

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18116

研究課題名(和文)新機序にもとづくエフェクターT細胞活性化と革新的癌創薬への展開

研究課題名(英文)A novel mechanism of effector T cell activation and its innovative cancer drug discovery

研究代表者

定平 卓也 (Sadahira, Takuya)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：20733322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌抑制遺伝子REIC/Dkk-3を治療遺伝子とする固形癌に対するin-situ 遺伝子治療は、「癌細胞の選択的アポトーシス」と「抗癌免疫の活性化」による相乗的効果増強作用を誘導し、原発巣のみならず転移巣に対しても顕著な治療効果を示すことが複数の動物モデルで実証されている。最近の研究においてREICタンパク質がエフェクターT細胞の抗腫瘍活性を強化する機能を有することが明らかになったことから、本申請研究では、REIC/Dkk-3遺伝子治療を生体内における代謝制御機構を介した抗癌免疫活性化の観点から系統的に解析し、自己癌ワクチン化療法としての免疫学的基盤の確立と革新的癌創薬への展開を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

REIC/Dkk-3遺伝子治療は腫瘍局所での自己の癌細胞のアポトーシスとエフェクターT細胞の機能強化による抗癌免疫活性化を誘導する「自己癌ワクチン化」という新しい癌治療概念を確立するものである。本研究を推進することで、産学連携の推進とあらゆる癌に応用可能な治療法の基盤確立に貢献することが可能と判断される。

研究成果の概要(英文)：In-situ gene therapy using the tumor suppressor gene REIC/Dkk-3 as a therapeutic gene for solid tumors induces synergistic effects of "selective apoptosis of cancer cells" and "activation of anti-cancer immunity" and shows remarkable therapeutic effects on not only primary tumors but also metastases in animal models. Since our recent studies have revealed that REIC protein functions to enhance the anti-tumor activity of effector T cells, this study is designed to systematically analyze REIC/Dkk-3 gene therapy from the viewpoint of anti-cancer immune activation via metabolic control mechanisms in vivo, and to investigate the possibility of using REIC/Dkk-3 gene therapy as an autologous cancer vaccine. This study aims to establish the immunological basis of REIC/Dkk-3 gene therapy as a vaccine-activated therapy and to develop it into an innovative cancer drug discovery tool.

研究分野：癌遺伝子治療

キーワード：遺伝子治療

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

岡山大学の我々のグループにより同定された癌抑制・治療遺伝子 REIC/Dkk-3 は、ヒトの前立腺癌、腎細胞癌、膀胱癌、肝細胞癌、非小細胞肺癌などの癌細胞で高頻度に発現が低下していること、発現低下の主たる要因はプロモーター領域のメチル化によること、前立腺癌では、検討した 52 症例全ての癌組織でタンパク質の発現が低下しており、アデノウイルスを用いて強制発現させると小胞体ストレス応答に基づき癌特異的アポトーシスが誘導されること、REIC/Dkk-3 タンパク質が、樹状様細胞を分化誘導し、マウス生体内での抗癌免疫賦活化に加え、癌抗原特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) の誘導も実証してきた。さらに最近の我々の研究において REIC タンパク質がエフェクター T 細胞 (エフェクター CD8 陽性 T 細胞) を活性化し、高い抗腫瘍作用を有することが明らかにした。

近年、T 細胞における分化、エフェクター機能には細胞内代謝が密接に関わっていることが報告されている。ナイーブ T 細胞は抗原刺激を受けて活性化し、エフェクター細胞へと分化し機能を獲得される際、細胞内代謝は解糖系を中心とした経路へのシフトを必要とする。しかし、がん細胞との代謝競合や多様な免疫抑制機序によって、エフェクター機能を発揮できない免疫疲弊状態に陥っている。代謝制御による抗腫瘍免疫応答増強が非常に重要であり、REIC タンパク質がどのような代謝制御分子機構に基づいて抗腫瘍エフェクター T 細胞を活性化させているのかという「問い」に対する研究を行い、次世代の免疫治療法の開発に挑戦した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新機序にもとづくエフェクター T 細胞活性化機構の解明である。最終的には革新的癌創薬への新展開を目標とした。本研究では、我々の研究グループが独自に保有している REIC タンパク質 (特許 5936129: REIC タンパク質の部分領域ポリペプチド) を用いて「代謝制御を介した癌特異的エフェクター T 細胞の新規活性化機構」の確立により、既に臨床に应用されている免疫チェックポイント分子阻害薬と併用することで従来の免疫治療では想像もできなかったレベルでの抗癌治療効果を有する製剤を創り出すことである。すなわち、本研究を推進することで、様々な癌腫に応用可能な新規の複合免疫療法が確立されることが期待される。REIC/Dkk-3 遺伝子治療に関する特許は岡山大学が保有している。ゆえに、これまで世界で行われていない我々独自の研究である。さらに、我々は薬剤を均一に投与する技術を独自に保有しており遺伝子治療を進めるうえで重要な薬剤投与法の最適化も同時に行った。

