

43. 抗がん免疫アジュバントとがんワクチン療法の確立

瀬谷 司

*北海道大学 医学部 免疫学分野

Key words : 抗がんワクチン療法, RNA アジュバント, TLR3, CTL 誘導, 完全寛解

緒 言

DNA の複製は形質の有利不利に拘わり無く変異のバイアスがかかり、変異は遺伝的浮動を通じて固定される。生物の系統発生の場で DNA の変異は種の分化、進化に関わり、個体発生と恒常性の立場から DNA 変異と遺伝的浮動が問題になるのはがんである。発がんは複数の変異が特定の体細胞に蓄積して起きる。

がん化は DNA ポリメラーゼの誤読が一定頻度で起きる酵素反応なので、日常の現象として論理的には頻繁に起きるはずだが、診断のできる大きさに育つがんはまれである。ヒトの例では高齢者でもがんと診断されて死ぬ例は 50%に満たない。

バーネットに始まる免疫監視機構の研究者は多くの「がんの芽」は免疫が摘んでいるからがんは育たない、と考えた。がんは遺伝子病に発端し、免疫病として倒れる、とされる所以である。事実、がんは免疫能が低い個体や高齢者に多発する。これが正しければヒト進行がんの症例であっても多くのがんを免疫増強で寛解しうるはずである。2012 年、ヒトにおいてこの仮説が正しいことが PD-1 抗体治療で証明された。

PD-1 抗体はリンパ球にある PD-1、樹状細胞にある PD-L1 の抑制連携を解除する。従って、免疫増強になり抗原特異的 CD8⁺ T リンパ球 (CTL) は増殖促進に向かう。樹状細胞ががん抗原を提示していれば、抗がん CTL が増殖し、CTL が腫瘍に侵入できればがん細胞は CTL によって排除される。即ちがんは寛解する。ほぼ 100% 死とされた進行がん患者が PD-1 抗体療法で魔法のように救済される。但し、PD-1 抗体の成功率は 20% 台に留まり、これらの成功例はがん特異的 CTL が前もってある (preexist) 場合に限られる。残り 80% 近い治療抵抗性のがんは PD-1/L1 抗体が効く閾値にまで CTL を誘導する (priming) 必要がある。CTL の誘導のためには Th1 環境が要り、樹状細胞 (DC) を免疫アジュバントで刺激することが必須である (表 1)。だが、アジュバントは多くがサイトカイン毒性を示し、実用化に到っていない。

本研究は炎症を起こさずに樹状細胞の CTL-priming を誘導し、残り 80% の PD-1/L1 抵抗症例を寛解する TLR3 アジュバントの開発に関する基礎研究である。

表1. 代表的な研究開発中の Th1 アジュバント

アジュバント	成分	自然免疫受容体・シグナル分子	誘導される獲得免疫
Poly I:C	Synthetic dsRNA analogue	TLR3, MDA5	抗体, Th1, CD8
Flagellin	Flagellin	TLR5	抗体, Th1 or Th2
Imiquimods	Synthetic ssRNA analogue	TLR7, TLR8	抗体, Th1, CD8
CpG	Synthetic CpG-ODNs	TLR9	抗体, Th1, CD8
QS-21	Saponin	不明	抗体, Th1, Th2, CD8
TDM	Trehalose dimycolate	Mincle	抗体, Th1, Th17
Curdan	β 1,3-glucan	Dectn-1	抗体, Th1, Th17, CD8
Hemizin	β -hematin crystals	MyD88	抗体, Th1 or Th2

TDM: trehalose dimycolate

方法および結果

種々の免疫増強剤がアジュバントとして使われている（表1）。TLR3 アジュバントとして polyI:C より優れた ARNAX をデザインし合成法を開発した（図 1A）[1](#)）。TLR3 のアゴニストとして研究用試薬 polyI:C と比較した構造情報も図 1A に示す。ARNAX の作用機序は樹状細胞の TLR3-TICAM-1 経路を活性化し、全身の mitochondrial antiviral signal (MAVS) 経路を活性化しないため、局所の I 型 IFN、IL-12 を十分補給するがサイトカイン血症は起こさないと特徴を持つ（図 1B）[1](#)）。

