

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19449

研究課題名(和文)自然免疫関連遺伝子を用いた新しい全細胞型がんワクチンの開発

研究課題名(英文)Development of whole cell cancer vaccine using innate immune-related genes

研究代表者

清野 研一郎(Seino, Ken-ichiro)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：20312845

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)：本研究では、がんワクチンの中でも全腫瘍細胞ワクチン(WTCV)のメカニズムについて検討した。本研究では、腫瘍細胞内のインターフェロン制御因子7(Irf7)が免疫原性を制御する上で重要であることを示した。実際、Irf7関連遺伝子を増強したWTCVは、放射線による腫瘍不活化後にワクチン接種すると、顕著な再発予防効果を発揮した。さらに、ワクチン効果につながるメカニズムは、インターフェロン- γ 産生B細胞によって媒介された。この研究は、腫瘍の免疫原性を増強し、再発予防としてWTCVを使用する方法について新たな洞察を与えるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Irf7軸の3因子であるIrf7、Irf44、Usp18をがん細胞に導入することで、WTCVの再発予防効果を増強できることが明らかになった。Irf7軸がワクチン効果を増強するメカニズムとして、IFN γ を産生するB細胞が抗腫瘍免疫応答を増強した。この治療戦略の研究と開発が進めば、がんの再発を予防する新たな治療法が確立され、より多くの患者がこの治療法の恩恵を受けられるようになるかもしれない。これらを総合すると、今回の知見は、がんにおけるIrf7軸を標的とした再発予防がんワクチンの今後の研究を促し、臨床における予防的治療として応用される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Among cancer immunotherapy, cancer vaccines can potentially prevent recurrent tumors by using the exquisite power and specificity of the immune system. Specifically, whole tumor cell vaccines (WTCVs) based on surgically resected tumors have been considered to elicit robust anti-tumor immune responses by exposing various tumor-associated antigens to host immunity. In this study, we indicate the importance of the interferon regulatory factor 7 (Irf7) axis within tumor cells in regulating immunogenicity. Indeed, WTCVs that augmented the Irf7 axis have exerted remarkable recurrence-preventive effects when vaccinated after tumor inactivation by radiation. The mechanism leading to vaccine effectiveness was mediated by interferon-gamma-producing B cells. This study provides novel insights into how to enhance tumor immunogenicity and use WTCVs as recurrence prophylaxis.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：がんワクチン

1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法の中でも、がんワクチンは特に、自己抗原とは異なる腫瘍特異的抗原に対して活性な腫瘍特異的 T 細胞集団を樹立することにより、がん細胞を破壊することを目的としている。がんワクチンは、細胞ベース、タンパク質/ペプチドベース、遺伝子ベースに分類される。タンパク質/ペプチドベースのワクチンや遺伝子ベースのワクチンを製造する際には、最適な腫瘍特異的抗原候補を決定する必要があるが、細胞ベースのワクチンを製造する際にはその必要はない。細胞由来ワクチンには、腫瘍細胞全体、腫瘍細胞溶解物、あるいは腫瘍関連抗原 (TAA) が結合した樹状細胞が含まれ、一般に患者由来の自己細胞から製造されている。細胞ベースのワクチンとして最もよく知られているのは樹状細胞ワクチンの一つである Sipuleucel-T であり、米国では進行前立腺癌の治療に臨床使用が承認されていた。しかし、この戦略は臨床試験で全生存期間をわずか 4 カ月しか改善しなかった。結局、商業的および費用対効果の懸念から、承認は撤回された。

