

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22801

研究課題名(和文) 自己抗原の異物化を介した腫瘍免疫原性の改善に基づく新規がん免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel anti-cancer immunotherapy based on tumor immunogenicity improvement by abnormal self-antigens

研究代表者

薄田 健史 (Susukida, Takeshi)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：50880689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：HLA-B\*57:01遺伝子を導入した癌細胞を皮下移植したマウスでは、アバカビル投与により腫瘍の増大が有意に抑制され、腫瘍組織中へのCD8陽性T細胞の浸潤も認められた。さらに、腫瘍内浸潤CD8陽性T細胞におけるサイトカイン産生細胞の割合も有意に増加した。一方で、HLA-B\*57:03遺伝子(陰性対照)を導入した癌細胞や野生型の癌細胞を皮下移植したマウスではアバカビル投与群におけるCD8陽性T細胞の浸潤及び腫瘍形成への影響は観察されなかった。以上より、アバカビルとHLA-B\*57:01の相互作用による免疫賦活が腫瘍への細胞傷害性CD8陽性T細胞の浸潤を促進し、抗腫瘍効果に繋がること示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のがん免疫療法の課題の1つに、抗原提示能が低い低免疫原性の腫瘍では細胞傷害性T細胞に認識されないため、免疫チェックポイント阻害剤を介しても細胞傷害性T細胞の活性化が誘導されないことが挙げられる。そのため既存のがん免疫療法では限定的な治療効果しか認められておらず、将来的な適応拡大を視野に入れると高効率な細胞傷害性T細胞の活性化法の開発は必要不可欠であった。本研究で実証した『低免疫原性腫瘍の抗原性を向上させる』がん免疫治療戦略によって、この課題への新たな解決策の提示が期待される。

研究成果の概要(英文)：Abacavir treatment showed significant tumor growth inhibition associated with CD8+ T cell infiltration into tumor in mice inoculated with HLA-B\*57:01 expressing tumor cells, but neither in HLA-B\*57:03 (negative allele) expressing tumor nor control tumor inoculated mice. Moreover, the tumor infiltrating CD8+ T cell were immune-activated and proliferated, with secreting cytotoxic cytokines. These results suggested that Abacavir/HLA-B\*57:01 interaction could improve tumor immunogenicity in poorly immunogenic tumor, leading to anti-tumor effect.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍免疫 HLA CD8陽性T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法ではがん細胞の免疫原性が治療奏効率を左右する。抗原提示能が低い低免疫原性の腫瘍では抗腫瘍エフェクター細胞である細胞傷害性 T 細胞(CTL)に認識されないため、免疫チェックポイント阻害剤に代表されるがん免疫療法の治療奏効率が非常に低いことが問題となっている。しかし、がん細胞の免疫原性を改善し CTL を活性化させることは容易ではないことから、高効率な CTL の活性化法の開発は必要不可欠である。

一方で、抗原提示分子として免疫原性を司る HLA は、その多型と薬物の組み合わせによって異常抗原を提示することで自己免疫性の薬物過敏症が惹起されることが近年明らかとなってきた。このうち HLA-B\*57:01 多型と抗 HIV 薬アバカビル(ABC)との組み合わせにより生じる過敏症はメカニズム研究が最も進んでおり、HLA-B\*57:01 の抗原提示ポケットに ABC が結合することでその構造が変化し、その結果、異常抗原(異物化自己抗原)となるポリクローナルペプチドが提示され、これを CTL が非自己と認識して活性化するため自己免疫性の過敏症に至ることが示唆されている。

これらの学術的背景から、「薬物との相互作用により産生される HLA 上の異物化自己抗原を認識することで活性化 CTL が誘導される現象」を低免疫原性腫瘍の抗原性を向上させる新たな「がん免疫治療戦略」に応用可能と考えた。

