

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09421

研究課題名(和文) TLR9とRIG-Iを標的とした肝がんに対するin situワクチン療法の開発

研究課題名(英文) Preclinical study of in situ vaccine immunotherapy for hepatocellular carcinoma targeting TLR9 and RIG-I

研究代表者

高橋 健 (TAKAHASHI, Ken)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60594372

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)：腫瘍局所の自然免疫を賦活化するin situワクチンは消化器がんでは有望な治療法である。本研究は当初、その有用性を肝がんモデルで明らかにすることを目的としたが、条件検討を重ねるも安定したモデルの構築が困難であり、大腸がんと膵がんのモデルで研究を遂行した。K3-SPG in situワクチンによる腫瘍増殖抑制、抗PD-1抗体との併用効果、免疫記憶誘導、治療側の対側腫瘍への抗腫瘍効果などの結果を得た。RIG-Iリガンドに関しては、K3-SPGのみで強い抗腫瘍効果を認めたため、詳細な解析は行わなかった。in situワクチンのコンセプトは消化器がん一般に適応でき、本研究の目的は達成できたといえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん免疫療法としてのin situワクチンは、個々の患者由来のがん抗原をそのまま利用するため煩雑な抗原同定の過程を要さない、抗原特異性が異なる抗腫瘍T細胞を多数誘導できる、局所療法なので全身性の副作用が少ない、局所療法ながら全身性の抗腫瘍免疫を誘導できるなどの利点を有し、理想的な個別化がんワクチン治療となりうる。消化器がんは難治であるが患者数も多く、新規の治療法の開発が期待される。消化器がんは、超音波ガイド下や内視鏡下に腫瘍局所への薬剤注入が可能であり、本研究の成果をもとに自然免疫活性化アジュバントをもちいたin situワクチンの臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：There is an urgent need for potent cancer immunotherapy for gastrointestinal malignancies. In situ vaccine, intratumoral injection of stimulator of innate immunity, allows for the development of vaccines in patients themselves. The aim of this study was to unveil the antitumor activity of in situ vaccine using novel TLR9 agonist K3-SPG in the preclinical models of gastrointestinal malignancies. Transplantable subcutaneous mouse models for colon and pancreatic cancers were established. In these models, K3-SPG suppressed tumor growth, prolonged survival and synergized with PD-1 blockade. K3-SPG in situ vaccine clearly induced immunological memory and suppressed untreated tumor at the opposite side of treated one. We excluded analysis of hepatocellular carcinoma (HCC) model and utilization of RIG-I agonist both of which were originally included in the experiment plans, because of technical difficulty in establishing HCC model and because of the potent antitumor activity of K3-SPG alone.

研究分野：消化器病学

キーワード：がん免疫 自然免疫 消化器癌 ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年のがん免疫療法の発展は、がん治療のパラダイムシフトをもたらした。肝がんなどの消化器がんは既存の治療では制圧できない難治疾患であるが、免疫療法は全身性の抗腫瘍効果と免疫記憶の誘導が期待できる点でがん治療には有利といえる。チェックポイント阻害剤の成功により、担がん宿主内には抗腫瘍性の細胞障害性 T 細胞 (CTL: Cytotoxic T cell) が存在し、CTL が腫瘍破壊の主たるエフェクター細胞であることが証明された。そのため、抗腫瘍 CTL の誘導を目的とするがんワクチンはがん免疫療法の有望な治療戦略であり、チェックポイント阻害剤との併用効果も期待できる。がんワクチンは、患者固有のがん抗原の投与と同時に自然免疫を至適に活性化して抗腫瘍免疫を誘導するアジュバントを投与することが理想的といえる。

