

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18171

研究課題名（和文）アデノ随伴ウイルス-CRISPR/Cas9を用いた卵巣癌の新規遺伝子治療戦略

研究課題名（英文）Novel gene therapy strategy for ovarian cancer using adeno-associated virus-CRISPR/Cas9

研究代表者

八幡 環（Yahata, Tamaki）

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90647562

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）：本研究ではAAV-CRISPR/Cas9を用いて、卵巣癌のPD-L1を標的とする新規遺伝子免疫療法モデルを開発し、その有効性について検討した。腫瘍のPD-L1遺伝子を欠損させるためのPD-L1-AAV粒子を作製した。マウス腹膜播種モデルにおいて、PD-L1-AAV粒子投与群は対照群と比較して生存期間が有意に延長した。免疫組織化学的検査では、PD-L1-AAV粒子投与群では対象群と比較して、腫瘍内のCD4陽性・CD8陽性T細胞数が有意に増加し、制御性T細胞数は有意に減少した。AAV-CRISPR/Cas9による卵巣癌のPD-L1を標的とする遺伝子免疫療法の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌におけるPD-L1を標的とした抗体療法の研究は複数報告されているが、AAV-CRISPR/Cas9を用いた卵巣癌の標的遺伝子に対する治療モデルの報告はない。本研究ではAAV-CRISPR/Cas9を用いることで、マウスに直接接種し、腫瘍のPD-L1遺伝子を改変することが可能となった。マウス卵巣癌腹膜播種モデルにおいて、PD-L1-AAV粒子を直接投与することで、腫瘍免疫応答を誘導し、重篤な有害事象を引き起こすことなく、腫瘍抑制効果を示すことが実証された。本研究成果はAAV-CRISPR/Cas9を介したPD-L1を標的とした新規免疫遺伝子治療が、臨床試験に向けての基盤研究となると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a novel gene immunotherapy model targeting PD-L1 in ovarian cancer using AAV-CRISPR/cas9 and investigated its efficacy. We produced PD-L1-AAV particles for knockout of PD-L1. In the peritoneal dissemination model, the survival time was significantly longer in the PD-L1-AAV particles-treated group compared to the control group. Immunohistochemically, the numbers of intratumoral CD4+ T cells, and CD8+ T cells were significantly higher, whereas that of regulatory T cells was significantly lower in the PD-L1-AAV particles-treated group compared to the control group. There were no specific severe adverse events in the organs such as lungs, livers, kidneys, and spleens. AAV-CRISPR/Cas9 may be a potential gene immunotherapy targeting PD-L1 in ovarian cancer.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：卵巣癌 PD-L1 AAV-CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌はその半数以上が初回診断時に腹膜播種を伴う進行症例である。進行症例に対する治療は腫瘍減量手術と化学療法が主となるが、長期予後は依然として改善されないままである。そのため、長期生存に寄与するような新規標的治療法の開発が必要である。癌が増殖進展するメカニズムとして、腫瘍微小環境において癌細胞が特異的に誘導する免疫寛容システム、宿主免疫監視からの回避能が必須であり、この機構の存在が従来の免疫療法の効果が不十分な原因と考えられている。申請者は過去の研究において、免疫寛容の主役である PD-L1/PD-1 経路に着目し、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 system を用いて、PD-L1 遺伝子を完全にノックアウトした卵巣癌細胞株 (PD-L1-KO ID8) を樹立し、腹膜播種モデルを用いて検討し、PD-L1-KO ID8 移植マウスでは Control ID8 移植マウスと比較して、腫瘍微小環境内への CD8⁺ T 細胞・NK 細胞・M1 マクロファージの浸潤数が増加し、生存期間が延長することを実証した。さらに PD-L1-KO ID8 移植マウスでは抗 PD-L1 抗体療法を行った Control ID8 移植マウスと比べて腫瘍重量は有意に減少することを示した (Yahata et al. Cancer Sci 2019)。同研究では細胞レベルでこれらの遺伝子をノックアウトしているため、臨床応用に向けては CRISPR/Cas9 による遺伝子編集を in vivo でいかに行うかという課題が解決していなかった。そこで申請者は、卵巣癌に発現する PD-L1 を直接欠損させる CRISPR/Cas9 を in vivo で実用化するために AAV-CRISPR/Cas9 system に着目した。AAV-CRISPR/Cas9 を卵巣癌細胞特異的に誘導し、PD-L1 を直接欠損させることで、腫瘍増殖抑制効果を見出すことが可能であるか、安全性は忍容可能かを明らかにした上で、本システムを用いた進行卵巣癌に対する新規の遺伝子・免疫療法の開発を目指して、以下の研究を計画した。