## 2. 研究の目的

ヒト-マウスキメラ型 HLA 遺伝子を導入した低免疫原性腫瘍細胞株を新たに樹立し、その担癌マウスモデルを用いて、薬物-HLA 相互作用による抗原異物化が抗腫瘍免疫応答を誘導できるか明らかにする。最終的に HLA と薬物との相互作用によりがん細胞の免疫原性を薬剤誘導性に制御する新たながん免疫治療戦略を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) HLA 安定発現腫瘍細胞株の樹立

ヒト-マウスキメラ型 HLA-B\*57:01 および HLA-B\*57:03(2 アミノ酸変異体の陰性対照) 遺伝子発現ベクターをリポフェクタミンに封入し、ルシフェラーゼ安定発現メラノーマ(B16F10-luc2)、肺癌(3LL)および結腸癌(Colon26)細胞にそれぞれ遺伝子導入した。G418 によるセレクション後の細胞を単クローン化したものについて、導入 HLA の mRNA、および FLAG タグ (HLA 遺伝子の末端に付加) のタンパク発現をそれぞれ確認した。いずれも  $\beta$ -actin を loading control として用いた。さらに導入 HLA タンパクの膜表面発現をフローサイトメトリー解析により確認した。

### (2) 実験動物の飼育と遺伝子型の判定

HLA-B\*57:01 遺伝子導入マウス(B\*57:01-Tg)の維持および繁殖は富山大学内の実験動物飼育室において行い、富山大学動物実験委員会の承認の下、実施した。遺伝子型の判定については、抽出したゲノムに対して、導入キメラ型 HLA 遺伝子の一部を増幅可能な以下のプライマーセットを用いて半定量的 PCR 反応を行い、アガロース電気泳動結果を基に判定した。chimeric HLA forward, 5' -GAG CTA CTC TCA GGC TGC GTG-3' , and reverse, 5' -CAT GTT AGC AGA CTT CCT CTG CC-3' 。

### (3) 担癌マウスモデルを用いた抗腫瘍効果の評価

(1) で樹立したヒト-マウスキメラ型 HLA 遺伝子安定発現腫瘍細胞を B\*57:01-Tg マウスおよび野生型マウスに 500,000 個/body の割合で皮下移植した。ABC 5mg または vehicle(滅菌水)を連日腹腔内投与し、腫瘍の発光活性と体積の測定により抗腫瘍効果の評価した。発光活性については IVIS、体積についてはノギスをそれぞれ用いて測定した。

さらに、抗腫瘍効果における CTL 依存的な免疫応答の重要性を証明するため、腹腔内への抗 CD8 抗体投与による CD8<sup>+</sup> T 細胞の depletion 実験や IFN- $\gamma$  欠損担癌マウスモデルを用いた実験も併せて実施した。加えて、CD8<sup>+</sup> T 細胞の腫瘍浸潤に関与する CXCR3 分子が ABC による抗腫瘍効果および CD8<sup>+</sup> T 細胞の腫瘍組織内浸潤に寄与するか検証するために、抗 CXCR3 抗体投与による blocking 実験も行った。

### (4) 腫瘍組織における CD8<sup>+</sup> T 細胞浸潤の評価

(3) で取得した腫瘍組織を O.C.T. compound に包埋、急速凍結した後、5 $\mu$ m の薄切をクリオスタットで作製した。アセトン固定を行った切片に対し CD8 の蛍光免疫染色を実施し、CD8<sup>+</sup> T 細胞の腫瘍組織内浸潤を蛍光顕微鏡 BZ-X810 を用いた観察から評価した。

(5) 腫瘍浸潤 CD8<sup>+</sup> T 細胞(CD8<sup>+</sup> TIL)を用いた解析による抗腫瘍免疫応答の評価

ABC-HLA 相互作用による抗腫瘍免疫応答については CD8<sup>+</sup> TIL におけるサイトカイン産生能等の機能から評価した。(3) で取得した腫瘍組織を物理的に破砕し、コラゲナーゼ及び DNase I 含有培地で 1 時間処理した。さらに溶血処理した後、各種標識抗体で染色した細胞をフローサイトメトリー解析により分離・検出した。サイトカイン類の染色実験では、溶血処理後の細胞を予め PMA, ionomycin 含有培地で 4 時間再刺激した。

