

令和 6 年 5 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20823

研究課題名（和文）NKT細胞活性化ワクチンによる腫瘍内レジデントメモリーT細胞の誘導と抗腫瘍効果

研究課題名（英文）Induction of resident memory T cells in tumors and antitumor effects by NKT cell-activated vaccines

研究代表者

阿部 智喜（Abe, Tomoki）

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90964081

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腫瘍抗原情報を導入したNKT細胞活性化ワクチンの腫瘍治療モデルの構築を目的とした。腫瘍細胞から直接取得した腫瘍溶解液を抗原情報として導入することを試み、現在モデル構築中である。また細胞膜輸送ペプチドを用いた効率的な腫瘍抗原導入の新技术を確立中である。同時に、AIを用いた病理標本を解析するイメージサイトメトリーを開発した。ヒト直腸癌の病理スライドの解析を行い、腫瘍細胞や間質細胞、各種免疫細胞を識別し、空間情報から得た指標と予後の関連を評価し、これらの指標がバイオマーカーとして有効であることを明らかにした。今後は、ワクチン治療を行った検体の腫瘍微小環境の評価を本AIで行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

われわれの新しいワクチンは、NKT細胞の活性化を介したCD8+/CD4+ T細胞の双方の免疫応答、腫瘍から直接取得した多数の腫瘍特異抗原を標的とする抗腫瘍効果の期待、ネオアンチゲン同定の時間・コストの削減、そして樹状細胞への効率的な抗原導入、といった面で非常に有望であり、今後の製品化・臨床応用も強く期待できる。さらに将来の癌治療において、患者ごとに個別化されたアプローチの可能性が示唆され、その独自性と創造性は高い。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this project was to develop a vaccine to activate NKT cells by introducing tumor antigen information. Vaccines incorporating tumor lysate obtained directly from tumor cells as antigen information are currently being prepared. We are also establishing a new method for efficient introduction of tumor antigen using cell membrane transporting peptides. At the same time, we developed image cytometry to analyze pathological specimens using AI. We analyzed pathological slides of human rectal cancer, identified tumor cells, stromal cells, and various immune cells, evaluated the relationship between indices derived from spatial information and prognosis, and found that these indices are effective as biomarkers. In the future, we plan to use this AI to evaluate the tumor microenvironment of vaccine-treated specimens.

研究分野：消化器癌の腫瘍微小環境

キーワード：がんワクチン レジデントメモリー 腫瘍微小環境 NKT細胞 人工知能 イメージサイトメトリー NK T細胞活性化ワクチン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

NKT細胞は自然免疫と獲得免疫を共に活性化し、抗腫瘍免疫を發揮するマスター細胞として、注目されてきた。樹状細胞(Dendritic cell: DC)に発現するCD1dに、NKT細胞の特異的エペトープである α -Galactosylceramide (Gal)を付加したgalDCを生体内に投与すると、NKT細胞が活性化され、サイトカインが分泌される。その結果、自然免疫系の代表的なエフェクター細胞であるNK細胞を活性化することで、抗腫瘍効果を發揮する。同時に、宿主の樹状細胞を成熟化させ、獲得免疫系の代表的なエフェクター細胞であるCD8+T細胞を活性化する。galDCに腫瘍抗原を付加し、投与すると、宿主の樹状細胞が抗原を取り込み、抗原情報を提示する。それにより腫瘍特異的なCD8+T細胞が誘導され、より高い抗腫瘍効果が得られることが報告されている。我々は独自開発した腫瘍抗原情報を導入したNKT細胞活性化ワクチンを開発し、マウス腫瘍予防モデルで完全拒絶に成功した。これはワクチンにより表皮に誘導された上皮レジデントメモリーT細胞(Tissue resident memory T細胞;TRM細胞)が貢献している。メモリーCD8+T細胞サブセットであるTRM細胞は腫瘍免疫応答の中心と考えられているが、その誘導については不明な点も多い。腫瘍内TRM細胞は重要な予後因子であり、それを効率的に誘導できる治療の開発は、新たな免疫治療となり得る。またワクチンに導入する抗原情報として、腫瘍細胞から得た腫瘍溶解液(Tumor cell lysate; TCL)を使用することで、全タンパクのまま、多様なTSAを漏れなく導入でき、CD8+T細胞のみならず、CD4+T細胞にも抗原提示し、強力な抗腫瘍効果を發揮することが期待できる。さらに全タンパクの導入は、ネオアンチゲンの同定・検証における負担を軽減できる可能性がある。将来的には、手術や検査で得られた患者特異的腫瘍抗原情報を生かし、新たな癌治療の開発、個別化治療の開発を目指す。