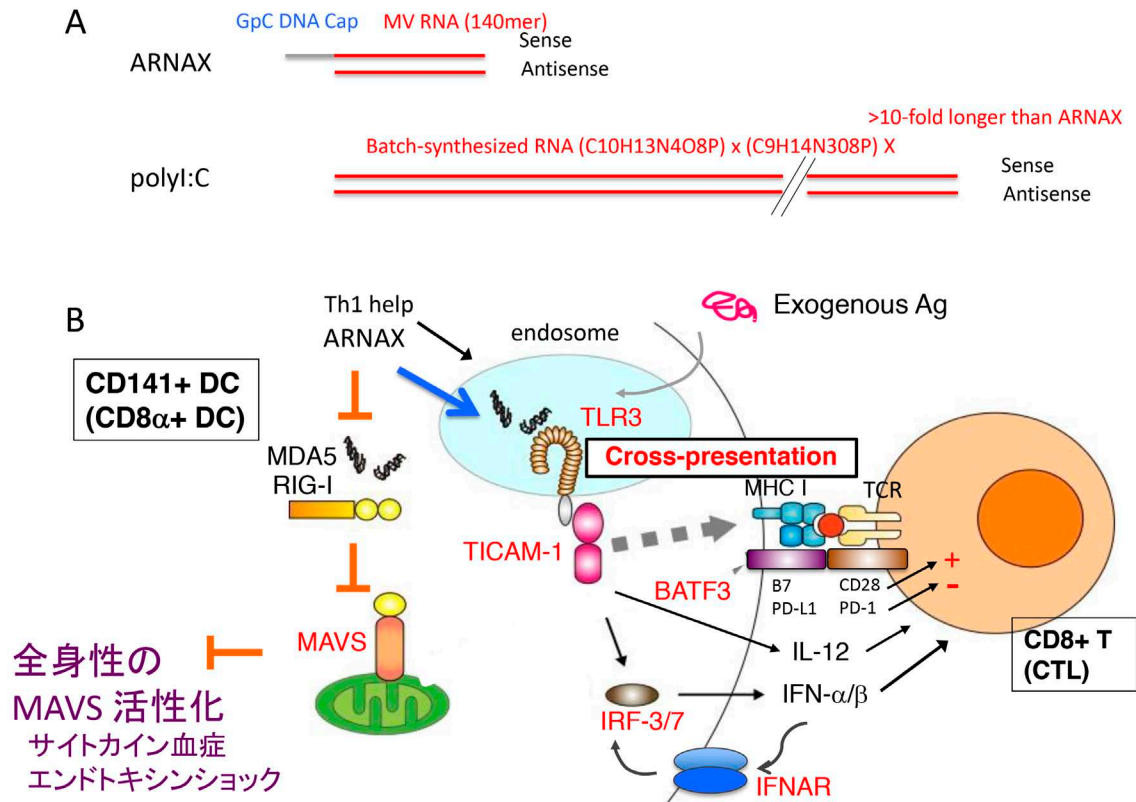


図1. ARNAX の概略^{1,6)}

A) ARNAX の構造と polyI:C の構造との比較。B) ARNAX の機能とサイトカイン毒性を發揮しない特徴。

マウス移植がんのモデルに治療プロコールとして PD-L1 抗体 (i.p.)、ARNAX/がん抗原 (TAA) (s.c.) を投与し、腫瘍退縮と CTL 誘導を解析した²⁾。C57BL/6 と syngeneic の腫瘍系 (EG7 lymphoma、MO5 melanoma 細胞株) を用いた (図2、図3)。これらの PD-L1 発現量を図2、3のAに示す。EG7 では PD-L1 high、low の2株を用いた。

EG7 は OVA を発現しているリンフォーマである (図2) ³⁾。PD-L1 治療抵抗性で PD-L1 low の OVA 陽性腫瘍に対し ARNAX/抗原のワクチン療法は奏効し腫瘍を退縮に導いた (図2E) ²⁾。CR 例では rechallenge 腫瘍も拒絶した。全例で腫瘍特異的 CTL が高く誘導された (図2D)。PD-L1 治療抵抗性で PD-L1 high の腫瘍では ARNAX/抗原治療、及び PD-L1 阻害との併用治療で併用がより奏効した (図2C)。WT1 陽性の腫瘍例では PD-L1 抗体単独で良い成績が得られ、ARNAX の添加は多少改善が見られた (data not shown) ²⁾。

