

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16015

研究課題名(和文) ネオ抗原由来mRNAとエクソソームによる個別化医療に資する樹状細胞ワクチンの作製

研究課題名(英文) Generation of dendritic cell vaccines for personalized medicine using neoantigen-derived mRNA and exosomes

研究代表者

坂本 卓弥 (SAKAMOTO, Takuya)

金沢医科大学・総合医学研究所・助教

研究者番号：40850623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：個別化医療に資する樹状細胞ワクチン療法の構築には、優れた抗原提示能を持つ樹状細胞の作製、リソースの問題、ネオ抗原由来ペプチド合成に代わる新たな方法が必要である。ネオ抗原ペプチド合成と樹状細胞ワクチンのペプチド導入に代わる新たな方法としてmRNAと樹状細胞由来エクソソーム(Dexosome)に着目した。本研究において無血清培地で新たにヒト急性骨髄性白血病細胞株(MUTZ3)由来樹状細胞の作製法を構築して、優れた機能性を持つDexosomeを作製できた。今回作製したDexosomeをネオ抗原由来mRNAの導入の媒体として用いることは、新たな樹状細胞ワクチン療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個別化医療に資する樹状細胞ワクチン療法の構築を行うためには、優れた抗原提示能を持つ樹状細胞の作製、リソースの問題、エレクトロポレーションに代わる新たなmRNA導入法の模索が必要である。今回の結果から優れた抗原提示能を持つ細胞株由来樹状細胞が作製でき、潤沢なDexosomeを回収することができた。更にDexosome自身の抗原提示能も高いことが認められた。今回作製した細胞株由来Dexosomeをネオ抗原由来mRNAの導入の媒体として用いることは、新たな樹状細胞ワクチン療法の開発および臨床応用に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The generation of dendritic cell vaccine therapy that contributes to personalized medicine requires the production of dendritic cells with excellent antigen presentation capabilities and the development of new methods to address resource issues and replace the synthesis of neoantigen-derived peptides. We focused on mRNA and dendritic cell-derived exosomes (dexosomes) as a new alternative to neoantigen peptide synthesis and peptide delivery for dendritic cell vaccines. In this study, we successfully established a method for the production of human acute myeloid leukemia-derived dendritic cells (MUTZ3) in serum-free culture conditions. This enabled the production of Dexosomes with excellent functionality. The use of Dexosomes for the delivery of neoantigen-derived mRNA is expected to lead to the development of novel dendritic cell vaccine therapies.

研究分野：再生医療・がん免疫療法

キーワード：樹状細胞 エクソソーム Dexosome MUTZ3 樹状細胞ワクチン療法 ネオ抗原

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、膵臓がんをはじめ難治性がんの標準治療の選択肢は限られており、これらのがんに対する明確な標準治療法としては、治癒切除以外に長期生存を期待できる治療法はなかった。近年、抗 PD-1 および抗 CTLA-4 抗体などの免疫チェックポイント阻害薬の出現により難治性がんにおける標準治療の選択肢の幅が広がり、がん細胞における遺伝子変異の頻度が高いほど有効性が高いことが報告されている。しかし、オンコパネルを使用した、がんゲノム診断において遺伝子変異に対する分子標的薬の同定は10%程度に過ぎず、共通の遺伝子変異であっても難治性がんの種類により有効性は異なるという限界があり、免疫チェックポイント阻害薬の奏効率は20%~30%と限界があるため、併用療法が大きな課題となっている。したがって、がんゲノム診断を基盤とした、患者個々のネオ抗原同定による個別化医療に資する汎用性のある樹状細胞ワクチン療法の開発が求められる。

