

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K01390

研究課題名(和文) 樹状細胞を腫瘍特異的に活性化する人工ネオ・アンティジェン担持エクソソームの開発

研究課題名(英文) Research on the artificial neo-antigen-presenting extracellular vesicles which can activate dendritic cells against tumors

研究代表者

伊藤 智子 (ITO, TOMOKO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・客員研究員

研究者番号：80372910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： 癌免疫治療では標的抗原の存在が不可欠であるが、一般の腫瘍抗原は免疫応答能力が弱い。一部の患者の腫瘍細胞は免疫誘導能力の高い変異型ネオ抗原を持つが、その割合は低く、これを持たない腫瘍細胞に対する治療法の開発が望まれている。

我々は抗原性の高い結核菌抗原ESAT-6を「人工ネオ抗原」として提示した細胞外小胞(ESAT-EV)を調製し、抗腫瘍免疫治療への応用を試みた。ESAT-EVは樹状細胞を強く活性化する能力を示した。これらESAT-EVまたは活性化した樹状細胞を担癌マウスに投与すると、どちらにおいても高い抗腫瘍効果が認められ、「人工ネオ抗原」提示EVの抗腫瘍ワクチンとしての有用性が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた微生物抗原提示細胞外小胞は、人工的なネオ抗原として働き抗腫瘍免疫を強制的に効率よく惹起するもので、癌免疫治療の本質的な適応限界を克服する全く新しい戦略を提供する。

本細胞外小胞製剤は患者本人の細胞から調製することができるため、拒絶応答等の副作用や、ウイルス感染等の危険因子を全く含まない安全性の高い製剤である。さらに細胞治療での免疫細胞活性化剤としての利用は、より安全性の高いヒトへの臨床応用の可能なシステムと期待される。

本研究で得られた知見は「腫瘍細胞の免疫原性の低さ」を克服する癌免疫治療の新しいプラットフォーム技術として広く展開でき、癌治療の向上に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)： Tumor specific mutant neoantigens are essential for successful cancer immunotherapy. However, in most cases, tumors have only non-mutated self-antigens, which possess no or low immunogenicity. To overcome this disadvantage, we have developed a novel "artificial neoantigen strategy".

We prepared extracellular vesicles (EVs) from the cultured cells which had been transfected with plasmid encoding the strong bacterial antigen ESAT-6. The EVs presented ESAT-6 antigen or its epitopes on their surfaces as an "artificial neoantigen".

Those EVs presenting ESAT-6 antigen effectively stimulated the cultured DCs. Injection of the EVs into tumor-bearing mice showed significant antitumor activity. Administration of the DCs stimulated by the EVs also exhibited high antitumor effect in mice. Such "artificial neoantigen"-presenting EVs are expected as novel cancer vaccines.

研究分野：DDS

キーワード：細胞外小胞 ネオ抗原 ガン免疫治療

## 1. 研究開始当初の背景

がんは世界中で死因の上位を占める人類の大きな驚異の一つであり、治療薬などの目覚ましい進歩にもかかわらず生存率の著明な改善には至っていない。近年、外科治療、化学療法、放射線治療に続く第四の治療法として免疫療法が広く行われるようになった。中でも PD-1、PD-L1、CTLA4 などの免疫チェックポイント分子に対する抗体を用いた「免疫チェックポイント阻害療法」が注目を浴び多くの期待が寄せられている。しかし免疫チェックポイント阻害療法は、もともと腫瘍反応性 T 細胞が存在する患者にのみ有効であり、有効な患者の割合は 20~30% である。その主な原因として、一般的な腫瘍関連抗原の免疫原性が低いことがあげられる。このような免疫活性化機能の低い腫瘍に対して、いかに腫瘍反応性 T 細胞を誘導し活性化状態に導くかが抗腫瘍免疫治療の大きな課題となっている。

近年、免疫チェックポイント阻害療法を施した患者の遺伝子を解析した結果、効果の高かった患者の腫瘍細胞には変異性のネオ・アンティジェン(ネオ抗原)が多く存在することが判明し、免疫システムに外来の「デンジャー・シグナル」として認識されるためには「ネオ・抗原の存在が重要である」ことがわかるに注目されてきた。ネオ・抗原を持たない、抗原性の弱い腫瘍に対しても効果的に抗腫瘍免疫を促進する手法として、これまで、化学物質による変異の誘発などが提唱されたが、その効果の実証はされていない。

