

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16863

研究課題名(和文) 癌抗原特異的T細胞の腫瘍内への浸潤を増強するメカニズムの解明

研究課題名(英文) Research for the way to enhance the infiltration of tumor antigen specific CTLs into tumors

研究代表者

中田 潤 (Nakata, Jun)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90528952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス腫瘍モデルにおいてWT1-CTLペプチド単独療法に対しCD4+T細胞の除去、ヘルパーペプチドワクチン併用によるヘルパーCD4+T細胞の併用のいずれも末梢血中のWT1特異的CTLを増殖させた。しかしCD4+T細胞除去では腫瘍内のWT1特異的CTLは増加せず、WT1ヘルパーペプチド併用が最もWT1特異的CTL浸潤を増強させた。またWT1ヘルパーペプチド併用群で腫瘍内にオリゴクローナルに増殖したWT1特異的CTLのTCR配列(1B10)を同定し、この1B10-TCR導入ウイルスベクターを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD4+T細胞にはCTLの活性・抑制の2面性が報告されてきたが、腫瘍内に癌抗原特異的CTLを効果的に誘導するためにはヘルパーペプチドCD4+T細胞が必要不可欠であることを明らかにした。本知見は今後癌ワクチン療法の開発において進むべき道を明確にした。また、ヘルプ活性の高い外来性抗原由来のCD4+T細胞は末梢血中では強い誘導を引き起こしたが、腫瘍内への癌抗原特異的CTL誘導では癌抗原特異的ヘルパーペプチドが有意に増強効果がすぐれており、腫瘍内の免疫環境においてCD4+T細胞-樹状細胞-CD8T細胞の複合体の形成が効果的な抗腫瘍免疫の誘導に必要な可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Both depletion of CD4+ T cells and combination of helper peptide vaccination could enhance the induction of WT1-specific CTL response in peripheral bloods by WT1-CTL peptide vaccination. But, the frequency of WT1-specific CTLs did not increase by the depletion of CD4+ T cells. On the contrary, combination of WT1 helper peptide could induce higher frequencies of WT1-specific CTL response than WT1-CTL peptide vaccination alone. These results suggested that WT1 specific CD4+ T cells were essential to enhance the anti-tumor WT1-CTL response by WT1-CTL peptide vaccination. Furthermore, we identified the array of T cell receptor of intra-tumoral WT1-specific CTLs, and named as 1B10-TCR. We also established virus vector which could induce 1B10-TCR.

研究分野：癌免疫

キーワード：WT1 ペプチドワクチン療法 ヘルパーペプチド

1. 研究開始当初の背景

Wilms 腫瘍の原因遺伝子である Wilms Tumor 1 gene によりエンコードされる WT1 蛋白は、アメリカがん研究所による 75 種類の癌抗原のランキングで第 1 位と高い評価を受け、申請者らはヒト臨床試験において様々な癌腫に対し WT1-CTL ペプチドワクチン療法を行いその有用性を示してきた。ヒト臨床試験における解析では、WT1-CTL ペプチドワクチン療法によりほとんどの症例で末梢血に WT1 特異的 CD8+T 細胞が誘導されたが、この WT1 特異的 CD8+T 細胞頻度と臨床効果とが必ずしも相関しない。その原因の1つとして誘導された WT1 特異的 CD8+T 細胞が腫瘍内へ遊走・浸潤できない可能性が示唆されてきた。そのため、末梢血中に誘導された WT1 特異的 CD8+T 細胞の腫瘍内への遊走・浸潤がどのように制御されているかを解明することは、WT1 ペプチドワクチン療法の効果を高めることに重要である。

近年、CD4+ヘルパーT 細胞が CTL ペプチドワクチン療法の効果を増強する可能性が示唆されており、扁平上皮癌抗原(New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma-1: NY-ESO-1)、メラノーマ癌抗原(Melanoma-associated antigen 3 : MAGE-A3)、乳癌関連癌抗原(Human epidermal growth factor receptor 2 : HER2)など様々な癌抗原に対して CD4+ヘルパーT 細胞を誘導できるヘルパーペプチド配列が同定され、これらを併用した癌ワクチン療法のヒト臨床試験が始まっている。申請者らも新たに WT1 特異的 CD4+ヘルパーT 細胞を誘導できるマウス・ヒトに共通した WT1 蛋白におけるヘルパーペプチド配列を同定した。一方で抗腫瘍免疫における CD4+T 細胞の役割に関しては2面性があるとされ、CD4+ヘルパーT 細胞によるヘルプ機能とは逆に制御性 T 細胞などの CTL 反応を抑制する CD4+T 細胞も存在する。そのため CTL ペプチドワクチン療法において、ヘルパーペプチドの併用とは逆に抗 CD4 抗体による CD4+T 細胞除去がその効果の増強や長期維持につながるという報告もある。また、一般に癌細胞は CD4+T 細胞が認識する MHC Class II 分子を提示していないことも多く、CD4+T 細胞の主な働きはサイトカインやケモカインによる腫瘍内免疫環境の改善であるため、ヘルパーペプチドの併用において CTL ペプチドが由来する抗原とは異なる抗原でもよいという説もある。実際にマウスモデルでは外来性抗原である OVA を標的としたヘルパーペプチドが癌抗原を標的としたヘルパーペプチドと同程度に CTL ペプチドワクチン療法の効果を増強したという報告も見られる。