腫瘍に自然免疫賦活アジュバントを直接注入する *in situ* ワクチンは、適切にアジュバントを選択すれば、腫瘍局所で放出される患者固有のがん抗原を利用しつつ抗腫瘍免疫へと誘導するタイプの自然免疫を活性化できるため、腫瘍局所への治療介入のみで、強力かつ患者固有のがん抗原を標的とする腫瘍免疫を起動できると期待される。また、*in situ* ワクチンには、局所療法ながら全身性の免疫応答を惹起できる一方で、全身性の副作用が少ないという利点がある。特に、腫瘍穿刺が臨床上おこなわれている肝がんなどの消化器がんにおいては、将来有望な治療法となりうるが、その有用性は明らかでない。

## 2. 研究の目的

本研究では、標的とする自然免疫活性化受容体を、主に樹状細胞で発現する Toll-like receptor 9 (TLR9) と腫瘍細胞で発現する RIG-I の両者とし、TLR9 リガンドには分担研究者の石井らが独自に開発した新規のナノ粒子 TLR9 リガンド "K3-SPG" を用いることとした。K3-SPG と RIG-I リガンドの投与で腫瘍局所における自然免疫活性を最大化する *in situ* ワクチンを肝がんなどの消化器がんのモデルマウスで試み、その有用性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) K3-SPG は分担研究者である石井らが作製し、RIG-I リガンド 3pRNA は既報に従い作製した。  
(2) 健常人のヒト末梢血単核球細胞 (PBMC) やマウス脾細胞を、RIG-I リガンド、K3-SPG、従来型 TLR9 リガンド K3 で *in vitro* 刺激し、ELISA や qPCR で I 型 IFN や IL-12 などのサイトカイン産生や IFN 応答遺伝子の発現を解析した。  
(2) 肝がん細胞株 (Hepa1.6 細胞)、大腸がん細胞株 (Colon26, MC38)、膵がん細胞株 (KPC-N) を用いて各癌腫の皮下移植モデルマウスを作製し、RIG-I リガンド、K3-SPG による *in situ* ワクチンを実施した。無治療群に加えて、K3 治療群、K3-SPG の経静脈治療群を比較対象とし、時系列ごとに腫瘍のサイズや生存期間を解析した。  
(3) *in situ* ワクチン終了後に腫瘍を摘出し、抽出した RNA を用いて IFN 関連遺伝子 (I 型 IFN, ISGs など) や樹状細胞活性化マーカー (CD80, CD86 など) を対象とする qPCR を行い、腫瘍局所での免疫環境の変化を解析した。  
(4) 抗 PD-1 抗体 (RMP1-14) の腹腔内投与を *in situ* ワクチンと併用し、(2) と同様に腫瘍のサイズや生存期間を解析した。  
(5) CD8 除去抗体 (YTS169.4) 投与下で *in situ* ワクチンを行い、抗体非投与群との比較で抗腫瘍効果における CTL の役割を解析した。  
(6) 免疫記憶の成立の確認のため、*in situ* ワクチンで腫瘍が消退したマウスに、再度同じ腫瘍細胞株を移植した。週齢をマッチさせたコントロールマウスにも細胞移植を行い、両群における腫瘍増殖の有無を観察した。  
(7) 全身性の抗腫瘍免疫の成立の確認のため、両側に腫瘍細胞株を移植し、片側のみに *in situ* ワクチンを行い、対側腫瘍の腫瘍増殖の有無を解析した。

