



An oral cancer vaccine using Bifidobacterium vector augments combination of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 antibodies in mouse renal cell carcinoma model

植木, 秀登

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8780号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490005>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



課程博士関係

学位論文の内容要旨

An oral cancer vaccine using Bifidobacterium vector augments combination of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 antibodies in mouse renal cell carcinoma model

ビフィズス菌ベクターを用いた経口がんワクチンは、マウス腎細胞がんモデルにおいて抗 PD-1 抗体と抗 CTLA-4 抗体の併用療法の抗腫瘍効果を増強する

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻 溝渕知司 教授)

植木秀登

近年、抗 PD-1 抗体であるニボルマブと抗 CTLA-4 抗体であるピリムマブなどに代表される免疫チェックポイント阻害薬（ICI）をベースとした併用療法が、転移性または切除不能な腎細胞癌（RCC）に対する主要な治療選択肢となっている。しかし、これらの免疫療法の奏効率は 30～40%にとどまり、未だに多くの患者が奏功を得られていないのが現状である。そのため、癌免疫療法のポテンシャルを最大限発揮するために、腫瘍抗原を効率的に樹状細胞に提示したり、腫瘍浸潤リンパ球を増加させたりできる併用療法の開発が課題であった。

ICI を含めた癌免疫療法の根本原理は腫瘍特異的細胞性免疫の誘導にあり、これまでも腫瘍免疫を人工的に誘導でき、かつ ICI と併用できるがんワクチンについての研究が行われてきた。米国 National Cancer Institute はワクチンのターゲットとしての腫瘍関連抗原（Tumor associated antigen: TAA）を治療効果、免疫原性、がん原生、特異度、発現量と陽性細胞率などのクライテリアからランキングを実施し、本ランキングにおいて Wilms' tumor (WT) 1 タンパクが「がんワクチン療法で応用が期待される抗原ランキング」で第一位となった。WT1 遺伝子は、白血病、乳癌、小児腎臓腫瘍（ウィルムス腫瘍）など様々な腫瘍で過剰発現していることが報告されており、WT1 タンパクが腎癌や膀胱癌を含めた泌尿器科悪性腫瘍においても発癌性の役割を果たしていることが示唆されてい

る。過去の研究により WT1 特異的 T 細胞は WT1 陽性腫瘍細胞を攻撃することが明らかにされており、WT1 をがんワクチンとして使用することで TAA 特異的な抗腫瘍効果を増強することが期待されている。我々は過去に腸管免疫系へのデリバリーシステムとしてビフィズス菌 (*Bifidobacterium longum*) をベクターとした経口ワクチンプラットフォームを開発し、WT1 タンパクを表層発現する組換えビフィズス菌を用いた経口がんワクチン (*B. longum* 420) を作製した。*B. longum* 420 がマウスの膀胱癌や前立腺癌モデルにおいて強力な細胞性免疫を誘導することは既に示されているが、腎細胞癌においても抗腫瘍効果の増強作用を発揮するかは明らかではない。以上のことから、本研究では、マウス腎細胞癌モデルに対して *B. longum* 420 が免疫誘導効果によって抗腫瘍効果を発揮するか、また、抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体の抗腫瘍効果を増強するかを明らかにすることを目的とした。

まず初めに、*B. longum* 420 の接種により誘導される WT1 特異的 T 細胞の有無を調べるため、マイトマイシン C 処理した腎癌腫瘍細胞 (Renca) で刺激した脾臓細胞の細胞内サイトカイン染色を行った。*B. longum* 420 投与マウス群では、WT1 特異的にインターフェロン (IFN) - γ を産生する CD4⁺T 細胞の頻度が、PBS 群に比べて有意に高かった ($p<0.05$)。また、TNF- α を産生する CD4⁺T

細胞および CD8+T 細胞の頻度も、*B. longum* 420 投与マウス群が他の群より有意に高く ($p<0.05$ 、 $p<0.01$)、*B. longum* 420 の投与により WT1 特異的 T 細胞が産生されていることが示された。

次の実験では、抗 PD-1 抗体に *B. longum* 420 を併用して Renca 細胞に対する抗腫瘍効果を評価した。併用療法群の平均腫瘍体積は 21 日目に PBS 群と比較して有意に抑制され ($p<0.05$)、平均生存期間は、PBS 群で 25.6 ± 5.8 、*B. longum* 420 で 36.6 ± 5.7 日、抗 PD-1 抗体単独で 43.4 ± 5.3 日であった。*B. longum* 420 と抗 PD-1 抗体の併用群の生存曲線は、他の治療群と比較して 71.2 ± 29.9 日と有意な延長を示した ($p<0.05$)。次に、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を調べるために、治療後に別のマウス治療群から腫瘍組織を採取した。CD4+および CD8+ T 細胞の免疫組織化学的染色では、併用療法を行ったマウスでは、他の群と比較して腫瘍組織に浸潤する CD4+および CD8+ T 細胞の数が著しく増加した。また、腫瘍組織から単離した T 細胞のフローサイトメトリー解析から、*B. longum* 420 と抗 PD-1 抗体の併用投与は、腫瘍浸潤 CD8+および CD107a+CD8+ T 細胞を増加させた (それぞれ $p = 0.734$ 、 0.257)。次に、抗 PD-1 抗体と抗 CTLA-4 抗体に *B. longum* 420 を併用して抗腫瘍効果を評価した。併用療法群は、21 日目において PBS 投与群と比較して有意に腫瘍増殖が抑制された ($p<0.05$)。また、*B. longum* 420 と抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体の併用群の生存曲線は、

