

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16411

研究課題名(和文) CpGによる活性化T細胞エクソソームを介したがん悪性化制御作用及び分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of CpG-mediated suppression of malignant progression of tumors via activated T cell-released exosomes

研究代表者

百瀬 文康 (Momose, Fumiyasu)

三重大学・医学系研究科・産学官連携講座助教

研究者番号：20798326

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)：本研究では、CpGの腫瘍内投与が、CpGを投与した局所腫瘍に加え、CpG非投与部位の遠隔腫瘍に対しても抗腫瘍効果を示し、腫瘍微小環境中の腫瘍の浸潤や転移を促進するがん間質や腫瘍関連マクロファージ等の抗腫瘍免疫抑制に働く環境を改善し、がんの悪性化を抑えることを見出した。また、CpGはエクソソームの産生を促し、上記の作用はエクソソーム阻害剤により抑制され、CpGによる全身性の抗腫瘍効果やがん悪性化抑制作用にはエクソソームが関与している可能性を示した。さらにCpGとがん免疫療法を併用した治療法の探索では、CpGにがんワクチンやT細胞療法を併用すると抗腫瘍効果がさらに増強することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遠隔転移を伴うがんの生存率は、早期原発がんと比較して著しく低下する。そのため、現在がんの浸潤や転移を標的とした治療薬の早急な研究開発が社会的に求められている。本研究では、CpGの腫瘍内投与が、腫瘍の浸潤や転移等のがんの悪性化を促すがん間質組織や腫瘍関連マクロファージ等の腫瘍微小環境中の抗腫瘍免疫抑制環境を抑制することを明らかにし、エクソソームの産生を介して全身性の抗腫瘍効果を誘導する可能性を示した。本研究を基礎とした今後の進展によりさらに本機構について解明できれば、がん浸潤・転移阻害薬の創製やCpGと免疫療法を併用した複合的がん免疫療法の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, intratumoral administration of CpG showed anti-tumor effects not only on CpG-administered local tumors, but also on distant tumors at non-administered sites. We found that CpG improved the tumor microenvironment which promotes tumor invasion and metastasis, acts on anti-tumor immunosuppression, such as tumor stroma and tumor-associated macrophages, and suppressed malignant progression of tumors. In addition, CpG promoted the production of exosomes and above effects of CpG were inhibited by administration of exosome inhibitors. These results suggest exosomes were involved in systemic effects of CpG. Furthermore, the exploratory study of combination therapy of CpG and cancer immunotherapy showed the treatment of CpG with cancer vaccines and T cell therapy could exhibit more effective anti-tumor effects.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：CpG がん悪性化制御 T細胞 エクソソーム マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

遠隔転移を伴うがんの生存率は、早期の原発がんと比較して著しく低下する。そのため、現在がんの浸潤や転移を標的とした治療薬の早急な開発が社会的に求められている。近年、腫瘍微小環境中の間葉系幹細胞 (MSC) や腫瘍関連繊維芽細胞 (CAF) のがん間質細胞が、がん細胞の上皮間葉転換 (EMT) を促進し浸潤や転移等のがんの悪性化を促すことが明らかとなってきた。そのため、がん悪性化において、がん間質の制御が極めて重要な課題で、新しい標的創薬となることが期待されている。研究代表者らは以前にマウス活性化 CD8⁺T 細胞のエクソソームの機能解析を行い、エクソソームががん間質細胞を抑制し、がんの浸潤・転移を抑えることを見出した。さらに、最近、CpG ODN を腫瘍両側移植マウスの片側腫瘍に投与した結果、投与腫瘍に加え、投与局所以外の遠隔腫瘍のがん間質を抑制することを発見した。本作用はヌードマウスでは認められず、これらの結果より CpG の腫瘍内投与による全身性の抗腫瘍免疫応答や腫瘍微小環境中のがん悪性化抑制作用には活性化 T 細胞やエクソソームが関与している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、CpG の腫瘍内投与による全身性の抗腫瘍効果と腫瘍微小環境中のがん悪性化抑制作用について明らかにし理解を深める。さらに、本作用における T 細胞やそのエクソソームの関与について明らかにし、がん浸潤・転移阻害剤の創製に向けた臨床応用の基盤を構築する。

