

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20802

研究課題名（和文）膵がんにおける術前in situワクチン療法の開発

研究課題名（英文）Neoadjuvant in situ vaccination for pancreatic cancer

研究代表者

岡田 浩和（okada, hirokazu）

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：60911823

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝子改変膵がんモデルマウスから樹立した膵がん細胞株をナイーブマウスの皮下に同種移植し、生着した腫瘍をDay10に摘出し、これを膵がん術後モデルマウスとして用いる。術前K3-SPG-ISV群とControl群の膵がん術後モデルマウスを比較し、再発腫瘍の増殖の有無と生存期間を解析した。両群とも大半は再発なく生存し、生存期間に有意差を認めなかった。再発せず長期生存した膵がん術後モデルマウスの皮下に同じ膵がん細胞株を再移植すると、Control群では腫瘍が生着し増大したのに対し、術前ISV群では腫瘍が生着せず免疫記憶が成立していることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最難治がんの膵がんは根治切除後の再発率が高く、術後再発予防のための新規治療法の開発が急務である。術後にミクロレベルで残存する腫瘍細胞を排除するには、長期にわたり全身性の抗腫瘍効果が期待できるがん免疫療法が有望である。腫瘍に自然免疫賦活剤を直接注入するin situワクチン療法（ISV: In Situ Vaccine）は腫瘍自身をワクチン抗原のソースとして利用し、局所療法で副作用を抑えつつ全身性の抗腫瘍免疫を誘導できるという利点を有する。本研究は、膵がんモデルマウスで摘出前の腫瘍に新規TLR9リガンドK3-SPGの術前ISVを施行し、術後の再発抑制効果について明らかにする。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic cancer cell lines established from genetically modified pancreatic cancer model mice were allografted subcutaneously into naive mice, and the engrafted tumors were removed on day 10 and used as pancreatic cancer postoperative model mice. I compared the preoperative K3-SPG-ISV group and the control group of pancreatic cancer model mice after surgery, and analyzed the recurrent tumor growth and the survival period. Most of the mice in both groups survived without recurrence, and there was no significant difference in survival time. After the same pancreatic cancer cell line was re-implanted subcutaneously in postoperative pancreatic cancer model mice that survived for a long time without recurrence, the tumors engrafted and increased in the control group, whereas the tumors did not engraft in the neoadjuvant ISV group. It was inferred that immunological memory was established.

研究分野：医学

キーワード：腫瘍学 免疫学

1. 研究開始当初の背景

(1) 最も予後不良な疾患のひとつである膵がんに対する唯一の根治療法は手術である。近年、術前後の補助療法が進歩したが、根治切除例でも多くの症例で再発を認め、切除例の5年生存率は25%前後と低い。そのため、術後再発を予防する新規治療法の開発がのぞまれる(Ann Gastroenterol Surg. 2:274-281, 2018)。術後にミクロレベルで残存する腫瘍細胞を排除するには、長期にわたり全身性の抗腫瘍効果が期待できるがん免疫療法が有望であるが、膵がんに対する術前免疫療法は有効性がいまだ確立されていない。

(2) 腫瘍に自然免疫賦活剤を直接注入する in situ ワクチン療法 (ISV: In Situ Vaccine) は、腫瘍自身がワクチン抗原の供給源となり、煩雑ながん抗原の同定作業を経ずに個別化がんワクチンが達成できる、局所療法で副作用を最小限に抑えつつ全身性の免疫を誘導できる、などの利点があり、術前療法との親和性が高いと考えられるが、先行研究は少なくその有用性は明らかでない。新規 TLR9 リガンド K3-SPG は、既存の TLR9 リガンドでは両立しえなかった「抗腫瘍免疫に重要なサイトカインである 型 IFN の高い誘導能」と「臨床応用可能な安定性」の両者を備える(Proc Natl Acad Sci U S A. 111: 3086-91, 2014)。申請者はこれまでに、K3-SPG を用いた ISV を膵がんモデルマウスで試み、従来型リガンドや経静脈投与に比べてより強い抗腫瘍効果を認めること、局所療法ながら遠隔病巣にも抗腫瘍効果を認めること、治療で腫瘍が退縮したマウスには膵がん特異的な免疫記憶が成立していること等を明らかにした。

