



Vaccine based on dendritic cells electroporated with an exogenous ovalbumin protein and pulsed with invariant natural killer T cell ligands effectively induces antigen-specific antitumor...

渡部, 晃大

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2022-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8307号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008307>

※ 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。



学位論文の内容要旨

Vaccine based on dendritic cells electroporated with an exogenous ovalbumin protein and pulsed with invariant natural killer T cell ligands effectively induces antigen-specific antitumor immunity

樹状細胞に OVA タンパクを電気穿孔法で導入し、iNKT 細胞リガンドを付加したワクチンは、抗原特異的な抗腫瘍免疫を効果的に誘導する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
食道胃腸外科学
(指導教員: 掛地 吉弘 教授)

渡部 晃大

はじめに

PD-1 阻害をはじめとした、がん免疫療法の進歩はめざましい。がん免疫療法でより良い治療効果を得るためにには、腫瘍特異的細胞傷害性 CD8⁺ T 細胞 (CTL) が最も重要な要素であり、ワクチンは、腫瘍特異的 CTL を誘導する最も一般的な方法である。腫瘍抗原情報を宿主に提供するために、腫瘍組織のほか、腫瘍に関連するタンパク質、ペプチド、核酸情報などの方法が用いられている。特に、核酸ワクチンは、生体内で効率よく宿主に抗原タンパクを発現させることができ、強い免疫反応が得られる。しかし、核酸ワクチンは特定の抗原情報を必要とするため、必ずしも腫瘍ワクチンとして適しているとは言えない。ネオアンチゲン (腫瘍細胞の遺伝子変異の産物) は、腫瘍ワクチンの分野で、理想的な標的抗原と考えられている。しかし、ネオアンチゲンの遺伝情報を特定するためには多大な労力と時間、費用が必要である。そこで、標的抗原を特定することなく腫瘍溶解液を利用できるタンパクベースのワクチンが優位性を持っていると考える。

ワクチン接種では、通常、宿主の抗原特異的 CD8⁺ T 細胞を活性化し、その後、メモリー CD8⁺ T 細胞を誘導する。このプロセスにおいて、CD8⁺ T 細胞がクローニング拡大と長期生存を達成するためには、樹状細胞 (DC) などの抗原提示細胞 (APC) による外来抗原の交差提示とヘルパー CD4⁺ T 細胞による免疫学的サポートが必要である。最近の研究で、invariant Natural Killer T 細胞 (iNKT 細胞) がこのプロセスを強化することが示されている。iNKT 細胞は T 細胞受容体 (TCR) 固有のレパートアを持ち、マウスでは TCR α 鎮が iNKT 細胞特異的 TCR β 鎮と対になっている。その結果、APC 上に発現する MHC 様分子である CD1d に結合した α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) のような脂質抗原を特異的に認識することができる。 α -GalCer が抗原と共に生体内に投与されると、iNKT 細胞は CD8 α ⁺ DC と相互作用する。そして、これらの DC は、CD4⁺ ヘルパー T 細胞とは異なるメカニズムで、抗原を cross priming し、ナイーブ CD8⁺ T 細胞をリクルートし、抗原特異的 CD8⁺ T 細胞応答を増強する。この概念に基づき、 α -GalCer と腫瘍抗原を共存させたがん免疫療法戦略が提唱されている。

マクロファージ、B 細胞、DC など、抗原特異的免疫反応を活性化する APC の中で、DC は最も強力である。 α -GalCer を付加した CD1d 発現 DC の投与は、 α -GalCer だけの投与と比較して腫瘍の成長および転移を抑制し、生存期間を延長することが知られている。 α -GalCer の複数回投与や B 細胞による α -GalCer の提示は、NKT 細胞アナジー (不応) を引き起こし、PD-1 の発現を増加させ、TNF、IL-2、IFN- γ などの抗腫瘍関連サイトカインの産生を減少させる。一方、DC が α -GalCer のような糖脂質を提示すると、iNKT 細胞を Th1 表現型に強く偏らせる共刺激シグナルを提示する。 α -GalCer を付加した DC を投与すると、iNKT 細胞が活性化され、IFN- γ 産生が誘導される。 α -GalCer-CD1d 複合体を発現する DC が強い免疫応答を誘導する可能性がある。

そこで、外来性タンパクを抗原とし、 α -GalCer を DC に付加することで、iNKT 細胞誘導ワクチンとして作用する可能性があると考え、我々は、オボアルブミン (OVA) 全タンパク質をモデル抗原として使用した。マウス骨髄から誘導した未成熟樹状細胞 (imDC) に OVA