4. 研究成果

(1) 各種 HLA 安定発現腫瘍細胞における導入 HLA の発現確認

本研究で新規に樹立した HLA-B\*57:01 および HLA-B\*57:03 遺伝子安定発現腫瘍細胞株について、単一クローン化後の細胞における HLA 発現を確認した。

B16F10-luc2 細胞では、導入 HLA の mRNA (図 1a) およびタンパク (図 1b) の発現が安定発現腫瘍細胞 (HLA-B\*57:01/B16F10-luc2 および HLA-B\*57:03/B16F10-luc2) でのみ確認された。

さらに、膜表面での HLA タンパク発現についても HLA 安定発現腫瘍細胞でのみ確認された (図 1c)。

また、HLA-B\*57:01 および HLA-B\*57:03 遺伝子導入を行なった 3LL、Colon26 細胞においても同様に、導入 HLA の mRNA、タンパク発現、膜表面発現が確認された。

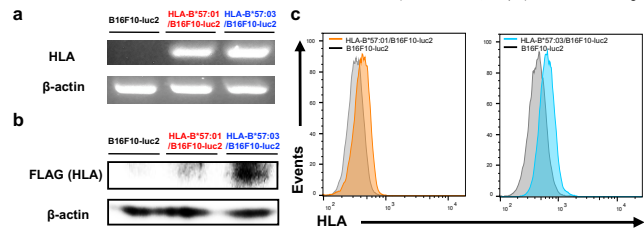


図 1 | 樹立したHLA安定発現B16F10細胞株における導入キメラ型HLA遺伝子・タンパクの発現

(2) ABCによる HLA 多型特異的な抗腫瘍効果

B16F10-luc2 の担癌マウスモデルでは、HLA-B\*57:01/B16F10-luc2 担癌マウスにおいて ABC 5mg の連日投与により腫瘍の発光活性の減弱 (図 2a) および腫瘍の増大の有意な抑制 (図 2b) が認められた。その一方で、HLA-B\*57:03/B16F10-luc2 およびコントロール B16F10-luc2 を担癌したマウスでは ABC 投与による腫瘍への影響はいずれも観察されなかった (図 2a-b)。さらに、3LL、Colon26 についても同様に担癌マウスモデルを用いて ABC 投与の腫瘍増大に与える影響を検証した。その結果、HLA-B\*57:01 遺伝子導入腫瘍 (HLA-B\*57:01/3LL; 図 2c、および HLA-B\*57:01/Colon26; 図 2d) でのみ ABC 投与群において腫瘍増大の抑制が認められ、HLA-B\*57:03 遺伝子導入腫瘍およびコントロールの腫瘍では有意な変化は認められなかった (図 2e)。これらの結果から、ABC が HLA 多型特異的に腫瘍に対して抗腫瘍効果を示すことが示唆された。

加えて、B\*57:01-Tg マウスにおいても HLA-B\*57:01/B16F10-luc2 および HLA-B\*57:01/3LL の担癌マウスモデルを作製し追加検証を実施したところ、いずれの腫瘍においても vehicle 投与群と比較して ABC 投与群腫瘍の増大が有意に抑制された。したがって、HLA-B\*57:01 分子が全身性に発現している環境においても、ABC と HLA-B\*57:01 の相互作用による抗腫瘍効果が得られることが示唆された。

