

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22823

研究課題名（和文）免疫チェックポイント分子を応用したミセル型ナノ粒子ポリマーワクチンの創出

研究課題名（英文）Development of polymeric micellar nanoparticle vaccines using immune checkpoint molecules

研究代表者

塚本 昌子 (TSUKAMOTO, Masako)

日本大学・医学部・専修指導医

研究者番号：80570910

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）：がん治療で治療抵抗性となるがん微小環境を打破するために、DNAM-1とTIGITの共通リガンドであるCD155を改変し、活性と抑制のバランス制御できるワクチンの創出を目的として、T細胞活性のTCRとDNAM-1、抑制のTIGITの関係について研究を行った。TIGITの存在によりTCRは抑制された。CD155と結合するDNAM-1とTIGITでは、DNAM-1の反応が強く、DNAM-1よりTIGITに結合しやすいことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行した腫瘍では免疫細胞の疲弊化や制御性T細胞の増加など局所環境が免疫抑制状態に陥る『がん微小環境』による無効化が障害となっている。その打破として様々な抗がん剤やがんワクチンが臨床応用されており、免疫チェックポイント阻害薬もあげられる。TIGITは免疫チェックポイント分子の1つであり、次世代の免疫チェックポイント阻害薬として開発が進められている。T細胞の活性化の過程でTIGITが重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We need to overcome the tumor microenvironment that includes the proteins produced by all of the cells present in the tumor that support the growth of the cancer cells. Modifying CD155 which is a common ligand for DNAM-1 (DNAX Accessory Molecule-1, CD226) and TIGIT (T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains), we would create a vaccine that could control the balance between activity and suppression. Then, we investigated the relationship between TCR (T cell receptor), DNAM-1, and TIGIT. The presence of TIGIT suppressed TCR micro cluster. DNAM-1 strongly bonded to CD155 compared with TIGIT, this results suggested CD155 modification would needed to argument TIGIT-CD155 reaction.

研究分野：免疫

キーワード：免疫チェックポイント T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な抗がん剤やがんワクチンが臨床応用されているが、進行した腫瘍では免疫細胞の疲弊化や制御性 T 細胞の増加など局所環境が免疫抑制状態に陥る『がん微小環境』による無効化が障害となっている。ナノ粒子ワクチンはミセル化ナノ粒子内から薬物放出するため、血中濃度の持続や腫瘍への薬物の移行量の増加など、薬剤送達システムを考慮した投薬が可能である。特に、ポリエチレングリコール (PEG) の親水性ポリマーと疎水性ポリマーを分子レベルで結合させた共重合体ナノ粒子ポリマーはミセル形成後の安定性が高く、内包物を継続的に徐放するだけでなく、ミセル外側に親水性物質を付加することもできるとされる。ミセル型ナノ粒子ポリマーががんワクチンの基剤として有効であることをマウス担がんモデルを用いて実証した。しかし進行がんを想定したモデルでは、がん体積の大きさやナノ粒子ワクチンを接種するタイミングの違いなどにより十分な効果を出せないこともあった。

所属リンパ節やがん原性炎症反応によって形成された tertiary lymphoid organs を含め、『がん微小環境』が維持されている間は、がんワクチンの接種が逆効果を生む可能性も考えられる。一方、免疫チェックポイント阻害療法は年間の費用だけで患者 1 人当たり億単位という高額な治療であり、経済的な側面からもナノ粒子ワクチンとの併用療法だけでは不十分と考えられ、ミセル型ナノ粒子ポリマーの側に免疫チェックポイント分子の阻害効果も加えるなど、T 細胞や NK 細胞の疲弊化を同時に解除できるアジュバント機能の高いワクチンをエンジニアリングする研究は重要である。本研究では『がん微小環境』を打破するために、腫瘍免疫に重要な 2 つのエフェクター細胞である T 細胞とナチュラルキラー (NK) 細胞に共通の活性化補助刺激受容体 DNAM-1 (DNAX Accessory Molecule-1, CD226) と免疫チェックポイント分子の 1 つ TIGIT (T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) に注目した。TIGIT は、活性化レセプターである DNAM-1 と競合することにより免疫活性を調整する抑制性レセプターであり、T 細胞の活性化を抑制し、T 細胞を疲弊させる。TIGIT の阻害は細胞傷害性 T 細胞の増殖と機能を増強する。DNAM-1 と TIGIT の共通リガンドである CD155 を改変し、活性化と抑制のバランス制御をすることで、より効率的な抗腫瘍効果を期待できると考えた。

2. 研究の目的

新規ミセル化ナノ粒子ポリマーに、免疫細胞に広く共通の活性化受容体 DNAM-1 のみを選択的に刺激できる改良型 CD155 リガンドの mRNA を内包させ、がん免疫応答の主軸である 2 つのエフェクター細胞である T 細胞とナチュラルキラー (NK) 細胞を同時に活性化する新規がんワクチンの創出を目的とした。

3. 研究の方法

CD155、DNAM-1、TIGIT 発現細胞の樹立 : CD155 を標的細胞に、DNAM-1 および TIGIT を T 細胞

に発現させ、in vitro での混合実験で T 細胞の活性化応答を評価する。CD155 発現細胞は CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞、T 細胞は蛾チトクローム特異的 CD4+T 細胞株 2D12 を用いた。