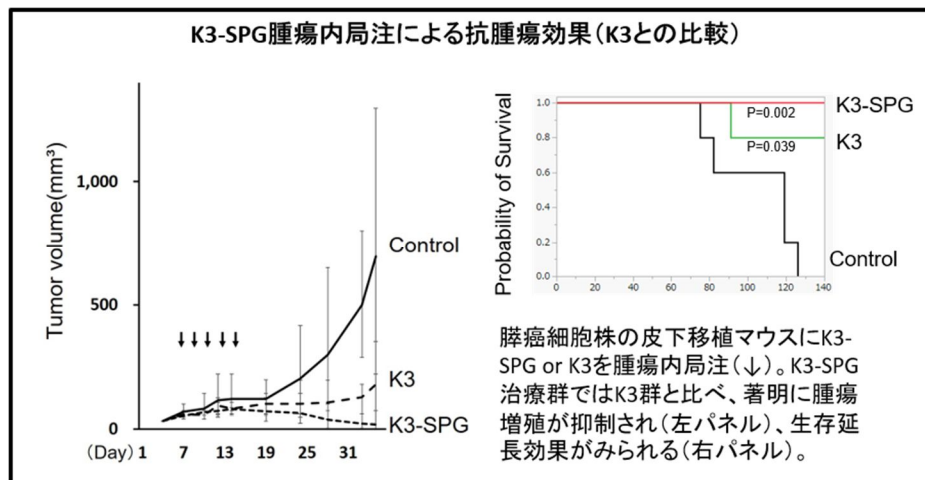
#### 4. 研究成果

肝がん、大腸がん、膵がんの細胞株を用いて主に皮下移植モデルで K3-SPG の抗腫瘍効果を評価した。なお、肝がんに関しては Hepa1.6 細胞を用いたが、既報にある C57BL/6 マウスでは生着率が安定せず、この細胞株の本来の由来である C57L/J マウスを用いるなどいくつかの手段を試みた。しかし、皮下移植、肝内移植ともに上記の他のモデルと比較して生着率が安定しないと結論づけた。肝がんの解析は十分でなかったが、大腸がんや膵がんなど他の消化器癌モデルでは以下に述べるように当初計画していた *in situ* ワクチンの評価は達成できたと考えられる。

予備実験としてヒト PBMC やマウス脾細胞を用いておこなった K3-SPG の *in vitro* 刺激実験では、従来型リガンド K3 と比較して、K3-SPG は、抗腫瘍免疫誘導に適した自然免疫の活性化パターンである I 型 IFN 応答や IL-12 の産生を強力に誘導した。

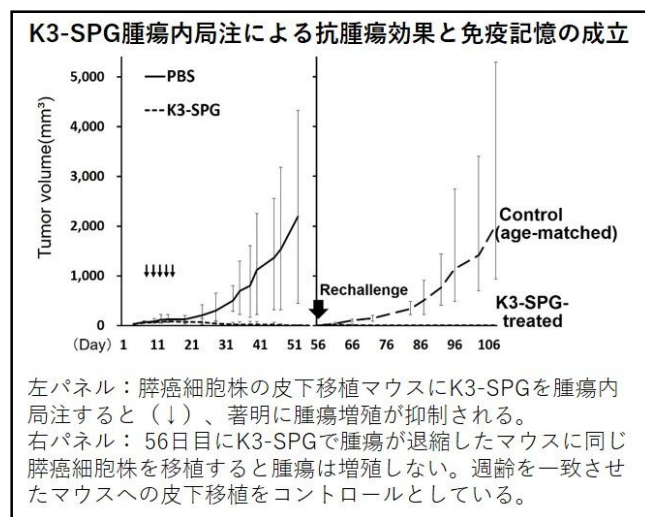
大腸がんモデルでは Colon26 細胞(一部の試験では MC38 も使用)、膵がんモデルでは研究室で保有している膵がんを自然発症する KPC マウス由来の膵がん細胞株(KPC-N 細胞)を用いて皮下マウスモデルを確立し、K3-SPG の *in situ* ワクチンを試みた。両モデルともに、無治療群や K3 治療群と比べ、腫瘍増殖抑制と生存期間延長が認められた(図参照)。また、K3-SPG *in situ* ワクチンの抗腫瘍効果は K3-SPG の経静脈投与より強いことが確認され、抗 PD-1 抗体との併用実験では、K3-SPG 単剤治療と比べて抗腫瘍効果の

