

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08299

研究課題名(和文) リポペプチド系抗がん免疫アジュバントの新展開 - がんワクチンにおける創薬視点の工夫

研究課題名(英文) Development of the lipopeptide based antitumor immunoadjuvants by drug design

研究代表者

赤澤 隆 (Akazawa, Takashi)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・がん創薬部主任研究員

研究者番号：80359299

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)：昨今の研究から、免疫原性の高い細胞死(Immunogenic Cell Death)の概念が認識され、単純な凍結がん組織・ホルマリン固定がん組織サンプルからでは不可能で、生きたがん細胞からしか作れない有効なワクチン調製法を開発できる可能性があった。この仮説の基、申請者が考案した人工アジュバント「電荷依存的に細胞接着するリポペプチド」のがんワクチン応用法を確立した。

一方で、がんワクチン株の機能解析から、がん細胞に発現しワクチン効果を増強するいくつかの候補分子を同定した。これらのワクチン増強因子は、がんワクチン開発における創薬視点の工夫点として、今後の研究へつなげていく計画である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者固有がん細胞としての性質を維持したまま試験管内で培養する技術が開発され、その研究成果を患者へ還元する方法として、遺伝子診断や有効治療薬の評価など、個別化医療への応用が期待されている。本研究課題では、申請者のオリジナル創薬戦略から設計した人工アジュバント「電荷依存的に細胞接着するリポペプチド」と患者由来の培養がん細胞を「がん抗原」として利用する。これまでに考案されてきたワクチン戦略では対応できなかった、患者がん細胞の多様性を克服し、さらに強力な免疫活性化を誘導する新規がんワクチンを、個別化医療の新たなアウトプットとして提供する研究である。

研究成果の概要(英文)：Recent studies about the concept of immunogenic cell death suggested that it would be possible to prepare effective vaccine by live tumor cells but not formalin fixed- or frozen-tumor tissue. In this project, we established the method to prepare a novel cell based vaccine using original designed adjuvant " lipopeptide adhering to cell surface by a charge-dependent manner " .

On the other hand, we succeeded in identifying some candidate molecules as cancer vaccine-related immunogenic factors in vaccine cell line. We are planning to apply these findings for the next cancer vaccine strategy as a novel perspective of drug discovery.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：がんワクチン Immunogenic Cell Death 腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

協調可能な作用機序を持つ抗がん免疫療法剤として、アジュバント(免疫賦活)・抗原蛋白およびペプチド(抗原補充)・免疫チェックポイント阻害剤(抑制シグナル解除)があげられる。この3者併用の複合がん免疫療法は治療効果の飛躍的な改善が期待されていた。一方で、がん・感染症ワクチン分野において、新規アジュバント開発は重要課題であり、天然・人工の様々な Toll-like receptor (TLR) リガンドが国内外で検討された。がん分野では強力な活性を有する核酸由来物質 (CpG, poly I:C) が重点的に研究され、ヒト臨床での安全性を考慮した改良が加えられている (Kobiyama K, PNAS 2014, Matsumoto M, Nat commun 2015)。一方、細胞骨格・膜成分由来物質としては Monophosphoryl Lipid A (MPLA) が比較的安全性の高い LPS 誘導体として、Human Papillomavirus (HPV) ワクチンに応用された (Mata-Haro V, Science 2007)。

リポペプチド系アジュバント (TLR2 リガンド) の開発においては、マイコプラズマ由来の天然リポペプチド MALP2、抗原ペプチド複合体を考慮した人工リポペプチド (Jackson DC, PNAS 2004)、ランダム配列の合成リポペプチド群 (Reutter F, J Pept Res 2005)、細菌遺伝子情報データベースに基づく予測リポペプチド (Azuma M, PLoS one 2010) 等が検討された。TLR2 リガンドは核酸系リガンドと比較すると、IFN α/β に起因すると予想される全身性応答・副作用が少ない反面、抗がん効果は弱い傾向にあった。同時に TLR2 リガンドは免疫活性化時に制御性 T 細胞や抑制性マクロファージなどを誘導するため、その効果が減弱されるメカニズムがあると予想されていた (Yamazaki S, PLoS one 2011, Maruyama A, BBRC 2015)。

