

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08333

研究課題名（和文）細菌の嫌気部位集積性を利用した悪性黒色腫に対する新規免疫誘導方法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel method of enhancing the immunogenicity of malignant melanoma cells using the anaerobic site-accumulation properties of bacteria.

研究代表者

堀内 大 (Horiuchi, Yutaka)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：30608906

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：がん免疫応答を惹起するためには、がん細胞が抗原性に加え十分なアジュバント性を併せ持つことが必要となる。本研究では、細菌細胞内感染ががん細胞にアジュバント性を付与し、それにより腫瘍特異的な免疫応答が惹起されるか検討した。造腫瘍能をもつ非感染細胞と細菌感染細胞を混和してマウスに皮下接種したところ造腫瘍性が抑制された。更にこれらのマウスに非感染細胞のみ再接種しても腫瘍形成には至らなかった。感染細胞接種マウスでは、腫瘍細胞由来抗原特異的CD8+Tリンパ球(CTL)のin vivo増殖も確認された。以上より、細菌の細胞内感染は高いアジュバント性を腫瘍細胞に付与し、抗腫瘍免疫応答を賦活化すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細菌細胞内感染ががん細胞におけるアジュバント特性を増強し、腫瘍特異的免疫応答を誘発するかどうか検討し、有望な結果を得た。今回得られた知見は、細菌の腫瘍細胞内感染を起点として抗腫瘍免疫応答が惹起されることを示しており、細菌を用いたがん治療法の科学的根拠を高めるものである。近年大きく発展を遂げた免疫チェックポイント阻害療法などとがん細菌療法との併用によって、従来までの標準的ながん治療の効果をより高めることができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether bacterial intracellular infection could enhance adjuvant properties in cancer cells, triggering tumor-specific immune responses. The results were promising. Subcutaneous inoculation of mice with a mixture of tumour-forming non-infected and bacterial-infected cells not only suppressed tumourigenicity but also prevented tumour formation upon re-immunisation with only non-infected cells. Additionally, in vivo proliferation of tumor cell-derived antigen-specific CD8+ T lymphocytes (CTL) was observed in mice inoculated with infected cells. These findings hint at the potential of bacterial intracellular infection to revolutionize cancer immunotherapy by stimulating an anti-tumor immune response.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：細菌 細胞内感染 悪性黒色腫

1. 研究開始当初の背景

メラノーマ(悪性黒色腫)は代表的な難治性がんの一つである。近年の分子標的薬と免疫チェックポイント阻害薬の登場によりメラノーマの治療は長足の進歩を遂げた。しかし、その治療奏効率は未だ満足できるものではなく、新たな発想に基づく治療手段の開発が求められている。近年、がん治療の奏功において、がんに対する免疫応答が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。このことから、新しい治療手段として理想的なのは、がん細胞を細胞死に至らしめるとともに、強力な抗がん免疫応答が誘導できる方法だと考えることができる。1890年代、米国の外科医 W. B. Coley は、細菌感染症である丹毒を併発した患者のがん病変が解熱後に消失したことを観察し、その経験をもとに細菌をがん病変に接種することで一定の治療成績を得た。しかし、1920年代のペニシリンの発見により生体内の細菌の排除が可能となり、それによる諸疾患の目覚ましい救命効果によって、細菌を投与する Coley のがん治療法はナンセンスなものとして忘れ去られていった。近年、解析方法の進歩により、体内のさまざまな機能発現に、生体内にいる細菌のはたらきかけが重要な役割を持つことが明らかになってきた。一方で、感染を契機に引き起こされる生体内分子に対する免疫応答についての知見も蓄積されつつある。これらの細菌をめぐる今日の状況と、一世紀前の W. B. Coley の足跡を踏まえると、新たながん治療の可能性が浮かびあがってくる。