2. 研究の目的

樹立した腫瘍に対するワクチンの治療効果を明らかにする。また腫瘍内へのTRM細胞の誘導機構や誘導されたTRM細胞の抗腫瘍効果を確認することである。

さらに、深層学習アルゴリズムを用いた病理診断システムを構築し、腫瘍内免疫細胞の評価を行う。これを用いて腫瘍細胞と免疫細胞の数や同在、距離等の空間情報を取得し、ワクチンによる治療効果との相関を評価する。

3. 研究の方法

方法1. われわれの前研究では、電気穿孔法により腫瘍タンパク抗原(Ovalbumin; OVA)を樹状細胞に導入し、ワクチンを作成した。われわれはこの手法を用いて、腫瘍溶解物を導入することで、多数の抗原情報に対して抗腫瘍効果を發揮するワクチン作成を目指した。

C57BL/6マウスの皮下腫瘍モデル(大腸癌細胞株MC38)を作成する。腫瘍より腫瘍溶解物を作成し、電気穿孔法でマウスDCに挿入し、ワクチンベクター(TCL-EP-galDC)を作成する。皮下腫瘍モデルマウスにTCL-EP-galDCで治療を行い、腫瘍の縮小があるか腫瘍内TRM細胞の割合が増加しているかを確認する。

方法2. ディープラーニングを用いた病理標本イメージサイトメトリー(Deep learning-based image cytometry; DL-IC)を開発した。DL-ICは病理スライド全体を解析し、個々の細胞種を同定可能である。われわれはこの手法を用いて、腫瘍組織内における各種免疫細胞の密度や距離などの空間情報を取得する。ヒト直腸癌患者の外科手術標本を取得し、DL-ICを用いて各種指標を算出し、バイオマーカーとしての有用性を明らかにする。さらにワクチン治療を行ったマウスから得た組織標本に対して評価を行い、ワクチンによる治療効果・予後との相関を評価する。

4. 研究成果

1. C57BL/6マウスの皮下腫瘍モデル(大腸癌細胞株MC38)を作成した。OVAを電気穿孔法でマウス骨髄から採取した樹状細胞に挿入し、樹状細胞上のCD1dに α -ガラクトシルセラミドを付加し、ワクチンベクター(OVA-EP-galDC)を作成した。ワクチン作成は可能であったが、電気穿孔法によるワクチン作成法は、樹状細胞の生存率が60%程度であり、将来的なワクチンの臨床応用への課題と考えた。その中で、細胞膜輸送ペプチド(VP-R8)を用いた樹状細胞への抗原情報の導入技術を知り、本研究への応用を考案した。樹状細胞株DC2.4を培養した。DC2.4上のCD1dを免疫染色で確認したが、染色不能であり、発現を確認できなかった。現在、骨髄から採取した樹状細胞に細胞膜輸送ペプチドを用いた抗原情報の導入を検証している。腫瘍溶解物の作成、抗原導入の手技の安定化を行っ