2. 研究の目的

申請者は、ウシ結核菌の細胞骨格成分 (BCG-CWS) を用いた免疫アジュバント療法の基礎・臨床研究に携わり (Akazawa T, Cancer Res 2004)、その経験から免疫アジュバントを人工設計する独自の創薬プロジェクト「アジュバント・エンジニアリング」を開始した (Akazawa T, Cancer Sci 2010)。天然の MALP2 が持つ P2C/Pam2Cys 構造 (TLR2 リガンドの基本構造) に機能ペプチドを付加する戦略である。一般的な化合物スクリーニングとは異なり、体内動態制御などの *in vivo* での機能性を考慮した人工設計を行い、2つの実用化候補化合物を得ていた。

そのうちの1つ P2CSR11 は、電荷依存的細胞接着性リポペプチドであり、がん細胞等の細胞表面電荷を利用して結合するワクチン調製ツールである。微生物成分アジュバント付着がん細胞は免疫系から微生物と認識されるため、内部がん抗原に対する免疫応答を誘導することができる (下図)。



また、この根本的な概念となる自家がんワクチン療法は、患者由来の摘出がん組織を抗原としてワクチン応用する個別医療の一種である。フェーズ試験も実施されたが (Kuang M et al. Clin Cancer Res. 2004) 十分な治療効果は得られていない。抗原はホルマリン固定・凍結保存組織に由来するため、細胞可溶化物としての利用に限定され、改良の余地があった。

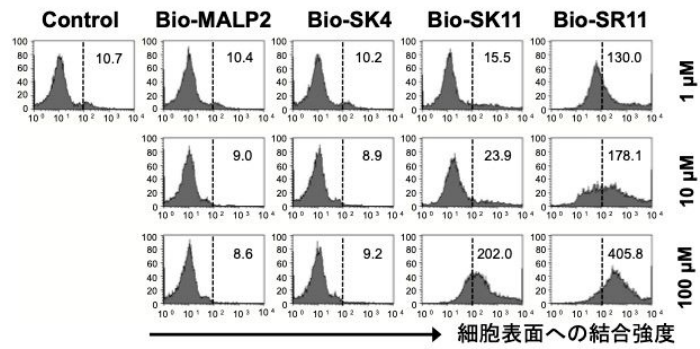
現在までに、がん細胞培養に技術革新が起こり、患者由来がん細胞の培養が容易に成功する状況にある。本研究では、生がん細胞を応用し、その加工法(細胞死誘導法)も含めた検討を行い、人工アジュバント修飾がん細胞の調製と免疫抑制系の解除等のサポートを併せ、強力な新型自家がんワクチンを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

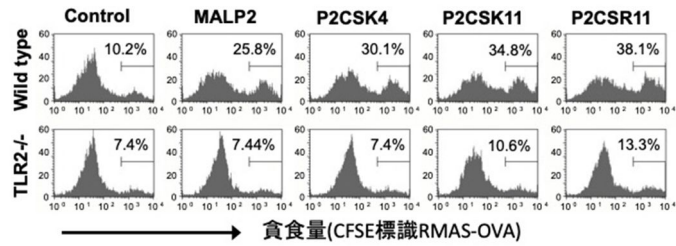
本研究では、培養がん細胞・OVA 遺伝子導入株 (EG7-OVA) を、放射線・抗がん剤・物理的な破壊法で処理し、抗がん免疫の誘導に有利な細胞加工法を検討した。特に焦点としたのは、がん細胞の破碎物を単純に利用する mixture・混合物と、がん細胞を不活化(生存維持活動を停止)により抗原を含む封入体とした場合の比較である。がん抗原の封入体として細胞膜を考慮すれば、ネクローシスよりもアポトーシス様の膜系を保持した形態(炎症を伴わず食細胞にクリアランスされ、抗原の捕獲効率が良い)がワクチンに望ましい。また、がん局所への放射線照射治療では、その有効性に免疫系の関与が報告され (Takeshima T, Cancer Res. 2010)、放射線照射がん細胞が体内で良い免疫源になると予想される。アジュバント化合物 P2CSR11 は電荷に依存して細胞膜に結合するため、抗原封入体を外側から修飾し、人工的なワクチン粒子を形成させることが可能である。これらの有用性を *in vitro* 実験で証明するため、人工アジュバント修飾がん細胞の樹状細胞貪食および抗原提示能を評価した。また、その治療効果をマウス *in vivo* 実験 (C57BL6 への移植モデル) で比較検討している。