2. 研究の目的

個別化医療に資する樹状細胞ワクチン療法の構築には、優れた抗原提示能を持つ樹状細胞の作製、リソースの問題、ネオ抗原由来ペプチド合成に代わる新たな方法が必要である。HLA 型に適合するネオ抗原由来ペプチドを設計・合成しても GMP グレードになると高額になり納品までに半年以上を費やすことからペプチド合成にかわる新たな方法を模索しなければならない。そこで、比較的安価で合成が容易な mRNA に着目した。しかし、mRNA の導入においてはエレクトロポレーションが一般的であり細胞の量的回収が困難である。そこで申請者は mRNA 導入方法の一つとしてエクソソームに注目した。樹状細胞由来のエクソソームは、樹状細胞同士のコミュニケーションツールであることから mRNA の導入に適している可能性がある。しかし、樹状細胞由来のエクソソーム自体も臨床で応用するためには量的回収に問題がある。したがって申請者はヒト急性骨髄性白血病細胞株(MUTZ3)由来樹状細胞とエクソソーム(Dexosome)に注目した。現時点で、MUTZ3 由来樹状細胞(MUTZ3-DC)から放出される Dexosome が機能的であるかどうかは不明であり、個別化医療に資する樹状細胞ワクチン療法の構築を行うために、まずは複数の MUTZ3-DC から放出される Dexosome の性質を評価することで、機能的であるかどうかを明確にする必要がある。その上で潤沢な Dexosome を用いた mRNA の導入法に繋げることが目的である。

3. 研究の方法

(1) 無血清培地による MUTZ3 由来樹状細胞の作製

現在、報告されている MUTZ3-DC の作製には FBS が含まれた血清培地が必要である。しかし、FBS 中の小胞が MUTZ3-DC から放出される Dexosome の解析結果に影響を与える可能性がある。したがって無血清培地(AIM-V: Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, MA, USA)を用いた MUTZ3-DC の作製方法を確立した。MUTZ3-DC には IL-4 と IFN- γ から分化させる方法がある。AIM-V に培養した MUTZ3 を分化用サイトカインカクテル(GM-CSF, TNF- α , Mitoxantron, IL-4 or IFN- γ)で未熟樹状細胞(M-imIL-4-DC, M-imIFN-DC)に分化させた。成熟化には TNF- α , IL-1 β , PGE2 により成熟樹状細胞(M-mIL-4-DC, M-mIFN-DC)を作製した。回収時の生細胞率測定にはトリパンブルー染色により評価した。

(2) 各種 MUTZ3-DC の DC 成熟マーカーの発現評価

DC の成熟マーカーの発現(CD80, CD86, CD83, HLA-ABC, HLA-DR, CD40)をフローサイトメトリーに評価することは DC への分化・成熟の指標となる。したがってフローサイトメトリーにより MUTZ3 由来の未熟樹状細胞(M-imIL-4-DC, M-imIFN-DC)と成熟樹状細胞(M-mIL-4-DC, M-mIFN-DC)に発現している表面抗原を評価した。

(3) 各種 MUTZ3-DC から分泌される Dexosome の性質評価

未熟樹状細胞である M-imIL-4-DC, M-imIFN-DC と成熟樹状細胞の M-mIL-4-DC, M-mIFN-DC から Dexosome が放出されるかどうかを、分化および成熟化後の培養上清から磁気ビーズにより Dexosome を抽出し、Nanosight による粒子径の測定および膜表面に発現するエクソソームマーカー(CD9, CD63, CD81)をフローサイトメトリーにより評価した。

(4) 各種 MUTZ3-DC から放出されるエクソソームの成熟マーカーの発現評価

各種 MUTZ3-DC から放出される Dexosome には DC と同様に成熟マーカーが発現するかをフローサイトメトリーにより評価した。

(5) 各種 MUTZ3-DC から放出される Dexosome の抗原提示能評価

各種 MUTZ3-DC から放出される Dexosome が機能的であるかを評価するために MART-1 ペプチドを直接 Dexosome に結合させて健常人から採取した CD8⁺T 細胞と共培養後、14日と21日における MART-1 特異的 CD8⁺T 細胞をフローサイトメトリーにより評価した。

(6) IFN- γ で分化・成熟させた MUTZ3-DC においてエレクトロポレーションによる EGFP-mRNA の導入評価

ネオアンチゲン由来 mRNA を樹状細胞に導入するにはエレクトロポレーションが一般的であるが、細胞にダメージを与えるため樹状細胞の量的回収が困難である。したがって予め MUTZ3-DC に mRNA をエレクトロポレーションにより導入し、そこから放出される Dexosome を抽出して樹状細胞ワクチンに添加することで、Dexosome 内の mRNA および mRNA 由来のペプチドが導入されるという仮説を立てた。したがってエレクトロポレーションに代わる方法として Dexosome が妥当であるかどうかを評価した。0.5 μ g の EGFP-mRNA を IFN- γ で分化・成熟させた MUTZ3-DC (2×10^6 cells/ml) にエレクトロポレーションで導入した(Puls voltage: 1350, Puls width: 30 ms, Puls number: 4)。24 時間インキュベーションを行い、フローサイトメトリーにより EGFP 陽性細胞の割合を評価した。

