DC を確保す

るため iPSDC を用いることとした。健康人ドナーの末梢血単核球 (PBMC) より iPS 細胞を樹立し、5ステップ法にて樹状細胞を分化誘導させた(北谷 Sci Rep 2018)。分化誘導させた iPSDC と従来の単核球由来 DC の共刺激因子の発現について FACS にて解析した。

(2) Ub-MSLN 遺伝子導入 DC における MSLN 分解能についての免組織化学染色による解析と pentamer 解析による MSLN 特異的エピートペプチドの発現解析をおこなった。免組織化学染色には Abcam 社のモノクローナル抗ヒト MSLN 抗体を用いた。Pentamer assay には ProImmune 社 HLA-A2 拘束性 pentamer を用いた。

(3) XCL1-OVA synthetic long peptide (SLP)-FLAG 配列をもつ plasmid DNA を作成する。また、Ub に NheI site 付加した配列を TA cloning し、NheI 制限酵素を用いて XCL1-SLP-FLAG と Ub 配列を ligation し、XCL1-SLP-FLAG-Ub 配列を持つ plasmid DNA の作成を行う。このワクチンを精製し、Western blotting 法により、抗 dsRNA 抗体、抗 FLAG 抗体、抗 Ub 抗体を用いて目的のワクチンであることを確認する。

(4) 末梢血単核球 (PBMC) 中のリンパ球を MSLN あるいは Ub-MSLN 融合遺伝子導入 iPSDC を用いて週1回3回刺激 (in vitro) した後、MACS で CD8<sup>+</sup>T 細胞を sorting し、MSLN 特異的 CTL を誘導した。細胞傷害活性の解析は <sup>51</sup>Cr release assay にておこなった。

#### 4. 研究成果

(1) PCR 法で monoUb を gel extraction し、DNA 精製後、TA cloning した (図1)。MSLN 遺伝子

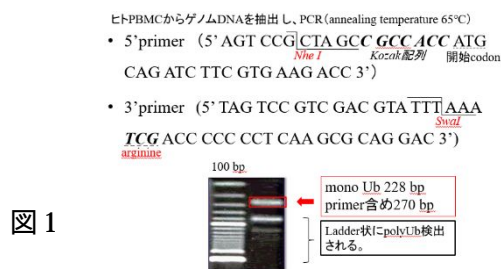


図1

導入アデノウイルスベクターおよび Ub-MSLN 融合遺伝子導入アデノウイルスベクターは COS-TPC 法で作成した (図2)

iPSDC 共刺激分子の発現は CD11c 98%, CD40 31%, CD80 29%, CD83 24%, CD86 93%, HLA-ABC 100%, HLA-DR 99% であった。アデノウイルスベクターを用いた MSLN 遺伝子導入 iPSDC および Ub-MSLN 融合遺伝子導入 iPSDC においてもその発現頻度は同等であった。(富永、尾島、宮澤ら Gene Therapy 2023)

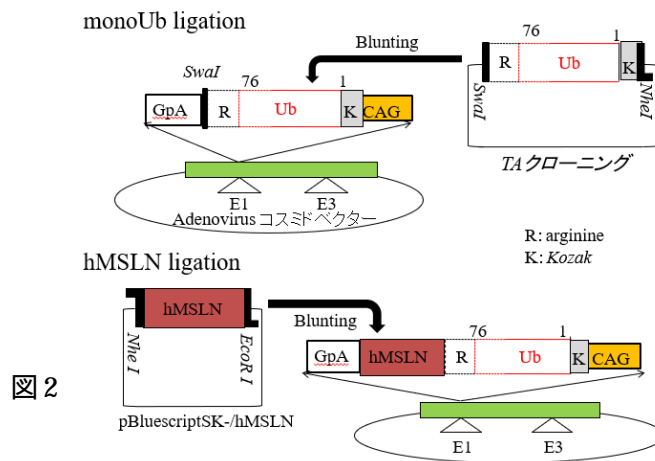


図2

(2) MSLN 遺伝子導入 iPSDC における MSLN 発現の FACS 解析では 82% であった。(図3、富永、尾島、宮澤ら Gene Therapy 2023 より引用)