4. 研究成果

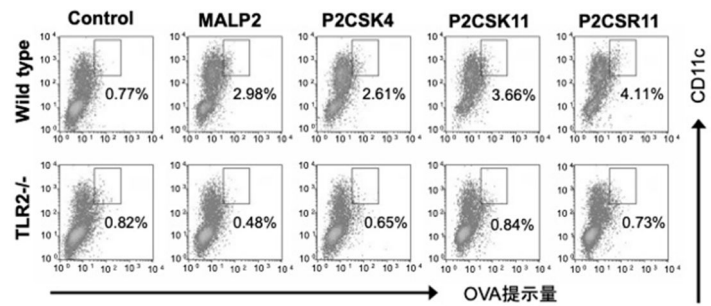
新規人工設計リポペプチドの開発にあたり、放射線照射によって不活化した細胞に対して、効率よく結合するペプチドを探索した。細胞膜上の負電荷に対しては、正電荷アミノ酸をより多く含むペプチドに効果的な接着性が認められ、また、ポリリジン（K11）よりもポリアルギニン（R11）に強い細胞接着性を認めた。この結果より、P2CSR11を人工設計し、抗がん効果を検討した（右図）。



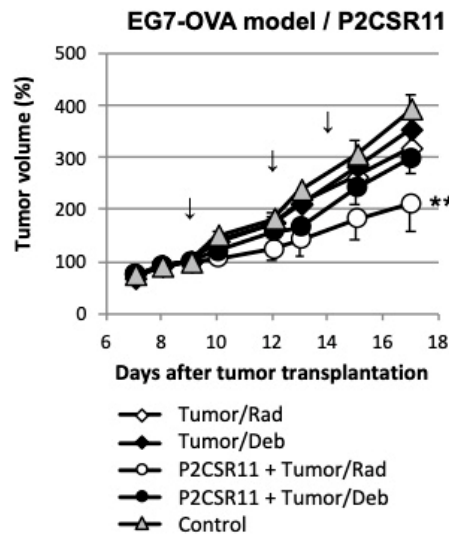
次に、これらのリポペプチドを、放射線不活化がん細胞に接着させたのち、樹状細胞による貪食活性を *in vitro* 実験で検討した。この結果、P2CSR11/P2CSK11で修飾した（TLR2 リガンドを付加した）がん細胞が、効率的に貪食されることが明らかとなった（右図）。



さらに、がん細胞を貪食した樹状細胞がおこす抗原提示についても検討した。CD11c 陽性の樹状細胞は、P2CSR11・P2CSK11で修飾したがん細胞を貪食し、その内包する抗原を効率よく提示することが明らかとなった。この結果は TLR2 リガンド付加がん細胞がワクチンとして、CTL 誘導に有利な活性を持つことを示唆している（右図）。