対照的に、患者から採取した全腫瘍細胞ワクチン (WTCV) には多様な TAA が含まれており、理論的には、体内に接種すれば幅広い抗腫瘍免疫反応を引き起こすことができる。とはいえ、メラノーマ腫瘍を用いた臨床試験では、客観的な臨床反応が観察された症例は 10% 未満であったため、結果は限定的であった。この治療法を成功させるためには、腫瘍細胞の免疫原性を改善しなければならない。一つの戦略は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) を分泌するように遺伝子改変した腫瘍細胞を用いることである。マウス腫瘍モデルを用いた多くの研究で、GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞による WTCV が強力な全身免疫を誘導することが証明されている。もう一つの戦略は、腫瘍細胞の免疫原性を増強することであり、インターフェロン (IFN) によって惹起される抗ウイルス反応も有用であると考えられている。IFN 経路の増強は、自然免疫と適応免疫のあらゆる側面において、最も重要な免疫原性の誘因のひとつである。事実、I 型または II 型 IFN を腫瘍細胞に導入することで、特定のがんにおいてがんワクチンの有効性が増強されることが確認されている。

一方、我々は以前、いくつかのがん細胞株を用いた WTCV において、腫瘍細胞に放射線を照射すると高いワクチン効果が得られることを示している (Abe et al. *Hum Cell* (2016) 29:58-66)。しかしそのメカニズムはこれまで不明であった。

2. 研究の目的

我々が見出した WTCV のメカニズムを明らかにし、そこから明らかになった因子をワクチン効果の低いがん細胞に導入することで、新たながんワクチン療法の可能性を検討することを目的とした。がんワクチンの研究にもかかわらず、現在のところ、WTCV として臨床適応となったアプローチはない。したがって、がんワクチンに関する基礎研究は重要であり、臨床的に有益な方法を探求する絶好の機会となる。

3. 研究の方法

以前の研究で WTCV 効果の高いがん細胞株と低い細胞株の遺伝子発現を次世代シーケンサーで比較検討した。その結果効果の高い細胞株で発現の高い遺伝子を抽出し、それを低い細胞株に遺伝子導入した。WTCV の効果判定は、ナイーブな腫瘍細胞をのちに接種し、腫瘍形成を見ることで行った。腫瘍を形成されたマウスのリンパ節から細胞を採取し、シングルセル RNA 解析により免疫細胞の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現

放射線照射後の各がん細胞株の遺伝子発現を調べた。WTCV 効果の高い細胞株において発現量の多い順に、Irf7、IFN 誘導タンパク質 44 (Irf44)、ユビキチン特異的ペプチダーゼ 18 (Usp18)、2-5-オリゴアデニル酸合成酵素 3 (Oas3) の 4 つの自然免疫関連遺伝子が抽出された。これらの抽出因子は、ウイルス感染に対する免疫応答で誘導される IFN を制御する重要な役割を担っている。興味深いことに、ワクチン効果の有無にかかわらず、I-III 型を含むいずれの IFN の発現においても、がん細胞間で差は認められなかった。これらの結果は、がん細胞における Irf7、Irf44、Usp18、Oas3 が、IFN 産生に依存しない形でワクチン効果に寄与し、その結果、WTCV として使用した場合に再発予防につながる可能性を示唆している。

(2) ワクチン効果の低い細胞株への遺伝子導入

WTCV としての腫瘍抑制効果に関する 4 つの候補因子の重要性を評価するために、まず、ワクチン効果のあるがん細胞で最も高発現していた Irf7 を、ワクチン効果のない 4T1A に導入したがん細胞株を樹立した。樹立したがん細胞株における Irf7 の発現は、リボ核酸 (RNA) とタンパク質レベルで確認した。照射した Irf7 トランスジェニック 4T1A を皮下免疫し、2 週間後にナイーブ腫瘍をチャレンジしたマウスは、空のベクターを導入した 4T1A をワクチン接種した対照群と比較して、腫瘍の発生が遅延し、生存期間が延長することが観察された。さらに、すでに中程

度のワクチン効果を示した CT26 を用いて Irf7 導入細胞株を樹立しその能力を評価した。ワクチン接種アッセイでも同様の結果が得られた。これらのデータは、WTCV によるワクチン効果における Irf7 の価値を示している。

