

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09183

研究課題名(和文) 樹状細胞サブセットの選択的貪食による革新的XCL1産生腫瘍細胞ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of XCL1-producing tumor cell vaccine by selective phagocytosis of dendritic cell subsets

研究代表者

勝田 将裕 (Katsuda, Masahiro)

和歌山県立医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：50464673

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)：マウス腫瘍細胞にXCL1を産生する遺伝子を導入して腫瘍増殖能を失活させ、これを whole-cell-vaccineとしてマウスに投与した。XCL1産生 whole-cell-vaccineを投与したマウスでは、腫瘍増殖が抑制された。XCR1ノックアウトマウスやB2microglobulinノックアウトマウスを用いたモデルでは腫瘍増殖抑制効果消失したことより、XCR1依存性、CD8Tcell依存性の効果が示唆された。また、XCL1産生 whole-cell-vaccineを投与後24時間に接種部を摘出、観察おこなったところ、周囲に多くのXCR1+ DCが遊走してきていることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

XCR1を発現したDCサブセット(XCR1+ DC)は、CTLの誘導に優れており抗腫瘍免疫において重要な役割を果たしていると報告されている。我々はXCR1+DCサブセットに効率的に抗原提示を行う whole-cell-vaccineを作成し、その抗腫瘍効果を検討した。XCL1産生 whole-cell-vaccineは、ワクチン接種部へのXCR1+ DCの遊走を促し効率的に腫瘍細胞がXCR1+ DCへと取り込まれることにより、腫瘍特異的CTLが誘導され抗腫瘍効果を発揮することがわかった。今後の臨床応用に向けさらなる改良を加えれば、がんワクチン療法の新たな選択肢となりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mouse tumor cells transfected with XCL1 producing gene and inactivated by irradiation were administered as a whole-cell-vaccine to tumor-bearing mice. Tumor growth was suppressed in mice treated with XCL1-producing whole-cell-vaccine. In models using XCR1-knockout mice and B2microglobulin-knockout mice, the tumor growth-suppressive effect disappeared, suggesting that this effect is dependent on both XCR1 and CD8Tcells. In addition, 24 hours after administration of the XCL1-producing whole-cell-vaccine, many XCR1+ DC migrated around the vaccine inoculated site.

研究分野：消化器外科学

キーワード：がんワクチン 樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年、樹状細胞[Dendritic cell(DC)]を中心とした抗原提示細胞は不均一な細胞集団であり、免疫応答を活性化させるばかりでなく、逆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ことがわかってきた。従来のがんワクチンでは、これらの多様な抗原提示細胞のサブセットすべてに送達されることになり、抗原特異的細胞障害性 T 細胞[cytotoxic T lymphocyte(CTL)]の誘導が制限されていた可能性が考えられる。従って、がん細胞を殺す機能を持った CTL を誘導する活性の強い DC サブセットに、生体内で腫瘍抗原を選択的に送達させることができれば、非常に効率よく強力な抗原特異的 CTL を誘導できると考えられた。そこで我々は、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<sup>+</sup> DC)に注目した。報告では、XCR1<sup>+</sup>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<sup>+</sup> DC が必須であることが証明されている。

我々は、生体内で XCR1<sup>+</sup>DC に選択的に抗原ペプチドを送達する DDS 機能を付与した次世代型ペプチドワクチンとして、XCR1 のリガンドである XCL1 と腫瘍抗原ペプチドの連結ワクチンを開発した。この連結ペプチドをマウスに投与すると、生体内でペプチド特異的 CTL の顕著な誘導を介した強力な抗腫瘍効果が得られた。従って、強力な腫瘍抗原特異的 CTL の誘導には、CTL 誘導活性の強い樹状細胞サブセットである XCR1<sup>+</sup> DC への抗原の選択的な送達が極めて有用であることが明らかとなった。

一方、がんワクチンの臨床応用においては、免疫原性の高い腫瘍抗原の選択が課題である。近年、免疫療法において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である neoantigen は極めて免疫原性が高く、複数の neoantigen に対する CTL を誘導することが重要であることが明らかとなってきた。元来樹状細胞は患者生体内において腫瘍を貪食すると、neoantigen を含む複数の腫瘍抗原由来エピトープペプチドを提示する機能を有している。従って、生体内で CTL を誘導する活性の強い DC サブセットである XCR1<sup>+</sup> DC に腫瘍細胞を選択的に貪食させる治療戦略により、免疫原性の強い複数の腫瘍抗原に対する CTL の効率的な誘導を介した強力な抗腫瘍効果を発揮する新規がんワクチン療法の開発を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、腫瘍細胞自身に XCL1 を遺伝子導入して XCL1 を産生できるように改変したのち、放射線照射した非増殖性 XCL1 産生腫瘍細胞ワクチンを開発することである。XCL1 が XCR1 の特異的なリガンドであること、XCL1 により XCR1<sup>+</sup> DC の遊走能が更新することから、XCL1 を産生する腫瘍細胞自身をワクチンすることで、生体内で強力な CTL 誘導能をもつ XCR1<sup>+</sup> DC により腫瘍細胞が効率的に貪食され、腫瘍細胞のもつ多様な抗原に対応する強力な CTL を誘導することが可能と考えた(図1)。