一方我々は、抗原性の高い結核菌抗原を腫瘍細胞に導入し、人工的なネオ・抗原として強制的に発現させて細胞性免疫を惹起する新しい抗腫瘍免疫治療戦略、「人工ネオ・抗原療法」を開拓し、その高い治癒効果を報告してきた。

その基本となったのは、腫瘍組織内で高い遺伝子発現を示す DNA 三元複合体の開発である。申請者らは、DNA をポリカチオン、および天然酸性多糖と特殊な条件下で混合することで、生体内で、特に腫瘍組織内で高い遺伝子発現を導く DNA 複合体の調製に成功した。このシステムを利用して抗原性の高い微生物抗原の遺伝子をがんモデルマウスに導入すると、サイトカイン遺伝子同等以上の強い抗腫瘍効果を示した。さらに、原発性腫瘍に対してもこの手法が有効であることを、動物臨床研究において確認し、「人工ネオ・抗原療法」の有効性を証明した。

その治癒メカニズムとして我々は以下の仮説を立てた。はじめに腫瘍細胞が微生物抗原遺伝子を取り込み、その表面に微生物抗原タンパクまたはそのエピトープを提示する。これらの細胞は、固有の腫瘍関連抗原とともに微生物抗原を提示した細胞外小胞(エクソソームを含む;以下 EV と記す)を分泌する。これを捕食した抗原提示細胞(APCs)が、微生物抗原を「外来デンジャー・シグナル」として認識して成熟し、微生物抗原、並びに同時に捕食した腫瘍抗原を提示して、細胞傷害性 T 細胞(CTL)をクロスプライムする、という機序である。

本仮説を実証するために、培養メラノーマ細胞に結核菌抗原 ESAT-6 をコードした DNA 三元複合体を導入して長期発現させ、分泌した EV を単離して同じ細胞を移植したがんマウスに投与した。すると、これらのマウスは、腫瘍細胞、および結核菌抗原に対する強い細胞性免疫を示し、さらに著しい腫瘍の退縮が認められた。

もう一つの投与系路として、EV の直接投与ではなく、*ex vivo* で樹状細胞に EV を加えて刺激を与え、活性化した樹状細胞を患者に戻す方法を考案した。実際にがんマウスの単球から誘導した樹状細胞に「人工ネオ・抗原提示 EV」を取り込ませたのち、同マウスに戻したところ、EV 直接投与同等の顕著な腫瘍増殖抑制効果が確認された。

人工ネオ・抗原提示 EV を用いた免疫治療は副作用の低い安全で効果の高い新しい抗腫瘍免疫治

療法として期待され、その治癒効果、免疫活性化のメカニズムを詳細に調べ、「人工ネオ・抗原」を提示した EV 製剤の調製手法を最適化することが、より効果の高い抗腫瘍ワクチンとして創製するために強く望まれた。

## 2. 研究の目的

上述のように、「人工ネオ・抗原」を提示した EV は、樹状細胞の成熟化を誘発し、抗腫瘍細胞性免疫を効果的に活性化して、抗腫瘍免疫治療の効果を画的に向上させる抗腫瘍ワクチンとして高い可能性をもっている。本研究では、「人工ネオ・抗原」提示 EV の抗腫瘍効果、治癒のメカニズム等を詳しく調べ、EV 製剤の設計にフィードバックして、安全性と臨床効果の高い EV 調製条件を確立する。続いて、その投与経路として生体内への直接投与と、*ex vivo* で樹状細胞に加えて生体内に戻す、それぞれの方法について検討し、これらの結果を総合的に判断し、安全性と治療効果の高い、臨床への適応が可能な EV 癌治療システムの創製を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、臨床研究に適応可能な微生物抗原提示 EV 製剤を得るため、EV の調製方法の確立、効果・安全性の確認、治癒機序の解明、最適な製剤設計を行った。具体的には、

- (1) 結核菌の抗原タンパクである ESAT-6 の遺伝子をコードしたプラスミドを合成し、培養腫瘍細胞に導入して ESAT-6 抗原提示 EV、“ESAT-EV”を調製した。
- (2) 担癌モデルマウスに ESAT-EV を投与してその抗腫瘍治癒効果を調べた。
- (3) 培養樹状細胞を ESAT-EV で活性化したのち担癌マウスに投与し、その効果を調べた。
- (4) ESAT-EV の免疫細胞活性化機能を *in vivo*、*in vitro* で評価し、治癒のメカニズムを検討した。
- (5) 安全性・保存安定性を合わせて評価し、安全で効果の高いフォーミュレーションの設計を行った。

