

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：83802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12094

研究課題名(和文) ワクチン・アジュバント -TCP免疫賦活作用のオートファジー修飾による増強

研究課題名(英文) Research toward the development of beta-TCP as a novel vaccine adjuvant.

研究代表者

丸山 宏二 (Maruyama, Kouji)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：20311417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨補填材として臨床で使われる β -リン酸三カルシウム(β -TCP)は、免疫賦活作用を有する。マウス腫瘍モデルでは、 β -TCP・がん抗原・Toll様受容体(TLR)リガンドの三者により強い抗腫瘍効果が誘導される。本研究では、インフラマソーム活性化を指標に β -TCPの免疫賦活作用を増強するオートファジー(AP)調節物質を探索、マウス腫瘍モデルで抗腫瘍効果を評価した。その結果、試験管内の探索で2種類の化合物が選抜されたが、マウス抗腫瘍試験では何れも β -TCPへの増強作用を認めなかった。一方、これら2種類のAP阻害物質は、TLRリガンドとの併用で強い抗腫瘍効果を誘導することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、がん治療の領域では、細胞毒性をもつ化学療法剤による古典的的化学療法から、がん細胞特異的な分子標的薬や免疫系を活性化する免疫チェックポイント阻害剤(ICPI)による治療へと急速な方向転換が始まっています。特にがん免疫療法は、がん患者さんが本来持つ身体の機能をアップさせてがんと戦う治療法であり、有効性が高く副作用が弱い治療法として大変期待されています。ノーベル賞を受賞した本庶佑博士の開発したICPIのオプジーボをはじめ、有効な薬剤の多くが大変高価な抗体医薬です。本研究の成果は、免疫系を活性化するより安価な小分子化合物の開発・臨床応用に道を拓くもので、がん免疫療法の新しい流れに資するものです。

研究成果の概要(英文)：Beta-tricalcium phosphate (b-TCP), which is clinically used as a bone substitute material, has an immunostimulatory effect. In mouse tumor models, combination therapy with b-TCP, tumor antigens (TA), and Toll-like receptor ligands (TLRL) induces potent antitumor effects. In this study, we searched for autophagy (AP) modifiers that enhance the immunostimulatory effect of b-TCP using inflammasome activation as an index in vitro, and evaluated the antitumor effect in mouse tumor models. As a result, two AP inhibitors were selected as candidates by in vitro screening, but none of the mouse antitumor studies showed an enhancing effect on b-TCP. On the other hand, these two AP inhibitors were shown to induce potent antitumor effects when used in combination with TA and TLRL. Although these results deviate from the original objectives, but we believe that the findings provide completely novel insights that pave the way for the application of TLRL and AP inhibitors to cancer immunotherapy.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード： β -TCP オートファジー修飾物質 Toll様受容体 がん抗原 がん免疫療法

1. 研究開始当初の背景

骨主成分のリン酸カルシウムの化合物である β -TCP は、生体に対する毒性が低く、整形外科領域で骨補填材として使用されてきた。これまでに、骨再生における β -TCP の作用に関しては様々な知見が集積しているが、免疫系に対する作用の詳細は明らかになっていない。申請者らは、これまでに β -TCP に関して以下の知見を報告している。

1. 正常マウス皮下へ移植した β -TCP 顆粒は、免疫細胞の遊走を刺激して移植周囲への著明な細胞の集積を招来した。また、マウス・マクロファージ (M Φ) の株化培養細胞 J774A.1 を β -TCP 顆粒で刺激したところ、共刺激分子 CD86 の発現亢進と炎症性サイトカイン TNF- α 、ケモカイン MIP-1 α 、免疫細胞の遊走等に関わる ICAM-1 の可溶性蛋白の産生亢進を認め、J774A.1 を β -TCP で刺激した培養上清はマウス脾臓細胞の遊走を増強した。