3. 研究の方法

本研究では、まず始めに CpG の腫瘍内投与による腫瘍局所や全身性の抗腫瘍効果を検証するため、繊維肉腫細胞株 CMS5a を BALB/c マウスの背部右側と左側の離れた 2ヶ所に皮下移植後、本マウスの右側の腫瘍のみに CpG を投与し、CpG を直接投与した腫瘍と反対側の投与していない遠隔腫瘍の両者に対する CpG の抗腫瘍効果について検討した。また、各々の腫瘍を摘出し、腫瘍微小環境中のがん間質や腫瘍関連マクロファージ (TAM)、活性化マクロファージや腫瘍浸潤細胞 (TIL) を免疫組織学的染色にて解析し、CpG の腫瘍微小環境への影響について検討した。

次に上記の効果におけるエクソソームの関与を検証するため、CMS5a 腫瘍両側移植 BALB/c マウスにエクソソーム阻害剤 GW4869 を投与し、CpG の抗腫瘍効果と腫瘍微小環境への影響について同方法にて検討した。また、同マウスの末梢血を採取し血漿を分離後、市販のエクソソーム分離キットを用いてエクソソームを単離し Nano cytometer や Flow cytometer で解析を行った。

さらにこれら *in vivo* で見出した知見について検証するため、BALB/c マウスより採取した脾臓細胞を抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体で初代培養した T 細胞や BALB/c マウス骨髄細胞に IL-4 や M-CSF を添加し分化誘導したマクロファージに IL-2 や CpG を添加し、マウス間葉系幹細胞 (MSC) と直接あるいは Transwell を用いて共培養する *in vitro* モデルを構築し、活性化 T 細胞や活性化マクロファージが MSC の増殖に及ぼす影響について、ギムザ染色を用いて検討した。

最後に CpG と免疫療法を併用した複合的がん免疫療法の探索では、上記の CMS5a 腫瘍移植 BALB/c マウスに CpG と共に CMS5a 腫瘍に発現する mERK2 ネオアンチゲンの CD8 エピトープを含むがんペプチドワクチンや同ネオアンチゲンを認識する TCR を有したトランスジェニックマウス由来の CD8⁺T 細胞を併用投与し、抗腫瘍効果の増強について検討した。

4. 研究成果

(1) CpG の腫瘍内投与による全身性抗腫瘍効果の検討

CpG の腫瘍内投与による全身性の抗腫瘍効果を検証するため、CMS5a 腫瘍両側皮下移植 BALB/c マウスの片側腫瘍 (右) に CpG を腫瘍内投与又は静脈内、腹腔内、皮下投与し、全身性の抗腫瘍効果について比較検討した。その結果、CpG の腫瘍内投与が、CpG 投与側腫瘍に加え、投与していない反対側腫瘍 (左) に対しても抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった (図 1)。本結果より、CpG の腫瘍内投与は、静脈内投与等の全身投与と同等又はそれ以上の全身性の抗腫瘍効果を有することが明らかとなった。