2. 研究の目的

臨床的視点では、ISV の研究は治療目的に腫瘍退縮を目指すことを前提とするものであったが、摘出前の腫瘍に ISV を施行すれば、術後に有効に機能するがん免疫を誘導でき、再発予防に役立つのではと着想した。また膵がんは診断目的に腫瘍の直接穿刺が汎用手技として行われており、膵がん患者の摘出前の腫瘍に ISV を行い、抗腫瘍免疫を誘導した後に腫瘍を切除すれば、全身性の抗腫瘍免疫・免疫記憶によって術後再発が抑制されると予測される。現在 ISV は、様々な悪性疾患を対象に腫瘍退縮を目的とした臨床試験が進行中であるが、術前療法としての試みはほとんどなくその有用性は明らかでない。以上より、本研究の目的は、摘出前の腫瘍に K3-SPG-ISV を施行した膵がん術後モデルマウスを用いて、術前 ISV により術後の再発が抑制されるかを明らかにする。(図1)

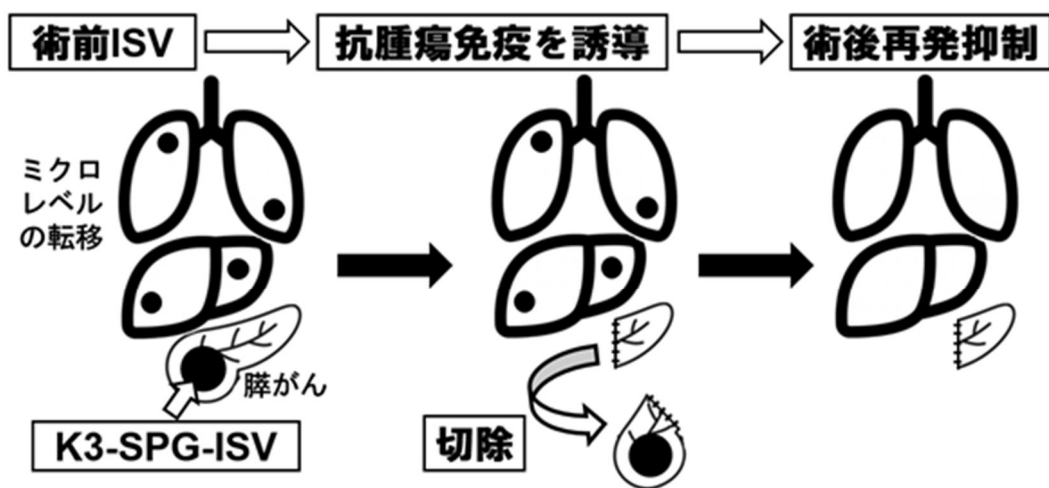


図1. 研究概略図; 術前K3-SPG-ISVは術後再発を抑制する

3. 研究の方法

遺伝子改変膵がんモデルマウス(KPC: LSL-KrasG12D/+, Trp53R172H/+, Pdx1-Cre)から樹立した膵がん細胞株 2×10^6 cells を6~8週齢のナイーブマウス C57BL6 の皮下に同種移植し、生着した腫瘍を Day10 に摘出し(本モデルでは約 200mm³ に相当)、これを膵がん術後モデルマウスとして以下の実験に用いる。

(1) 皮下腫瘍の外科切除法を確立し、膵がん術後モデルマウスを作成する。

(2) 術前 K3-SPG ISV 群と Control 群 (PBS 投与) の膵がん術後モデルマウスを比較し、再発腫瘍の増殖の有無や生存期間を解析する。

(3) 膀胱がん術後モデルマウスの皮下に同じ膀胱がん細胞株を再移植し、ISVの有無による免疫記憶成立の違いを確認する。

(4) 術前 K3-SPG ISV 群と Control 群の摘出した腫瘍を Flow cytometry 解析し、ISV 後の免疫状態を細胞レベルで明らかにする。