2. マウス骨髄細胞から分化させた M Φ 及び樹状細胞 (DC) の初代培養系へ β -TCP 顆粒を添加したところ、M Φ では共刺激分子 CD86 の発現亢進とケモカイン CCL2 ~ 5 及び CXCL2 各分子の産生亢進が、DC では抗原を提示する主要組織適合抗原 MHC クラス I とクラス II、CD40・CD80・CD86 の各共刺激分子と成熟 DC のマーカー DEC205 の発現亢進と CCL2 及び 3、CXCL2 の各ケモカイン及び M Φ の分化を刺激するサイトカイン M-CSF の産生亢進を認めた。さらに、 β -TCP は DC の機能的成熟 (エンドサイトーシスの低下) を誘起し、 β -TCP で刺激した DC の培養上清は脾臓細胞の遊走を増強した。これらの成績より、 β -TCP は表現型と機能の両面において M Φ と DC の活性化と成熟を誘導することが示された。

近年、炎症反応において重要な役割を果たす蛋白複合体であるインフラマソームに関する研究が進み、様々な物質が「危険信号」としてインフラマソームを介して細胞に認識され、炎症性サイトカイン IL-1 β や IL-18 の産生亢進をはじめ様々な免疫応答が惹起されることが知られている [Schroder K et al, Cell 2010]。申請者らは、 β -TCP がインフラマソームを活性化すること (図 1、未発表成績) 及び E.G7-OVA 腫瘍モデル (後述) において β -TCP と Toll 様受容体リガンド (TLRL) である Poly(I:C) の併用によって、腫瘍抗原ワクチンの抗腫瘍効果が著明に増強することを見出している (図 2、未発表成績)。以上の成績より β -TCP はインフラマソームを活性化する作用をもち、ワクチン・アジュバントとしての免疫増強作用の一部は、インフラマソーム活性化を介することが示唆されている。

近年、研究の大いに進展した生物学の領域のひとつに「オートファジー」がある。オートファジーは、細胞内の不要または機能しなくなった構成成分を分解・除去または再利用するためのプロセスで、代謝系や免疫系など広範な生命現象に深く関わる。免疫系の機能、特に炎症反応や自己免疫に対してオートファジーは抑制的に作用することが知られており、相互に相反的に作用する。実際、オートファジー関連蛋白 Atg16L1 の一塩基多型がオートファジー不全を引き起し、炎症反応ひいてはクローン病の発症と強く相関することが報告されている。これまでの研究により、オートファジーと炎症反応の関係は解明が進んできているとはいえ、オートファジー調節物質を用いて積極的に免疫反応を調節しようという試みはまだこれからの領域であり、解明すべき事項は数多く残されている。

2. 研究の目的

本研究は、オートファジーの抑制物質または促進物質を用いてオートファジーの反応

を調節、ワクチン・アジュバントとしてのβ-TCPの作用に対する影響を明らかにし、β-TCPの作用を増強する方法・条件を探索することを目的とする。

本研究の学術的独自性は、ワクチン・アジュバントの効果増強物質としてオートファジー調節物質の作用を検討することである。ある生体機能を調節する化合物は、作用点が単一機能だけではないこともあり注意を要するが、本研究からオートファジーと免疫系の新たな機能的関連性の見いだされる可能性があり、オートファジー調節物質とβ-TCPとの併用により観察される現象には大きな興味もたれる。

3. 研究の方法

本研究では、本研究で検討したオートファジー調節物質は、促進物質4種類、阻害物質10種類の計14種類の化合物が含まれる。これらのうち、以下の三段階のスクリーニングを実施した。

(1) ヒト単球様培養細胞 THP-1 を用いたスクリーニング

ヒト単球様培養細胞 THP-1 を PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) によって M 様細胞へ分化させ、β-TCP、TLRL のリポポリサッカライド (LPS) 及びオートファジー調節物質を添加し、IL-1βの産生量をインフラマソーム活性化の指標として目的物質の初段のスクリーニングを行った。