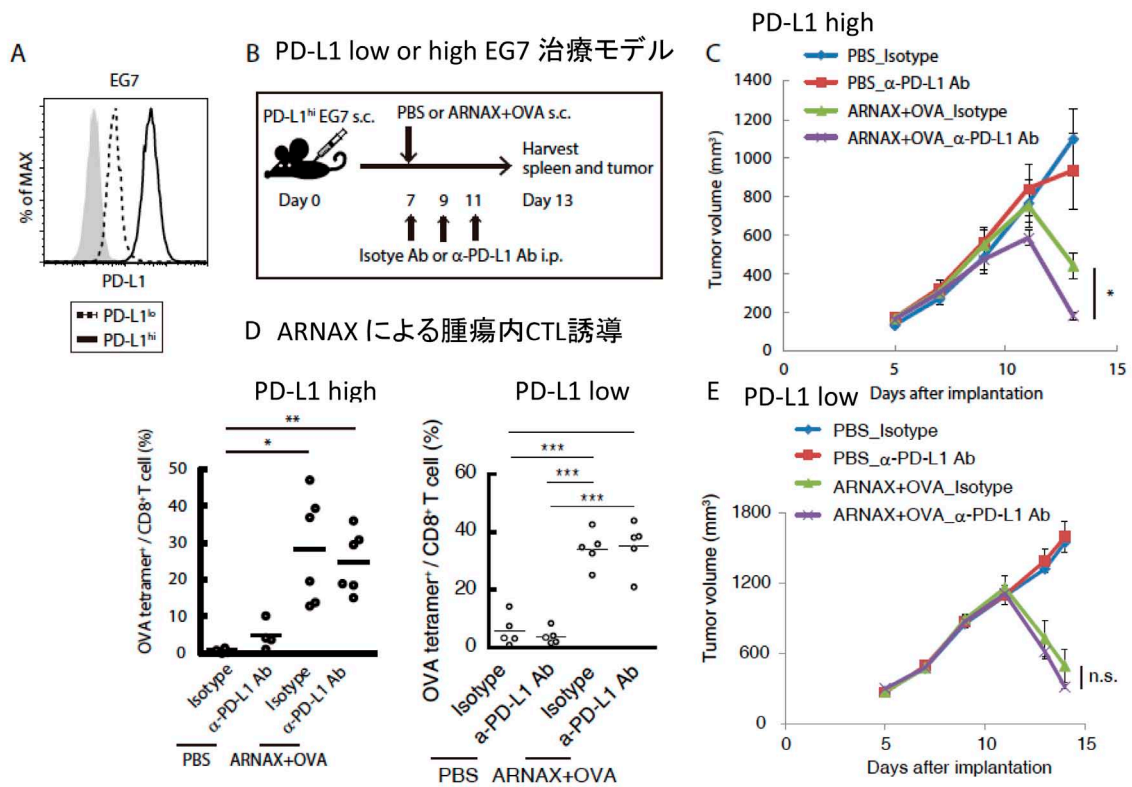


図2. ARNAX の EG7 lymphoma に対する抗がんワクチンアジュバント効果

A) EG7 (OVA) 腫瘍細胞の PD-L1 レベル (flowcytometry)。PD-L1 high と low の EG7 細胞をヒト PD-L1 発現機構に准じて作製した⁴⁾。B) マウス EG7 移植モデルのプロトコル。C) PD-L1 high EG7 腫瘍に対する ARNAX + 抗原療法と PD-L1 併用療法の効果。腫瘍退縮を縦軸に取った。横軸は ARNAX 投与後の日数。D) ARNAX/抗原 +/- PD-L1 抗体投与後の腫瘍内の抗がん CTL の増加。左図：D-L1 high EG7 腫瘍、右図：D-L1 low EG7 腫瘍。E) PD-L1 low EG7 腫瘍に対する ARNAX + 抗原療法と PD-L1 併用療法の効果。C~E) *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (解析には Kruskal-Wallis test を用いた)。

