

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10711

研究課題名(和文) XCR1発現樹状細胞への選択的送達能を有する新規腫瘍細胞ワクチンの開発

研究課題名(英文) The development of a novel whole cell tumor vaccine with selective delivery ability to XCR1+ dendritic cells

研究代表者

宮澤 基樹 (Miyazawa, Motoki)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90549734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では腫瘍抗原の発現低下による免疫逃避を克服するため、単一の腫瘍抗原ではなく、腫瘍細胞のもつ多様な抗原を標的とするという観点から、腫瘍細胞にXCL1遺伝子を導入し、放射線照射により非増殖性としたXCL1腫瘍細胞ワクチンを新規に開発し、腫瘍細胞が優れたCTL誘導能を有するXCR1+ DCに優先的に送達されることで、強力な抗腫瘍効果の発揮することを明らかにした。XCR1+DCは強力な抗腫瘍免疫を誘導できる樹状細胞であり、XCL1はXCR1と親和性のある特異的なリガンドである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数の腫瘍抗原に対するCTLを誘導すること、がん細胞独自の遺伝子変異に伴って新たに生まれた変異抗原(neoantigen)に対するCTLを誘導することは、腫瘍免疫における課題の一つである標的腫瘍抗原の発現低下を克服する有望な戦略である。臨床応用を念頭に置いた場合、種々の抗原やneoantigenの一つ一つにXCL1を連結させたワクチンを作製することは困難であることから、本研究では腫瘍細胞自身にXCL1を発現させたのち、放射線照射した非増殖性XCL1発現腫瘍細胞ワクチンを開発し、その抗腫瘍効果をマウス実験で証明した。本研究成果は臨床応用を見据えた新規がん免疫療法の基盤的研究となりうる。

研究成果の概要(英文)：In order to overcome the immune escape due to the decreased expression of tumor antigens, the XCL1 gene was introduced into tumor cells from the viewpoint of targeting various antigens possessed by tumor cells, rather than a single tumor antigen. Newly developed a non-proliferative XCL1 tumor cell vaccine showed a strong antitumor effect by being preferentially delivered to XCR1+ DC that have excellent CTL inducing ability. XCR1+DC are dendritic cells capable of inducing strong antitumor immunity, and XCL1 is a specific ligand with affinity for XCR1.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍細胞ワクチン XCR1 樹状細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞には CTL を活性化するサブセットや、液性免疫、すなわち抗体産生を支持するヘルパーT細胞(Th細胞)を活性化するサブセットが存在し、また、免疫応答にブレーキをかける機能を持ったサブセットも存在する。腫瘍免疫において樹状細胞は CTL 誘導のための抗原提示を行う要となる免疫担当細胞であるが、これまでのがんワクチンによる腫瘍免疫治療では、これらの多様なサブセットに送達されるため、抗腫瘍効果が十分発揮できない。今回我々が注目したのは、CTL 誘導活性の強い樹状細胞サブセットとして、ケモカイン受容体 XCR1 を発現する樹状細胞(XCR1⁺ DC)である。報告では、XCR1⁺DC を *in vivo* で欠失させられる遺伝子改変マウスを用いて、*in vivo* におけるウイルスや細菌の感染および癌に対する CTL の誘導に XCR1⁺DC が必須であることが証明されている (Yamazaki, *J Immunol* 2013;190:6071-82, Shimizu, *J Immunol* 2013;190:5609-19, Eickhoff, *Cell* 2015;162:1322-37, Kitano, *PNAS* 2016;113:1044-9)。本申請者らは XCR1 の特異的なリガンドである XCL1 に腫瘍抗原ペプチドを連結させることにより、腫瘍抗原ペプチドが XCR1⁺ DC に選択的に送達され、有効な抗腫瘍免疫が誘導できると仮説した(図1)。これまでの研究で、OT-I ペプチド、OVA タンパクに比較して、mXCL1-OT-I をマウスに投与した場合に特異的 IFN- γ 産生の誘導が顕著に認められた。また、マウス XCL1 (mXCL1) とがん抗原ペプチドを融合させたタンパク(mXCL1-ペプチド連結ワクチン)を作製し、マウス腫瘍モデルにおいて OVA 発現腫瘍細胞株(メラノーマ細胞株 B16-OVA) に対する抗腫瘍効果を検討した。OT-I ペプチド、OVA タンパク、および mXCL1-OT-I を 1 週間間隔で 2 回ワクチンし、投与後 7 日目に OVA 発現 B16 癌細胞株を接種した。結果として mXCL1-OT-I で最も強い抗腫瘍効果が認められた。抗原のモル数を考慮すると、OT-I ペプチド、OVA タンパクは、各々モル数に換算して、mXCL1-OT-I の 133 倍、15 倍の抗原を含んでいる。この点を考慮すると、mXCL1-OT-I の有効性は極めて高かった (Mizumoto, et al *Br J Cancer* 2020)。一方、腫瘍免疫において、腫瘍細胞の heterogeneity に起因する標的腫瘍抗原の発現低下が課題である。この課題を克服する方法として、単一の抗原ではなく、複数の腫瘍抗原に対する CTL を誘導すること、あるいはがん細胞独自の遺伝子変異に伴って新たに生まれた変異抗原(neoantigen)に対する CTL を誘導することが挙げられる。臨床応用を念頭に置いた場合、種々の抗原や neoantigen の一つ一つに XCL1 を連結させたワクチンを作製することは困難であることを勘案し、実臨床を見据えた新たな戦略として、腫瘍細胞自身に XCL1 を発現させたのち、放射線照射した非増殖性 XCL1 発現腫瘍細胞ワクチンを着想するに至った。腫瘍細胞自身をワクチンすることで、腫瘍細胞のもつ多様な抗原に対応する CTL を誘導し、さらに XCL1 を腫瘍細胞の細胞膜上に発現させることで、強力な CTL 誘導能をもつ XCR1⁺ DC に選択的に送達することが理論的に可能となる。