2. 研究の目的

AAV-CRISPR/Cas9 system を用いた卵巣癌進展に関与する PD-L1 を標的とした新規遺伝子・免疫療法の開発を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変用 PD-L1-AAV 粒子の作製

DNA 実験安全委員会の承認を得て本研究を行った。PD-L1 遺伝子のゲノム領域断片 (PD-L1 改変 vector 用) と Guide-down-control annealed oligos (Control vector 用) を pAAV-Guide-it-down にそれぞれ組み込み、Stellar Competent Cells を transformation する。これを培養し、菌体を回収後、DNA の精製を行った (名称: pAAV-Guide-down-PD-L1 Vector、pAAV-Guide-down-Control Vector)。次に作製した pAAV-Guide-down-PD-L1、または pAAV-Guide-down-Control Vector と pAAV-Guide-it-Up を各々 pRC2-mi342 Vector、pHelper Vector とともに HEK 293T 細胞株にトランスフェクトし、AAV 粒子を作製した (名称: PD-L1-AAV 粒子、Control-AAV 粒子)。

(2) マウス卵巣癌細胞株における PD-L1-AAV 粒子の in vitro 実験

In vitro において PD-L1-AAV 粒子をマウス卵巣癌細胞株 (ID8) に異なる multiplicity of infection (MOI) で transduce し、Flow cytometry を用いて蛋白レベルでの腫瘍細胞の PD-L1 発現を評価した。

(3) 卵巣癌担癌マウスへの PD-L1-AAV 粒子投与による治療効果の検討

動物実験委員会の承認を得て実験を行った。In vivo において卵巣癌細胞株を野生型マウスに移植後、腹膜播種モデルを作製した。続いて PD-L1-AAV 粒子を腹腔内投与し、生存期間を Control-AAV 粒子を投与したマウスと比較検討した。また別実験にて腹膜播種モデルに PD-L1-AAV 粒子を腹腔内投与後、腫瘍を回収し、腫瘍重量と腹水量を比較検討した。さらに免疫組織化学的染色にて、腫瘍内の CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、T-reg 細胞数を比較検討した。

(4) 卵巣癌担癌マウスへの AAV 粒子投与による有害事象の検討

PD-L1-AAV 粒子を投与した際の影響を評価するために、マウス内の主要な臓器を摘出し、HE 染色を実施し、構造学的な異常の有無について評価した。

4. 研究成果

(1)(2) 遺伝子改変用 PD-L1-AAV 粒子の作製とマウス卵巣癌細胞株の in vitro 実験

まず、PD-L1-AAV 粒子、Control-AAV 粒子を作製した (図 1)。PD-L1-AAV 粒子による in vitro 実験において、ID8 細胞に PD-L1-AAV 粒子を MOI=10, 100, または 1000 で形質導入後、フローサイトメトリーにて PD-L1 の KO 効率を確認した。結果、Control-AAV 粒子を形質導入した群では、IFN- γ 添加下で PD-L1 の発現は抑制されなかった。一方で、PD-L1 AAV 粒子を形質導入した群では、IFN- γ 添加下において、それぞれ、1.02%、1.46%、and 3.38%と濃度依存性に PD-L1 発現が抑制された (図 2)。