免疫応答を引き起こす性質である免疫原性は、免疫応答を開始に必要となる「アジュバント性」と免疫応答の対象の決定に必要となる「抗原性」によって構成される。メラノーマなどのがん細胞は、正常細胞とは異なる特有の抗原性を持ち、免疫応答の対象となりうる。しかし、アジュバント性が低いため、十分な免疫応答を引き起こすことはできない。一方、細菌は宿主細胞とは大きく異なる分子を持ち、強い抗原性を持つとともに、一部の分子パターンは「Pathogen-associated molecule patterns (PAMPs)」と呼ばれ、強いアジュバント性を発揮する(下図:細菌の免疫原性)。以上のことから、細菌が細胞内に感染することによって、がん細胞の不十分なアジュバント性を補える可能性が想起された。

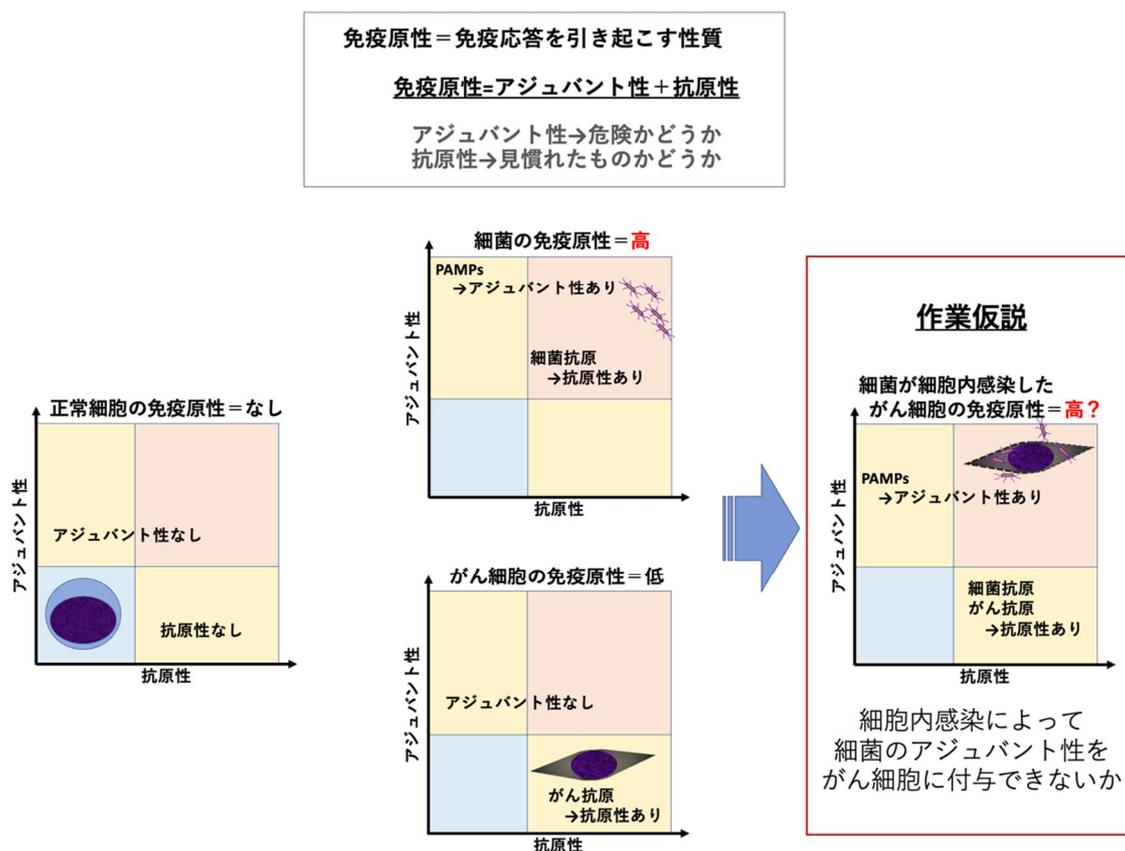


図 1. 細胞と細菌の免疫原性および本研究の作業仮説

2. 研究の目的

本研究は、細胞内寄生菌 *Salmonella typhimurium* の弱毒株 VNP20009 をがん細胞内に感染させることによって、がん細胞に高免疫原性細胞死 Immunogenic cell death (ICD)を引き起こすことができるかについて追求する。サルモネラの細胞内感染が ICD と同様の細胞変性を惹起できるのであれば、それを利用し、メラノーマ細胞に由来する抗原に対応する抗腫瘍免疫応答を引き出すことを狙う。

