

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18090

研究課題名(和文) NKT細胞活性化ベクターを用いた大網内への抗腫瘍免疫誘導による腹膜播種の新規治療

研究課題名(英文) Novel treatment of peritoneal dissemination by induction of anti-tumor immunity in the omentum using NKT cell activation vector

研究代表者

有本 聡 (Arimoto, Akira)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：20778766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腹膜播種マウスモデルに作成し、進行が急激で予後不良であることを示した。腫瘍免疫微小環境の解析を行い、腹腔内サイトカインはG-CSF及びIL-6を著明に増加させること、これに伴いIPMN-MDSCが病態と共に進行することを示した。NKT細胞の活性化ワクチンベクターの質的評価を行い、NKT細胞は勿論のこと、NK細胞及びCD8+T細胞が誘導されることを確認した。腫瘍の皮下接種モデルに対する予防的な効果があることを示すことに成功し、肺転移モデルでの有効性も示すことに成功した。現在は、腹膜播種モデルにおける治療成績を検証している段階である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤の癌治療への導入以降、免疫が癌治療に与えるインパクトが十分であったが、次なる治療として、その耐性に対する克服が重要となる。NKT細胞及び α -Galが人間との相同性があるため、NKT細胞活性化ワクチンベクターを開発し、腹膜播種といった難治性癌モデルに対して、その克服に関して前臨床モデルで示すことができることは、非常に期待のできる治療であると考え。消化器癌治療への恩恵をもたらす社会的にも、有意義であると考え。

研究成果の概要(英文)：A mouse model of peritoneal dissemination was developed, which showed rapid progression and poor prognosis. Analysis of the tumor immune microenvironment showed that intraperitoneal cytokines markedly increased G-CSF and IL-6 and that PMN-MDSCs progressed with the disease. Qualitative evaluation of the NKT cell activation vaccine vector showed that it induced NKT cells and NK cells, and CD8+ T cells. We succeeded in showing that the vaccine was prophylactic against a subcutaneous tumor inoculation model, and we also succeeded in showing its efficacy in a lung metastasis model. Currently, we are in the process of verifying the therapeutic results in a peritoneal seeding model.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 腹膜播種 milky spot CD8+T細胞 T細胞疲弊 NKT細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腹膜播種は、胃癌、大腸癌などの消化器癌に高頻度に認められる転移形式であり、極めて予後不良である。腹膜播種は、腫瘍より遊離した癌細胞 (peritoneal exfoliated cancer cell; PECC) の微小転移から形成され、進展していく。PECC は足場として、大網や腹膜に表面に局在する milky spot と呼ばれる原始的なリンパ組織に、他の臓器に先んじて接着する。また、milky spot は腹腔内の二次リンパ組織として機能し、免疫細胞および抗原が milky spot と腹腔内を行き来していることが明らかとなっている。これらの性質から、大網における抗腫瘍免疫が腹膜播種成立に大きな役割を果たしていることがわかる。近年、胃癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の有効性が証明されたが、腹膜播種に対する有用性は十分であるといえない。

免疫チェックポイント阻害剤のブレイクスルーは、いくつかの免疫療法が奏効する必要条件を明確にしつつある。腫瘍内への T 細胞性免疫の誘導、腫瘍反応性 T 細胞の誘導、及びその維持である。では、T 細胞不応性腫瘍の腫瘍内へ T 細胞を呼び込むために、何らかの刺激 (治療) を契機に起こす、腫瘍細胞の特殊な細胞死である免疫原性細胞死

(Immunogenic cell death: ICD) 及び NK 細胞-DC の活性化が重要であることが報告された。また、と は、ネオアンチゲンや T 細胞分化の重要性を強調した。には、抗腫瘍免疫記憶の誘導が必要であり、細胞傷害性機能を発揮するエフェクター細胞の供給源である幹細胞様メモリー T 細胞 (stem cell-like memory, Tscm) が重要な役割を担うと推定される。この①～③の成立が困難であることが、免疫チェックポイント阻害剤不応性の原因であると考えられ、腹膜播種という病態の難治性を支持すると考える。

NKT 細胞を発動する新規ワクチンベクターの開発 NKT 細胞はそのリガンドである Galactosyl ceramide (Gal) を樹状細胞 (dendritic cell: DC) に付加して投与方法 (DC/Gal) により、獲得免疫系と自然免疫系を同時に駆動する腫瘍免疫のマスター細胞であり、腫瘍抗原の同時的投与により腫瘍反応性 T 細胞が誘導される。NKT 細胞を活性化するワクチンベクターは、免疫チェックポイント阻害剤の効果発揮の条件を満たす強力な免疫治療モダリティであることが期待される。我々はこれらの観点から、電氣的穿孔法 (electroporation; EP) による、腫瘍タンパク抗原 (モデル抗原である卵白アルブミン、ovalbumin: OVA) をそのまま樹状細胞に導入するシステムを用いて、新たなワクチンベクター (OVA-EP-DC/Gal) を開発している。NKT 細胞の誘導が大網内にされることを確認しており、これを腹膜播種に応用したいと考えている。