増強作用がみられた。この K3-SPG の *in situ* ワクチン効果は、CD8 T 細胞除去処理によって打ち消されたことから、治療により誘導された CTL が抗腫瘍効果を及ぼすことが示唆された。腫瘍内の免疫環境の解析で、K3-SPG 投与群では摘出腫瘍を用いた qPCR による遺伝子発現解析で、I 型 IFN 応答遺伝子や樹状細胞活性化マーカーの発現が上昇していた。*in situ* ワクチンで腫瘍が退縮したマウスへの細胞株再移植実験では、週齢をマッチさせた無治療コントロールマウスで移植細胞株が生着し増大するのに対して、*in situ* ワクチンの腫瘍退縮マウスでは再移植した細胞が生着せず、免疫記憶が成立していることが確認された(図参照)。最後に、治療側の対側への抗腫瘍効果は、Colon26 細胞では認めないものの、KPC-N では認められ、その違いの解析は今後の課題と考えられた。



増強作用がみられた。この K3-SPG の *in situ* ワクチン効果は、CD8 T 細胞除去処理によって打ち消されたことから、治療により誘導された CTL が抗腫瘍効果を及ぼすことが示唆された。腫瘍内の免疫環境の解析で、K3-SPG 投与群では摘出腫瘍を用いた qPCR による遺伝子発現解析で、I 型 IFN 応答遺伝子や樹状細胞活性化マーカーの発現が上昇していた。*in situ* ワクチンで腫瘍が退縮したマウスへの細胞株再移植実験では、週齢をマッチさせた無治療コントロールマウスで移植細胞株が生着し増大するのに対して、*in situ* ワクチンの腫瘍退縮マウスでは再移植した細胞が生着せず、免疫記憶が成立していることが確認された(図参照)。最後に、治療側の対側への抗腫瘍効果は、Colon26 細胞では認めないものの、KPC-N では認められ、その違いの解析は今後の課題と考えられた。

増強作用がみられた。この K3-SPG の *in situ* ワクチン効果は、CD8 T 細胞除去処理によって打ち消されたことから、治療により誘導された CTL が抗腫瘍効果を及ぼすことが示唆された。腫瘍内の免疫環境の解析で、K3-SPG 投与群では摘出腫瘍を用いた qPCR による遺伝子発現解析で、I 型 IFN 応答遺伝子や樹状細胞活性化マーカーの発現が上昇していた。*in situ* ワクチンで腫瘍が退縮したマウスへの細胞株再移植実験では、週齢をマッチさせた無治療コントロールマウスで移植細胞株が生着し増大するのに対して、*in situ* ワクチンの腫瘍退縮マウスでは再移植した細胞が生着せず、免疫記憶が成立していることが確認された(図参照)。最後に、治療側の対側への抗腫瘍効果は、Colon26 細胞では認めないものの、KPC-N では認められ、その違いの解析は今後の課題と考えられた。



なお、RIG-I リガンドに関しては、K3-SPG のみで強い抗腫瘍効果を認め、また、臨床的視点からは治療のシンプル性を重視すべきことから、詳細な評価や解析は行わなかった。

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 Nakano S, Eso Y, Okada H, Takai A, Takahashi K, Seno H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Recent Advances in Immunotherapy for Hepatocellular Carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 775
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12040775	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hirokazu Okada, Ken Takahashi, Kouji Kobiyama, Yoshihiro Nishikawa, Masahiro Shiokawa, Norimitsu Uza, Yuzo Kodama, Hiroshi Seno, Ken J. Ishii
2. 発表標題 In situ vaccine immunotherapy for gastrointestinal cancers using novel nanoparticulate TLR9 agonist K3-SPG
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田浩和, 高橋健, 宇座徳光, 児玉裕三, 石井健, 妹尾浩
2. 発表標題 新規TLR9アゴニストK3-SPGを用いたがんワクチン免疫療法の消化器がんへの応用
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019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	石井 健  (ISHII Ken)  (00448086)	東京大学・医科学研究所・教授    (12601)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	岡田 浩和  (OKADA Hirokazu)		