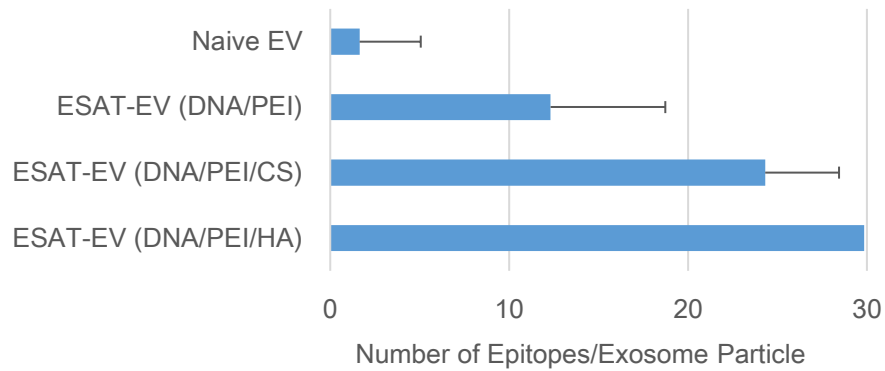
## 4. 研究成果

結核菌抗原タンパク、ESAT-6 の遺伝子を導入した培養 B16 メラノーマ細胞から「人工ネオ・抗原」として ESAT-6 抗原(またはそのエピトープ)を提示した EV、“ESAT-EV”を調製し、その免疫活性化のメカニズムを解析した。

はじめに効率の良い EV の調製条件を検討した。24well プレートに培養した B16 細胞に、ESAT-6 遺伝子をコードしたプラスミドと PEI からなる二元複合体、あるいはそこにコンドロイチン硫酸、またはヒアルロン酸を混合した三元複合体を導入し、分泌された EV を培養上澄から単離した。コントロールとして遺伝子導入をしていない EV (Naive EV) も同様に調製した。EV の分泌量は表面アセチルコリンエステラーゼの活性測定により定量した。

Naive EV の分泌量は 1 well 当たり約  $3.5 \times 10^9$  個であった。DNA/PEI 二元複合体を用いて遺伝子導入した場合は EV の量はやや減少したが、コンドロイチン硫酸やヒアルロン酸で被覆した三元複合体を用いた系では分泌された EV の分泌量は Naive EV と同等以上であった。コンドロイチン硫酸やヒアルロン酸等の酸性多糖で被覆した三元複合体は DNA/PEI 二元複合体に比べ細胞毒性が低く、細胞が活性を維持できたためと考えられる。EV の粒子サイズはいずれも約 100 nm であった。

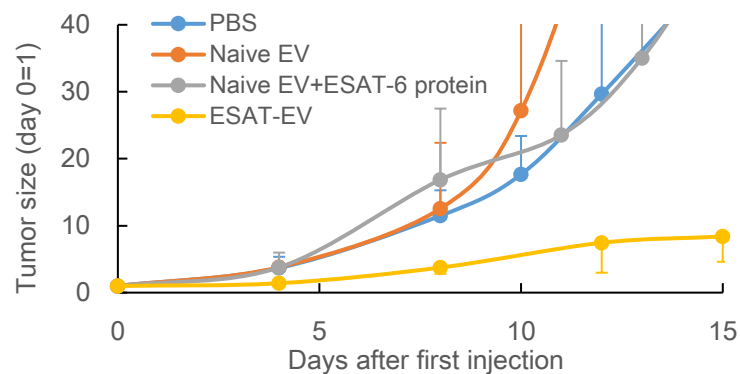
次に、Tim-4 固定化プレートに EV を吸着させ、抗 ESAT-6 抗体、標識二次抗体を加えて ESAT-6 抗原、エピトープを定量した。酸性多糖で DNA/PEI を被覆した三元複合体システムでは、二元複合体を用いた場合よりもエピトープ提示量が有意に高かった。これは、三元複合体が長期にわたって高い遺伝子発現を可能にするためと考えられる。上記のように三元複合体は人工ネオ・抗原提示 EV 調製のための遺伝子導入に適していることが確認された。



