

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：83901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21549

研究課題名(和文) 様々な免疫原性の腫瘍細胞が混在するヘテロジニアスな難治性腫瘍に対する治療法の開発

研究課題名(英文) Development of cancer immunotherapy for heterogenous tumor including multiple immunogenic tumors.

研究代表者

村岡 大輔 (Muraoka, Daisuke)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫制御TR分野・ユニット長

研究者番号：20608955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍は、発現する抗原の免疫原性により高免疫原性腫瘍と低免疫原性腫瘍に大別される。近年、ヒト臨床腫瘍では、高免疫原性腫瘍部と低免疫原性腫瘍部が混在することが明らかになっており、このような腫瘍はがん免疫療法に対し抵抗性になることが明らかになっている。本研究では、独自開発した、マウスヘテロ腫瘍モデルを用いて、このようなヘテロ腫瘍では各腫瘍部において免疫関連状態のみではなく細胞外基質関連遺伝子の発現も異なることを見出した。また、当腫瘍に対する治療法として、細胞輸注療法を軸とした治療法が効果的であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高免疫原性腫瘍と低免疫原性腫瘍が混在するヘテロジニアスな腫瘍が、どのような機構により免疫療法に対する感受性を獲得するかは依然として不明な点が多い。本研究では、このようなヘテロ腫瘍において、免疫原性の違いが、細胞外基質など腫瘍の構造形成の根幹にかかわる遺伝子発現にまで影響を及ぼすことを明らかにした。また、このような腫瘍には細胞輸注療法を軸とする治療法が効果的であることも明らかにした。以上の結果を組み合わせ発展させることで、今後のがん免疫療法の開発に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Tumors are broadly classified into highly immunogenic tumor and poorly immunogenic tumors based on the immunogenicity of the antigen expressed. In recent years, it has revealed that human clinical tumors contain both highly and poorly immunogenic tumors, and that such tumors are resistant to cancer immunotherapy. In this study, using a mouse heterogenous tumor model, we found that not only immune-related genes, but also extracellular substrate-related gene expression was different in each tumor site of such heterogenous tumors. We also found that cell transfusion therapy is an effective treatment for these tumors.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

腫瘍は、発現する抗原の免疫原性により高免疫原性腫瘍と低免疫原性腫瘍に大別される。研究代表者は、腫瘍の免疫原性が腫瘍環境や免疫療法の治療効果と相関することを明らかにしてきた。高免疫原性腫瘍は腫瘍関連マクロファージ(Tumor Associated Macrophage; TAM)が活性化しており免疫療法に対し感受性だが、低免疫原性腫瘍は TAM が非活性化状態で免疫療法に対し抵抗性である[1]。一方、様々な免疫原性の腫瘍が混在するヘテロジニアスな腫瘍が、免疫療法に対して抵抗性になることが明らかになってきた[2] [3]。この様な報告と同様に、研究代表者も、高免疫原性腫瘍と低免疫原性腫瘍が混在するヘテロマウス腫瘍皮下移植モデルを構築し独自に検討を進める中で、下記の 3 点を見出した。①ヘテロジニアスな腫瘍は免疫療法に対し抵抗性を示す。②免疫療法後の腫瘍局所には、低免疫原性腫瘍のみならず高免疫原性腫瘍も多く残存する。③低免疫原性腫瘍に対する免疫誘導のみならず高免疫原性腫瘍に対する免疫誘導も減弱する。しかし、このように腫瘍のヘテロ性と免疫療法に関する知見は増えてきたものの、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

研究代表者は、現在までの知見から、腫瘍局所で低免疫原性腫瘍が、高免疫原性腫瘍に何らかの働きかけを行うことで、腫瘍全体が免疫療法に対する抵抗性を獲得するのではと考えた。そこで、本研究では、「低免疫原性腫瘍がどのようにして、免疫療法抵抗性の獲得に寄与するのか」を明らかにすることを目指す。具体的には、ヘテロ腫瘍モデルにおいて低免疫原性腫瘍が、どのような因子を用いて免疫療法抵抗性を導くのかを免疫組織学的解析および網羅的な遺伝子発現解析を用いて検討する。また、これに加えヘテロ腫瘍に対して有効な治療法の探索も行う。