2. 研究の目的

本研究では、大網や腹腔内に存在する腫瘍反応性 T 細胞の誘導不全が腹膜播種成立の要因となることを示し、NKT 細胞活性化療法の腹膜播種に対する有効性を検証することを目的とする。また同時に、抗腫瘍免疫成立の重要な要因である T 細胞性免疫の誘導条件を解明することを目的とする。大網は、腹膜播種の足場となり、腹腔内の免疫細胞の供給源となるという視点からはあまり捉えられていない。本研究は大網中の milky spot の特徴的な性質に着目し、細胞学的な解析を中心に行う。これにより、腹腔内の抗腫瘍免疫の開始から破綻までの状況を観察し、経時的に病態の解析ができる理想的なモデルである。同時に NKT 細胞活性化による新規的な治療を検討しうる。またヒト胃癌、大腸癌患者の免疫応答を同様の方法で評価でき、臨床応用を見据えた実践的な研究である。

3. 研究の方法

まず、安定した腹膜播種モデルの作成を行う。マウス大腸癌細胞株 MC38 を用いて、腹注を行い、腹膜播種を発生させる。腹腔内の環境、特に腹水を中心に解析し、また、大網組織の milky spot の検出と観察を行う。大網内や腹腔内の免疫細胞を解析し、腹膜播種モデルの特徴を捉える。フローサイトメトリーを用い、大網、洗浄腹水、腸間膜リンパ節、脾臓、肝臓、骨髄、末梢血を検体として使用する。

第 2 に、NKT 細胞活性化療法の有効性を検証する。NKT 細胞活性化ワクチンベクターの質の評価と安定供給を確立する。電気穿孔法 (Electroporation: EP) によるモデル抗原である卵白アルブミン (Ovalbumin: OVA) を骨髄由来樹状細胞に導入し、Galactosylceramide (α -Gal) を付加したワクチンベクターにおいて、NKT 細胞の活性化により、NK 細胞を中心とした自然免疫系の誘導、さらには樹状細胞の成熟を介した抗原特異的 CD8⁺T 細胞の誘導に関して、誘導される免疫系を全体的に評価する。腹腔内、大網のデータを取得する。

第 3 に、腹膜播種モデルにおけるワクチンベクターによる治療を解析する。大網内 NKT 細胞、Tscm 細胞の誘導や動態、機能を解析する。また、腹腔内細胞の変化についても確認しておく。NKT 細胞および免疫記憶の中心をなす Tscm 細胞の局在を調べる。IFN γ 、TNF α 、IL-2 産生を評価することで、その T 細胞群の多機能性を評価し、疲弊の程度の評価とする。腸間膜リンパ節、脾臓、大網 (milky spot) に関しては免疫染色を行い、NKT 細胞 および Tscm 細胞の組織内の局在および CD3⁺ T 細胞との割合を調べる腹膜播種モデルマウスに NKT 活性化療法 (OVA-EP-DC/Gal、腹腔内投与および静注) を行い、効果を評価する。評価は生存期間や IVIS で進行状態を評価する。

4. 研究成果

1. マウス腹膜播種モデルの作成 マウス大腸癌 CT26-BALB/c マウス及び MC38-C57BL/6 の 2 系

統で腹膜播種モデルを作成した(図 1A,B)。2 系統のマウスは非常に病態の進行が早く、MC38-C57BL/6 の皮下接種モデルと比較すると、生存期間は明らかに短く(図 1D) 病勢の進行も早かった(図 1F,G)。腹膜播種モデルでは結節を多数形成し(図 1E) 内部は均一で播種結節に対して、浸潤した免疫細胞は殆ど認められなかった(図 1C)。腹膜播種モデルの作成に成功した。

サイトカインプロファイルでは血漿では IL-6 が上昇し、腹腔内では IL-6 及び G-CSF が上昇していた(図 2)。これに伴い、腹腔内及び末梢血中の MDSC、特に PMN-MDSC が上昇していることが判明した。