他の治療群と比較して 78.7 ± 14.5 日の有意な延長を示した ($p < 0.05$)。CD4+ および CD8+ T 細胞の免疫組織化学染色では、*B. longum* 420 と抗 PD-1 抗体 および抗 CTLA-4 抗体の併用で治療したマウスでは、他の治療群と比較して、腫瘍組織に浸潤する CD4+ および CD8+ T 細胞の数が著しく増加した。また、興味深いことに、抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体単独投与群では、他の投与群と比較して Foxp3+ T 細胞が増加する傾向にあった。この結果は、ICI 抵抗性腫瘍で制御性 T 細胞が増加するという過去の報告に矛盾しない結果であった。フローサイトメトリーでは、*B. longum* 420、抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体の組み合わせでは、腫瘍浸潤 CD8+ および CD107a+CD8+ T 細胞の数が最も多く（それぞれ $p = 0.271$ 、 0.304 ）、抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体単独群では、CD4+ T 細胞の数が全治療群の中で最も多かった ($p = 0.285$)。これらの結果から、マウス腎癌モデルにおいて、*B. longum* 420 の経口投与は腫瘍内への CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞の浸潤を促し、抗 PD-1 抗体あるいは抗 PD-1 抗体と抗 CTLA-4 抗体の併用療法による抗腫瘍効果の増強作用を発揮していることが示唆された。

また、本研究におけるもう一つの興味深い知見は、*B. longum* 420 の経口投与による腸内細菌叢の変化である。ICI と *B. longum* 420 を投与すると、糞便中の乳酸桿菌科の割合が変化した。各群のマウスは 1 匹ずつしか分析されていないの

で、結果の解釈には注意が必要であるが、ICI と *B. longum* を含むプロバイオティクスの投与前後で腸内細菌叢を比較した研究はこれまでなかったため、重要な知見であった。詳細な作用機序は不明であるが、*B. longum* 420 によるマイクロバイオーームの変化が ICI の有効性を高めている可能性があるため、今後は *B. longum* 420 の経口投与による腸管免疫誘導だけでなく、腸内細菌叢の変化にも着目して追加実験を行っていく必要があるだろう。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲第 3351 号	氏 名	植木 秀登
論 文 題 目 Title of Dissertation	An oral cancer vaccine using Bifidobacterium vector augments combination of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 antibodies in mouse renal cell carcinoma model ビフィズス菌ベクターを用いた経口がんワクチンは、マウス腎細胞がんモデルにおいて抗 PD-1 抗体と抗 CTLA-4 抗体の併用療法の抗腫瘍効果を増強する		
審 査 委 員 Examiner	主 査 眞 庭 謙 昌 Chief Examiner 副 査 寺 井 義 人 Vice-examiner 副 査 児 玉 裕 三 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

近年、抗 PD-1 抗体であるニボルマブと抗 CTLA-4 抗体であるピリムマブなどに代表される免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) をベースとした併用療法が、転移性または切除不能な腎細胞癌 (RCC) に対する主要な治療選択肢となっている。しかし、これらの免疫療法の奏効率は 30~40%にとどまり、未だに多くの患者が奏功を得られていないのが現状である。そのため、癌免疫療法のポテンシャルを最大限発揮するために、腫瘍抗原を効率的に樹状細胞に提示したり、腫瘍浸潤リンパ球を増加させたりできる併用療法の開発が課題であった。ICI を含めた癌免疫療法の根本原理は腫瘍特異的細胞性免疫の誘導にあり、これまでも腫瘍免疫を人工的に誘導でき、かつ ICI と併用できるがんワクチンについての研究が行われてきた。米国 National Cancer Institute はワクチンのターゲットとしての腫瘍関連抗原 (Tumor associated antigen: TAA) を治療効果、免疫原性、がん原生、特異度、発現量と陽性細胞率などのクライテリアからランキングを実施し、本ランキングにおいて Wilms' tumor (WT) 1 タンパクが「がんワクチン療法で応用が期待される抗原ランキング」で第一位となった。WT1 遺伝子は、白血病、乳癌、小児腎臓腫瘍 (ウィルムス腫瘍) など様々な腫瘍で過剰発現していることが報告されており、WT1 タンパクが腎癌や膀胱癌を含めた泌尿器科悪性腫瘍においても発癌性の役割を果たしていることが示唆されている。過去の研究により WT1 特異的 T 細胞は WT1 陽性腫瘍細胞を攻撃することが明らかにされており、WT1 をがんワクチンとして使用することで TAA 特異的な抗腫瘍効果を増強することが期待されている。過去に腸管免疫系へのデリバリーシステムとしてビフィズス菌 (*Bifidobacterium longum*) をベクターとした経口ワクチンプラットフォームを開発し、WT1 タンパクを表層発現する組換えビフィズス菌を用いた経口がんワクチン (*B. longum* 420) を作製され、*B. longum* 420 がマウスの膀胱癌や前立腺癌モデルにおいて強力な細胞性免疫を誘導することは既に示されているが、腎細胞癌においても抗腫瘍効果の増強作用を発揮するかは明らかではない。以上のことから、本研究では、マウス腎細胞癌モデルに対して *B. longum* 420 が免疫誘導効果によって抗腫瘍効果を発揮するか、また、抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体の抗腫瘍効果を増強するかを明らかにすることを目的とした。

