

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17573

研究課題名（和文）EMT関連分子を標的とした新規免疫療法の確立に向けた基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research for the novel immunotherapies targeting EMT related molecules

研究代表者

石橋 佳 (Kei, Ishibashi)

旭川医科大学・医学部・客員助教

研究者番号：80646076

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍の浸潤転移に関係するEMT関連分子を標的とする免疫療法の開発に関する基礎的研究を行った。EMT関連分子を標的とするCD4陽性リンパ球を健康人末梢血単核球から分離誘導した。誘導したリンパ球はEMTを発現する腫瘍細胞株に対して、生体外で抗腫瘍効果を認めることが示された。しかしながら、マウスを使った実験では、マウス内での特異的リンパ球の誘導は確認されたが、抗腫瘍活性までは確認することができなかった。今後、さらなる研究が望まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の浸潤や転移といった、体内で進展していくために必要な能力の一つに上皮間葉移行（EMT）という癌の形質転換が知られている。その上皮間葉移行に関与する分子をEMT関連分子といい、浸潤・転移能力を持ちうる癌細胞に発現しているといわれている。本研究では、浸潤・転移能力を有するEMT関連分子を発現した癌細胞に対して特異的に抗腫瘍活性を持つリンパ球をヒトのリンパ球から誘導することができた。これによって、より悪性度の高い癌に対しての有効な新規免疫療法の開発の可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：We conducted a basic study on the development of immunotherapy targeting EMT-related molecules associated with tumor invasion and metastasis, and induced CD4-positive lymphocytes targeting EMT-related molecules from healthy peripheral blood mononuclear cells. The induced lymphocytes showed antitumor effects against EMT-expressing tumor cell lines in vitro. However, in experiments using mice, induction of specific lymphocytes in mice was confirmed, but anti-tumor activity could not be confirmed. Further studies are desired in the future.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：EMT関連分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年悪性腫瘍の微小環境下での免疫逃避機構の仕組みが徐々に明らかになってきている。免疫チェックポイント分子の発現や、各種サイトカインの分泌による免疫抑制性の細胞の誘導、そして、MHC分子や免疫の標的となりうる抗原の発現低下など様々である。

体内に生じた悪性腫瘍はこうして宿主の免疫鉗子から逃れる環境を整えることで、体内での生存を可能にするが、生存環境を整えた悪性腫瘍細胞はさらなる進展をなすために様々な分子を発現することが分かってきた。その中に、浸潤・転移能に関与する、EMT 関連分子が挙げられる。

EMT とは腫瘍細胞の細胞間接着分子(カドヘリン)や細胞極性の消失などによって、浸潤・転移能を有するようになる一連のプロセスを指し、浸潤・転移能を有する癌細胞の多くで EMT 関連分子を発現していると考えられる。実際の複数の癌腫において TWIST や SNAIL, ZEB1 などの発現と予後が相関するとの報告がなされており、EMT 関連分子を標的とした治療は多くの癌腫、特に浸潤能・転移能が強く、悪性度の高い腫瘍に対して有効な治療となることが期待される。そこで、我々は EMT に関連して発現する分子は免疫治療の標的になり得るかという問いのもと、本研究を計画した。癌ワクチン療法の EMT 関連分子の免疫原性の評価や抗原特異的な免疫細胞の誘導に関する研究は少なく、本研究を行うことによって、転移・浸潤能を有する癌細胞に共通の標的抗原を発見し、将来的に広い癌腫を対象とした免疫療法の開発につながることを期待される。

2. 研究の目的

本研究では、免疫療法の中でも、EMT 関連分子を標的抗原とした新たな癌ワクチン療法の確立を目指しており、EMT 関連分子を標的としたワクチン療法を確立することで、最終的には MET を介する進展様式を持つ多くの悪性腫瘍の発生をも阻止することができると期待される。

本研究では、すでにある癌を標的にしつつ、最終的には癌の発生予防という新しい戦略をとることができると考えている。

本研究では EMT 関連分子を標的とした、新しい癌ワクチン療法を開発するための基礎的研究を行うことを目的とする。その目的を達成するために、本研究では以下のことを行っていく。

EMT 関連分子の特異的 T 細胞を誘導するエピトープを同定する。

誘導した特異的 T 細胞の *in vitro* および *in vivo* での評価を行う。

ヒト担癌患者での特異的 T 細胞の誘導の可能性を評価する。

3. 研究の方法

EMT 関連分子は複数の分子が知られているが、今回はその中で重要な役割を担っていると考えられる TWIST1, SNAIL, ZEB1 の 3 種類にターゲットに絞って、それぞれの分子に対して HLA-class II (日本人に多い DR4, DR8, DR15 など) と親和性の高いと予想されるエピトープをコンピュータアリゴリズムを使って同定する。

健康人末梢血単核球から CD4 陽性細胞を分離し、先に同定した EMT 関連分子の候補エピトープペプチドで刺激し、エピトープペプチドで反応を示すペプチド特異的 CD4 陽性リンパ球を誘導する。

得られたペプチド特異的リンパ球が *in vitro* で抗腫瘍活性を持つかを、EMT 関連分子を発現した腫瘍細胞株との共培養によって検証する。EMT 関連分子特異的 CD4 陽性リンパ球と腫瘍細胞を共培養させ、その情勢の IFN γ や LDH の測定によって定量的に評価する。

また、マウスでの vaccination によってマウス内に EMT 関連分子に特異的なリンパ球が誘導されるかを評価する。マウスにアジュバンドとともにエピトープペプチドを vaccination したのち、マウスの脾臓およびリンパ節を摘出。脾臓およびリンパ節からリンパ球を分離し、エピトープペプチドでの刺激での特異的反応を IFN γ の測定によって評価する。さらに、EMT 関連分子を発現した癌細胞を移植したマウスにエピトープペプチドで vaccination し、腫瘍径の変化を測定することで、マウス体内で誘導された EMT 関連分子特異的リンパ球の抗腫瘍活性について評価する。

さらに、ヒト担癌患者での体内での EMT 特異的リンパ球が存在しているかを評価する。ヒト担癌患者から CD4 陽性 T 細胞を分離し、EMT 関連分子エピトープペプチドで刺激することで、特異的な反応を示すかどうかを評価する。また、健康人から誘導された CD4 陽性 T 細胞と比較して反応が増強しているかを評価することで、ヒト担癌患者内でエピトープペプチドに特異的なメモリー T 細胞が存在するか否かの評価になりうると考えられる。

4 . 研究成果

今回の研究では , TWIST1 , SNAIL , ZEB1 などの EMT 関連分子から同定したエピトープペプチドに対する特異的な CD4 陽性リンパ球の誘導を成功させた . この特異的 CD4 陽性リンパ球は , 各 EMT 関連分子を発現する腫瘍細胞株との共培養によってコントロール群と比較して優位に抗腫瘍活性を示し , 抗腫瘍活性を有していることが示された .

マウスに対して , エピトープペプチドの vaccination を行い , マウスの脾臓およびリンパ節から分離したリンパ球をエピトープペプチドで刺激することで , vaccination していないマウスと比較して優位にペプチド特異的な反応を示した .

しかし , 腫瘍細胞を移植したマウスに対して , ペプチドで vaccination を行うことで腫瘍径の縮小 (抗腫瘍効果) を期待したが , 対照のマウスと比較して有意な腫瘍径の縮小は観察されなかった .

また , 担癌患者末梢血から誘導した CD4 陽性細胞は健常人と比較して , 有意に少量のペプチドで特異的免疫反応を示し , 担癌患者内にはペプチドに対する特異的なメモリー T 細胞が存在することが示唆された .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------