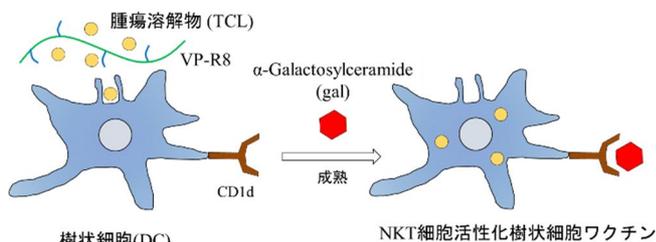


図1 VP-R8を用いた腫瘍溶解物を導入したNKT細胞活性化樹状細胞ワクチン

ており、マウス腫瘍治療モデルへの利用を構想中である(図 1)。

2. DL-IC の開発を行った。ヒト直腸癌患者の手術標本の病理組織スライドを用いた。この病理スライドにヘマトキシリン染色、免疫染色(CD8、CD103)を行った。腺癌細胞や正常腺細胞、間質細胞、CD8 陽性 T 細胞、CD103 陽性 T 細胞、CD8/CD103 陽性 T 細胞、その他のリンパ球、マクロファージなどの細胞を深層学習で学習させて DL-IC を構築した。病理組織スライドをデジタルスライドとしてとり込み、whole slide image として DL-IC で解析し、スライド内の個々の細胞を識別した。病理医の細胞判別と比較し、精度を F1 score で評価した。腺癌細胞、リンパ球、CD8 陽性 T 細胞の精度はそれぞれ、0.6、0.9、0.9 であった(Abe T, et al. (2023) Anticancer Res 43: 3755.)。

まず、術前治療として術前補助放射線化学療法を施行したヒト直腸癌患者 40 例の手術標本の病理組織スライドを用いて検証した。Whole slide image 内のすべての腫瘍細胞や間質細胞、各種免疫細胞を識別し、識別した各種細胞の座標情報を用いて、密度や細胞間距離を算出した。予後情報を用いてバイオマーカーとしての有用性を評価した(図 2)。

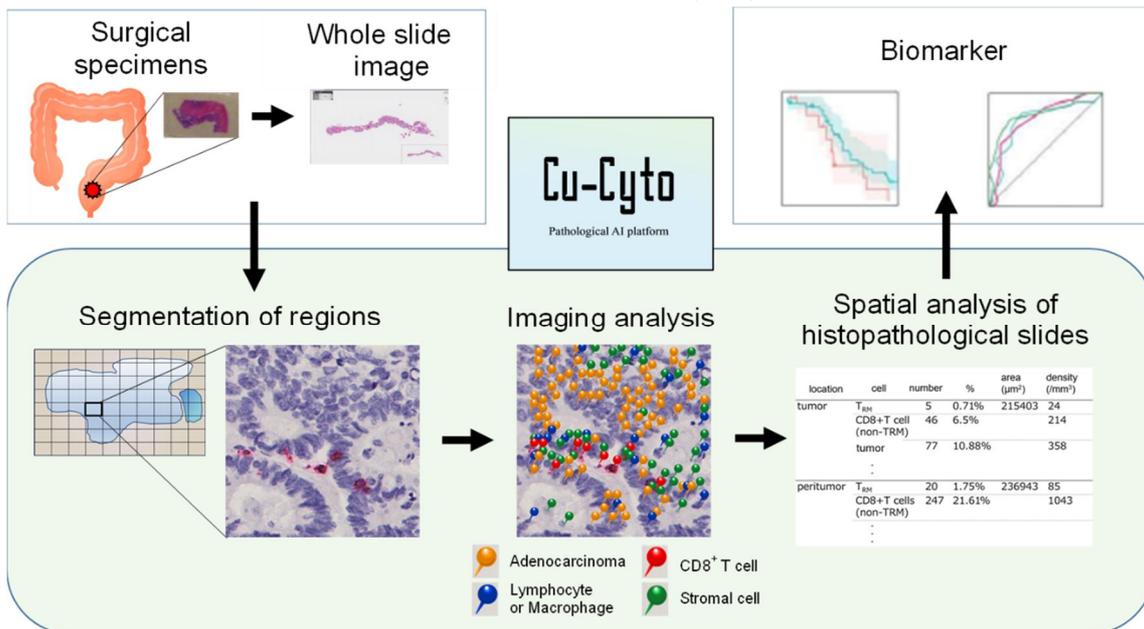


図 2 Deep learning based image cytometry による解析フロー

術前治療として術前補助放射線化学療法を施行したヒト直腸癌患者 40 例の手術標本の病理組織スライドを用いた。DL-IC により腫瘍細胞や間質細胞、各種免疫細胞を識別したうえで、腫瘍内における CD8 陽性 T 細胞の密度を測定した。腫瘍内 CD8 陽性 T 細胞の密度の高低で 2 群に分けて、Disease free survival を比較したところ、CD8 陽性 T 細胞の密度が高い群で良好な Disease free survival を示した(p<0.05)。