ESAT-EV に提示された ESAT-6 抗原エピトープ数

次に、単球から分化させた培養 DC を用いて、ESAT-6-EV の免疫活性化機能をフローサイトメリーにより評価した。ESAT-EV を培養 DC に加えると、3 日後には CD80、CD86 などの共刺激因子、および IL-12 の発現が向上し、ESAT-6-EV が DC を成熟させる機能を持つことが確認された。また、添加 1 日後には TNF  $\alpha$  の発現も見られ、人工ネオ・抗原が自然免疫も誘発して抗腫瘍効果を初期の段階から誘導することが示唆された。

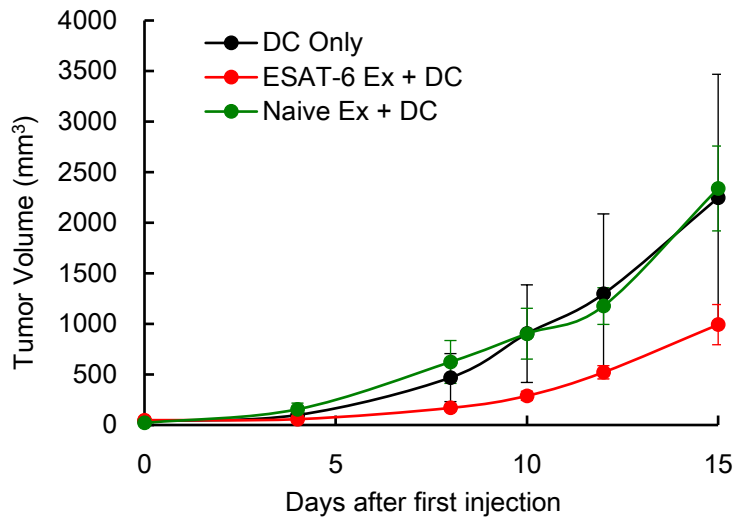
ESAT-EV を B16 メラノーマ細胞を移植した担癌マウスに局所投与すると、非常に高い抗腫瘍効果が観察された。



B16 細胞由来 EV の抗腫瘍効果

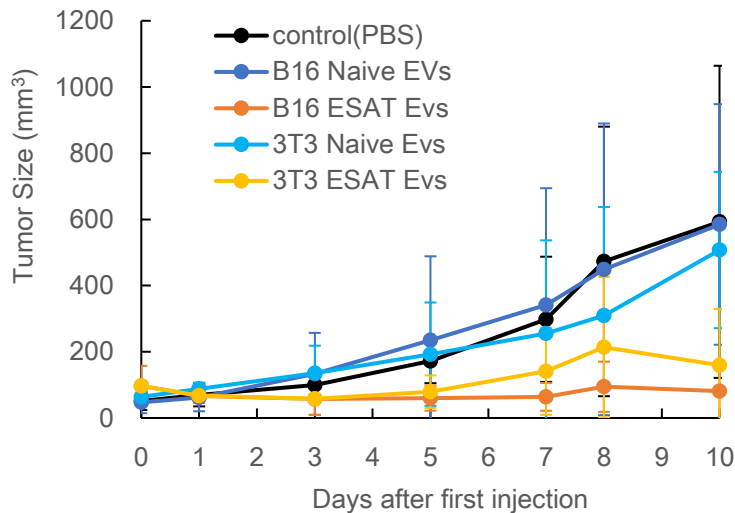
ESAT-6 遺伝子を取り込んだ腫瘍細胞が ESAT-6 抗原を「人工ネオ・抗原(エピトープ)」として提示した EV(ESAT-EV)を分泌し、それを捕食した樹状細胞がこの結核菌抗原を「外来危険信号」と認識して成熟・活性化した。その際、微生物抗原と同時に腫瘍に対しても免疫を強く惹起したものと考えられる。

ESAT-EV による抗腫瘍効果への樹状細胞の関与を立証するため、ESAT-EV を培養 DC に取り込ませ、活性化した DC を担癌モデルマウスに投与してみた。すると ESAT-EV を直接投与したときとほぼ同等の、顕著な抗腫瘍活性が確認され、樹状細胞が抗原提示 EV の抗腫瘍機序に大きく関与することが示唆された。