をエレクトロポレーション（電気穿孔法、EP 法）で導入した後、 α -GalCer の付加と、リポポリサッカライド（LPS）による成熟を行う OVA-EP-galDC システムを構築し、有効性を評価した。

結果

マウス骨髓由来 imDC に OVA タンパクを EP した。imDC と非蛍光標識 OVA を EP した imDC は、顕微鏡的に蛍光シグナルを示さなかった一方、蛍光標識 OVA と共に培養した imDC と蛍光標識 OVA を電気穿孔した imDC では、蛍光シグナルを認めた（Figure 1A）。imDC の蛍光シグナルをフローサイトメトリーで定量化すると、蛍光標識 OVA を電気穿孔した imDC は、蛍光標識 OVA で共培養した imDC よりも高いシグナルを示した（Figure 1B）。

EP は一定の細胞死を引き起こすため、生存率を確認した。EP 法を受けた imDC の生存率は、pure な imDC よりも低かったが、OVA と共に培養した imDC と比較して有意差は認めなかった（Figure 1C）。

次に、OT-1 トランシスジェニックマウスを用いて、OVA を EP した DC（OVA-EP-DC）が抗原特異的 CD8⁺ T 細胞応答を引き起こすかを評価した。OVA-EP-DC は、pure な DC と比較して、OT-1 CD8⁺ T 細胞の増殖を促進した（Figure 1D）。抗原タンパクを EP した DC が、抗原特異的 CD8⁺ T 細胞を効率的に刺激した。

マウスを OVA-EP-galDC 等で免疫し、その後、腫瘍抗原として OVA を発現する EG7 細胞株を皮下接種した（Figure 2A）。OVA-EP-galDC は、腫瘍の成長を有意に抑制した。次に、CD8⁺ T 細胞および NK 細胞が腫瘍増殖抑制に及ぼす直接的な影響を評価するために、モノクローナル抗体を用いてこれらの細胞型のそれぞれを枯渇させた（Figure 2B）。CD8⁺ T 細胞の枯渇は、OVA-EP-galDC の抗腫瘍効果を消失させた（Figure 2B、青線）。NK 細胞の枯渇は、腫瘍の成長をある程度抑えたが、完全な拒絶は達成しなかった（Figure 2B、黒点線）。OVA-EP-galDC は、主に CD8⁺ T 細胞に依存する形で、皮下腫瘍の完全拒絶を得たと示唆される。

次に宿主の iNKT 細胞、NK 細胞、DC、T 細胞の活性化を評価した。OVA-EP-galDC 等で免疫した 4 日後のマウス脾臓細胞をフローサイトメトリーで調べた（Figure 3A）。galDC または OVA-EP-galDC での免疫は、iNKT 細胞および NK 細胞の頻度と絶対数が有意に増加した（Figure 3B、Figure S1A）。次に、OVA-EP-galDC が宿主の内在性 DC を活性化させるかを確認した。galDC または OVA-EP-galDC の投与は、CD86⁺ 活性化 DC、ならびに CD40⁺ および CD80⁺ 活性化 DC の数を有意に増加させた（Figure 3C, S1D）。 α -GalCer を付加した DC で免疫された宿主の iNKT 細胞、NK 細胞、および内在性 DC が効率的に活性化されることが示された。

内在性 DC が活性化されると、CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞と相互作用し、CD8⁺ T 細胞は直接的な抗腫瘍活性を引き出す。そこで、免疫 7 日後の脾臓における抗原特異的 CD8⁺ T 細胞の状態を評価した（Figure 3D）。galDC と OVA-EP-galDC は、脾臓細胞の絶対数を有意に増

加させ、OVA-tetramer⁺ CD8⁺ T 細胞の割合と絶対数も増加した。OVA-EP-galDC が脾臓の iNKT 細胞、NK 細胞、および DC を効果的に誘導した。

OVA-EP-galDC 単独では抗原特異的 CD8⁺ T 細胞応答が明確に観察されなかつたため（Figure 3D,E）、CD45.2⁺ OT-1 マウス系を用いて抗原特異的 T 細胞が活性化されるかを確認した。OT-1 CD45.2⁺ CD8⁺ T 細胞を CD45.1⁺ コンジェニックマウスに移植した翌日に、OVA-EP-galDC 等で免疫を行った（Figure 4A）。OVA-EP-galDC は、他と比較して OVA 特異的 OT-1 CD8⁺ T 細胞の割合と絶対数を有意に増加させた（Figure 4B）。また、CD8⁺ CD44⁺ CD62L⁻ KLRG1⁻ CD127⁺ 記憶前駆 T 細胞についても、OVA-EP-galDC は割合と絶対数を有意に増加させた（Figure 4C）。OT-1 CD8⁺ T 細胞を移入すると、OVA-EP-galDC は脾臓内 OVA 特異的 CD8⁺ T 細胞を効果的に活性化した。