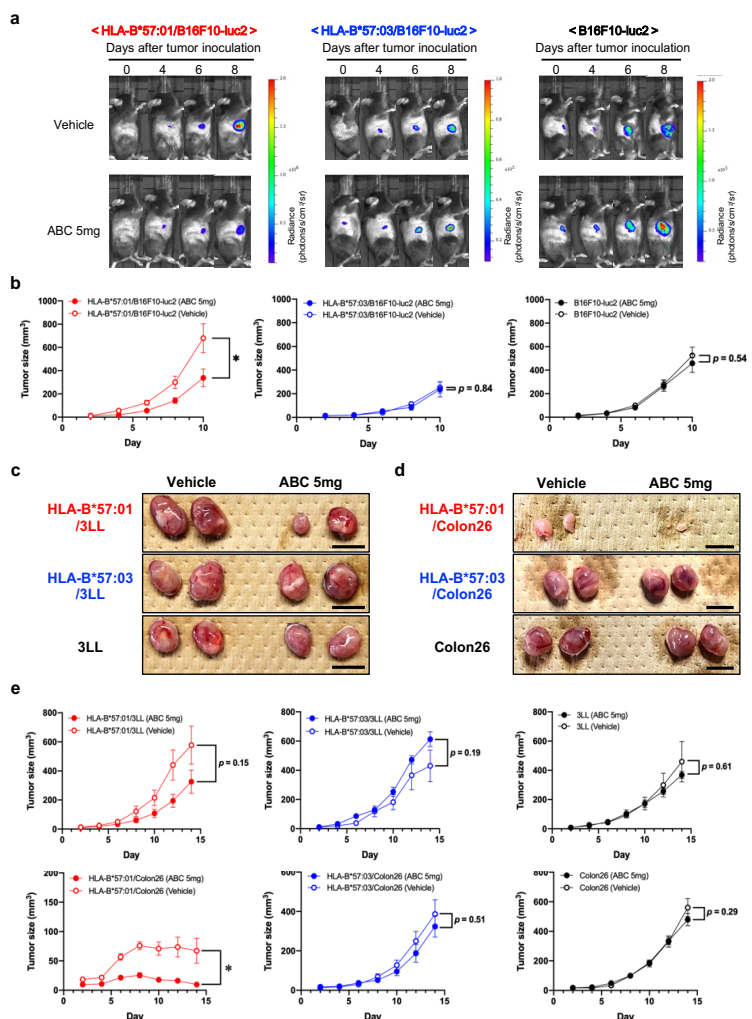


図 2 | HLA遺伝子導入腫瘍を担癌したマウスモデルにおけるABCによる抗腫瘍効果

### (3) ABCによるHLA多型特異的な腫瘍免疫原性の改善

(2)の検体から作製した凍結腫瘍組織の切片に対してCD8の免疫染色を実施し、CD8<sup>+</sup>T細胞の腫瘍組織内浸潤を評価した。その結果、ABC投与による腫瘍の増大抑制が認められたHLA-B\*57:01/B16F10-luc2 (図3a)、HLA-B\*57:01/3LL (図3b)、HLA-B\*57:01/Colon26 (図3c)においてCD8<sup>+</sup>T細胞の腫瘍組織内浸潤が観察された。加えて、B\*57:01-Tgマウスでも同様にHLA-B\*57:01遺伝子導入腫瘍におけるCD8<sup>+</sup>T細胞の腫瘍組織内浸潤が認められた。その一方で、HLA-B\*57:03遺伝子導入腫瘍およびコントロールの腫瘍ではCD8<sup>+</sup>T細胞の腫瘍組織内浸潤がいずれも観察されなかった。これらの結果から、ABCとHLA-B\*57:01との相互作用が腫瘍組織内への細胞傷害性CD8<sup>+</sup>T細胞の浸潤を促進し、その結果、抗腫瘍効果に繋がったことが示唆された。