3. 研究の方法

研究代表者は、CMS5a 線維肉腫が低免疫原性腫瘍であること、そして CMS5a にヒト NY-ESO-1 タンパク質を強制発現させた CMS5a/NY が高免疫原性腫瘍であることを同定している[1]。本申請研究では、CMS5a の低免疫原性を損なわず、当腫瘍の追跡を可能にするシステムとして、当細胞に CD90.1 を発現させた CMS5a/CD90.1 を作製し、これらと高免疫原性腫瘍(CMS5a/NY)を混合移植する独自のヘテロマウス腫瘍皮下移植モデルを構築し検討した。具体的には、CMS5a/NY (高免疫原性:CD90.1 発現なし)と CMS5a (低免疫原性:CD90.1 発現あり)を混合し BALB/c マウスに皮下移植しモデルを作製した。移植腫瘍は回収後、免疫組織学染色により解析した。また、CD90.1 の陽性部位を低免疫原性腫瘍部位、CD90.1 陰性部位を高免疫原性部位としてレーザーマイクロダイセクションにより別々に回収し、RNA-seq 解析により、各部位における網羅的遺伝子発現解析を行った。治療実験は高免疫原性腫瘍 CMS5a/NY を認識する TCR を発現する遺伝子操作マウスを用いて、ヘテロ腫瘍マウスモデルに対する腫瘍縮小効果を検討した。CMS5a/NY と低免疫原性腫瘍のヘテロ腫瘍皮下移植モデルに、当遺伝子操作マウスから回収した CD8 陽性細胞による細胞輸注療法を施した。また、マウスには、細胞輸注療法の前処置として、抗がん剤投与もしくはがんワクチンを施してそれぞれの効果を検討した。

4. 研究成果

腫瘍の高免疫原性部位と低免疫原性部位の違いを免疫組織化学染色にて比較した。その結果、低免疫原性部位に比して、高免疫原性部位では腫瘍局所マクロファージが活性化しており MHC class II の発現が高くなっていた。また制御性 T 細胞(Treg)が多く局在していることが確認された(図 1)。

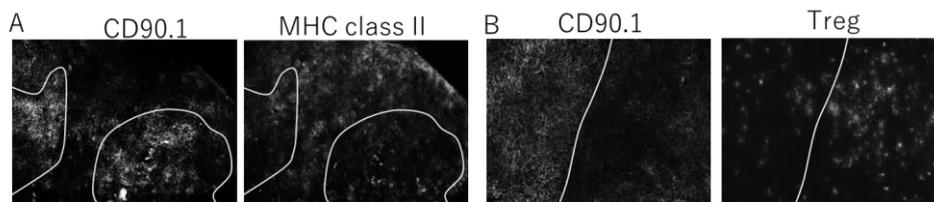


図 1. ヘテロ腫瘍におけるマクロファージの活性化および Treg の局在
A) マクロファージの活性化マーカー MHC class II の分布 B) Treg の局在

次に、CD90.1 の発現を指標にして、腫瘍の高免疫原性部位と低免疫原性部位の網羅的遺伝子発現解析をおこなった。各部位の全体の遺伝子発現を比較したが、大きな違いは観察されなかった。また、各部位における、全遺伝子の相関関係を検討も検討したが、高免疫原性部位と低免疫原性部位にて発現する遺伝子は高い相関関係にあり、多くの遺伝子が共通で発現していた(図2)。次に、発現が優位に異なる遺伝子について解析した。その結果、高免疫原性部位で 18 遺伝子、低免疫原性部位で 7 遺伝子の発現がそれぞれ優位に高かった(図3)。