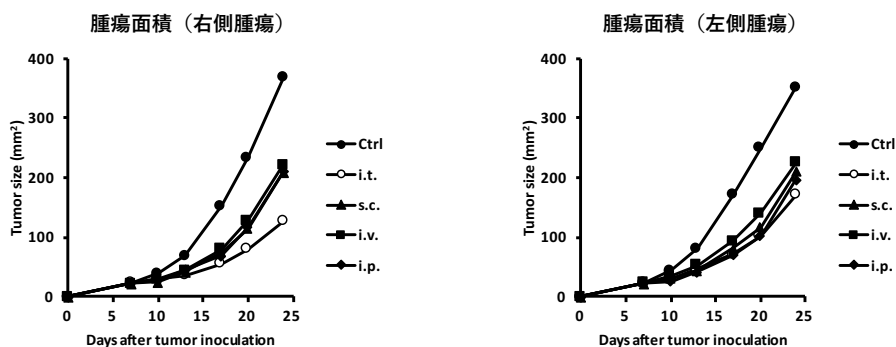


図 1. CpG の各投与方法による抗腫瘍効果

(2) CpG の腫瘍内投与による腫瘍微小環境への影響

次に CpG の腫瘍内投与が投与腫瘍及び非投与遠隔腫瘍中の腫瘍微小環境に及ぼす影響について検証するため、CMS5a 腫瘍両側移植 BALB/c マウスの片側腫瘍に CpG を腫瘍内投与後、各々の腫瘍を摘出し、腫瘍微小環境中のがんの浸潤・転移を促進するがん間質組織や腫瘍関連マクロファージ (TAM)、抗腫瘍免疫に働く活性化マクロファージや腫瘍浸潤 CD8⁺T 細胞を免疫組織学的染色にて解析した。その結果、CpG 投与群の CpG 投与腫瘍及び CpG 非投与腫瘍は、CpG 非投与群の腫瘍と比較して著しく小さく、がん間質組織の抑制が認められた (図 2A, B)。また、CpG 投与群の CpG 投与腫瘍では CD206⁺F4/80⁺M2 マクロファージの減少と MHC class II (IA/IE)⁺F4/80⁺の活性化 M1 マクロファージや CD8⁺T 細胞の顕著な増加が認められた (図 2B)。さらに、CpG 非投与腫瘍においても、CpG 投与腫瘍と比べ効果は弱いものの、同様の傾向が認められた。これらの結果より、CpG の腫瘍内投与は投与局所腫瘍や非投与遠隔腫瘍中の腫瘍微小環境中の抗腫瘍免疫抑制環境を著しく改善・解除し、がんの悪性化を抑制している可能性が示唆された。

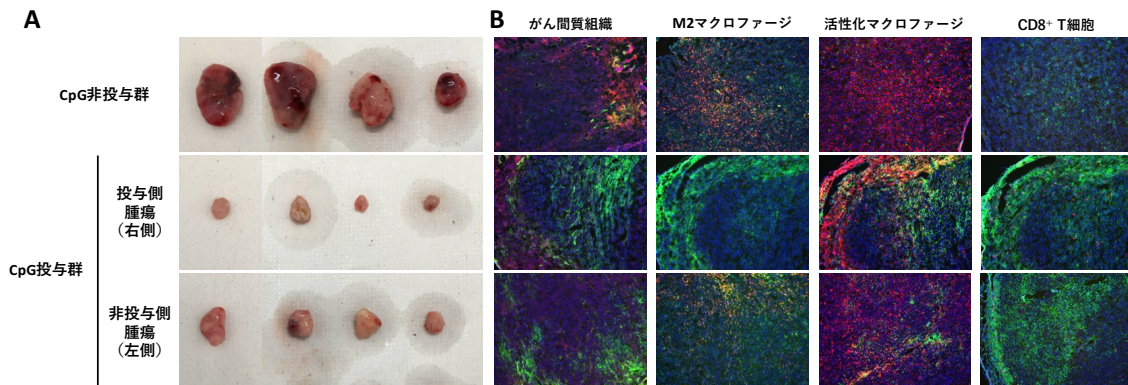


図 2. CpG の腫瘍局所及び全身性の抗腫瘍効果とがん悪性化抑制作用

A)上段より CpG 非投与群腫瘍、CpG 投与群 CpG 投与側局所腫瘍 (背部右側腫瘍)、CpG 投与群 CpG 非投与側遠隔腫瘍 (背部左側腫瘍) B)左より CD140⁺Sca-1⁺間葉系間質細胞、CD206⁺F4/80⁺M2 マクロファージ、MHC Class II (IA/IE)⁺F4/80⁺ 活性化マクロファージ、CD8⁺T 細胞の局在