ESAT-EV で活性化させた培養 DC 投与による抗腫瘍効果

一方、実際の臨床への応用を考えると、患者の腫瘍細胞を採取して培養することは困難である。そこで、正常細胞由来の「ESAT-EV」についてもその抗腫瘍効果の検討を行った。正常細胞由来の EV は腫瘍抗原を持たないが、腫瘍組織内の樹状細胞はすでに腫瘍抗原を貪食しているものも多く、これらが ESAT-6 抗原を取り込み刺激を受けたことで抗腫瘍免疫を惹起すると期待される。繊維芽細胞由来の培養細胞に ESAT-6 遺伝子を導入し、分泌された EV を単離し、担癌マウスに投与した。すると、腫瘍細胞 B16 メラノーマ由来の ESAT-EV を投与したときと同様に、明確な抗腫瘍効果が観察され、このような正常細胞由来の微生物抗原提示 EV の抗腫瘍ワクチンとしての有効性が確認された。



B16 細胞または線維芽細胞(3T3 細胞)由来 EV による抗腫瘍効果

最後に EV の凍結保存安定性の検討を行った。B16 細胞から得られた EV を蛍光標識し、凍結乾燥・再水和後の形態を蛍光顕微鏡で観察した。PBS で分散した EV は、凍結すると凝集塊を形成し、融解後、または凍結乾燥・再水和後も再分散はしなかった。一方、ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸を加えた EV は凍結しても細かい分散を保ち、凍結乾燥・再水和後も細かい分散が観察され、これらの多糖類は EV の凍結安定剤として有用であることが示唆された。

以上のように、「人工・ネオ抗原」提示 EV は、抗原性の弱い腫瘍に対しても抗腫瘍免疫を効果的に惹起し、抗腫瘍ワクチンとして高い可能性を持つことが認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ito Tomoko, Sugiura Kikuya, Hasegawa Aya, Ouchi Wakana, Yoshimoto Takayuki, Mizoguchi Izuru, Inaba Toshio, Hamada Katsuyuki, Eriguchi Masazumi, Koyama Yoshiyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Microbial Antigen-Presenting Extracellular Vesicles Derived from Genetically Modified Tumor Cells Promote Antitumor Activity of Dendritic Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 57～57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics13010057	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 -