4. 研究成果

(1) 顕微鏡画像から作製した IL-4 および IFN- γ で分化・成熟させた樹状細胞(M-mIL-4-DC, M-mIFN-DC)は、樹状突起が確認でき DC 様の細胞を作製できたことを確認した。また DC 回収時に生細胞率をトリパンブルー染色により評価したが、両群ともに変化は認められなかった。また DC の回収率に関しては、M-mIL-4-DC と比較して M-mIFN-DC で有意に高かった(図 1)。

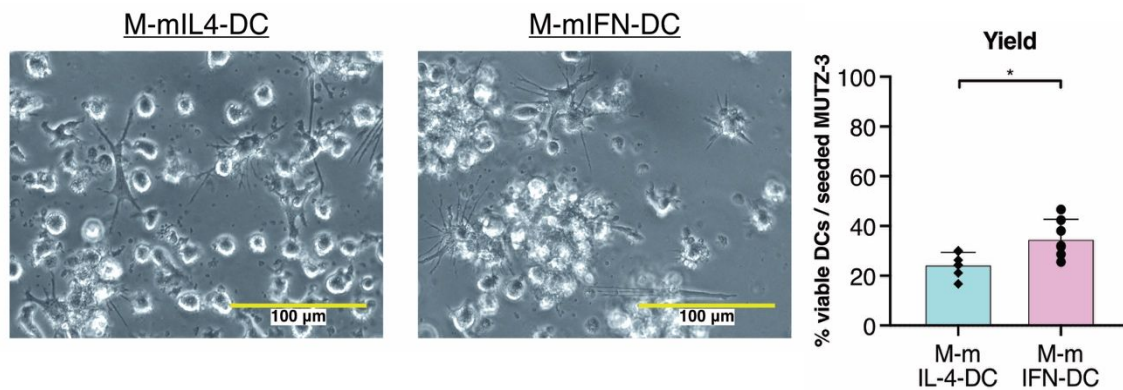


図 1. IL-4 および IFN- γ で分化・成熟させた樹状細胞の細胞形態および樹状細胞回収量 (n=6)

(2) 次に各種未熟樹状細胞(M-imIL-4-DC, M-im-IFN-DC)と成熟化した樹状細胞(M-mIL-4-DC, M-mIFN-DC)の成熟マーカー発現を評価した。M-mIFN-DC において成熟マーカーの CD80, CD86, CD83, HLA-ABC, CD40 の蛍光強度(MFI)は M-im-IFN-DC よりも有意に高く、より成熟度が高い樹状細胞に分化している可能性がある。さらに M-mIL-4-DC と比較すると抗原提示能に關与する HLA-ABC や CD86 の MFI が有意に高いことを示した(図 2)。したがって無血清培地により IL-4 および IFN- γ による MUTZ3-DC の作製方法を構築できた。