はじめに、*B. longum* 420 の接種により誘導される WT1 特異的 T 細胞の有無を調べるため、マイトマイシン C 処理した腎癌腫瘍細胞 (Renca) で刺激した脾臓細胞の細胞内サイトカイン染色を行った。*B. longum* 420 投与マウス群では、WT1 特異的にインターフェロン (IFN) $\cdot \gamma$ を産生する CD4+T 細胞の頻度が、PBS 群に比べて有意に高かった ($p < 0.05$)。また、TNF- α を産生する CD4+T 細胞および CD8+T 細胞の頻度も、*B. longum* 420 投与マウス群が他の群より有意に高く ($p < 0.05$, $p < 0.01$)、*B. longum* 420 の投与により WT1 特異的 T 細胞が産生されていることが示された。

次の実験では、抗 PD-1 抗体に *B. longum* 420 を併用して Renca 細胞に対する抗腫瘍効果を評価した。併用療法群の平均腫瘍体積は 21 日目に PBS 群と比較して有意に抑制され ($p < 0.05$)、平均生存期間は、PBS 群で 25.6 ± 5.8 、*B. longum* 420 で 36.6 ± 5.7 日、抗 PD-1 抗体単独で 43.4 ± 5.3 日であった。*B. longum* 420 と抗 PD-1 抗体の併用群の生存曲線は、他の治療群と比較して 71.2 ± 29.9 日と有意な延長を示した ($p < 0.05$)。次に、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を調べるために、治療後に別のマウス治療群から腫瘍組織を採取した。CD4+および CD8+ T 細胞の免疫組織化学的染色では、併用療法を行ったマウスでは、他の群と比較して腫瘍組織に浸潤する CD4+および CD8+ T 細胞の数が著しく

増加した。また、腫瘍組織から単離した T 細胞のフローサイトメトリー解析から、*B. longum* 420 と抗 PD-1 抗体の併用投与は、腫瘍浸潤 CD8+ および CD107a+CD8+ T 細胞を増加させた（それぞれ $p = 0.734, 0.257$ ）。次に、抗 PD-1 抗体と抗 CTLA-4 抗体に *B. longum* 420 を併用して抗腫瘍効果を評価した。併用療法群は、21 日目において PBS 投与群と比較して有意に腫瘍増殖が抑制された（ $p < 0.05$ ）。また、*B. longum* 420 と抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体の併用群の生存曲線は、他の治療群と比較して 78.7 ± 14.5 日の有意な延長を示した（ $p < 0.05$ ）。CD4+ および CD8+ T 細胞の免疫組織化学染色では、*B. longum* 420 と抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体の併用で治療したマウスでは、他の治療群と比較して、腫瘍組織に浸潤する CD4+ および CD8+ T 細胞の数が著しく増加した。また、興味深いことに、抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体単独投与群では、他の投与群と比較して Foxp3+ T 細胞が増加する傾向にあった。この結果は、ICI 抵抗性腫瘍で制御性 T 細胞が増加するという過去の報告に矛盾しない結果であった。フローサイトメトリーでは、*B. longum* 420、抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体の組み合わせでは、腫瘍浸潤 CD8+ および CD107a+CD8+ T 細胞の数が最も多く（それぞれ $p = 0.271, 0.304$ ）、抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体単独群では、CD4+ T 細胞の数が全治療群の中で最も多かった（ $p = 0.285$ ）。これらの結果から、マウス腎癌モデルにおいて、*B. longum* 420 の経口投与は腫瘍内への CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞の浸潤を促し、抗 PD-1 抗体あるいは抗 PD-1 抗体と抗 CTLA-4 抗体の併用療法による抗腫瘍効果の増強作用を発揮していることが示唆された。また、本研究におけるもう一つの興味深い知見は、*B. longum* 420 の経口投与による腸内細菌叢の変化である。ICI と *B. longum* 420 を投与すると、糞便中の乳酸桿菌科の割合が変化した。

本研究は、WT1 タンパクを表面発現する組換えビフィズス菌を用いた経口がんワクチンの免疫誘導効果によって、マウス腎細胞癌モデルに対して抗腫瘍効果を発揮するかを検討した研究であるが、抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体の抗腫瘍効果の増強を明らかにした価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。