3. 研究の方法

本研究方法は、具体的に以下のとおりである。エフェクター T 細胞を解析するために、モデル抗原を有するマウス癌細胞株を樹立する。モデル抗原としては卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) を使用する。前立腺癌株 (PC-3, DU-145, LNCaP)、腎細胞癌株 (RENCA)、膀胱癌細胞株 (MBT-2) に OVA を遺伝子導入し OVA 発現癌細胞株を樹立する。これらの OVA 発現癌細胞株を用いることで免疫正常マウスにおいて種々のモデルが構築可能である。一方で、OVA 特異的エフェクター T 細胞の検出にはテトラマー試薬を用いて検証する。このテトラマー試薬は抗原特異的反応の検出の際に用いられるが、これによって MHC 分子と抗原ペプチドの複合体と結合する免疫細胞を検出することが可能である。テトラマーは蛍光標識されており、反応の検出にはフローサイトメトリー法 (FACS) を用いる。解析の対象は、申請者の定平らが開発した組織内圧を可及的に一定に保ちつつ、治療薬を均一に注入できる画期的な薬剤投与技術: ISPS (In situ permeation system) を用いて REIC/Dkk-3 遺伝子もしくは REIC タンパク質を注入した腫瘍局所に浸潤したリンパ球 (Tumor-infiltrating Lymphocyte: TIL) の解析に加え、必要に応じて血中や脾臓、リンパ節におけるリンパ球も追加する。疲弊マーカー (PD-1, PD-L1, CTLA-4, Tim-3, VISTA) と多機能性マーカー (IFN- γ , IL-2, TNF- α) を検証する。テトラマーで同定された抗原特異的エフェクター T 細胞は MHC・抗原ペプチド複合体との親和性を有しているが、実際に癌細胞に対する細胞障害性の有無に関する評価は不十分のため、蛍光抗体ビーズで分離精製した元の細胞株と反応させて MTT assay により細胞死の程度を評価し、エフェクター T 細胞の細胞障害活性を確認する。さらに、IFN- γ 産生能を評価して機能評価を行う。次に、REIC タンパク質によるエフェクター T 細胞の代謝調節機構を介した抗腫瘍効果の検証を行う。In vitro では CD8 陽性 T 細胞の刺激培養系 (anti-CD3 および CD28) を立ち上げ、CD8 陽性細胞における REIC タンパク質の作用評価が可能な系を既に作成している。これを用いて、naïve/memory phenotype, effector phenotype、各種免疫細胞集団における 2-DG および短鎖脂肪酸 (BODIPY) の取り込み、代謝産物 (メタボライト)、インスリン受容体シグナル、Glut1 発現などを測定し、REIC タンパク質処置群とコントロール群を比較する。また、各種腫瘍細胞株をマウス皮内接種し、腫瘍移植後に REIC タンパク質存在下で培養した OVA 特異的エフェクター T 細胞を養子免疫し、腫瘍に浸潤した OVA 特異的エフェクター T 細胞の疲弊分子、memory phenotype、アポトーシスを FACS により測定する。また、同腫瘍細胞を用いた系において、REIC タンパク質投与により腫瘍に浸潤した癌特異的エフェクター T 細胞の 2-デオキシグルコース (2-DG) の取り込みを OVA テトラマーおよび 2-NBDG により評価する。最後に、免疫チェックポイント分子阻害薬と REIC タンパク

質を併用し、in vivo での抗腫瘍効果を検証する。さらに、エフェクターT細胞に対する代謝制御の分子メカニズムも同時に解析する。申請者の定平はこれまでの先行研究において、CD8陽性T細胞に発現しているケモカインレセプター(CXCR7)がREICタンパク質を結合し、AMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)を活性化しうることを見出している。AMPKは細胞内のATP合成がしたことを感知すると活性化し、細胞内の様々な代謝経路を調節し、細胞内ATPレベルの回復を測ることで注目されている分子であり、解糖系、脂肪酸酸化、アミノ酸代謝など多岐にわたる細胞内代謝を調節している。活性化AMPKの働きとしては、細胞内Glutの細胞膜表面への移行や、ホスホフルクトキナーゼ(PEK)を活性化することで、解糖系の亢進に寄与する。また、AMPKは抗酸化物質グルタミン酸の代謝に関わっており、腫瘍微小環境での酸化ストレスの制御においても重要な役割を担っている。つまり、CD8陽性T細胞におけるAMPK活性はエフェクター機能発揮、維持の鍵となると言え、REICタンパク質がエフェクターT細胞活性化剤として機能することを示唆していることを検証した。

4. 研究成果

本邦では抗PD-1抗体に続いて抗CTLA-4抗体が承認され、免疫チェックポイント阻害抗体を用いたがん免疫治療はすでに有効な治療法の1つとして広く認識されている。現在、これら免疫チェックポイント分子阻害薬の対象となる癌腫の適応は年を追うごとに広がりを見せている。免疫チェックポイント分子阻害薬は、T細胞を活性化することで効果を発揮する。このことは抗腫瘍免疫応答の中でも、エフェクターT細胞の活性が重要であることを示唆している。近年では同治療のさらなる進展のため、バイオマーカーや他の治療との併用が注目されている。これまでの研究活動で、REIC/Dkk-3遺伝子治療による抗腫瘍効果のメカニズムは、REIC遺伝子強制発現により癌細胞特異的アポトーシスが誘導され癌抗原が放出されることと、分泌されたREICタンパク質の作用により抗原提示細胞が誘導され放出された癌抗原をT細胞に提示し、抗原提示を受けたT細胞が活性化され抗原特異的CTLに分化し、抗腫瘍効果を発揮するものであった。しかし、REICタンパク質がどうしてCD8陽性T細胞のエフェクターとしての機能を活性化するかは不明であった。本研究でCD8陽性T細胞に発現するケモカインレセプター(CXCR7)がREICタンパク質のリガンドであることを確認した。さらに、REICタンパク質の刺激を受けたCD8陽性T細胞がある特定の代謝制御分子機構を介してエフェクターT細胞に分化し、抗腫瘍作用活性を亢進させることを実験により見出した。また、一連の研究は腫瘍に均一に薬剤を投与する実験から見出されたものであり、薬剤投与法の重要性も併せて示唆する成果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------