2. 研究の目的

(1) マウス腫瘍モデルを用いた WT1-CTL ペプチドワクチン療法において、CD4+T 細胞を介して腫瘍内への WT1 特異的 CTL 反応を最も高める方法を確定する。また、さらにどのように腫瘍内への WT1 特異的 CTL 反応が誘導されたのか、そのメカニズムを解明する。

(2) マウス腫瘍モデルにおいて腫瘍内に誘導された WT1 特異的 CTL から、WT1 を発現する腫瘍を殺傷できる TCR 配列を同定し、TCR 導入ウイルスベクターを作成する。

3. 研究の方法

(1) マウス皮下腫瘍モデルを用い、WT1-CTL ペプチドワクチン療法をベースに、抗 CD4 抗体による CD4+T 細胞除去併用ワクチン群、WT1 ヘルパーペプチド併用ワクチン群、ヘルパー活性の高い外来性抗原 OVA のヘルパーペプチド併用ワクチン群の 3 群において末梢血および腫瘍内への WT1-CTL 誘導能を比較した。

(2) WT1-126CTL ペプチド・35 ヘルパーペプチド併用ワクチン療法で治療したマウス皮下腫瘍より WT1 特異的 T 細胞を1細胞ずつ単離ソートし、ex-vivo で刺激して増殖させ、増殖した T 細胞の TCR (1B10) を同定した。この 1B10-TCR を導入するウイルスベクターを作成し、1B10-TCR 導入 T 細胞が WT1 特異的に腫瘍細胞を殺傷することを確認した。

4. 研究成果

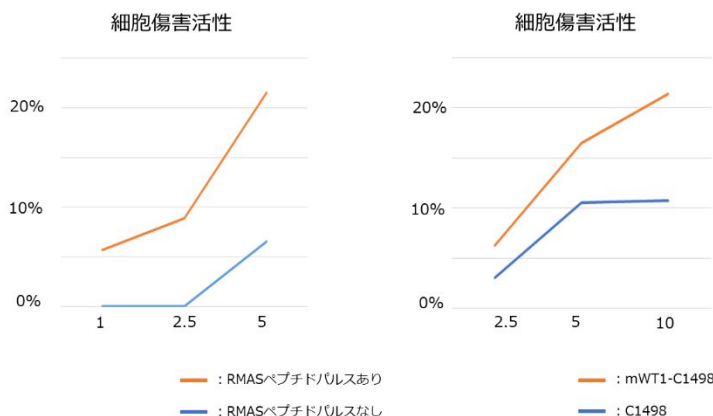
(1) まずは、CD4+T 細胞除去が WT1-CTL ペプチドワクチン療法により末梢血中に誘導される WT1-CTL の頻度に与える影響を評価した。制御性 T 細胞の除去のタイミングにより癌ワクチン療法への影響が異なると報告されているため、WT1-CTL ペプチドワクチン療法前、WT1-CTL ペプチドワクチン療法後 1 日目、4 日目、8 日目の 4 つのタイミングで抗 CD4 抗体の投与を開始し、それぞれの群において末梢血中に誘導される WT1-CTL 頻度を 1 週間毎に計測したところ、WT1-CTL ペプチド単独群では投与後 3 週目のピーク時には 6 匹中 2 匹で 0.10%以上に上昇し、最大約 0.25%まで上昇したのに対し、抗 CD4 抗体を併用群では投与開始時期によらず、いずれの群でも 6 匹中 5 匹～6 匹で WT1-CTL 頻度は 0.10%以上に上昇し、最大では 0.32～0.39%にまで上昇

した。特に WT1-CTL ペプチドワクチン投与後 1 日目または 8 日目に抗 CD4 抗体の投与を開始した群では、WT1-CTL ペプチド単独群と比較してピーク時の 3 週目の末梢血中 WT1-CTL 頻度が有意に増加した。次にヘルパーペプチドの併用を評価したところ、WT1 ヘルパーペプチド併用群では、6 匹中 5 匹で WT1-CTL 頻度が 0.10%を越え、3 週目には最大約 0.82%にまで上昇し、平均値は約 0.52%であった。一方 OVA ヘルパーペプチド併用群では、6 匹すべてのマウスで WT1-CTL 頻度が 0.10%を越え、WT1-CTL 反応もは 2 週目にピークとなり、最も反応の高いマウスで約 1.89%にまで上昇し、平均値は約 1.10%であった。