より優れた腫瘍抑制率を達成するために、Irf7 に加えて、ワクチン効果のある癌細胞で 2 番目に高発現する遺伝子である Irf44 を発現する形質転換 4T1A を樹立した。しかし、この細胞株を用いた WTCV ではワクチン効果をさらに高めることはできなかった。さらに、ワクチン効果のあるがん細胞株で 3 番目に高発現した遺伝子である Usp18 を Irf7 および Irf44 トランスジェニック 4T1A に導入した。Irf7/Irf44/Usp18 トランスジェニック 4T1A によるワクチン接種されたマウスは腫瘍発症の劇的な抑制効果を示した。最も注目すべきは、Irf7/Irf44/Usp18 の 3 遺伝子を導入した CT26 による WTCV は、腫瘍の発生を完全に抑制し 100% の生存率を示したことである。同様に、ワクチン効果のない 3LL 細胞への 3 遺伝子の導入は、腫瘍抑制効果の著しい改善をもたらした。

上記のように CT26 では極めて良好な結果が得られたが、4T1A では満足のいく結果、すなわち 100% の腫瘍抑制はまだ達成されていない。そこで、4T1A でより高いワクチン効果を得るために、ワクチン効果のあるがん細胞で Irf7、Irf44、Usp18 に次いで 4 番目に高発現している遺伝子である Oas3 も導入した。興味深いことに、がん細胞への遺伝子導入がワクチン効果に及ぼすこれまでの効果は、Oas3 の導入によってキャンセルされた。これらの観察結果は、4T1S のようなワクチン効果のあるがん細胞が生み出す抗腫瘍効果は、Oas3 ではなく、Irf7、Irf44、Usp18 に依存していることを示唆している。

(3) メカニズム解析

がん細胞中の Irf7 が WTCV の抗腫瘍効果を増強することを理解するために、Irf7 がほとんど発現していない 4T1A と Irf7 が高発現している 4T1S をマウスに投与し、ワクチン接種 14 日後（腫瘍チャレンジの日）にリンパ節細胞のシングルセル RNA シークエンシングを行った。その結果、4T1A または 4T1S ワクチン接種によって誘導された CD4+ T、CD8+ T、および CD19+ B 細胞分画において、顕著な集団差が観察された。

特に CD19+B 細胞分画についての解析では、9 つの遺伝子が 4T1S ワクチン接種マウスリンパ節内の細胞でアップレギュレートされた。注目すべきことに、それらは IFN 産生の正の制御に関連している遺伝子群であった。以前の研究で、二次リンパ組織の細胞由来の IFN 発現がワクチン効果に関与している可能性が示唆されていたので、この変化に注目した。IFN +CD19+ B 細胞は CD20 を発現している。そこで、抗 CD20 抗体を投与したマウスで 4T1S ワクチン接種による抗腫瘍効果を調べその寄与を評価した。抗 CD20 抗体を投与すると、40 日以内に 100% 腫瘍が発生し、最終的に全個体が死亡した。したがって、ワクチン効果は完全にキャンセルされた。以上の観察結果を総合すると、ワクチン効果を持つがん細胞内の Irf7 が B 細胞に直接的または間接的に作用して B 細胞由来の IFN 発現を増加させ、これらの細胞集団が再発予防効果を発揮するというシナリオが示唆された。

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 1件）

1. 著者名 Kajihara Nabeel, Tanaka Yoshino, Takeuchi Riko, Kobayashi Takuto, Tanji Masafumi, Ataka Tsukasa, Nakano Shiho, Yamada Taisho, Takaoka Akinori, Hasegawa Yoshinori, Seino Ken-ichiro, Wada Haruka	4. 巻 12
2. 論文標題 Augmented interferon regulatory factor 7 axis in whole tumor cell vaccines prevents tumor recurrence by inducing interferon gamma-secreting B cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 OncoImmunology	6. 最初と最後の頁 2213132-2213132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/2162402X.2023.2213132	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Haruka Wada, Nabeel Kajihara, Kenichiro Seino
2. 発表標題 Dying but not dead cancer cells exert cell-based cancer vaccine effect.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
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	和田 はるか (Wada Haruka) (70392181)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授 (10101)	

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