また、CD8<sup>+</sup>T細胞除去条件やIFN- $\gamma$ 欠損マウスでは、ABC投与による抗腫瘍効果が認められなかったことから、ABC-HLA相互作用による抗腫瘍効果においてCTL依存的な免疫応答が重要な役割を果たしていることが証明された。加えて、抗CXCR3抗体投与条件ではABCによる(i)腫瘍増大の抑制および(ii)腫瘍組織内におけるCD8<sup>+</sup>T細胞の浸潤が共に認められなかったことから、CXCR3分子のABC-HLA相互作用によるCTL依存的な抗腫瘍効果への関与が示唆された。

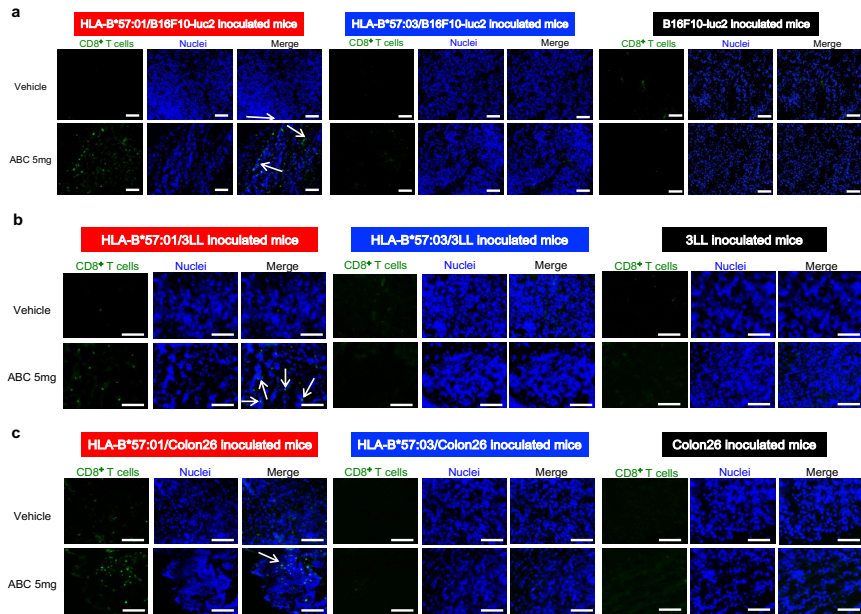


図3 | HLA遺伝子導入腫瘍担癌マウスの腫瘍組織におけるCD8<sup>+</sup>T細胞の浸潤 (緑: CD8, 青: 核)

### (4) ABC-HLA相互作用によるCD8<sup>+</sup>TILの活性化

(2)のHLA-B\*57:01/B16F10-luc2担癌マウスにおける腫瘍組織中のCD8<sup>+</sup>TILの機能をフローサイトメトリー解析により評価した。炎症性サイトカインであるIFN- $\gamma$ を産生したCD8<sup>+</sup>T細胞を染色したところ、ABC投与群ではCD8<sup>+</sup>TIL中のIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>細胞の割合がvehicle投与群と比較して有意に増加した(図4a)。さらに、IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>細胞の大部分がTNF- $\alpha$ <sup>+</sup>でもあった(図4b)。TNF- $\alpha$ はアポトーシス誘導に寄与する因子であることから、ABC投与により増加したIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TILは抗腫瘍機能を有したCTLであることを示唆している。同様に、HLA-B\*57:01/3LL担癌マウスにおいても、ABC投与によるIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TILの増加が確認されている。

また、増殖細胞マーカーであるKi-67を染色したところ、CD8<sup>+</sup>TIL中のKi-67<sup>+</sup>細胞の割合がABC投与群で有意に増加した(図4c)。加えて、活性化T細胞マーカーである4-1BBの発現もABC投与群のCD8<sup>+</sup>TILにおいて有意に増加した(図4d)。ゆえに、ABC投与によってCD8<sup>+</sup>TILが腫瘍組織内で活性化し、かつ増殖していることが示唆された。

