

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08329

研究課題名（和文）膵癌局所の免疫賦活を最大化するナノ粒子TLR9リガンド併用光免疫療法の開発

研究課題名（英文）Preclinical study of near-infrared photoimmunotherapy for pancreatic cancer that incorporates nanoparticulate TLR9 agonist K3-SPG

研究代表者

高橋 健（Ken, Takahashi）

公益財団法人田附興風会・医学研究所 腫瘍研究部・研究員

研究者番号：60594372

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）：本研究はナノ粒子TLR9リガンドK3-SPGによるin situ vaccine (K3-SPG-ISV)にCD44を標的とする光免疫療法（photoimmunotherapy: PIT）を組み込み、主に膵癌モデルマウスでこの併用療法の有用性を検討した。K3-SPG-ISV/NIR-PITは相乗的かつ全身性の抗腫瘍効果を示し、免疫記憶を誘導した。また、PD-1阻害療法の効果を増強した。腫瘍内のIFN関連遺伝子の発現上昇と細胞傷害性CD8 T細胞の関与が確認された。本研究の結果、K3-SPG とPITを併用する新たなISV治療戦略の有用性が示され、新たながん免疫療法の開発に繋がると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は消化器癌のなかでも患者数、年間死亡数ともに多く、治療開発のニーズが高い。免疫療法は化学療法と異なり免疫記憶により治療終了後も長期にわたる再発抑制効果が期待できる優位性があるが、現在の免疫療法の主流であるチェックポイント阻害剤の成績は十分とはいえない。本研究の自然免疫アジュバントを用いたISVと光免疫療法の組み合わせ戦略は、腫瘍をワクチン抗原のソースに転化し免疫誘導を最大化できるため、進行癌に対する治療目的のみでなく、術前免疫療法として実施することで術後再発を効果的に抑制しうる可能性があり、新たな免疫療法の選択肢となることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In situ vaccine (ISV), which activates innate immunity and/or promotes the release of cancer antigens at the tumor site, evokes cancer immunity. Based on our previous findings that ISV using unique TLR9 ligand K3-SPG (K3-SPG-ISV) induces antitumor immunity, here we aimed at testing the hypothesis that near-infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) can be an ideal partner of K3-SPG-ISV by providing vaccine antigens. We showed synergistic antitumor effects of K3-SPG-ISV and CD44-targeting NIR-PIT in the pancreatic cancer model. This combination had systemic antitumor effects, induced immunological memory, and enhanced PD-1 blockade therapy. Mechanistically, we observed intratumoral upregulation of IFN-related genes as well as decreased antitumor effect by CD8 T cell depletion, suggesting the possible roles of IFN and cytotoxic T cell response. In summary, our research highlighted the potential of a novel ISV strategy incorporating NIR-PIT and K3-SPG as a next-generation cancer immunotherapy.

研究分野：がん免疫

キーワード：がん免疫 自然免疫 TLR9 光免疫療法

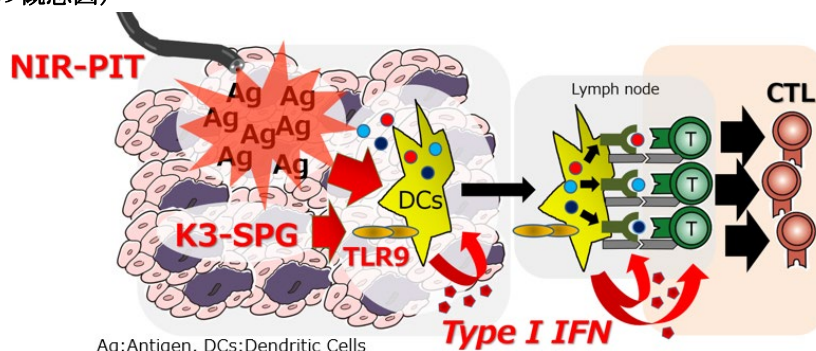
1. 研究開始当初の背景

膵癌は既存の治療では制圧できない最難治癌であり、有効な治療法や術後の再発予防法は開発されていない。腫瘍破壊の主役である癌抗原特異的な細胞障害性 T 細胞 (CTL: Cytotoxic T cell) の誘導には、腫瘍局所での腫瘍細胞死に伴う癌抗原の放出 (Local Tumor Antigen Release: LTAR) と自然免疫活性化 (Local Innate Immune Activation: LIIA) の 2 つの段階が必要である。自然免疫の活性化アジュバントを腫瘍に直接注入する in situ vaccine (ISV) は、LIIA を人為的に強化してがん免疫を誘導しようとするものであり、① 局所療法で全身性の副作用を最小限に抑えつつ全身性の免疫を誘導できる、② 患者固有の癌抗原がワクチン抗原となり抗原投与を要さないなどの利点がある。また、膵癌を含む消化器領域癌では内視鏡や超音波を用いて病変部への近接が可能のため、ISV は臨床応用に結びつきやすい。I 型 IFN は CTL の誘導に優れ、抗腫瘍免疫を効果的に賦活化する。申請者は、既存の TLR9 リガンドと比べて I 型 IFN 産生能に勝るナノ粒子化 TLR9 リガンド “K3-SPG” の可能性に着眼し、これまでに K3-SPG を用いた ISV (K3-SPG-ISV) の抗腫瘍効果を膵癌モデルマウスで見出した。しかし、K3-SPG-ISV 単独では効率的な LTAR は期待できないため、K3-SPG-ISV の抗腫瘍効果をより高めるためには LTAR 効果に優れたパートナー療法との併用が必要と考えた。