一方、*in vivo* 実験として、凍結融解によるがん細胞破砕物または放射線処理したがん細胞と P2CSR11 を混合したものをワクチンとし、その抗がん免疫作用・抗腫瘍効果を比較検討した。実験はマウスに腫瘍を移植して生着を確認後、3回/週で腫瘍周辺の皮下に調製したワクチン投与を行い、腫瘍体積の変化を測定した。この結果、P2CSR11 は破砕物ではなく、放射線照射したがん細胞、すなわち、抗原が封入された細胞膜と、TLR2 リガンド・免疫賦活剤でその表面を修飾した粒子とすることで、がんワクチンとして最も効果的な免疫応答を誘導することが明らかとなった（右図）。



将来的に、患者由来がん細胞の培養方法が確立されれば、これらをワクチンの材料・抗原として有効活用し、個別医療・個別ワクチンとして応用展開することが可能となる。本研究成果は、細胞を抗原封入体として捉え、かつアジュバント修飾してワクチンへ応用する、新たな自家癌ワクチン戦略の可能性を示すものであり、今後の発展応用が期待できるものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Akazawa Takashi, Ohashi Toshimitsu, Wijewardana Viskam, Sugiura Kikuya, Inoue Norimitsu	4. 巻 109
2. 論文標題 Development of a vaccine based on bacteria-mimicking tumor cells coated with novel engineered toll-like receptor 2 ligands	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1319 ~ 1329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/cas.13576	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 De Silva Nadeeka H., Akazawa Takashi, Wijewardana Viskam, Inoue Norimitsu, Oyamada Maremichi, Ohta Atsuko, Tachibana Yuki, Wijesekera Daluthgamage Patsy H., Kuwamura Mitsuru, Nishizawa Yasuko, Itoh Kazuyuki, Izawa Takeshi, Hatoya Shingo, Hasegawa Tetsuya, Yamate Jyoji, Inaba Toshio, Sugiura Kikuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of effective tumor immunotherapy using a novel dendritic cell?targeting Toll-like receptor ligand	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0188738-0188738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1371/journal.pone.0188738	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 Ohashi T, Terasawa K, Aoki M, Akazawa T, Shibata H, Kuze B, Asano T, Kato H, Miyazaki T, Matsuo M, Inoue N, Ito Y.	4. 巻 in press
2. 論文標題 The importance of FDG-PET/CT parameters for the assessment of the immune status in advanced HNSCC.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.anl.2020.01.002	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 0件）

1. 発表者名 柿原優佳、弓場英司、Nadeeka De Silva H、赤澤隆、井上徳光、金城綾二、鳩谷普吾、稲葉俊夫、杉浦喜久弥
2. 発表標題 高効率アジュバントを用いた腫瘍免疫治療の検討
3. 学会等名 第157回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋敏充、柴田博史、赤澤隆、井上徳光
2. 発表標題 FDG-PET-CTを用いた腫瘍内M2様マクロファージの評価・頭頸部癌におけるWarburg効果と腫瘍内M2様マクロファージの解析
3. 学会等名 第77回日本癌学会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋敏充、青木光広、赤澤隆、久世文也、水田啓介、井上徳光、伊藤八次
2. 発表標題 高乳酸頭頸部癌におけるM2様マクロファージ分化の促進
3. 学会等名 日本がん免疫学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小熊 恵二、堀田 博、若宮 伸隆 (p103 - 116の共同執筆、井上徳光、赤澤 隆)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 474 (執筆部分14ページ)
3. 書名 シンプル微生物学 (改訂第6版)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪国際がんセンター・研究所・腫瘍免疫学部 https://oici.jp/laboratory/department/shuyou/</p> <p>大阪国際がんセンター・研究所・がん創薬部 https://oici.jp/laboratory/department/gansouyaku/</p>
--

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
連携研究者	井上 徳光 (Inoue Norimitsu) (80252708)	和歌山県立医科大学・分子遺伝学・教授 (24701)	
連携研究者	井上 正宏 (Inoue Masahiro) (10342990)	京都大学・医学研究科 クリニカルバイオリソース研究開発講座・特定教授 (14301)	
連携研究者	杉浦 喜久弥 (Sugiura Kikuya) (30171143)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授 (24403)	