以上の結果から、ABC-HLA相互作用による抗腫瘍効果は抗腫瘍免疫応答(CD8<sup>+</sup>TILの活性化)を介して誘導されていることが示唆された。

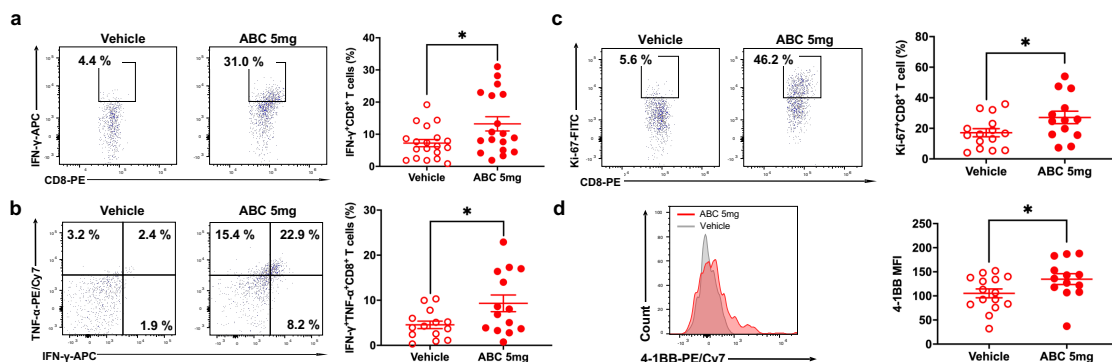


図4 | HLA-B\*57:01/B16F10-luc2担癌マウスにおける腫瘍浸潤CD8<sup>+</sup>T細胞(CD8<sup>+</sup>TIL)の活性化

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 1件）

1. 著者名 Susukida Takeshi, Kuwahara Saki, Song Binbin, Kazaoka Akira, Aoki Shigeki, Ito Kousei	4. 巻 4
2. 論文標題 Regulation of the immune tolerance system determines the susceptibility to HLA-mediated abacavir-induced skin toxicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02657-2	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 -

1. 著者名 Song Binbin, Aoki Shigeki, Liu Cong, Susukida Takeshi, Kuwahara Saki, Ito Kousei	4. 巻 463
2. 論文標題 The PD1 inhibitory pathway and mature dendritic cells contribute to abacavir hypersensitivity in human leukocyte antigen transgenic PD1 knockout mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology	6. 最初と最後の頁 152971 ~ 152971
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tox.2021.152971	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 Susukida Takeshi, Aoki Shigeki, Shirayanagi Tomohiro, Yamada Yushiro, Kuwahara Saki, Ito Kousei	4. 巻 52
2. 論文標題 HLA transgenic mice: application in reproducing idiosyncratic drug toxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Metabolism Reviews	6. 最初と最後の頁 540 ~ 567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/03602532.2020.1800725	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 薄田健史, 青木重樹, 白柳智弘, 伊藤晃成, 早川芳弘
2. 発表標題 アバカビルとHLA-B*57:01分子との相互作用による腫瘍免疫原性の改善を志向とした新規がん免疫薬物療法の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 薄田健史, 青木重樹, 白柳智弘, 伊藤晃成, 早川芳弘
2. 発表標題 薬物-HLA相互作用を介した腫瘍免疫原性の改善に基づく新規がん免疫治療戦略の開発
3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑原佐季, 薄田健史, 風岡顯良, 青木重樹, 伊藤晃成
2. 発表標題 HLA多型依存的なアパカビル過敏症発症の個人差に対する免疫寛容系の関与
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑原佐季, 薄田健史, 青木重樹, 伊藤晃成
2. 発表標題 アパカビルによるHLA多型依存的な特異体質毒性の発現への免疫寛容系の関与
3. 学会等名 第27回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青木重樹, 桑原佐季, 薄田健史, 伊藤晃成
2. 発表標題 HLA多型特異的な薬物性の免疫毒性発症に対する免疫寛容系の関与
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020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
---------	---------