3. 研究の方法

S. typhimurium VNP20009 株を遺伝子改変し、赤色蛍光タンパク質 tdTomato を安定発現する菌株を樹立する。この蛍光発現菌株 VNP-tdT をマウスメラノーマ細胞株 B16F10 の培養に接種し、メラノーマ細胞への細胞内感染の条件の最適化を行う。次に、in vitro 実験で、サルモネラ感染メラノーマ細胞の被貪食性、貪食細胞活性化能を検討する。さらに、感染メラノーマ細胞をマウスに接種することで、サルモネラ感染メラノーマ細胞の抗腫瘍免疫の惹起および腫瘍増大抑制効果の誘導を確認する。最後にメラノーマ抗原 gp100 特異的 T 細胞受容体遺伝子導入マウス (Pmel-1 マウス) にサルモネラ感染メラノーマ細胞を接種して、メラノーマ抗原特異的 T 細胞免疫応答の誘導可能性を評価する。

4. 研究成果

まず、マウスメラノーマ B16F10 細胞株へのサルモネラ VNP-tdT 株の感染条件を検討し、Multiplicity of infection (MOI) 1000、5 時間の条件で、ほぼ 100%の細胞が細胞内感染することを見出した。また、この条件では感染がん細胞は特徴的な空胞変性を呈することが観察された(図 2)。

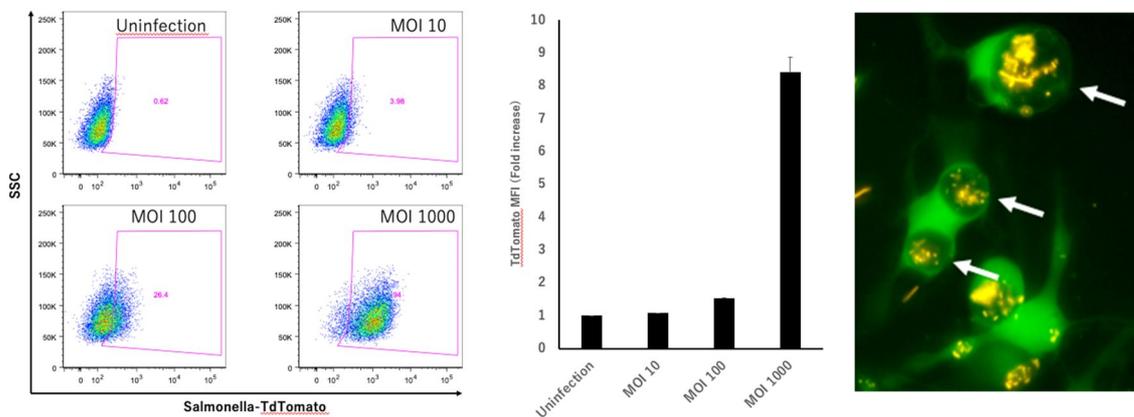


図 2. サルモネラ接種 5 時間後の各 MOI の tdTomato 陽性細胞の割合(左)および tdTomato の平均蛍光強度(中)。サルモネラ感染細胞の空胞変性(右)。

つぎに、サルモネラ感染メラノーマ細胞の被貪食性、貪食細胞活性化能を検討した。サルモネラの感染によって、腫瘍細胞から ATP が放出されることが明らかとなった。細胞から放出される ATP は、"Find me" シグナルとして、貪食能を持つ免疫細胞を感染細胞に集める役割を持つ。また細胞表面の貪食抑制分子 CD47 の発現はサルモネラの細胞内感染によって低下した(図 3)。