また異なる 2 種類の細胞種の細胞間距離を基に算出した指標を定義した(Co-localization index)(図 3)。各症例に対し Co-localization index を算出し、2 群に分けて、Disease free survival の関連性を評価した。Co-localization index が高い症例で良好な Disease free survival を示し、この指標がバイオマーカーとして利用可能であることを明らかにした(図 4)。今後は、本イメージサイトメトリーを用いて、ワクチン治療を行った検体における腫瘍微小環境の評価を行う予定である。

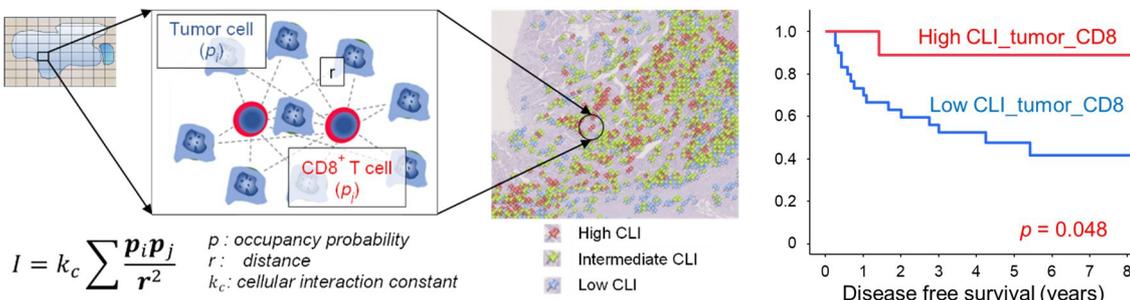


図 3 Co-localization index の算出方法

図 4 Kaplan-Meier curves for Disease free

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 0件）

1. 著者名 ABE TOMOKI、YAMASHITA KIMIHIRO、NAGASAKA TORU、KAKEJI YOSHIHIRO	4. 巻 43
2. 論文標題 Deep Learning-based Image Cytometry Using a Bit-pattern Kernel-filtering Algorithm to Avoid Multi-counted Cell Determination	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3755 ~ 3761
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.16560	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomoki Abe, Toru Nagasaka, Kimihiro Yamashita, Tomosuke Mukoyama, Souichiro Miyake, Yasuhiro Ueda, Masayuki Ando, Yuki Okazoe, Takao Tsuneki, Yukari Adachi, Ryunosuke Konaka, Ryuichiro Sawada, Shingo Kanaji, Hiroshi Hasegawa, Takeru Matsuda, Takumi Fukumoto, and Yoshihiro Kakeji
2. 発表標題 Deep learning-based image cytometry and co-localization index in tumor immune microenvironment
3. 学会等名 AACR2024（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 阿部智喜、長坂暢、山下公大、向山知佑、三宅泰一郎、上田泰弘、安藤正恭、岡副佑城、常城宇生、安達祐里、小中龍之介、澤田隆一郎、長谷川寛、金治新悟、松田武、押切太郎、福本巧、掛地吉弘
2. 発表標題 腫瘍免疫微小環境に対するAIイメージサイトメトリーと共有指標
3. 学会等名 第21回デジタルパソロジー学会・AI研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿部智喜、山下公大、長坂暢、安達祐里、上田泰弘、岡副佑城、小中龍之介、松田武、福本巧、掛地吉弘
2. 発表標題 腫瘍免疫微小環境の定量的評価を目的としたdeep learning-based image cytometry
3. 学会等名 第79回消化器外科学会
4. 発表年 2024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
研究協力者	山下 公大 (Yamashita Kimihiro)		
研究協力者	高村 史記 (Takamura Shiki)		
研究協力者	斎藤 雅史 (Saito Masashi)		

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