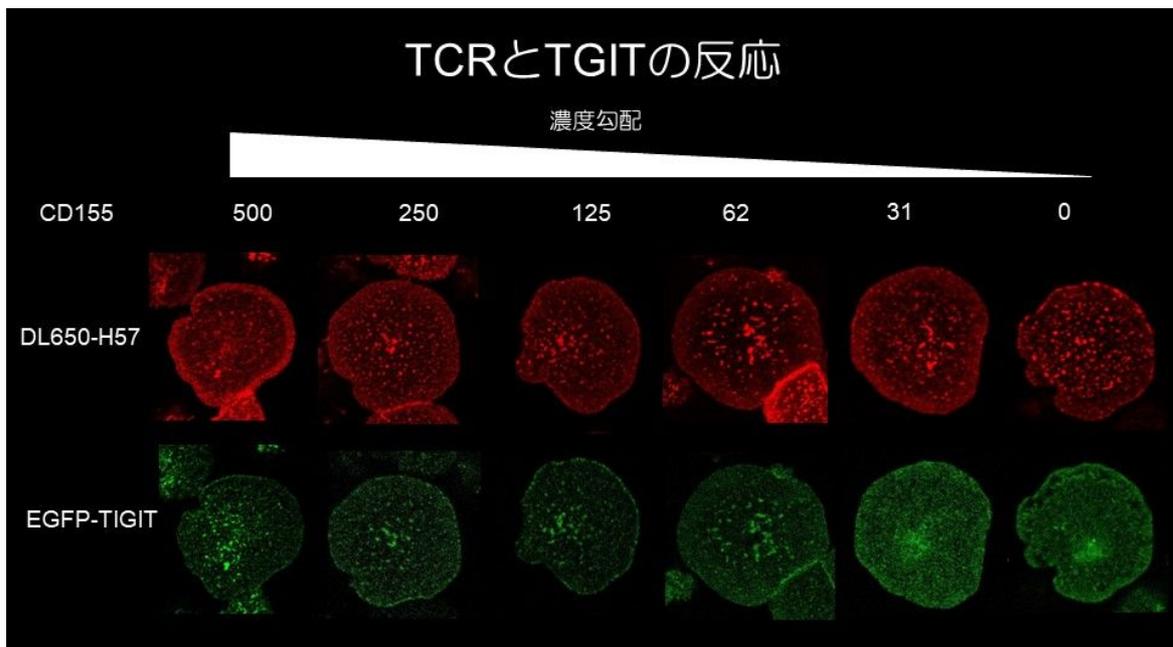
T 細胞の活性化の評価：標的細胞と T 細胞の混合培養により産生される interleukin-2 (IL-2) を ELISA とウェスタンブロットにより解析した。 で作成した細胞を用いて行った。

人工平面脂質二重膜を用いた分子イメージング：T 細胞とメンブレンとの接着面にてできる免疫シナプスが、TCR マイクロクラスターで構成されている。TCR (T cell receptor) マイクロクラスターは、TCR 下流のキナーゼやアダプター、リン酸化チロシン蛋白などが集まった、T 細胞活性化の最小ユニットである。Glycosylphosphatidylinositol アンカー型 CD155 のタンパク質精製を行い、DNAM-1、TIGIT、CD155、TCR の挙動を一分子解析した。

4 . 研究成果

CD155 を発現した CHO 細胞、DNAM-1 と TIGIT を発現した 2D12、DNAM-1 のみを発現した 2D12 を使用し、共培養を行い IL-2 の産生を ELISA で確認した。DNAM-1 発現細胞と CD155 発現細胞では、CD155 発現していない細胞と比較して IL-2 産生が増加した。TIGIT 発現した細胞では IL-2 の産生が低下した。DNAM-1 と CD155 にて IL-2 の産生が増強され、TIGIT にて IL-2 産生が低下することから、TIGIT は T 細胞の活性化を抑制することが想定された。

ウェスタンブロットにて T 細胞の活性化を確認した。Erk のリン酸化は培養開始 2 分で最も認められた。DNAM-1 発現細胞では Erk のリン酸化が増強した。DNAM-1 と TIGIT 発現細胞では Erk のリン酸化が抑制されず、TIGIT-CD155 の反応より DNAM-1-CD155 の反応が強いことが示された。人工平面脂質二重膜を用いた分子イメージングでは CD155 存在下で TCR と TIGIT の反応を確認した。CD155 の濃度を段階的に用意したところ、TCR はいずれの濃度でも反応が認められ、CD155 は濃度勾配により反応が強くなった。しかし CD155 の濃度が高くなり TIGIT-CD155 の反応



が強くなると TCR の反応が抑制された。イメージングでも TIGIT が T 細胞の活性を抑制することが示唆された。DNAM-1 発現した細胞では TIGIT の反応が抑制された。

以上の結果から、TIGIT は T 細胞の活性化を抑制することが示された。DNAM-1 存在下では TIGIT-CD155 の反応より DNAM-1-CD155 の反応の方が強くなることが示唆された。DNAM-1 存在下ではいずれの実験法においても TIGIT-CD155 反応より DNAM-1-CD155 反応が強いため、TIGIT-CD155 の評価が困難である。DNAM-1 発現がない細胞を用いて TIGIT の評価を行うことが必要である。また選択的に TIGIT と結合する CD155 の改変が必要であるがその改変に至っておらず、今後の課題である。

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