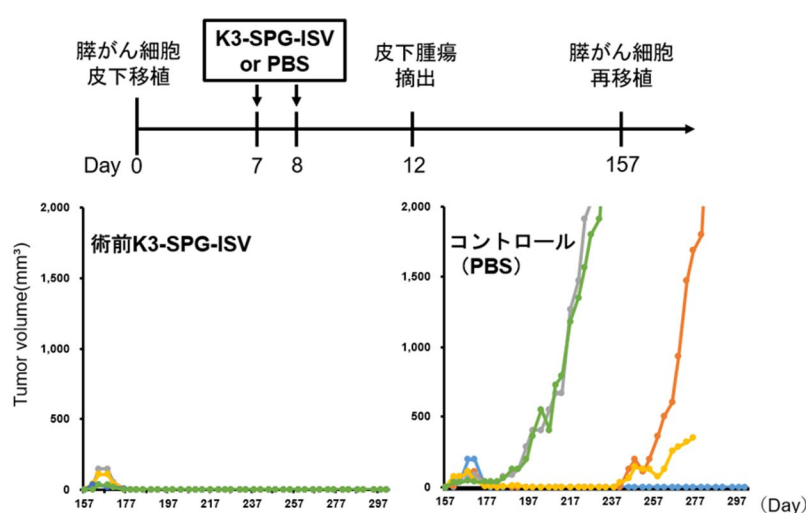
(5) 術前 K3-SPG ISV 群と Control 群の摘出した腫瘍を RNA-seq 解析を行い、ISV 後の免疫状態をトランスクリプトームレベルで明らかにする。

4. 研究成果

(1) 皮下腫瘍の外科切除法を確立し、膀胱がん術後モデルマウスを作成した。

(2) 術前 K3-SPG-ISV 群と Control 群の膀胱がん術後モデルマウスを比較し、再発腫瘍の増殖の有無と生存期間を解析した。N=6 で実験し、術後 73 日目～112 日目に局所再発により 1～2 匹ずつ死亡したが、両群とも大半は再発なく生存し、生存期間に有意差を認めなかった。

(3) 再発せず長期生存した膀胱がん術後モデルマウスの皮下に同じ膀胱がん細胞株を再移植し、



膀胱がん細胞株の皮下移植マウスに、7, 8日目にK3-SPGを腫瘍内局注し、12日目に腫瘍を摘出した。157日目に同じ膀胱がん細胞株を皮下に再移植すると、すべてのマウスで生着しなかった(左パネル、N=4)。PBSの腫瘍内局注をコントロールとし、同様の再移植で5匹中4匹は腫瘍が生着し増大した(右パネル)。

図2. 術前K3-SPG-ISVは免疫記憶を誘導する

ISVの有無による免疫記憶成立の違いを確認した。Control 群では腫瘍が生着し増大したのに対し、術前K3-SPG-ISV 群ではすべてのマウスで腫瘍が生着せず免疫記憶が成立していることが推察された。(図2)

(4) 術前 K3-SPG-ISV 群と Control 群の摘出した腫瘍について、Flow cytometry を行った。腫瘍内の CD45+ MHC+ CD11c+ CD86+ CD8a+ の Cross-presenting DC (樹状細胞) について解析を行ったところ、K3-SPG-ISV によって腫瘍内の Cross-presenting DC が増加することがわかった。

(5) 術前 K3-SPG ISV 群と Control 群の摘出した腫瘍を RNA-seq 解析を行ったところ、IFN 関連遺伝子の誘導を認めた。

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 Okada Hirokazu, Takahashi Ken, Yaku Hiroaki, Kobiyama Kouji, Iwaisako Keiko, Zhao Xiangdong, Shiokawa Masahiro, Uza Norimitsu, Kodama Yuzo, Ishii Ken J., Seno Hiroshi	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 2132
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 -

〔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
---------	---------