(2) マウス樹状細胞 (DC) の初代培養系を用いたスクリーニング

上記の初段のスクリーニングによって選抜されたオートファジー調節物質について、C57BL/6 マウス骨髄細胞より顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF) で分化させた DC の初代培養系にβ-TCP、LPS、及びオートファジー調節物質を添加し、IL-1βの産生量をインフラマソーム活性化の指標として目的物質の二次スクリーニングを行った。

(3) マウス腫瘍モデルを用いる抗腫瘍試験

Ovalbumin (OVA) を遺伝子導入したマウス・リンパ腫細胞 E.G7-OVA と OVA 蛋白を抗原ワクチンとして用いる腫瘍モデルにおいて、β-TCP と TLRL の Poly(I:C) の併用がワクチンの抗腫瘍効果を著明に増強する。この実験系にオートファジー調節物質の投与を加え、抗腫瘍効果に対する影響を検討する。図1にオートファジー阻害物質の 3-methyladenine (3-MA)を用いた抗腫瘍試験の実験スケジュールの概要を示す。マウスに週1回、非検薬を含む薬剤を3週間にわたって投与し、4週目に腫瘍細胞を皮下に投与する。その後1か月にわたり腫瘍増殖をモニターした。

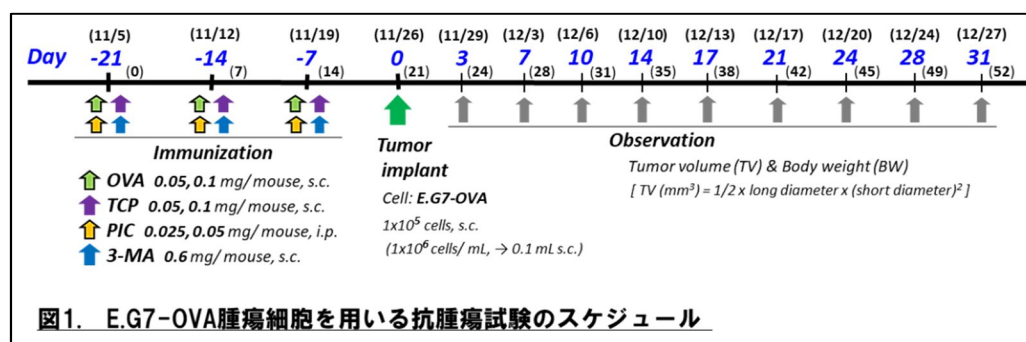


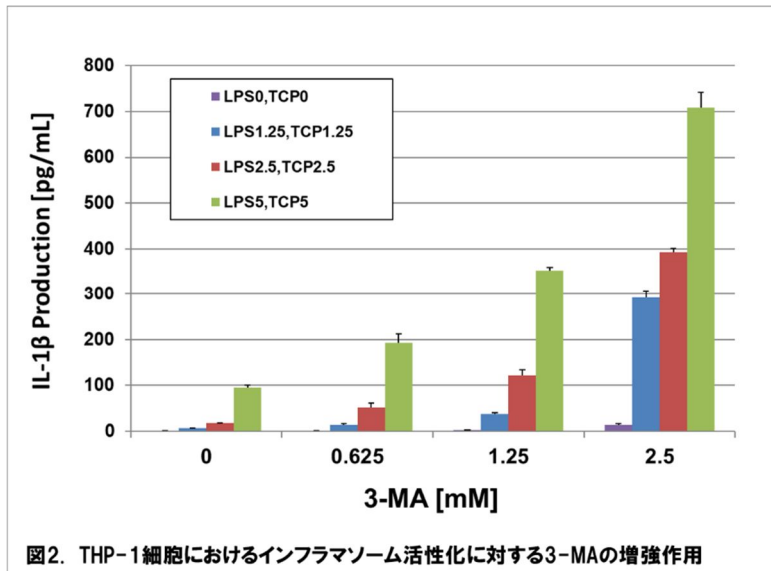
図1. E.G7-OVA腫瘍細胞を用いる抗腫瘍試験のスケジュール

4. 研究成果

本研究で検討したオートファジー調節物質は、促進物質4種類、阻害物質10種類の計14種類の化合物が含まれる。これらのうち、一次スクリーニングで4種類、二次スクリーニングで2種類の化合物が残り、これらはすべてオートファジー阻害物質であった。