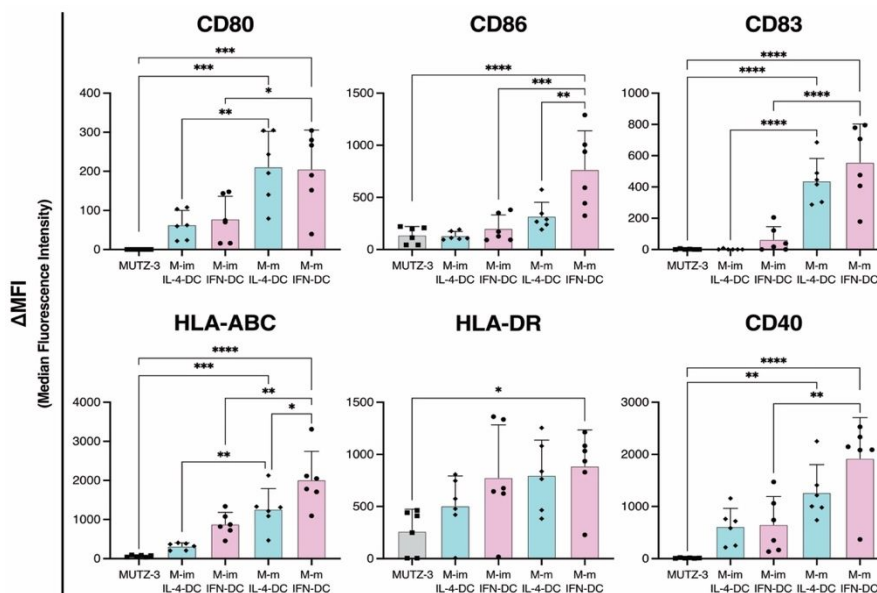


図 2. IL-4 および IFN- γ で分化・成熟した MUTZ3 由来樹状細胞の表現型(n=6)

(3) IL-4 および IFN- γ で分化させた未熟および成熟樹状細胞においてエクソソーム(Dexosome)が放出されていることを確認するために分化および成熟過程の培養上清から Dexosome を抽出し

た。そして Nanosight で粒子径を測定し、フローサイトメトリーにより CD9、CD63、CD81 の発現を評価した。未熟 MUTZ3 由来樹状細胞から放出される Dexosome を “M-imIL-4-Dex, M-imIFN-Dex”、成熟 MUTZ3 樹状細胞の Dexosome を “M-mIL-4-Dex, M-mIFN-Dex と表記する。未熟および成熟 MUTZ3-DC の培養上清から約 100nm の粒子径が検出され、エクソソームマーカーである CD9、CD63、CD81 の発現が認められたことから Dexosome が放出されていることを証明した(図 4)。

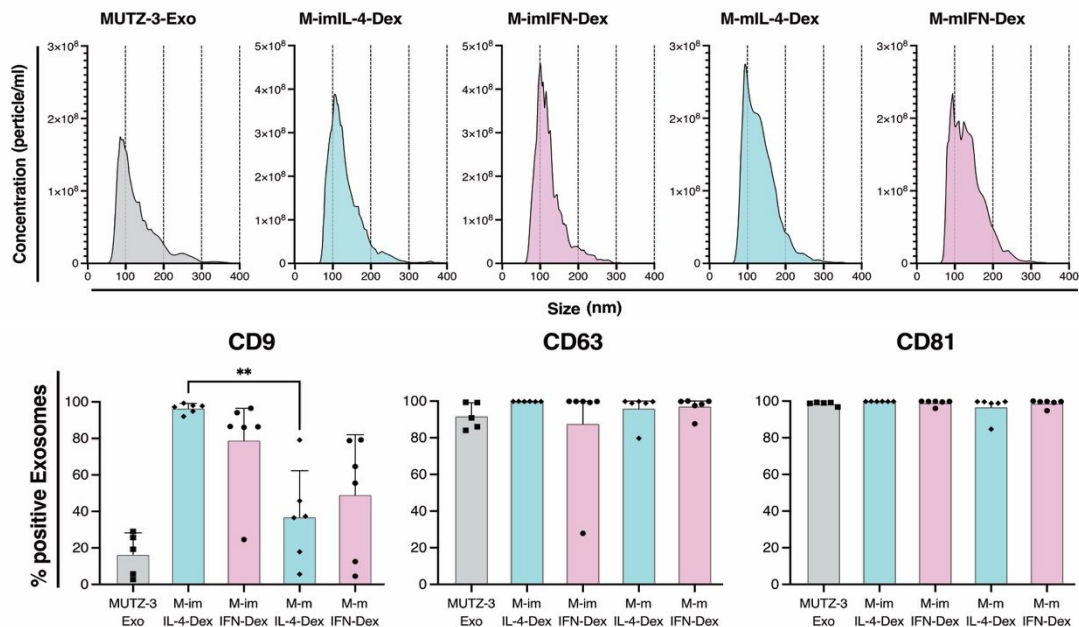


図 3. IL-4 および IFN- γ で分化・成熟した MUTZ3 由来樹状細胞から分泌された Dexosome について(n=6)