1. 著者名 USHIGUSA Takahiro, KOYAMA Yoshiyuki, ITO Tomoko, WATANABE Kenichi, CHAMBERS James K., HASEGAWA Aya, UCHIDA Kazuyuki, KANEKI Ryoji, HATOYA Shingo, INABA Toshio, SUGIURA Kikuya	4. 巻 80
2. 論文標題 Innate immunity mediated by dendritic cells/macrophages plays a central role in the early period in tumor treatment using gene of Mycobacterium tuberculosis antigen	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 190～196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.17-0466	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20件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 小山義之、伊藤智子、善本隆之、溝口出
2. 発表標題 アデノウイルスの免疫活性化機能を模倣した癌免疫治療の新戦略
3. 学会等名 第20回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小山義之、伊藤智子、善本隆之、溝口出
2. 発表標題 腫瘍溶解性ウイルスを模倣した細胞外小胞による免疫誘導システム
3. 学会等名 第8回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小山義之、伊藤智子、溝口出、善本隆之、浦喜久弥、長谷川綾、大内若菜、稲葉俊夫
2. 発表標題 腫瘍溶解性ウイルスを模した癌免疫治療の新戦略
3. 学会等名 第85回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小山義之、伊藤智子、江里口正純、善本隆之、溝口出、杉浦喜久弥、長谷川綾、大内若菜、稲葉俊夫
2. 発表標題 微生物抗原を提示した細胞外小胞の腫瘍免疫治療、感染予防・治療ワクチンへの応用
3. 学会等名 第7回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoko Ito, Masazumi Eriguchi, Aya Hasegawa, Wakana Ouchi, Toshio Inaba, Kikuya Sugiura, Yoshiyuki Koyama
2. 発表標題 Development of "Artificial neoepitope"-presenting exosomes for novel cancer immunotherapy
3. 学会等名 European Society of Gene and Cell Therapy 27th annual congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiyuki Koyama, Tomoko Ito, Masazumi Eriguchi, Aya Hasegawa, Wakana Ouchi, Toshio Inaba, Kikuya Sugiura
2. 発表標題 Antitumour immune activation by "artificial neoantigen"-presenting exosomes derived from the genetically modified cells
3. 学会等名 European Society of Gene and Cell Therapy 27th annual congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤智子、杉浦喜久弥、大内若菜、長谷川綾、稲葉俊夫、江里口正純、小山義之
2. 発表標題 エクソソームを用いた抗原提示細胞への結核菌抗原エピトープ/MHC Class I分子複合体の送達とその抗腫瘍免疫誘導効果
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山義之、伊藤智子、杉浦喜久弥、大内若菜、長谷川綾、稲葉俊夫、江里口正純
2. 発表標題 「人工ネオエピトープ」提示エクソソームの調製と抗腫瘍ワクチンへの応用
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiyuki Koyama, Tomoko Ito, Masazumi Eriguchi, Aya Hasegawa, Wakana Ouchi, Toshio Inaba, Kikuya Sugiura
2. 発表標題 Mechanism of antitumor immunity activation by "artificial neoantigen"-presenting exosomes
3. 学会等名 ISEV2019 (The International Society for Extracellular Vesicles) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoko Ito, Kikuya Sugiura, Aya Hasegawa, Wakana Ouchi, Toshio Inaba, Masazumi Eriguchi, Yoshiyuki Koyama
2. 発表標題 Preparation of "artificial neoepitope"-presenting exosomes and their ability to stimulate antitumor immunity
3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会第19回シンポジウム
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Yoshiyuki Koyama, Kikuya Sugiura, Aya Hasegawa, Wakana Ouchi, Toshio Inaba, Masazumi Eriguchi, Tomoko Ito
2. 発表標題 "Artificial neoantigen"-transfection induced significant inhibition of tumor growth by eliciting innate immunity in the early period in tumor treatment
3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会第19回シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山義之、伊藤智子、長谷川綾、大内若菜、稲葉俊夫、江里口正純、杉浦喜久弥
2. 発表標題 結核菌抗原を「人工ネオアンティジェン」として提示したエクソソームによる抗腫瘍免疫活性化のメカニズム
3. 学会等名 第16回 日本免疫治療学会 学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大内若菜、牛草貴博、小山義之、伊藤智子、渡邊謙一、James K. CHAMBERS、内田和幸、金城綾二、鳩谷晋吾、稲葉俊夫、杉浦喜久弥
2. 発表標題 ESAT-6 DNA導入による腫瘍治療効果の免疫組織化学的解析
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉浦喜久弥、小山義之、伊藤智子、長谷川綾、大内若菜、江里口正純、稲葉俊夫
2. 発表標題 結核菌抗原を「人工ネオアンティジェン」として提示したエクソソームによる腫瘍治療効果の検討
3. 学会等名 日本獣医再生医療学会第14回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山義之、伊藤智子、江里口正純、長谷川綾、大内若菜、稲葉俊夫、杉浦喜久弥
2. 発表標題 「人工ネオエピトープ」提示エクソソームによる抗腫瘍免疫活性化のメカニズム
3. 学会等名 第5回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小山義之、伊藤智子、長谷川綾、杉浦喜久弥、稲葉俊夫、江里口正純
2. 発表標題 「人工Neoantigen」遺伝子を導入した細胞由来のエクソソームを用いた抗腫瘍免疫治療
3. 学会等名 第15回日本免疫治療学研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoko Ito, Kikuya Sugiura, Aya Hasegawa, Toshio Inaba, Masazumi Eriguchi, Yoshiyuki Koyama
2. 発表標題 Artificial neoepitope-presenting exosomes derived from the cells genetically modified to express Mycobacterium tuberculosis antigen as cellular immunity adjuvants
3. 学会等名 the 25th Anniversary Congress of the European Society for Gene and Cell Therapy (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshiyuki Koyama, Tomoko Ito, Masazumi Eriguchi, Aya Hasegawa, Toshio Inaba, Kikuya Sugiura
2. 発表標題 Dendritic cell activation induced by Artificial neoepitope-presenting exosomes derived from the genetically modified cells the 25th Anniversary Congress of the European Society for Gene and Cell Therapy
3. 学会等名 the 25th Anniversary Congress of the European Society for Gene and Cell Therapy (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小山義之、伊藤智子、江里口正純、長谷川綾、稲葉俊夫、杉浦喜久弥
2. 発表標題 「人工ネオエピトープ」提示エクソソームによる樹状細胞の活性化と抗腫瘍効果の向上
3. 学会等名 第4回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小山義之、伊藤智子、長谷川綾、杉浦喜久弥、稲葉俊夫、江里口正純
2. 発表標題 人工Neoantigenによる樹状細胞治療の効果改善
3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会第17回シンポジウム
4. 発表年 2017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