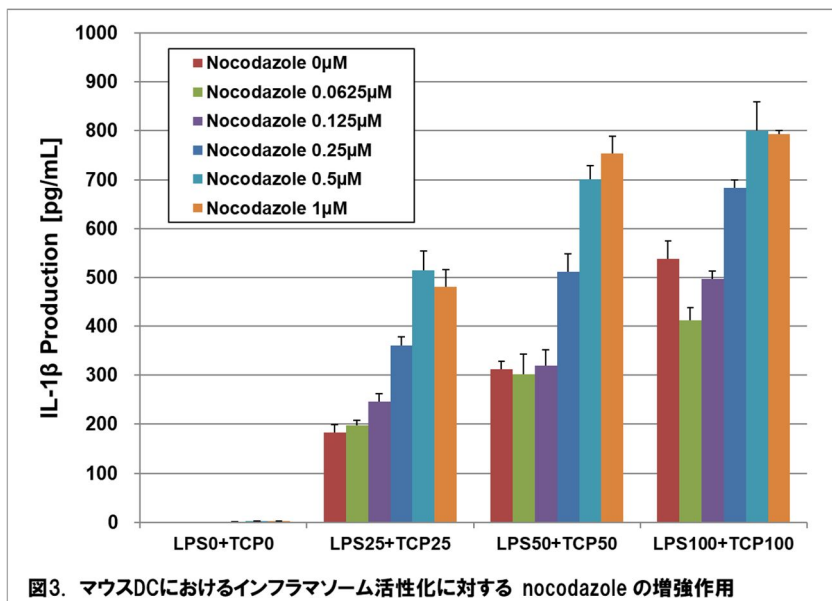
(1) ヒト単球様培養細胞 THP-1 を用いたスクリーニング

一次スクリーニングとして THP-1 細胞を用いた。図 2 にオートファジー阻害物質 3-MA の結果を示す。本実験では、3-MA は 0~2.5 μM 、 β -TCP は 0~5 $\mu\text{g/mL}$ 、LPS は 0~5 ng/mL の範囲で濃度を振って検討を行った。その結果、 $\langle\beta$ -TCP 0.625 $\mu\text{g/mL}$ + LPS 0.625 $\text{ng/mL}\rangle$ 、 $\langle\beta$ -TCP 1.25 $\mu\text{g/mL}$ + LPS 1.25 $\text{ng/mL}\rangle$ 、及び $\langle\beta$ -TCP 2.5 $\mu\text{g/mL}$ + LPS 2.5 $\text{ng/mL}\rangle$ 添加の各実験群において 3-MA の濃度依存的に IL1- β 産生が増加し、 β -TCP と LPS によるインフラマソーム活性化を増強することが示された。



(2) マウス樹状細胞 (DC) の初代培養系を用いたスクリーニング

骨髄細胞から誘導したマウス DC 用いた二次スクリーニングに関し、オートファジー阻害物質 nocodazole の検討結果を図 3 に示す。本実験では、nocodazole は 0~1 μM 、 β -TCP は 0~100 $\mu\text{g/mL}$ 、LPS は 0~100 ng/mL の範囲で濃度を振って検討を行った。 β -TCP 及び LPS 非添加の状態では、nocodazole を加えても IL1- β 産生の増加は観察されないが、 $\langle\beta$ -TCP 25 $\mu\text{g/mL}$ + LPS 25 $\text{ng/mL}\rangle$ を添加した実験群においては、nocodazole の用量依存的な IL1- β 産生の増加を認めた。 $\langle\beta$ -TCP 50 $\mu\text{g/mL}$ + LPS 50 $\text{ng/mL}\rangle$ 及び $\langle\beta$ -TCP 100 $\mu\text{g/mL}$ + LPS 100 $\text{ng/mL}\rangle$ 実験群においては、基底レベルの IL1- β 産生が増加しており、明瞭な nocodazole の用量依存性は認められなかった。