(3) CpG の全身性抗腫瘍効果とがん悪性化抑制作用におけるエクソソームの関与

次に CpG 腫瘍内投与による抗腫瘍効果や腫瘍微小環境中のがん悪性化抑制作用におけるエクソソームの関与について明らかにするため、CMS5a 腫瘍両側移植 BALB/c マウスに CpG 及びエクソソーム阻害剤 GW4869 を投与し抗腫瘍効果と腫瘍微小環境に及ぼす影響について検討した。その結果、CpG 投与マウスの末梢血中にはエクソソーム粒子の著しい上昇が認められ、GW4869 投与によりエクソソーム粒子の減少と全身性の抗腫瘍効果の減弱や腫瘍微小環境中の抗腫瘍免疫環境の抑制が認められた (図 3)。これらの結果より、CpG による全身性の抗腫瘍効果や腫瘍微小環境中のがん悪性化抑制作用にはエクソソームが関与している可能性が示唆された。

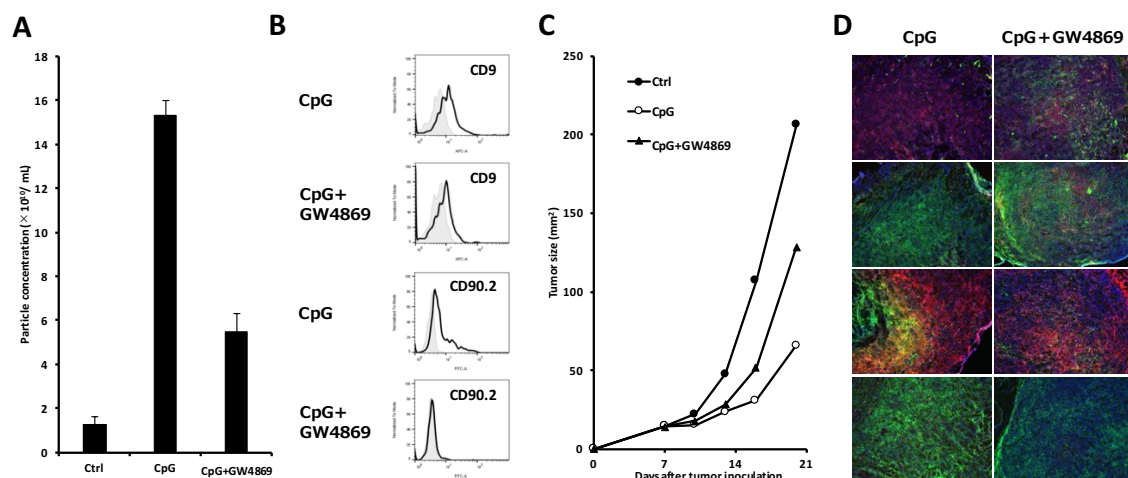


図 3. CpG の全身性抗腫瘍効果とがん悪性化抑制作用におけるエクソソームの関与

A) ナノトラッキング法 (NTA) による末梢血中のエクソソーム粒子の測定 B) フローサイトメーターによるエクソソーム粒子の解析 (CD9, CD90.2) C) エクソソーム阻害剤を投与した際の CpG の全身性抗腫瘍効果 D) 上段より CD140⁺Sca-1⁺間葉系間質細胞、CD206⁺F4/80⁺M2 マクロファージ、MHC Class II⁺F4/80⁺ 活性化マクロファージ、CD8⁺T 細胞の局在

(4) 活性化 T 細胞及びマクロファージを介したがん悪性化抑制作用の検討

次にこれら *in vivo* で得られた知見を基に、CpG によるがん悪性化抑制作用に T 細胞やマクロファージ、あるいはそのエクソソームが、どのように関与しているのか *in vitro* で確かめるため、マウス脾臓細胞由来 T 細胞やマウス骨髄細胞から分化・誘導したマクロファージを *in vitro* で初代培養後、IL-2 や CpG を添加し MSC と直接共培養あるいは Transwell を用いて共培養した *in vitro* モデルを構築し、T 細胞やマクロファージが MSC の増殖に及ぼす影響について検討した。その結果、IL-2 や CpG を直接 MSC に添加した場合や単に初代培養した T 細胞とマクロファージを MSC と培養した場合には MSC の増殖への影響は認められなかったが、T 細胞に IL-2 を添加した場合やマクロファージに CpG を添加、T 細胞と共培養した場合に MSC の増殖抑制が認められた。(図 4)。また、マクロファージに CpG を添加した well には、巨大な付着細胞が複数観察され、本細胞は CpG によって分化誘導された活性化マクロファージである可能性が示唆された。これらの結果より、CpG は活性化マクロファージの分化を促し、活性化されたマクロファージや T 細胞との強調を介して、活性化 T 細胞やそのエクソソームが MSC の増殖抑制に関与している可能性が示唆された。