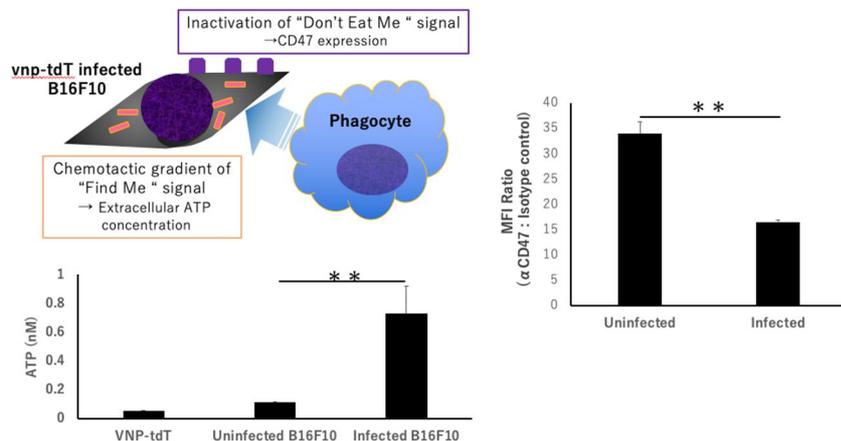


図 3. 実験概念図(左上)。VNP-tdT、未感染メラノーマ細胞、感染メラノーマ細胞からの ATP 放出(左下)および未感染メラノーマ細胞または感染メラノーマ細胞の CD47 の表出(右)。

実際に貪食能・抗原提示能を持つマクロファージや樹状細胞と共培養すると、感染がん細胞は効率良く貪食され、同時に貪食細胞の抗原提示能が活性化されることが明らかとなった(図4)。

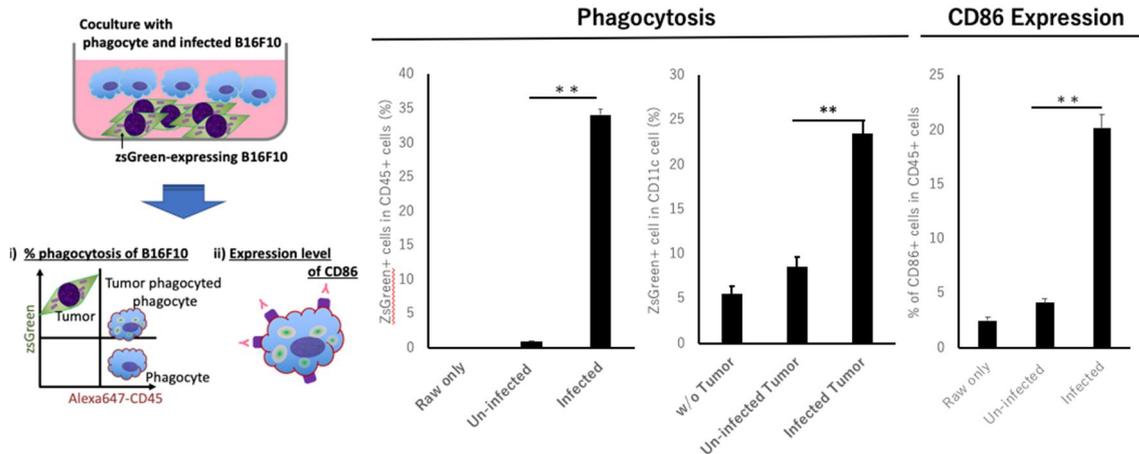


図4. 実験概念図(左上)、未感染メラノーマ細胞または感染メラノーマ細胞の被貪食性(中)と貪食細胞活性化能(右)

以上のような特徴を持つサルモネラ感染細胞をマウスに接種すると、メラノーマに対するリンパ球の細胞傷害活性が高まること、メラノーマ抗原特異的なリンパ球が増殖していることが確認された。さらに、感染細胞接種を受けたマウスではがん病態の進展が抑制されることが明らかとなった(図5)。