(3) マウス腫瘍モデルを用いた抗腫瘍試験

上述の二次スクリーニングをパスした化合物について、マウス・リンパ腫細胞 E.G7-OVA 腫瘍モデルを用いて抗腫瘍試験を実施した。図 4 に 3-MA を用いた検討結果を示す。無処置のコントロール群と比較して、抗原を含まない<3MA+TCP+PIC>群 [PIC は Poly(I:C)を表す] 及び<3MA+TCP+OVA>群では、差のない腫瘍増殖が観察された。<OVA+TCP+PIC>群は強い抗腫瘍効果の観察される薬剤の組み合わせだが、 β -TCP を欠く<3MA+OBA+PIC>群においても、腫瘍移植 21 日目以降に同様な有意な腫瘍増殖抑制が観察された。このことから、3-MA は β -TCP に対しては抗腫瘍効果を増強するような作用を示さないが、TLRL の Poly(I:C)に対しては増強作用を有するものと考えられた。

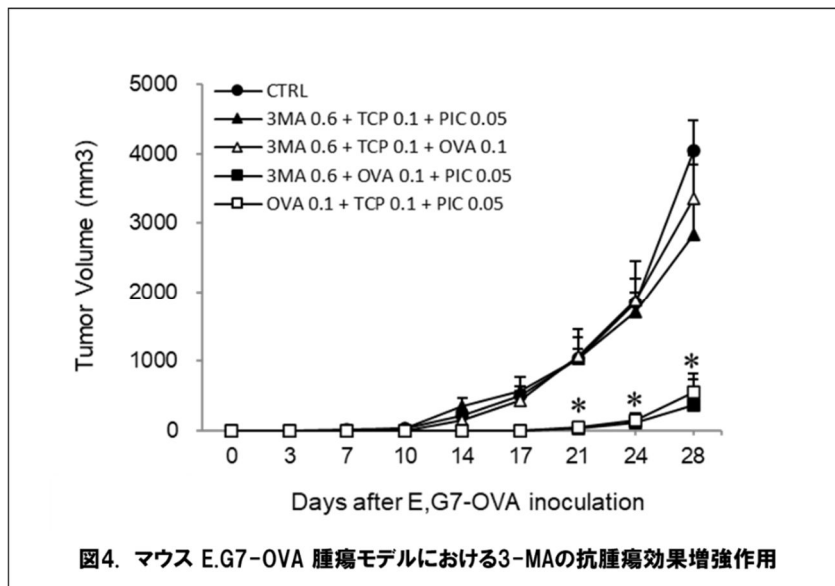


図4. マウス E.G7-OVA 腫瘍モデルにおける3-MAの抗腫瘍効果増強作用

本研究の結果からは、当初の目的であったワクチン・アジュバントとして β -TCP の作用を増強するオートファジー調節物質の同定することができなかったが、TLRL の抗腫瘍効果を増強する物質は見出すことができた。また、2次スクリーニングまで残った nocodazole に関しては、 β -TCP と Poly(I:C)の両者に対して明確な抗腫瘍効果増強効果を観察することはできなかった。本研究の結論は、「オートファジー阻害物質の 3-MA は、TLRL である Poly(I:C)のアジュバント効果を増強する」となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 丸山宏二
2. 発表標題 免疫賦活物質としての β -TCPのポテンシャル インフラマソーム活性化能について
3. 学会等名 日本実験動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kouji Maruyama
2. 発表標題 Immunomodulating effect of beta-tricalcium phosphate and its potential as a vaccine adjuvant
3. 学会等名 2nd World Congress on Pharmacology and Toxicology (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------