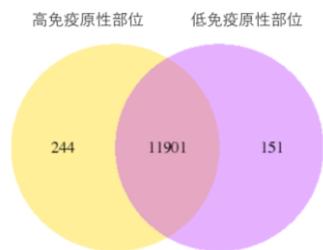


図 2. 高免疫原性部位と低免疫原性部位における発現遺伝子数

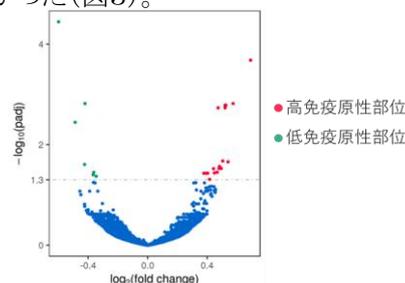


図 3. 高免疫原性部位と低免疫原性部位に発現する遺伝子のボルケーノプロット

次に、当遺伝子発現データのオントロジー解析を行った。活性酸素に関連する遺伝子群や細胞接着気質に関連する遺伝子群の発現が優位に異なることが明らかになった。その他、免疫関連遺伝子として、ミエロイドの活性化に関わる遺伝子や好中球の活性化に関わる遺伝子の発現が優位に異なっていた(図 4)。

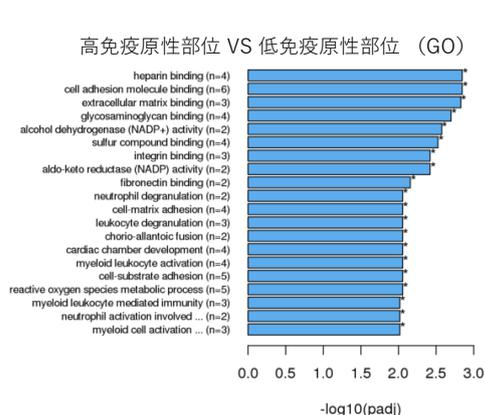
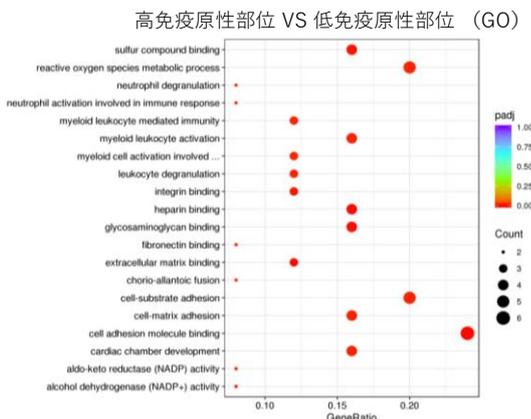


図 4. 高免疫原性部位と低免疫原性部位における発現遺伝子の GO Ontology 解析



また、網羅的遺伝子発現データの KEGG 解析も行った。その結果、細胞外マトリクスに関連する遺伝子群や細胞接着、細胞骨格調整に関わる遺伝子群の発現が優位に異なっていた(図 5)。

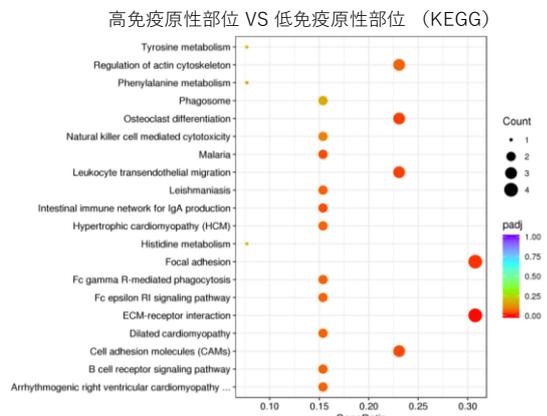
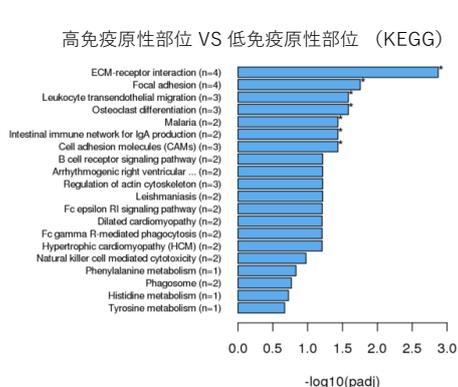