2. 研究の目的

本研究では腫瘍抗原の発現低下による免疫逃避を克服するため、単一の腫瘍抗原ではなく、腫瘍細胞のもつ多様な抗原を標的とするという観点から、腫瘍細胞に XCL1 遺伝子を導入し、放射線照射により非増殖性とした XCL1 腫瘍細胞ワクチンを新規に開発し、腫瘍細胞が優れた CTL 誘導能を有する XCR1⁺ DC に優先的に送達されることで、多様な腫瘍抗原に対する CTL が誘導され、強力な抗腫瘍効果の発揮することを明らかにする。

3. 研究の方法

腫瘍細胞が優れた CTL 誘導能を有する XCR1⁺DC に優先的に送達されることで、多様な腫瘍抗原に対する CTL が誘導され、強力な抗腫瘍効果の発揮することを明らかにする。方法、手順は次の通りである。

pcDNA3 ベクターのインサート領域に XCL1 遺伝子を導入し、マウス大腸癌由来細胞である MC38 ヘリポフェクションしたのちドラッグセレクションを行い、limiting dilution により XCL1 発現 MC38 クローンの絞り込みを行う。PCR と XCL1 ELISA 定量にて最も XCL1 を産生している細胞株を同定し、本実験で用いる XCL1 産生腫瘍細胞(XCL1MC38)とする。

XCL1MC38 の *in vivo* での増殖能を検討する。WT マウスに MC38、XCL1MC38 を接種し、その増殖速度を検討する。同様に XCR1KO マウスでも検討する。

XCR1⁺DC が venus を発現している XCR1⁺venus マウスを用いて、MC38、XCL1MC38 を接種し、48 時間後に腫瘍を摘出、蛍光観察を行う。

放射線照射による XCL1-MC38 への増殖を検討する。XCL1 産生腫瘍細胞に 50Gy の放射線照射を施行したものと無処理の細胞をそれぞれ *in vitro* で培養を行い、経時的に細胞数をカウントする。また、アポトーシスの評価のため AnnexinV および 7AAD で染色し、FACS 解析を行う。

放射線照射による XCL1 産生への影響を検討する。放射線照射 XCL1-MC38 と XCL1-MC38 を同条件で培養し、培養液上清に産生されてきた XCL1 の量を ELISA を用いて測定する。

XCL1 産生腫瘍細胞ワクチンの予防的投与による腫瘍増殖抑制効果を検討する。

同様の実験を XCR1 ノックアウトマウスを使用したワクチン治療モデルで検討する。

4. 研究成果

pcDNA3 ベクターのインサート領域に XCL1 遺伝子を導入し、マウス大腸癌由来細胞である MC38 とマウスメラノーマ由来細胞株である B16 ヘトリポフェクションした。その後、ネオマイシンに

よるドラッグセレクションを行い、limiting dilutionにより17クローンがpickupされた。これらにreal time PCRを施行し、遺伝子発現の強かった5クローンを選択し、さらにXCL1 ELISAにて定量を行い、最もXCL1を産生していた株を実験のXCL1産生腫瘍細胞(XCL1MC38)としてXCL1MC38のin vivoでの増殖能の検討を実施した。WTマウスにMC38, XCL1MC38を接種し、その増殖速度を検討したところXCL1MC38はMC38に比して有意に増殖速度が遅かった。この結果からXCL1が腫瘍増殖を抑制していることを示唆された。同様にXCR1KOマウスで行ったところ、両群間の腫瘍増殖速度の有意差は失われたことから、XCR1依存的にXCL1MC38の腫瘍増殖が抑制されていることがわかった。