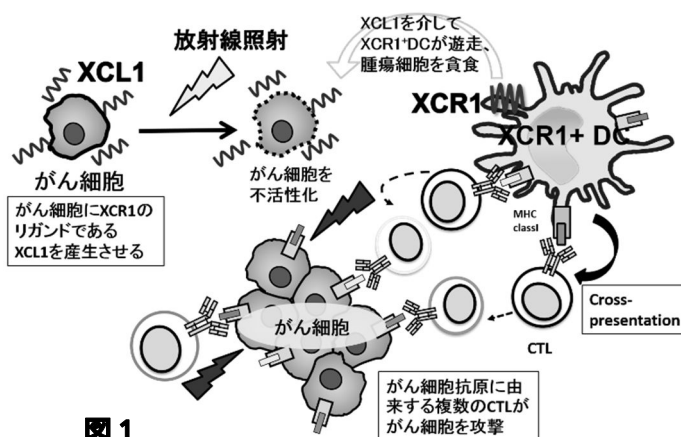


図1

## 3. 研究の方法

腫瘍細胞株に XCR1 の特異的リガンドである XCL1 を産生する遺伝子をリポフェクションにて導入し、恒常的に XCL1 を産生する腫瘍細胞株を樹立した。実際に XCL1 を産生しているかどうかについては Real Time PCR 法、ELISA 法を用いて確認した。作成した XCL1 産生腫瘍株に放射線照射を行い、不

活化することにより、whole-cell-vaccine を作成した。この新規ワクチンを、各種マウスに投与することにより、その抗腫瘍効果およびそのメカニズムを検討した。

#### 4. 研究成果

マウスメラノーマ由来細胞株(B16)およびマウス大腸癌由来細胞株(MC38)に XCL1 産生遺伝子をリポフェクタミンにて導入し、恒常的に XCL1 を産生する腫瘍細胞株を樹立した。

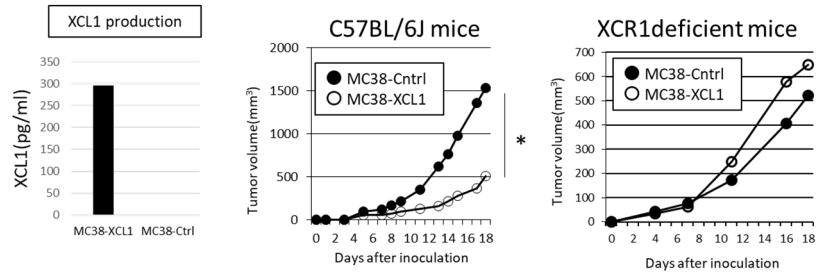


図 2

この XCL1 産生腫瘍細胞株は、in vitro では XCL1 非産生腫瘍株と同等の増殖速度であったにもかかわらず、野生型マウスに接種を行ったところ、有意に腫瘍増殖が抑制された。一方、XCR1 ノックアウトマウスに接種に接種した場合には、同等の腫瘍増殖速度であった(図 2)。

これらの結果より、XCL1 の産生は、なんらかの XCR1 依存的な抗腫瘍効果を有していることが示唆された。この抗腫瘍効果を利用したワクチンを作成すべく、XCL1 産生腫瘍細胞に放射線照射を行い、腫瘍増殖能を失活させ、かつ、XCL1 産生能は維持している状態を作り出し、これを whole-cell-vaccine としてマウスに投与した。