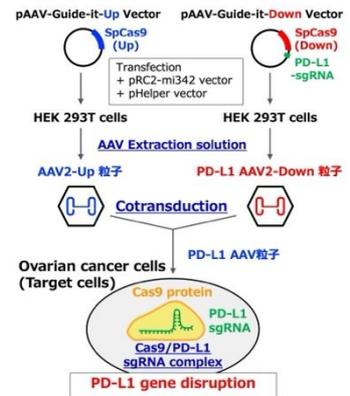


図 1. PD-L1-AAV粒子の構築

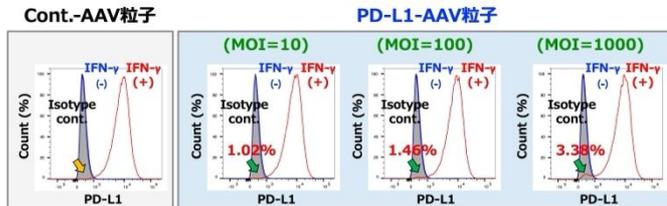


図 2. in vitroにおいてPD-L1-AAV粒子は濃度依存的にPD-L1を抑制する

(3) 卵巣癌担癌マウスへの PD-L1-AAV 粒子投与による治療効果

生存期間の比較では、Control-AAV 粒子で治療した群と比べ、PD-L1-AAV 粒子で治療した群では生存期間が有意に延長した (図 3)。また、腫瘍重量と腹水量の比較では、Control-AAV 粒子で治療した群と比較して、PD-L1-AAV 粒子で治療した群では腫瘍量が有意に減量することが示された。なお、両群における腹水量の差は認めなかった (図 4)。次に播種腫瘍における腫瘍浸潤リンパ球の数は Control-AAV 粒子で治療した群と比べて、PD-L1 AAV 粒子で治療した群では CD4 陽性 T リンパ球、CD8 陽性 T リンパ球が有意に増加し、一方で Treg cell は有意に減少した (図 5)。

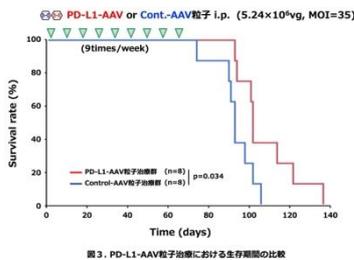


図 3. PD-L1-AAV粒子治療における生存期間の比較

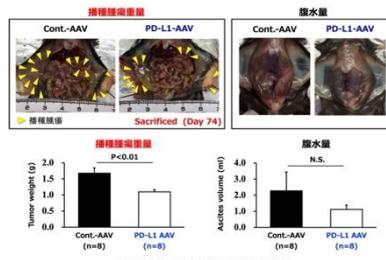


図 4. PD-L1-AAV粒子治療の腫瘍重量の比較

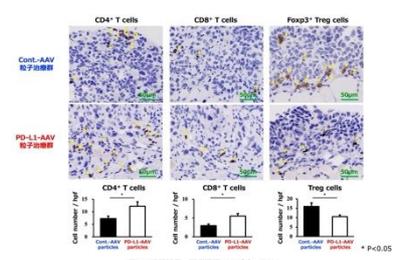


図 5. 播種腫瘍の腫瘍浸潤リンパ球の比較

(4) 卵巣癌担癌マウスへの AAV 粒子投与による有害事象

PD-L1 AAV 粒子治療を行った際の正常臓器への影響について検証を行い、肺、脾臓、肝臓、腎臓において、両群で有意な構造異常は認めなかった。

結論として、本研究結果は、AAV-CRISPR/Cas9 system を用いて腫瘍の PD-L1 遺伝子を欠損させることで、卵巣癌の腫瘍微小環境内で腫瘍浸潤リンパ球を増加させることにより、細胞増殖を抑制し、抗腫瘍免疫を促進させること実証した。したがって、AAV-CRISPR/Cas9 system を用いて PD-L1 遺伝子を標的とすることが、卵巣がんに対する新規遺伝子・免疫治療となり得ると考える。最後に、本研究結果は現在英文論文に投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Tamaki Yahata
2. 発表標題 Adeno associated virus-CRISPR/Cas9 mediated ovarian cancer treatment targeting PD-L1 gene in vivo
3. 学会等名 第64回婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八幡 環
2. 発表標題 アデノ随伴ウイルス-CRISPR/Cas9を用いた卵巣癌のPD-L1遺伝子を標的とした新規遺伝子治療戦略
3. 学会等名 第63回婦人科腫瘍学会学術講演会
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
---------------------------	-----------------------	----

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