OVA-EP-galDC による記憶前駆細胞の誘導が確認されたので、OT-1 移入マウスを用いて、メモリー CD8⁺ T 細胞の誘導に焦点を当てた（Figure 5A）。免疫 50 日後にマウス脾臓での OVA-tetramer 陽性 OT-1 由来 CD45.2⁺ CD8⁺ T 細胞を評価すると、OVA-EP-galDC が最も効率的に誘導していた（Figure 5B）。脾細胞由来 CD8⁺ T 細胞に OVA 刺激を加え、IFN- γ 産生を ELISPOT で確認すると、OVA-EP-galDC 投与群における IFN- γ 産生が最も効率的に促進された（Figure 5C）。OVA-EP-galDC が脾臓において OVA 特異的な記憶 T 細胞を効率的に誘導した。

皮膚の Tissue resident memory T 細胞（TRM 細胞）が皮下腫瘍の拒絶反応に重要な役割を果たすことが知られている。OVA-EP-galDC は皮下腫瘍を完全拒絶したので（Figure 2A, B）、皮膚における OVA 特異的 TRM 細胞を、OT-1 移入マウスを用いて探索した（Figure 6A）。免疫 14 日後において、OVA-EP-galDC は、非特異的 CD8⁺ T 細胞を誘導しなかつたが（Figure 6B）、OVA 特異的 OT-1 CD8⁺ T 細胞（OVA-tetramer⁺ CD45.2⁺ CD3⁺ CD8⁺ T 細胞）及び OT-1 由来の CD8⁺ TRM 細胞（OVA-tetramer⁺ CD45.2⁺ CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ CD103⁺ T 細胞）（Figure 6C, 6D）を誘導した。TRM 細胞の動態から見ても、OVA-EP-galDC が持続的な抗原特異的抗腫瘍免疫を効果的に誘導した。

考察

以上の結果から、OVA-EP-galDC は効率的な iNKT 細胞増強ワクチンであると考えられる。全長タンパク質抗原をワクチンに使用する利点は、患者由来の腫瘍組織の溶解物を使用できることである。一般に、腫瘍抗原の情報を特定することは困難である。しかし、生体内の腫瘍の成長を制御・抑制するためには、腫瘍抗原のマルチターゲッティングが不可欠である。我々の戦略は、腫瘍抗原の情報を特定することなく、広範な腫瘍抗原を標的とすることで、抗原特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導できる可能性がある。本システムを個別化抗腫瘍戦略とするために、現在、腫瘍細胞溶解液を使用することを試みている。

今回、OVA-EP-galDC ワクチン単独では、OVA-tetramer⁺ CD8⁺ T 細胞を増加させなかつた（Figure 3E）。その理由として、我々は 2 つの要因を推測している。1 つは、我々の実験系では、OVA-tetramer で検出できない OVA 反応性 T 細胞を調べられていないことである。

T細胞受容体レパートア解析など、腫瘍反応性T細胞を網羅的に解析する手法が必要である。もう1つは、 α -GalCerのアジュバント効果が不十分であった可能性であり、より強力なアジュバント効果を持つiNKT細胞糖脂質リガンドの使用を検討する必要がある。

腫瘍増殖抑制のためには、腫瘍特異的CD8⁺T細胞の適切な活性化と維持が不可欠である。メモリーCD8⁺T細胞は、2つの主要な亜集団に分類される。一つは、末梢血中を循環するCentral memory T (T_{CM}) 細胞と、Effector memory T (T_{EM}) 細胞である。もう一つは、T_{RM}細胞で、皮膚、肺、肝臓、消化管などに常在する。T_{RM}細胞は、いったん局所抗原に遭遇すると、迅速に反応して抗原特異的な免疫防御を発揮する。さらに、腫瘍部位におけるT_{RM}細胞の存在は、担癌宿主の良好な予後と相關することが示されている。さらに、マラリア感染に対するペプチドベースのワクチンに α -GalCerを追加すると、肝臓におけるT_{RM}細胞の蓄積が促進され、より良い肝保護効果が得られるという報告があり、今回の結果の妥当性が支持された。抗腫瘍免疫にはT_{RM}細胞を強く誘導することが重要であり、我々のiNKT細胞増強ワクチンは、抗原特異的T_{RM}細胞を誘導できる適切な戦略である。