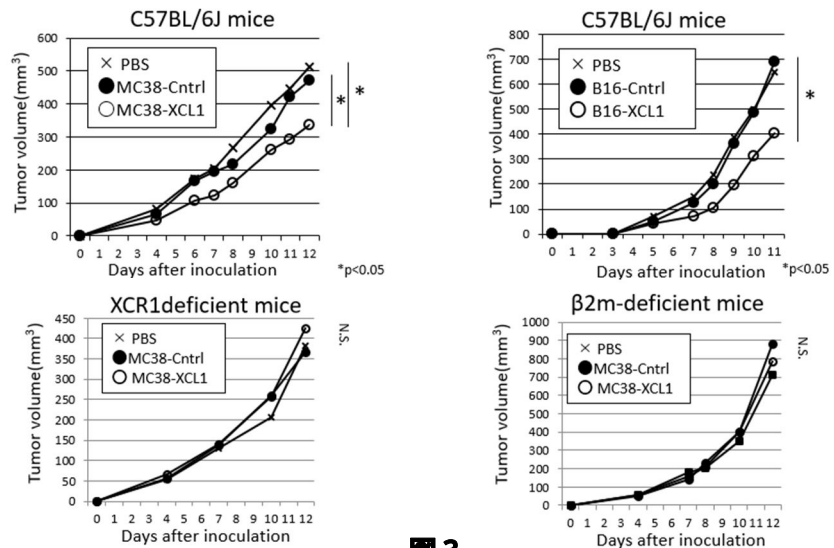


図 3

XCL1 産生 whole-cell-vaccine を投与したマウスでは、XCL1 非産生 whole-cell-vaccine と比較して腫瘍増殖が抑制される結果を得られた。この腫瘍増殖抑制効果は、XCR1 ノックアウトマウスや B2microglobulin ノックアウトマウスを用いたモデルでは消失したことより、XCR1 依存性、CD8Tcell 依存性であることが示唆された(図 3)。また、XCL1 産生 whole-cell-vaccine を投与後、所属リンパ節を摘出、CD8Tcell を MACS により分離、クロムリリースアッセイにてその細胞障害活性を検討したところ、XCL1 産生 whole-cell-vaccine にて誘導された CD8Tcell は XCL1 非産生 whole-cell-vaccine により誘導された CD8Tcell よりも有意に腫瘍細胞に対する障害活性があがっていることが分かった(図 4)。以上の結果より、XCL1 産生 whole-cell-vaccine は、効率的に XCR1+ DC へと取り込まれることにより、腫瘍特異的 CTL が誘導され、抗腫瘍効果を発揮することがわかった。

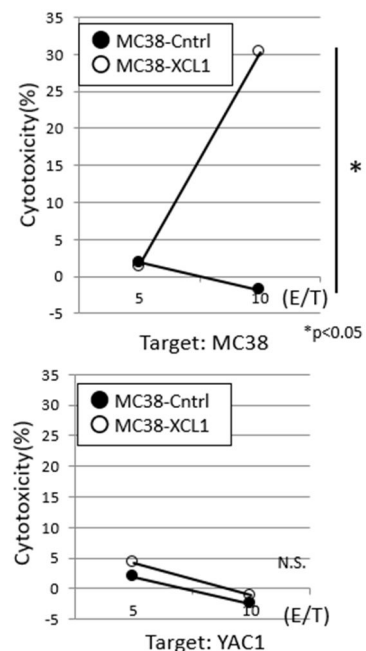


図 4

## 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 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(8)
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 Br J 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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masahiro Katsuda, Motoki Miyazawa, Toshiyasu Ojima, Hiroki Yamaue et al	4. 巻 20 (1)
2. 論文標題 A Double-Blind Randomized Comparative Clinical Trial to Evaluate the Safety and Efficacy of Dendritic Cell Vaccine Loaded With WT1 Peptides (TLP0-001) in Combination With S-1 in Patients With Advanced Pancreatic Cancer Refractory to Standard Chemotherapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trials	6. 最初と最後の頁 242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13063-019-3332-5.	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 Yuki Mizumoto, Hiroaki Hemmi, Masahiro Katsuda, Motoki Miyazawa, Yuji Kitahata, Atsushi Miyamoto, Mikihiro Nakamori, Toshiyasu Ojima, Kenji Matsuda, Masaki Nakamura, Keiji Hayata, Yuri Fukuda, Masanaka Sugiyama, Tomokazu Ohta, Takashi Orimo, Soichiro Okura, Izumi Sasaki, Koji Tamada, Hiroki Yamaue, Tsuneyasu Kaisho	4. 巻 122(8)
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 Gan To Kagaku Ryoho .	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2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、戸村 道夫、改正 恒康、山上 裕機
2. 発表標題 樹状細胞サブセットへの選択的・効率的抗原情報送達を目的とした腫瘍細胞ワクチンの開発
3. 学会等名 第121回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

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、戸村 道夫、改正 恒康、山上 裕機
2. 発表標題 XCR1+ DCをターゲットにしたwhole-cell-vaccineの開発
3. 学会等名 第25回にほん癌免疫学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新規がん免疫療法開発の基礎研究 <a href="https://wakayama-med-2ndsurg.jp/research/basic.php">https://wakayama-med-2ndsurg.jp/research/basic.php</a>
--

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	北畑 裕司  (Kitahata Yuji)  (00535338)	和歌山県立医科大学・医学部・講師    (24701)	

6. 研究組織（つづき）

	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・学長特命教員（特別顧問）    (24701)	
研究分担者	水本 有紀  (Mizumoto Yuki)  (60596980)	和歌山県立医科大学・医学部・学内助教    (24701)	
研究分担者	宮澤 基樹  (Miyazawa Motoki)  (90549734)	和歌山県立医科大学・医学部・講師    (24701)	

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