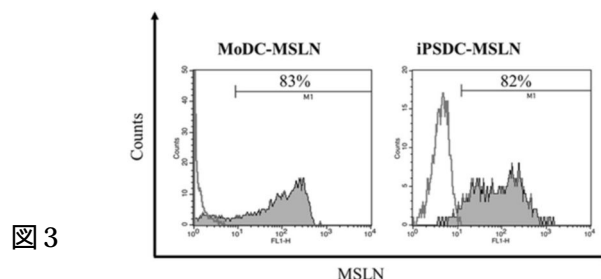


図3

一方、Ub-MSLN 遺伝子導入 iPSDC においては 48%と低下していた。これに対して Ub-proteasome 系の阻害薬である MG132 で処理した場合、その発現は 64%まで回復した。これは Ub-MSLN 融合遺伝子導入 iPSDC では MSLN 蛋白分解亢進していることが示唆された。Pentamer assay では MSLN 遺伝子導入 iPSDC で 1.17%、Ub-MSLN 融合遺伝子導入 iPSDC において 2.27%と MSLN 特異のエピトープペプチドの発現が Ub-MSLN 融合遺伝子導入 iPSDC で増強していた。(図 4、富永、尾島、宮澤ら Gene Therapy 2023 より引用)

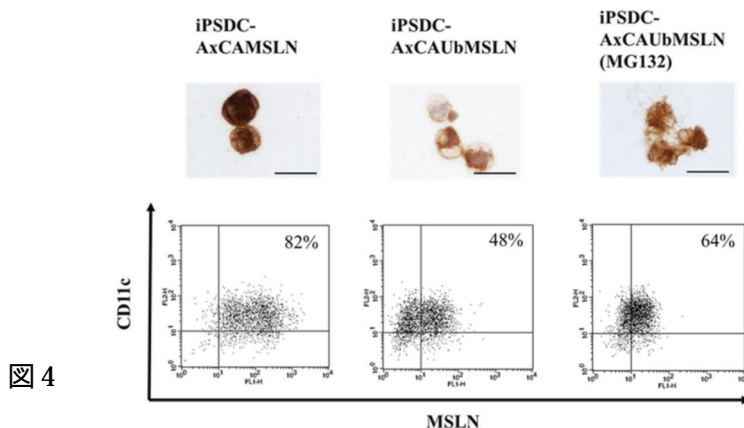


図 4

(3) XCL1-OVA synthetic long peptide (SLP)-FLAG 配列をもつ plasmid DNA を作成した (図 5、水本、勝田、宮澤ら Br J Cancer 2020)