OVA-EP-galDCは皮下腫瘍の拒絶に成功したが、galDC単独では、腫瘍増殖にほとんど影響を与えるなかった (Figure 2A, 3C)。同様にNK細胞を活性化できているのも関わらず、このような結果となったのは、このモデルではNK細胞はほとんどエフェクター機能を発揮していないことが示唆された。このため、OVA-EP-galDCを含むgalDCワクチンシステムがNK細胞のエフェクター機能を誘導できるかどうかを詳細に評価し直す必要があった。NK細胞のエフェクター機能は、CD4⁺およびCD8⁺T細胞とは独立した転移性肺腫瘍の制御において重要であることが示されているため、我々は、マウス肺転移モデルでOVA-EP-galDCとgalDCが誘導するNK細胞のエフェクター機能を確認した (Figure S2)。その結果、galDCでもマウスの肺転移の成長を良好に抑制し、NK細胞の抗腫瘍エフェクター機能が示唆された。また、OVA-EP-galDCワクチン接種後にNK細胞を枯渇させると、治療効果が減弱した (Figure 2B)。これらの結果から、NK細胞は少なくとも抗原特異的CD8⁺T細胞のエフェクター機能において支持的、調節的な役割を担っていることが示唆された。

NK細胞は単独では皮下腫瘍などの成長を抑制するには不十分であるが、我々の系では免疫調節機能を発揮していることが示唆された。このような抗腫瘍免疫におけるiNKT/NK細胞の機能をより理解するためには、iNKT細胞、NK細胞、DC、T細胞の相互作用を評価し直す必要がある。

結語

樹状細胞にOVAタンパクを電気穿孔法で導入し、 α -GalCerを付加したワクチンは、抗原特異的な抗腫瘍免疫を長期間に渡って、効果的に誘導した。

神戸大学大学院医学(系)研究科(博士課程)

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|-------------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|
| 受付番号 | 甲第3158号 | 氏名 | 渡部 晃大 |
| 論文題目 Title of Dissertation | Vaccine based on dendritic cells electroporated with an exogenous ovalbumin protein and pulsed with invariant natural killer T cell ligands effectively induces antigen-specific antitumor immunity 樹状細胞にOVAタンパクを電気穿孔法で導入し、iNKT細胞リガンドを付加したワクチンは、抗原特異的な抗腫瘍免疫を効果的に誘導する | | |
| 審査委員 Examiner | 主査 Chief Examiner 福本 巧 | 副査 Vice-examiner 横山 美 | 副査 Vice-examiner 菊池 信 |

(要旨は1,000字~2,000字程度)

<背景>

がん免疫療法で、良好な治療効果を得るために、腫瘍特異的細胞傷害性 CD8⁺ T 細胞 (CTL) が最も重要であり、腫瘍ワクチンは CTL を誘導する治療法である。有効なワクチンは、抗原特異的 CD8⁺ T 細胞を活性化し、そのクローンを拡大させ、その後、メモリー CD8⁺ T 細胞として、長期生存させる。この過程には、樹状細胞 (DC) など、抗原提示細胞 (APC) による外来抗原の交差提示が必要である。invariant Natural Killer T 細胞 (iNKT 細胞) は、糖脂質 α -ガラクトシルセラミド (α -Gal) を、MHC 様分子 CD1d を介して認識し、活性化される。活性化した iNKT 細胞は宿主 DC を成熟化させ、相互作用し、抗原の交差提示を引き起こし、抗原特異的 CD8⁺ T 細胞応答を誘導する。この特性を利用した iNKT 細胞活性化ワクチンは、抗原情報を同時に投与すると、抗原特異的 CTL を誘導することが明らかとなっている。有効な iNKT 細胞活性化ワクチンとして、抗原情報に mRNA を使用した報告があるが、mRNA を使用するには、がん抗原情報の特定が必要となり、費用と時間がかかる。煩雑な標的抗原の同定プロセスを経ず、腫瘍溶解液の利用も検討できるタンパクベースのワクチンに優位性があると考える。本研究では、マウス骨髓由来樹状細胞 (DC) に卵白アルブミン (OVA) をエレクトロポレーション (電気穿孔、EP) 法で導入後、 α -Gal を付加し、成熟化させた OVA-EP-galDC ワクチンを開発し、有効性を検証した。