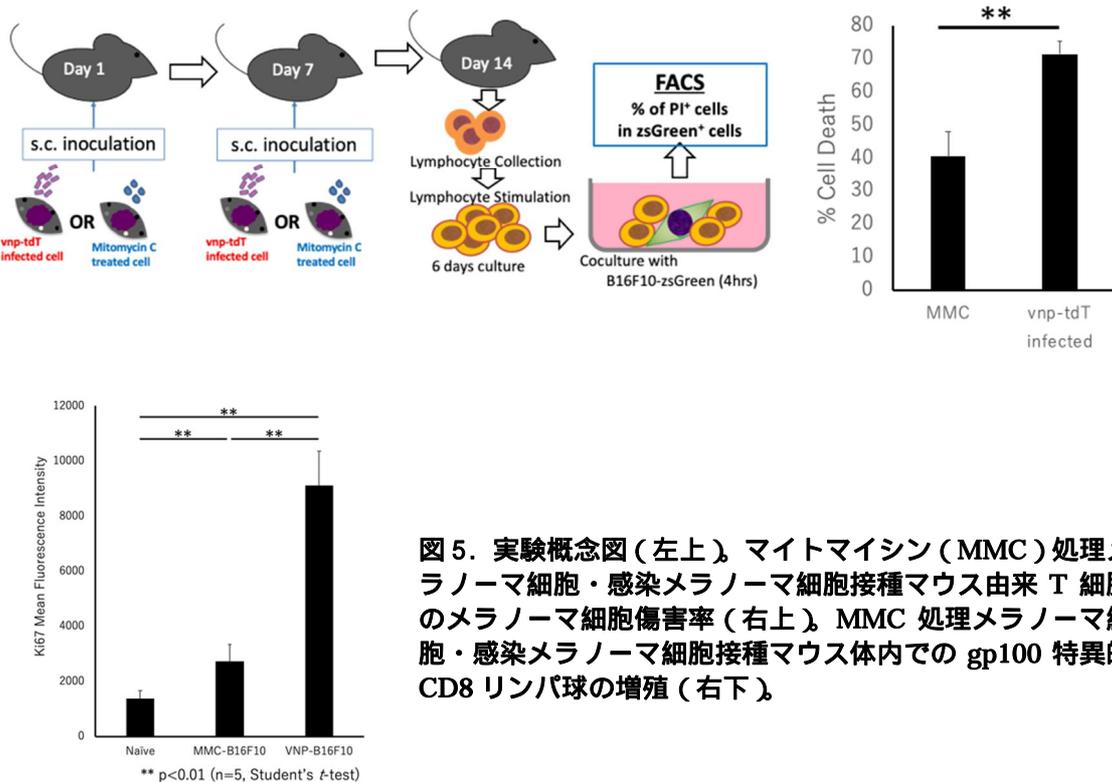
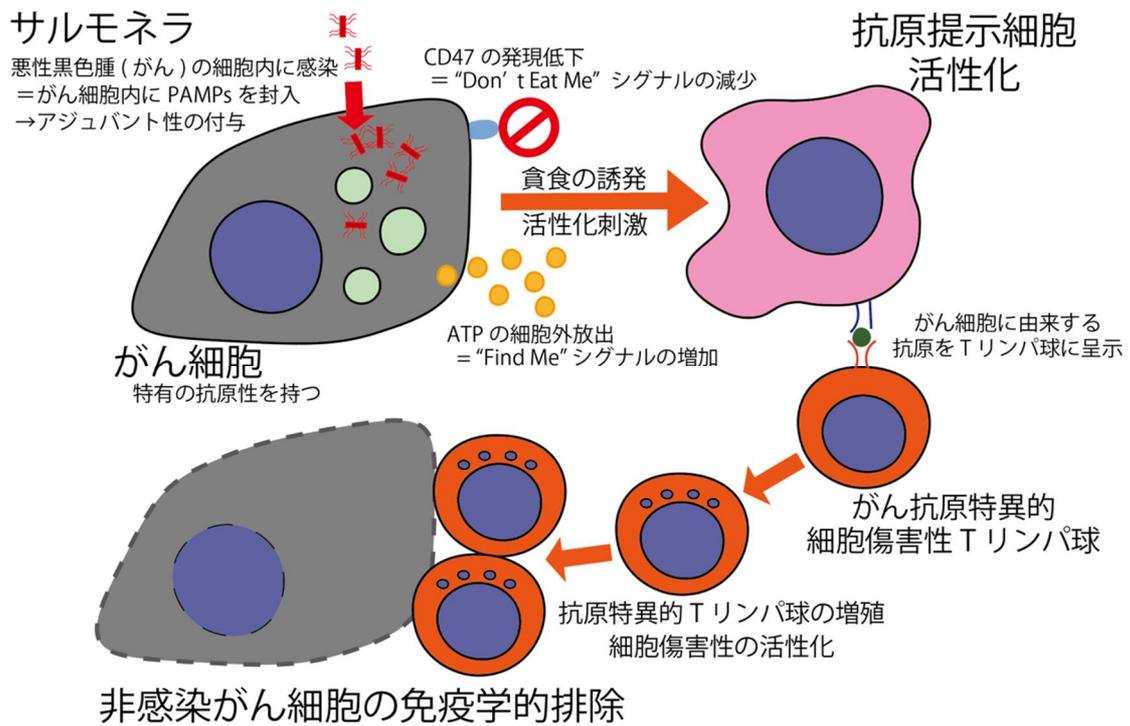