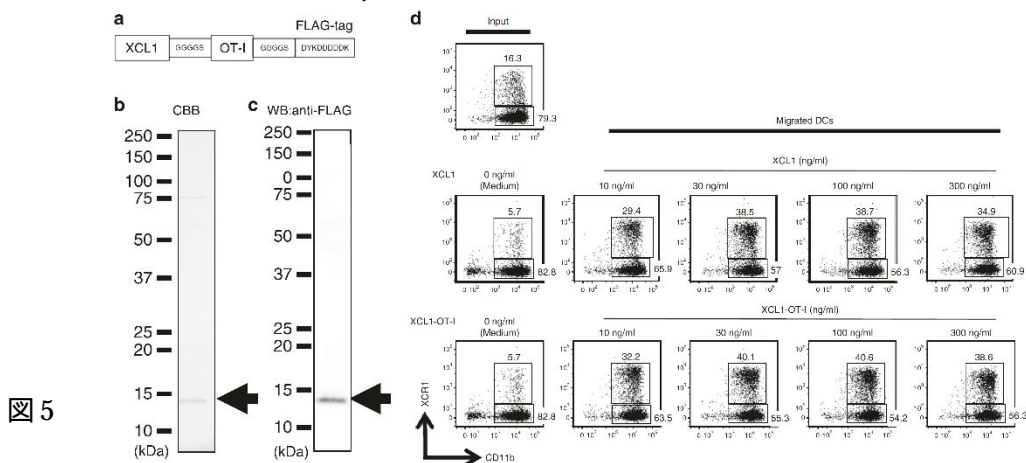


図 5

(4) クロム遊離試験で in vitro 細胞傷害活性を解析した結果、結果、MSLN 単独の遺伝子導入 iPSDC で誘導した CTL と比較して Ub-MSLN 融合遺伝子導入 iPSDC で誘導した CTL は有意に細胞傷害活性が増強していた。(図 6、富永、尾島、宮澤ら Gene Therapy 2023 より引用)

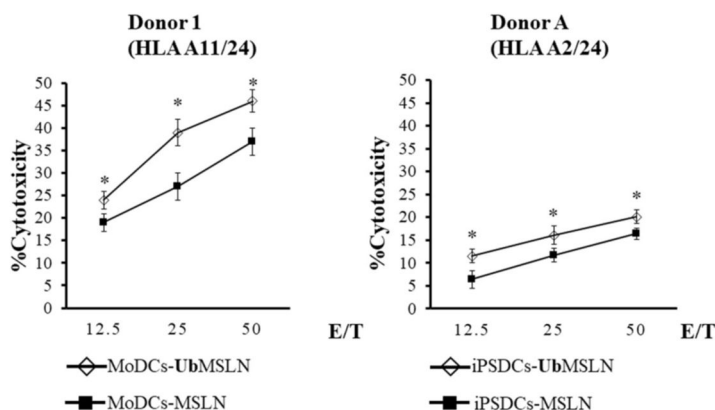


図 6

結果として Ub-MSLN 融合遺伝子導入 iPSDC による CTL の誘導能が MSLN 単独での遺伝子導入 iPSDC に比べて優れていることを示した。Ub 融合腫瘍抗原に XCL1 遺伝子を連結し、選択的に XCR1 陽性 iPSDC に送達するシステムについては課題が多く、本研究ではこれまでに得られた成果をもとにユビキチンプロテアソームシステムを用いた iPS 樹状細胞ワクチン療法として論文化 (富永、尾島、宮澤ら Gene Therapy 2023) し、報告した。

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 Tominaga Shinta, Ojima Toshiyasu, Miyazawa Motoki, Iwamoto Hiromitsu, Kitadani Junya, Maruoka Shimpei, Hayata Keiji, Yamaue Hiroki	4. 巻 -
2. 論文標題 Induced pluripotent stem cell-derived dendritic cell vaccine therapy genetically modified on the ubiquitin-proteasome system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41434-023-00388-z	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 富永 信太、尾島 敏康、宮澤 基樹、岩本 博光、北谷 純也、丸岡 慎平、山上 裕機、川井 学
2. 発表標題 ユビキチンプロテアソーム系を応用した新規 iPS 細胞由来樹状細胞ワクチン療法の基礎研究
3. 学会等名 第35回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富永信太、尾島敏康、宮澤基樹、岩本博光、北谷純也、丸岡慎平、山上裕機
2. 発表標題 ユビキチンプロテアソーム系を介した新規 iPS 細胞由来樹状細胞ワクチン療法の基礎的研究
3. 学会等名 第43回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2022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	山上 裕機  (Yamaue Hiroki)  (20191190)	和歌山県立医科大学・医学部・学長特命教員（特別顧問）    (24701)	

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	勝田 将裕  (Katsuda Masahiro)  (50464673)	和歌山県立医科大学・医学部・非常勤講師    (24701)	
研究分担者	尾島 敏康  (Ojima Toshiyasu)  (60448785)	和歌山県立医科大学・医学部・講師    (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