XCR1^{venus}マウスにMC38とXCL1MC38を接種し、48時間後に腫瘍を摘出し、蛍光観察したところ、MC38接種群では、腫瘍内にvenusを発現しているXCR1⁺DCをほとんど認めなかったが、XCL1MC38接種群ではそれを認めた。したがって、XCL1の作用により、腫瘍内へのXCR1+DCのmigrationを促していることが示唆された。

放射線照射によるXCL1-MC38の増殖の検討では、XCL1産生腫瘍細胞に50Gyの放射線照射を施行したものと比較対象として、無処理の細胞をそれぞれ用意し、Dishで培養した。経時的観察で、無処理の細胞はコンフルエントになったのに対して、50Gyの放射線照射をおこなった細胞は増殖を認めなかった。また、放射線照射24時間後のAnnexinVおよび7AAD染色ではアポトーシス細胞数は2群間で有意差は認めなかった。

放射線照射によるXCL1産生への影響の検討では、50Gyの放射線照射を行ってもXCL1の産生能は障害されることはなく、放射線を照射していない細胞と同様に上澄内へのXCL1の蓄積を認めた。このことより、少なくとも放射線照射施行後72時間まではXCL1産生能が保たれていることがわかった。すなわち、XCL1MC38は放射線を照射することによりXCL1産生能を保ったまま増殖能を失った状態が得られた。XCL1産生腫瘍細胞ワクチンによる腫瘍増殖抑制効果の検討を行った。XCL1MC38をWTマウスの左側大腿に接種し、腫瘍細胞を右側大腿に接種し、右大腿の腫瘍増殖の経過を観察した。すると、XCL1MC38群でコントロール群と比較して有意に腫瘍の増殖が抑えられ、XCL1産生腫瘍細胞ワクチンによる腫瘍増殖抑制効果が証明された。XCR1KOマウスを使用したワクチン治療モデルの実験でXCL1MC38による抗腫瘍効果が消失し、XCL1-XCR1を介した機序で免疫誘導が増強されていることがわかった。また、MHCclassI抗原が欠損した-2 microglobulin KOマウスを用いた場合も、XCL1MC38の腫瘍増殖抑制効果が失われた。そこで実際に、wholecell vaccineによりCD8⁺Tcell活性が増強され、腫瘍増殖を抑制しているのかを確認するために、whole-cell-vaccineを投与したマウスのリンパ節細胞を回収しました。回収したリンパ節細胞を2日間非動化MC38およびIL2の存在下でin vitro stimulationを行い、その後、MACSでCD8⁺Tcellを分離し、その細胞傷害活性を検討した。すると、XCL1MC38投与群において細胞傷害活性は優位に増強していた。結論として放射線照射XCL1MC38はコントロールMC38と比較して有意に腫瘍増殖を抑制した。この腫瘍増殖抑制はXCL1がワクチン接種部へのXCR1+DC遊走を促し、効率的に腫瘍特異的CTLを誘導できたと考えられた。

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 Mizumoto Y, Hemmi H, Katsuda M, Miyazawa M, Kitahata Y, Miyamoto A, Nakamori M, Ojima T, Matsuda K, Nakamura M, Hayata K, Fukuda-Ohta Y, Sugiyama M, Ohta T, Orimo T, Okura S, Sasaki I, Tamada K, Yamaue H, Kaisho T.	4. 巻 122
2. 論文標題 Anticancer effects of chemokine-directed antigen delivery to a cross-presenting dendritic cell subset with immune checkpoint blockade.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1185-1193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-0757-2	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 宮本 篤、勝田 将裕、宮澤 基樹、北畑 裕司、水本 有紀、小林 良平、尾島 敏康、邊見 弘明、改正 恒康、山上 裕機
2. 発表標題 XCL1産生Whole-Cell-Vaccineによる腫瘍抑制効果の検討
3. 学会等名 第32回日本バイオセラピィ学会学術集会総会
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	山上 裕機 (Yamaue Hiroki) (20191190)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	
研究分担者	勝田 将裕 (Katsuda Masahiro) (50464673)	和歌山県立医科大学・医学部・准教授 (24701)	

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 分 担 者	北畑 裕司 (Kitahata Yuji) (00535338)	和歌山県立医科大学・医学部・学内助教 (24701)	