以上の結果より、抗 CD4 抗体併用でもヘルパーペプチド併用でも末梢血中への WT1-CTL 誘導は増強されるが、WT1-CTL ペプチドワクチン療法時による末梢血中への WT1-CTL の誘導を増強するためには CD4+T 細胞を除去するよりも、ヘルパーペプチド併用によって CD4+ヘルパー T 細胞の誘導を高めることが強力であることを示した。また、併用するヘルパーペプチドは CTL ペプチドと抗原を合わせる必要がなく、外来性抗原である OVA のような強いヘルパー活性を有するヘルパーペプチドがより強いヘルプ機能を有することを示唆した。

(2) CD4+T 細胞除去、ヘルパーペプチド併用がいずれも末梢血中への WT1-CTL 誘導を増強したため、次にマウス腫瘍モデルにおいて WT1-CTL ペプチドワクチン療法による抗腫瘍免疫をも増強するか検証した。WT1-CTL ペプチド単独群では平均 0.70%程度であり、抗 CD4 抗体併用群では 0.3%程度と上昇を認めなかった。WT1 ヘルパーペプチド併用群では平均約 7.84%、OVA ヘルパーペプチド併用群では平均は約 3.45%といずれも WT1-CTL ペプチド単独群と比較して有意に高頻度の WT1-CTL 浸潤を認めた。特に WT1 ヘルパーペプチド併用群では最大約 26.90%と強い WT1 特異的 CTL 浸潤を引き起こしていた。以上の結果は、抗 CD4 抗体併用では末梢血中への WT1-CTL 誘導を増強できても腫瘍内への遊走・浸潤につながらないこと、ヘルパーペプチド併用群間で末梢血中への WT1-CTL 誘導には必ずしも腫瘍が発現する抗原由来のヘルパーペプチドを併用する必要はないが、抗腫瘍効果としては腫瘍が発現する抗原由来のヘルパーペプチドの併用が最も良い併用条件であることが明らかとなった。

(3) WT1 ヘルパーペプチド併用群では腫瘍内に浸潤する T 細胞のうち最大 26.9%が WT1 特異的 CTL となるなど強い浸潤を引き起こし、これらの TCR のレパトア解析ではオリゴクローナル増生を示した。そこで腫瘍内より CD3+CD8+WT1-tetramer+CD44+CD62L+のメモリー形質の WT1 特異的 CD8+ CTL を 1 細胞ずつ 96well プレートに単離回収し、ex vivo 刺激して増殖させた。増殖できた CD8+ CTL は腫瘍内で実際に分裂・増殖しているクローンと考えられ、race PCR 法にて TCR 配列を同定し、1B10-TCR と名付けた。さらにこの 1B10-TCR の 鎖、鎖を P2A 配列で結合した配列を組み込んだレトロウイルスベクターを作成した。マウス脾臓内 CD8+T 細胞にこの 1B10-TCR 導入ウイルスベクターを感染させ、Cr releasing assay にて WT1 特異的な細胞障害活性を評価した。RMAS 細胞株に WT1 ペプチドパルスした細胞は、ペプチドパルスしない細胞に比し有意に殺傷された。また、WT1 遺伝子を発現した C1498 腫瘍細胞株と WT1 遺伝子を導入していない C1498 腫瘍細胞株の比較では、WT1 発現 C1498 腫瘍細胞株が有意に殺傷された。(下図)。以上の結果から WT1 ヘルパーペプチド併用ペプチドワクチン療法を行ったマウス腫瘍から同定した 1B10-TCR 配列は WT1 ペプチドを特異的に認識する TCR であることが確認された。



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 0件）

1. 著者名 Nakajima Hiroko, Nakata Jun, Imafuku Kanako, Hayashibara Hiromu, Isokawa Kasuki, Udaka Keiko, Fujiki Fumihiro, Morimoto Soyoko, Hasegawa Kana, Hosen Naoki, Hashii Yoshiko, Nishida Sumiyuki, Tsuboi Akihiro, Oka Yoshihiro, Oji Yusuke, Sogo Shinji, Sugiyama Haruo	4. 巻 70
2. 論文標題 Identification of mouse helper epitopes for WT1-specific CD4+ T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 3323-3335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-021-03003-5	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Jun Nakata
2. 発表標題 CD11b+CD64+Ly6c-Ly6g- monocytic cells in skin vaccinated with anti-cancer peptide could be a target to prolong anti-cancer immunity by cancer vaccination
3. 学会等名 マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------	---------