(4) IL-4 および IFN- γ で分化させた未熟および成熟樹状細胞由来のエクソソーム(Dexosome)において DC と同様に成熟マーカーが発現しているかどうかをフローサイトメトリーにより評価した。M-mIL-4-Dex と比較すると M-mIFN-Dex において有意に高い HLA-ABC の発現が認められた。したがって DC の作製工程においてサイトカインの違いが性質の違う Dexosome を放出している可能性が示唆された(図 4)。

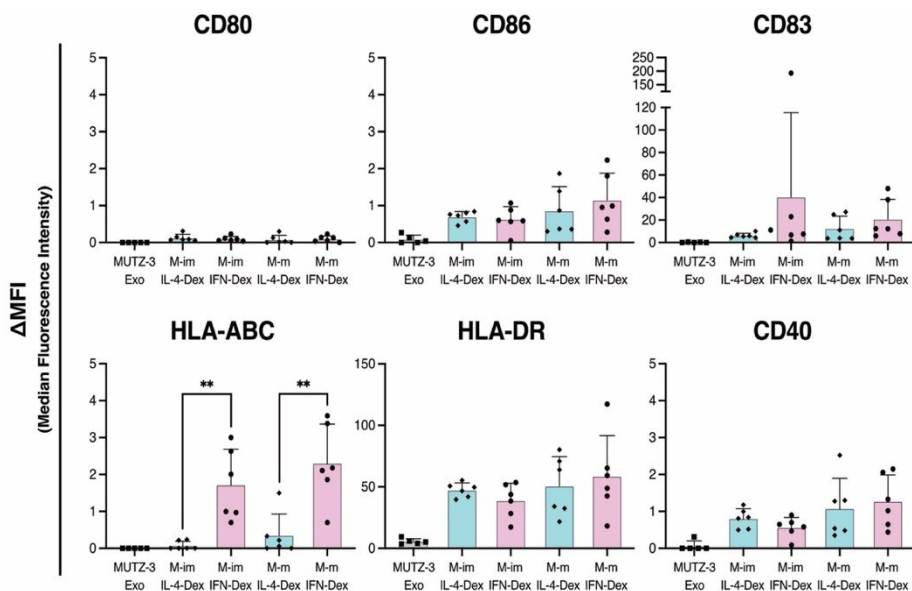


図 4. IL-4 および IFN- γ で分化・成熟した MUTZ3 由来樹状細胞の成熟マーカー発現評価(n=6)

(5) 図 4 の結果から M-mIFN-Dex に関して抗原提示能に関与する HLA-ABC の発現が高いことから、各種 MUTZ3-DC から放出される Dexosome を用いて MART- 1 ペプチドを直接結合させてから健常人

から採取した CD8⁺T 細胞と共培養し、抗原提示能を評価した。共培養 21 日目において、未熟樹状細胞由来の Dexosome である M-iIFN-Dex と比較すると成熟樹状細胞由来の M-mIFN-Dex で有意に高い MART-1 特異的 CD8⁺T 細胞を示したことから、樹状細胞の成熟化により抗原提示能が高い Dexosome を分泌していることを示した。さらに M-mIL-4-Dex と比較すると M-mIFN-Dex で MART-1 特異的 CD8⁺T 細胞が有意に高いことから、IFN- γ で分化・成熟した MUTZ3-DC から放出される Dexosome は優れた抗原提示能を示すことが認められた。

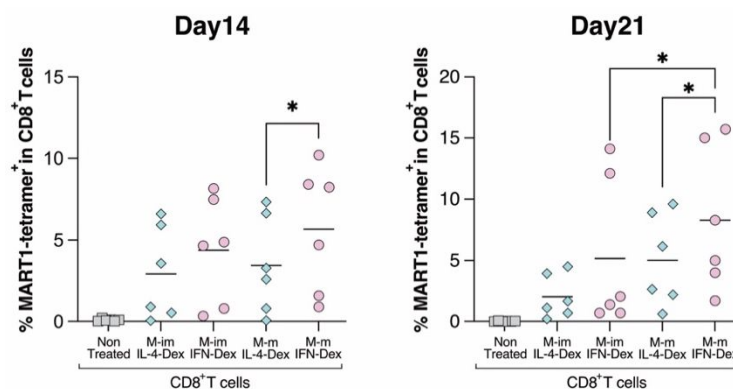


図 5. IL-4 および IFN- γ で分化・成熟した MUTZ3 由来樹状細胞から分泌された Dexosome の抗原提示能評価(n=6)