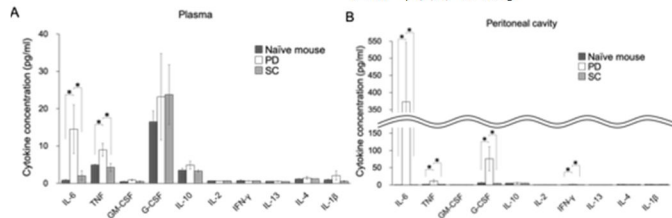


図 2. 各モデルにおけるサイトカインプロファイル

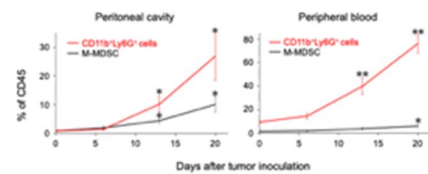


図 3. 腹膜播種の病勢と共に進行する PMN-MDSC

2. NKT 細胞活性化ワクチンベクターの作成 作成したワクチンベクターは、ベクター作成のために EP により NKT 細胞の誘導(図 3.D,E,F,G)、NK 細胞の誘導(図 3.H,I)は機能が落ちなかった。

また、移入した OT-I に関する活性化は該当のワクチンベクターのみで十分な増殖と活性化が認められた(図 3.B,C)。誘導された OT-I については、メモリー前駆 CD8⁺T 細胞として知られるメモリー細胞の前駆細胞を多く誘導していることがわかった。

3.腹膜播種モデルに関する治療

現在解析中。PMN-MDSC に関連した変化、大網内、腹腔内の T 細胞について解析をしている。

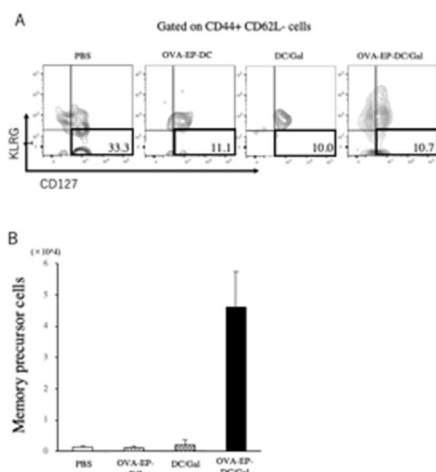


図 5. エフェクター時期におけるメモリー前駆細胞の誘導

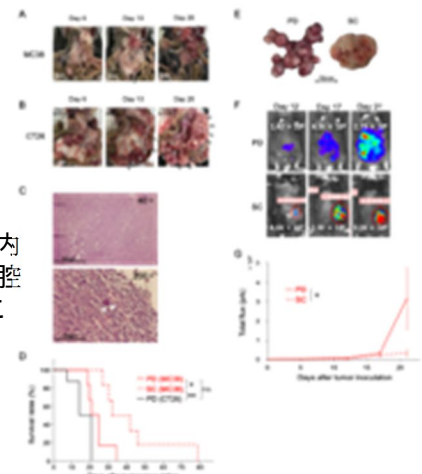


図1. 腹膜播種モデルの作成

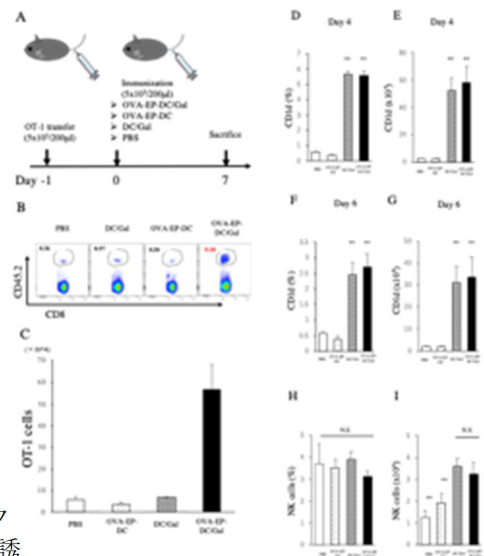


図4. NKT細胞活性化ワクチンによるCD8⁺T細胞、NKT細胞、NK細胞の誘導

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡部 晃大、山下 公大、有本 聡、西 将康、杉田 裕、福岡 英志、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、松田 武、押切 太郎、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 ガラクトシルセラミドを付加し、抗原導入した樹状細胞ベクターの抗腫瘍効果
3. 学会等名 第29回日本サイトメトリー学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡部 晃大、山下 公大、有本 聡、西 将康、杉田 裕、福岡 英志、瀧口 豪介、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、松田 武、押切 太郎、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 Antigen specific antitumor effect induced by antigen-electroporated, natural killer T cell ligand-loaded dendritic cells
3. 学会等名 第30回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡部 晃大、山下 公大、有本 聡、西 将康、福岡 英志、杉田 裕、瀧口 豪介、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、松田 武、押切 太郎、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 Antigen specific antitumor effect induced by antigen-electroporated, natural killer T cell ligand-loaded dendritic cells
3. 学会等名 第23回バイオ治療研究会学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------