2. 研究の目的

病変局所への光照射で腫瘍抗原特異的に腫瘍細胞を破壊できる光免疫療法 (NIR-PIT: Near-infrared photoimmunotherapy) は LTAR 効果に優れるという仮説のもと、本研究は、LTAR と LIIA を最大化する NIR-PIT/K3-SPG-ISV 併用療法の抗腫瘍効果やその作用機序を明らかにすることを目的とした。さらに、K3-SPG はナノ粒子に特徴的な EPR 効果 (Enhanced Permeability and Retention) により、非侵襲的な経静脈投与 (IV: intravenous injection) でも K3-SPG-ISV と同等の効果を示す可能性があるため、NIR-PIT/K3-SPG-IV 併用療法の抗腫瘍効果も併せて明らかにすることとした。

(本研究の概念図)



3. 研究の方法

研究室所有の膵癌モデルマウス (KPC: LSL-KrasG12D/+, Trp53R172H/+, Pdx1-Cre) から樹立された膵癌細胞株 (KPC-Pan) を主に使用し、一部の実験では 2 種類のマウス大腸癌細胞株 (MC38、Colon-26) を用いて、これら 3 種類の細胞株の同種皮下移植モデルを作成し実験に供した。また、一部の実験では腫瘍を両側皮下に移植した。NIR-PIT の表面抗原は、当初の研究計画段階では Mesothelin としていたが、これら 3 種類の細胞株で発現が明確に確認できた CD44 に設定しなおした。既報 (Nat Med. 17:1685-91, 2011) に準じて光感受性物質 IR700dye を結合した抗 CD44 抗体 (IR-CD44 Ab) を作成し、NIR-PIT の実験系を構築した。K3-SPG は、研究分担者の石井健教授の研究室で作成されたものを使用した。NIR-PIT では、細胞皮下移植後 day 7 または day 8 に IR-CD44 Ab を腫瘍内投与し、day 8、day 9 または day 9、day 10 に 100J/cm² の近赤外光を照射した。K3-SPG は、10μg を IR-CD44 Ab の投与同日に、腫瘍内投与 (K3-SPG-ISV) または経静脈投与 (K3-SPG-IV) した。

4. 研究成果

(1) 癌細胞株における CD44 の発現確認と in vitro における NIR-PIT の試み

KPC-Pan、MC38、Colon-26 における CD44 の発現を FACS と免疫染色で確認した。これら 3 種類の細胞株を用いて in vitro における NIR-PIT の効果を観察したところ、全ての細胞株で NIR-PIT により細胞膨化とそれに引き続く細胞破壊が確認された。

(2) 膵癌と大腸癌モデルマウスを用いた NIR-PIT (in vivo 実験)

KPC-Pan による膵癌モデル、MC38 と Colon-26 による大腸癌モデルに IR-CD44 Ab を投与し NIR-PIT を施したところ (研究の方法参照)、全てのモデルにおいて腫瘍の退縮効果が確認された。なお、近赤外光照射前におこなった IVIS 観察で腫瘍部位における IR700 蛍光シグナルの集積を確認した。

(3) NIR-PIT/K3-SPG-ISV 併用療法の実施

主に膵癌モデルマウス（以下、scKPC-Pan）で実験を行った。両側皮下に腫瘍を移植した scKPC-Pan に、それぞれ、無治療、NIR-PIT 単独療法、K3-SPG-ISV 単独療法、NIR-PIT/K3-SPG-ISV 併用療法を施し、それぞれの腫瘍増殖を評価した。併用群は NIR-PIT 単独群や K3-SPG-ISV 単独群と比べ、相乗的な抗腫瘍効果を認めた。さらに重要なことに、片側の腫瘍のみに NIR-PIT を施したにもかかわらず、対側の腫瘍でも増殖抑制効果を認め、全身性の抗腫瘍効果が示された。また、大腸癌モデルにおいても同様に併用療法による相乗効果を確認した。

(4) NIR-PIT/K3-SPG-ISV 併用療法による免疫記憶誘導

scKPC-Pan に対して NIR-PIT/K3-SPG-ISV 併用療法を施し、腫瘍が完全消失したマウスに KPC-Pan 細胞を再移植しても全てのマウスで腫瘍細胞は生着しなかった。これにより、本併用療法による免疫記憶の成立が示唆された。