図 5. 高免疫原性部位と低免疫原性部位における発現遺伝子の KEGG 解析

本研究に用いた、ヘテロジニアス腫瘍モデルは免疫チェックポイント阻害療法に対して抵抗性を示す。近年臨床現場では、当治療に加え細胞輸注療法に注目が集まっている。研究代表者は、高免疫原性腫瘍 CMS5a/NY が発現する抗原を認識する TCR が導入された遺伝子操作マウスを用い、ヘテロジニアスな腫瘍モデルに対する細胞輸注療法の効果を検討した。その結果、細胞輸

注療法単独では、当ヘテロ腫瘍に対する治療効果は発揮されなかったが、細胞輸注療法の前処置としてワクチンを施すことで、強い抗腫瘍効果が発揮されることを明らかにした。また、ワクチンの他、化学療法を前処置として施すことで、細胞輸注療法の効果が顕著に増強することも見出した。

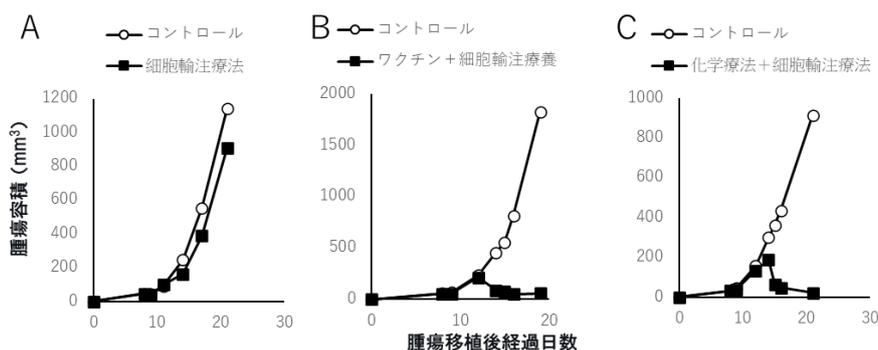


図 6. ヘテロ腫瘍に対する治療法の検討

A) 細胞輸注療法のみを施行、B) 前処置としてワクチンを投与し、細胞輸注療法を施行、C) 前処置として、化学療法(フルダラビン)を投与し、細胞輸注療法を施行

以上、本研究によりヘテロ腫瘍において高免疫原性部位と低免疫原性部位では、Tregをはじめとする免疫抑制性細胞の局在に違いがあることや、細胞外基質や細胞接着分子などの遺伝子発現がことなることが明らかになった。今後、このような違いが、免疫原性の違いによりどのように生じるのかを検討することで、さらに大きな知見が得られると考える。また、当ヘテロ腫瘍モデルは、細胞輸注療法と基盤とした治療により優位に腫瘍退縮が導かれることも示された。このような効果を発揮するには、ワクチンや化学療法による前処置が必須であるが、その理由は本研究では明らかにされていない。当処置の意義を明らかにすることは、より臨床に近い治療法の確立に繋がると期待される。

参考文献

1. Muraoka, D., et al., *Antigen delivery targeted to tumor-associated macrophages overcomes tumor immune resistance*. J Clin Invest, 2019. **129**(3): p. 1278-1294.
2. Gejman, R.S., et al., *Rejection of immunogenic tumor clones is limited by clonal fraction*. Elife, 2018. **7**.
3. Wolf, Y., et al., *UVB-Induced Tumor Heterogeneity Diminishes Immune Response in Melanoma*. Cell, 2019. **179**(1): p. 219-235 e21.

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 Daisuke Muraoka, Yosuke Dotsu, Yudai Sonoda, Akira Asai, Hiroaki Ikeda
2. 発表標題 Low molecular weight compound enhancing NF-κB signaling augments the T cell activation and anti-tumor immune response
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 道津洋介、村岡大輔、園田祐大、浅井章良、迎 寛、池田裕明
2. 発表標題 NF-κBシグナリングを介して腫瘍抗原直接認識能を向上する低分子化合物は腫瘍抗原特異的T細胞輸注療法の効果を増強する
3. 学会等名 第24回がん免疫学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------