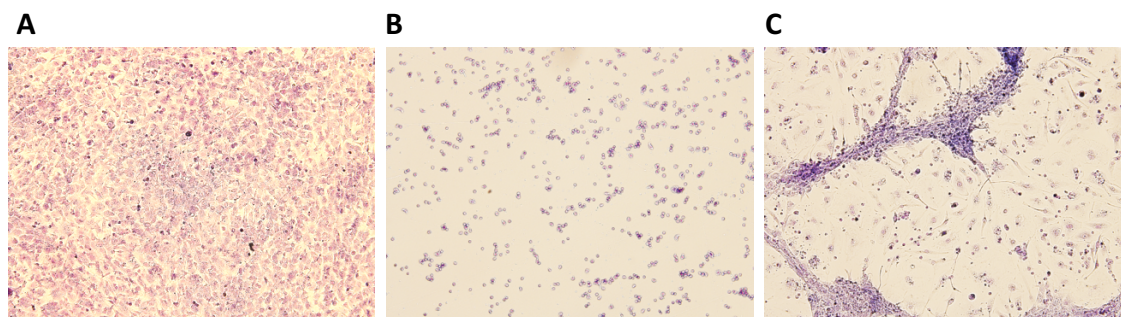


図 4. 活性化 T 細胞及びマクロファージを介したがん悪性化抑制作用の検討

左より(A) T 細胞+マクロファージ、(B) T 細胞+IL-2 添加、(C) T 細胞+マクロファージ+CpG 添加、を各々 MSC と共培養

一方、Transwell を用いてマクロファージと T 細胞を well 上層に、MSC を下層に分け、細胞を共培養した場合には、MSC の顕著な増殖抑制は観察されなかった。その原因として、Transwell 上層の不安定な足場環境によるマクロファージの活性化不足やエクソソームの不十分な産生、エクソソーム産生誘導には、両細胞が一度 MSC と相互接触する必要がある可能性が考えられた。今後、上記の原因について検証するため、本 Transwell モデルを用いた培養条件の改善や拡大等を実施し再検討する予定である。

(5) CpG 及び免疫療法を併用した複合的がん免疫療法の探索

最後に、CMS5a 腫瘍移植モデルを用いて、CMS5a に発現するネオアンチゲン (mERK2) を含むがんペプチドワクチンや mERK2 を認識する TCR を有した Tg マウス由来の CD8⁺ T 細胞を CpG と併用投与し抗腫瘍効果について検討した。その結果、CpG に上記のワクチンや T 細胞輸注を併用すると、CpG 単独投与と比べ、さらに抗腫瘍効果が増強し得ることが明らかとなった。

以上より、本研究では CpG の腫瘍内投与が腫瘍微小環境中の腫瘍の浸潤や転移等のがん悪性化を促すがん間質組織や腫瘍関連マクロファージの免疫抑制環境を抑制することを明らかにし、エクソソームの産生・放出を介して全身性の抗腫瘍効果を誘導する可能性を示した。CpG ががん悪性化に優位に働く M2 マクロファージの抑制と M1 マクロファージへの分化・誘導を促し、腫瘍微小環境を抗腫瘍免疫環境に変え、本活性化 M1 マクロファージと T 細胞との強調を介し、活性化 T 細胞やそのエクソソームががん悪性化を抑制すると考えられた。CpG のがん悪性化抑制作用において、活性化 T 細胞やそのエクソソームが直接的なエフェクター分子であると考えられるが、同時に本機構において、腫瘍微小環境中のマクロファージががん悪性化を制御する上で重要である可能性を示し、現在マクロファージに着目し、引き続き詳細な解析を進めている。本研究を基礎とした今後の進展により本機構についてさらに解明できれば、CpG を基盤としたがん浸潤・転移阻害薬の創製や免疫療法を併用した複合的がん免疫療法の開発が期待できる。