(6)EGFP-mRNA を IFN- γ で分化・成熟した MUTZ3-DC に電ポレーションにより導入し、24 時間において EGFP が細胞内で発現していることが認められた。また EGFP が発現している細胞は全体の 83%を示した(図 6)。しかし、これらの細胞から放出された Dexosome を抽出し、ヒト単球由来樹状細胞に添加しても細胞内に EGFP の発現が顕微鏡下では確認できなかった。EGFP-mRNA を導入しても Dexosome 内に EGFP が断片として含まれているため機能していない可能性が示唆される。

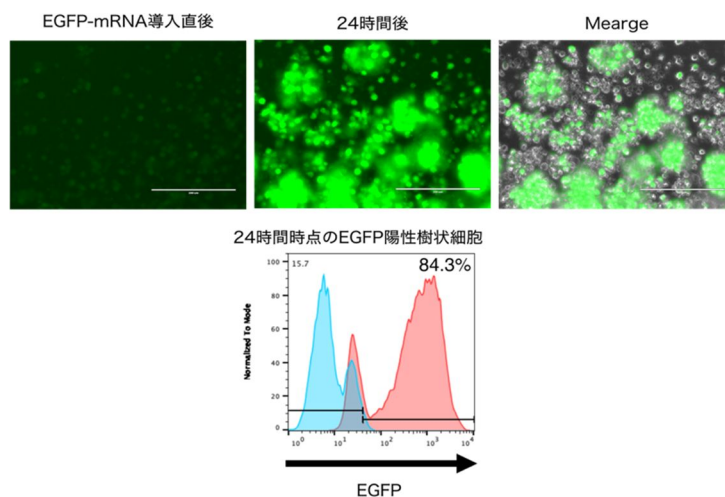


図 6. IFN- γ で分化・成熟した MUTZ3 由来樹状細胞における EGFP-mRNA を導入効率の評価

(まとめ)

個別化医療に資する樹状細胞ワクチン療法の構築を行うためには、優れた抗原提示能を持つ樹状細胞の作製、リソースの問題、電ポレーションに代わる新たな mRNA 導入法の模索が必要である。今回の結果から優れた抗原提示能を持つ細胞株由来樹状細胞が作製でき、潤沢な Dexosome を回収することができた。更に Dexosome 自身の抗原提示能も高いことが認められた。今回作製した Dexosome をネオ抗原由来 mRNA の導入の媒体として用いることで、新たな樹状細胞ワクチン療法の開発に繋がることを期待される。

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 3件）

1. 著者名 Kawaguchi Haruhiko, Sakamoto Takuya, Koya Terutsugu, Togi Misa, Date Ippei, Watanabe Asuka, Yoshida Kenichi, Kato Tomohisa, Nakamura Yuka, Ishigaki Yasuhito, Shimodaira Shigetaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Quality Verification with a Cluster?Controlled Manufacturing System to Generate Monocyte?Derived Dendritic Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 533 ~ 533
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/vaccines9050533	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 Sakamoto Takuya, Koya Terutsugu, Togi Misa, Yoshida Kenichi, Kato Tomohisa, Ishigaki Yasuhito, Shimodaira Shigetaka	4. 巻 23
2. 論文標題 Different In Vitro-Generated MUTZ-3-Derived Dendritic Cell Types Secrete Dexosomes with Distinct Phenotypes and Antigen Presentation Potencies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8362 ~ 8362
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23158362	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂本卓弥
2. 発表標題 クラスター制御培養により機能が向上した樹状細胞ワクチンの作製法
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本卓弥
2. 発表標題 MUTZ-3白血病由来の樹状細胞から放出されるエクソソームの機能評価
3. 学会等名 第70回日本輸血・細胞治療学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 クラスター制御培養による樹状細胞の調整法	発明者 下平滋隆, 小屋照継, 坂本卓弥, 碓美紗	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-204084	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------