(5) K3-SPG-ISV を非侵襲的な K3-SPG-IV とする試み

予備実験として、scKPC-Pan に Alexa647 でラベルした K3-SPG を IV（経静脈）投与し、皮下移植腫瘍に NIR-PIT を施したところ、K3-SPG の全身分布の IVIS 解析において、NIR-PIT を施した腫瘍局所のみ Alexa647-K3-SPG が高度に集積していることを見出した。K3-SPG はナノ粒子であることから、K3-SPG の EPR 効果が NIR-PIT の付加により増強された可能性が考えられた。このことは、NIR-PIT 付加により K3-SPG-IV でも K3-SPG-ISV と同様の効果が得られる可能性を示唆しているが、これまでの実験結果では、NIR-PIT/K3-SPG-IV による抗腫瘍効果は NIR-PIT/K3-SPG-ISV と比べ弱く、K3-SPG-IV で K3-SPG-ISV と同等の効果をj得るためには K3-SPG の投与量や回数などさらなる実験条件の工夫が必要であり今後の課題として残った。

(6) PD-1 阻害療法との併用実験

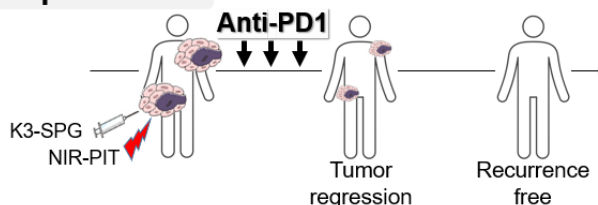
NIR-PIT/K3-SPG-ISV に PD-1 阻害療法を併用すると、PD-1 阻害による抗腫瘍効果が増強されることを見出した。現在 CTLA-4 阻害療法でも同様の効果がみられるか実験を継続中である。

(7) NIR-PIT/K3-SPG-ISV による抗腫瘍効果の機序の解明

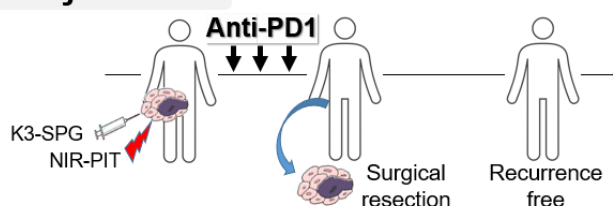
NIR-PIT/K3-SPG-ISV 併用療法を施した scKPC-Pan の腫瘍を用いて bulk の RNA-seq 解析を実施し、腫瘍内環境における強い IFN 応答を確認した。また、Effector 細胞の同定を試みたところ、除去抗体で CD8 T 細胞を除去したマウスにおいては、NIR-PIT/K3-SPG-ISV 併用療法の抗腫瘍効果が減弱すること、さらにこの効果は対側皮下の腫瘍においても観察されることが見出され、本複合療法における effector 細胞が CD8 T 細胞 (CTL) であることが示唆された。現在、NK 細胞や CD4 T 細胞などの他の免疫細胞を除去した場合の抗腫瘍効果の変化についても検討中である。

以上の研究成果をもとに、2021年と2022年の10月にそれぞれ国内特許出願(特願2021-171961)とPCT特許出願(PCT/JP2022/037841)を行った。そのうえで光免疫療法のライセンスを有する楽天メディカルと将来的な共同開発の話あいが進行中である。膵癌は消化器癌のなかでも難治癌で、治療開発のニーズが高い。免疫療法は化学療法と異なり免疫記憶により治療終了後も長期にわたる再発抑制効果が期待できる優位性があるが、現在の免疫療法の主流であるチェックポイント阻害剤の成績は十分とはいえない。本研究の自然免疫アジュバントを用いた ISV と光免疫療法の組み合わせ戦略は、腫瘍をワクチン抗原のソースに転化し免疫誘導を最大化できるため、進行癌に対する治療目的のみでなく、術前免疫療法として実施することで術後再発を効果的に抑制しうる可能性がある(下図参照)。また、現在の標準的な免疫療法である PD-1 阻害との併用効果も期待でき、新たな免疫療法の開発に繋がる。

Therapeutic ISV



Neoadjuvant ISV



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 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Hirokazu Okada, Ken Takahashi, Hiroaki Yaku, Kouji Kobiyama, Keiko Iwaisako, Xiangdong Zhao, Masahiro Shiokawa, Norimitsu Uza, Yuzo Kodama, Ken J Ishii, Hiroshi Seno | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 In situ vaccination using unique TLR9 ligand K3-SPG induces long-lasting systemic immune response and synergizes with systemic and local immunotherapy | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-05702-0 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

| | | |
|--|--------------|---------------|
| 産業財産権の名称 がん特異的細胞表面分子に対する結合性分子および光感受性分子の複合体ならびにアジュバントを含む医薬 | 発明者 高橋健 | 権利者 京都大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-171961 | 出願年 2021年 | 国内・外国の別 国内 |
| 産業財産権の名称 がん特異的細胞表面分子に対する結合性分子および光感受性分子の複合体ならびにアジュバントを含む医薬 | 発明者 高橋健 | 権利者 京都大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/037841 | 出願年 2022年 | 国内・外国の別 外国 |

〔取得〕 計0件

〔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 | 石井 健 (Ishii Ken) (00448086) | 東京大学・医科学研究所・教授 (12601) | |

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 |
|---------|---------|