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 Ishihara M, Nishida Y, Kitano S, Kawai A, Muraoka D, Momose F, Harada N, Miyahara Y, Seo N, Hattori H, Takada K, Emori M, Kakunaga S, Endo M, Matsumoto Y, Sasada T, Sato E, Yamada T, Matsumine A, Nagata Y, Watanabe T, Kageyama S, Shiku H	4. 巻 152
2. 論文標題 A phase 1 trial of NY-ESO-1-specific TCR-engineered T-cell therapy combined with a lymph node-targeting nanoparticulate peptide vaccine for the treatment of advanced soft tissue sarcoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2554 ~ 2566
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijc.34453	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Fumiyasu Momose, Takashi Nakai, Kohei Yabuuchi, Toru Katsumata, Tuyoshi Shimoboji, Hiroshi Shiku
2. 発表標題 Hyaluronic acid nanogel based cancer vaccine, in combination with adoptive T cell therapy totally suppresses ICI resistant-tumors
3. 学会等名 SITC 37th Annual Meeting & Pre-Conference Programs（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 百瀬 文康、中井 貴士、藪内 昂平、勝又 徹、珠玖 洋
2. 発表標題 Hyaluronic acid nanogel cancer vaccine strongly induce gp100 specific CTL and regress B16F10 melanoma with TCR-T therapy
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 Hiroshi Shiku, Takashi Nakai, Fumiyasu Momose, Kohei Yabuuchi, Yoshiyuki Nakagawa, Shogo Aso, Toru Katsumata, Tuyoshi Shimoboji
2. 発表標題 Combination Immunotherapy of Adoptive T Cell Therapy with Hyaluronic Acid (HA) Nanogel Based Cancer Vaccine
3. 学会等名 The 7th Annual CAR-TCR Summit（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 百瀬 文康、中井 貴士、藪内 昂平、中川 慶之、麻生 尚吾、勝又 徹、下房地 剛、珠玖 洋
2. 発表標題 ヒアルロン酸ナノゲルワクチンはPmel-1由来TCR-T細胞との併用によりgp-100 tet+ CTLを強力に誘導し、B16F10メラノーマを退縮させる
3. 学会等名 第26回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中井 貴士、百瀬 文康、藪内 昂平、中川 慶之、麻生 尚吾、勝又 徹、下房地 剛、珠玖 洋
2. 発表標題 ヒアルロン酸ナノゲルを用いたペプチドがんワクチン開発
3. 学会等名 第26回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 百瀬 文康、中井 貴士、白木 広治、福本 圭介、勝又 徹、藪内 昂平、村岡 大輔、池田 裕明、珠玖 洋
2. 発表標題 ヒアルロン酸誘導体を基盤とした新規がんワクチンデリバリーシステムによる腫瘍抗原特異的CTL及びメモリーT細胞誘導作用と抗腫瘍・再発抑制効果の検討
3. 学会等名 第25回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 百瀬 文康、中井 貴士、白木 広治、福本 圭介、勝又 徹、藪内 昂平、村岡 大輔、池田 裕明、珠玖 洋
2. 発表標題 HANG cancer vaccine rejects anti PD-1 therapy resistant-tumor via potent neoantigen-specific CTL in draining lymph node
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 百瀬 文康、中井 貴士、白木 広治、福本 圭介、勝又 徹、藪内 昂平、村岡 大輔、池田 裕明、珠玖 洋
2. 発表標題 ヒアルロン酸ナノゲルワクチンとTCR-T細胞併用は所属リンパ節で強力に腫瘍抗原特異的CTLを誘導し抗PD-1抵抗性腫瘍を消失させる
3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 医薬組成物	発明者 百瀬 文康、珠玖 洋、中井 貴士、藪内 昂平	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/22211	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 ヒアルロン酸誘導体、医薬組成物、及び医薬組成物の製造方法	発明者 藪内 昂平、中井 貴士、百瀬 文康、珠玖 洋	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-88995	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 医薬組成物	発明者 百瀬 文康、珠玖 洋	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-091520	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------