<結果>

1. EP 法により OVA を導入した樹状細胞 (OVA-EP-DC) は、iNKT 細胞活性化ワクチンに利用できる。

iNKT 細胞活性化ワクチンを作成するために、マウス DC に全長の卵白アルブミン (OVA) タンパク質を EP により導入した。蛍光標識された OVA を EP で導入した DC は、共培養した DC よりも、高輝度を示し、導入効率が良好であった。次に、EP により惹起される細胞死を評価したが、許容される範囲であった。また、EP で OVA を導入した DC (OVA-EP-DC) と、OVA 特異的な単一の T 細胞受容体をもつ OT-1 CD8⁺ T 細胞との共培養を *in vitro* で行うと、OT-1 CD8⁺ T 細胞の増殖を促進し、導入された OVA が機能していることが示された。故に、OVA-EP-DC は、iNKT 細胞活性化ワクチンに利用可能であった。

2. OVA-EP-galDC ワクチンは、腫瘍予防モデルで CD8⁺ T 細胞依存性に皮下腫瘍を拒絶した。

OVA-EP-DC に α -Gal を加えた、OVA-EP-galDC でマウスを免疫し、その後、OVA を発現する EG7 細胞株を皮下投与した。OVA-EP-galDC は、腫瘍を完全に拒絶した。また、CD8⁺ T 細胞の枯渇試験では、OVA-EP-galDC の抗腫瘍効果を減弱させた。OVA-EP-galDC 投与による抗腫瘍効果は、抗原特異性及び CD8⁺ T 細胞に依存することを示唆した。

3. OVA-EP-galDC ワクチンは、iNKT 細胞、NK 細胞、および DC の活性化を誘導した。

OVA-EP-galDC の免疫後 4 日の脾臓では、対照である galDC と同様に、iNKT 細胞、NK 細胞、及び活性化 DC を増加させた。また、免疫後 7 日 (エフェクター期) では、抗原特異的な CD8⁺ T 細胞の誘導において、OVA-EP-galDC 及び galDC では有意な差はなかった。

4. OVA-EP-galDC ワクチンは OT-1 CD8[±] T 細胞のクローン拡大と長期生存に効果を示した。

OVA-EP-galDC による抗原特異的 CD8⁺ T 細胞応答を、OT-1 CD8⁺ T 細胞を移植したマウスで再検証した。OVA-EP-galDC は、免疫後 7 日の OT-1 CD8⁺ T 細胞を有意に増加させた。また、免疫後 50 日 (メモリー期) でも、OVA-EP-galDC で免疫したマウスで、OT-1 CD8⁺ T 細胞の有意な増加を示した。脾臓 CD8⁺ T 細胞に OVA 抗原刺激を加えると、OVA-EP-galDC 投与群で IFN- γ 産生が亢進した。

5. OVA-EP-galDC は皮膚の組織常在型メモリー CD8[±] T 細胞を誘導した。

本研究の腫瘍予防モデルにおけるワクチンの効果を確認するため、皮膚に存在する抗原特異的 CD8⁺ T 細胞の検討を行った。同時に、強力な効果を発揮するとされる、組織常在型メモリー T 細胞 (T_{RM}) の検討も行った。免疫後 14 日に OVA-EP-galDC は、皮膚の OT-1 CD8⁺ T 細胞及び OT-1 T_{RM} 細胞を増加させた。

<総括>

OVA-EP-galDC による皮下腫瘍の拒絶は、皮膚の抗原特異的 CD8⁺ T 細胞がその主な役割を担っていることを明らかにした。最近の研究では、ウイルスワクチンで重要とされた T_{RM} 細胞が、抗腫瘍免疫応答でも重要な役割を示すことが明らかになってきた。本研究での T_{RM} 細胞の効果的な誘導は、ワクチンの有用性を示すのみならず、既に樹立した腫瘍に対する治療の有効性が期待される結果である。

全長タンパク抗原を使用するワクチン開発は、患者の腫瘍組織の細胞溶解液を将来的に使用することを目指したものである。最近の研究では、腫瘍細胞の遺伝子変異によって生成されたネオアンチゲンが有効な腫瘍抗原となることが報告されている。しかし、ネオアンチゲンの同定には費用と時間を要し、ワクチン作成上、大きな妨げとなる。腫瘍細胞溶解液を用いたワクチンは、ネオアンチゲン同定を省略するだけでなく、より広範な腫瘍抗原の標的化を可能とし、個別化戦略の一端を担う可能性がある。

本研究は、外来性全長タンパク抗原を EP で DC に導入し、 α -Gal を付加した iNKT 細胞活性化がんワクチンの効果についての研究で、抗原特異的 CD8⁺ T 細胞のクローン拡大、長期生存、及び T_{RM} 細胞の誘導を確認したもので、同様の報告は他にない。個別化がん医療に繋がる重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。

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。