図5. 実験概念図(左上)、マイトマイシン(MMC)処理メラノーマ細胞・感染メラノーマ細胞接種マウス由来 T 細胞のメラノーマ細胞傷害率(右上)、MMC 処理メラノーマ細胞・感染メラノーマ細胞接種マウス体内での gp100 特異的 CD8 リンパ球の増殖(右下)

本研究結果から、細菌のがん細胞内への感染によって、がん細胞特有の抗原性に加えて、十分なアジュバント性を併せもった免疫原性の高い状態ががん細胞にもたらされることが証明された。このことは細菌のがん細胞への細胞内感染が、がんの病態進展を抑えるのに十分な免疫応答の起点となることを示している。



今後の展望

近年、免疫チェックポイント阻害薬の成功により、がんに対する免疫応答を制御することによる治療方法が注目されている。免疫チェックポイント阻害薬は、がん免疫に対する抑制を抑える、いわばブレーキを外す治療法である。より効果的ながん免疫制御を目指して、免疫応答を強く賦活化する、いわばアクセルとなる治療方法の開発が求められている。本研究で明らかとなった「細菌のがん細胞内感染を起点としたがん免疫の賦活化」は、上記のニーズに合致するものであり、その活用によって革新的がん免疫療法開発が加速することが期待される。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Horiuchi Yutaka, Nakamura Akihiro, Imai Takashi, Murakami Takashi	4. 巻 3
2. 論文標題 Infection of tumor cells with <i>Salmonella typhimurium</i> mimics immunogenic cell death and elicits tumor-specific immune responses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 484
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pnasnexus/pgad484	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yutaka Horiuchi, Yukie Ando, Sara Hatazawa, Takashi Murakami.
2. 発表標題 Salmonella infected-melanoma cells evoke T-lymphocyte responses against melanoma.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yutaka Horiuchi, Takashi Murakami.
2. 発表標題 Intra-cellular infection of tumor with Salmonella typhimurium primes tumor-antigen specific T-cell responses.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yutaka Horiuchi, Yukie Ando, Takashi Murakami.
2. 発表標題 Salmonella infected-melanoma cells elicit anti-melanoma T-cell responses.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀内大、中村彰宏、今井孝、村上孝
2. 発表標題 サルモネラ感染がん細胞による抗腫瘍免疫応答の誘導
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022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
研究分担者	村上 孝 (Murakami Takashi) (00326852)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	

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