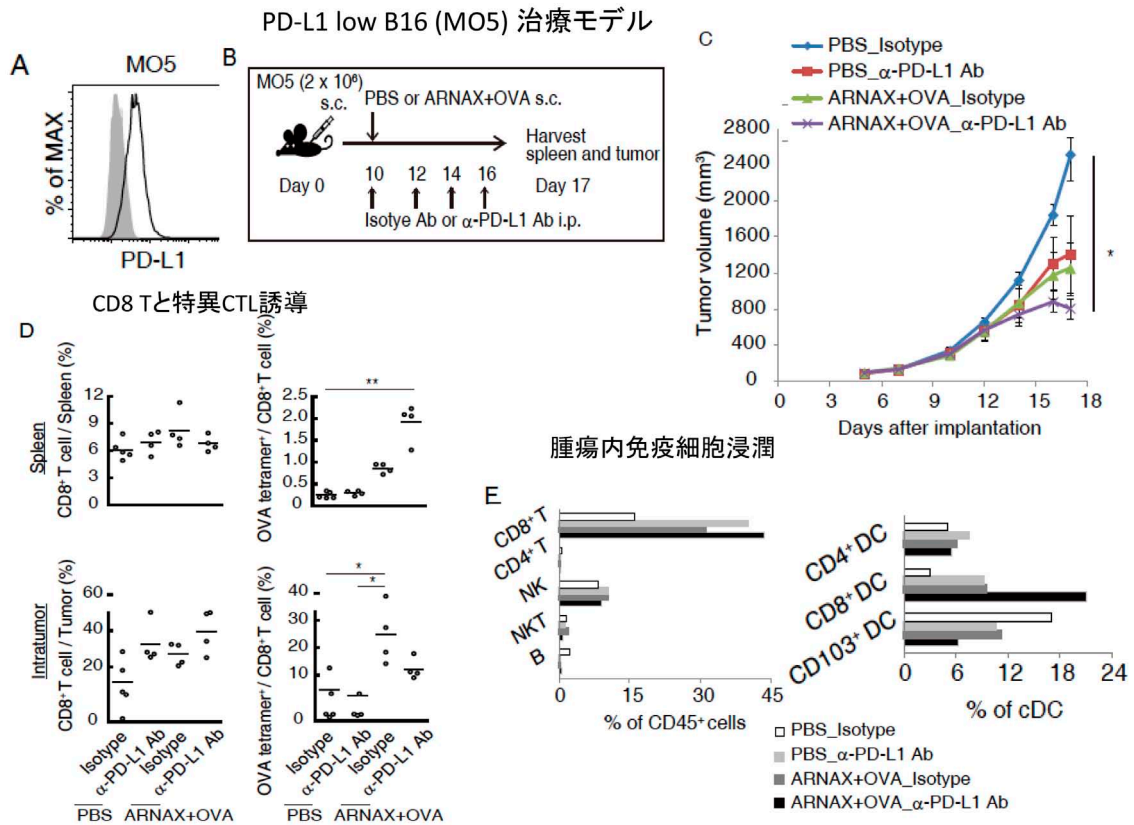


図 3. ARNAX の B16 melanoma (MO5) に対する抗がんワクチンアジュバント効果
 A) MO5 腫瘍細胞の PD-L1 レベル (flowcytometry)。B) マウス MO5 移植モデルのプロトコール。C) MO5 腫瘍に対する ARNAX + 抗原療法と PD-L1 併用療法の効果。腫瘍退縮を縦軸に取った。横軸は ARNAX 投与後の日数。D) ARNAX/抗原投与後の脾臓 (上図) 腫瘍内 (下図) の CD8⁺ T 細胞 (左図) と抗がん CTL (右図) の増加。ARNAX/抗原 +/- PD-L1 抗体投与後の腫瘍内の抗がん CTL の増加。F) ARNA/抗原 +/- PD-L1 療法に於ける腫瘍内の免疫細胞カウント。

ARNAX+OVA 治療を行った EG7 株移植マウスの腫瘍組織から mRNA を抽出し RNA シークエンス解析を行った。治療群では CTL の誘引に関わるケモカインや CTL の細胞傷害活性を担う遺伝子群の発現が上昇し、ARNAX による腫瘍内微小環境の改善が示唆された (data not shown) [2\)](#)。

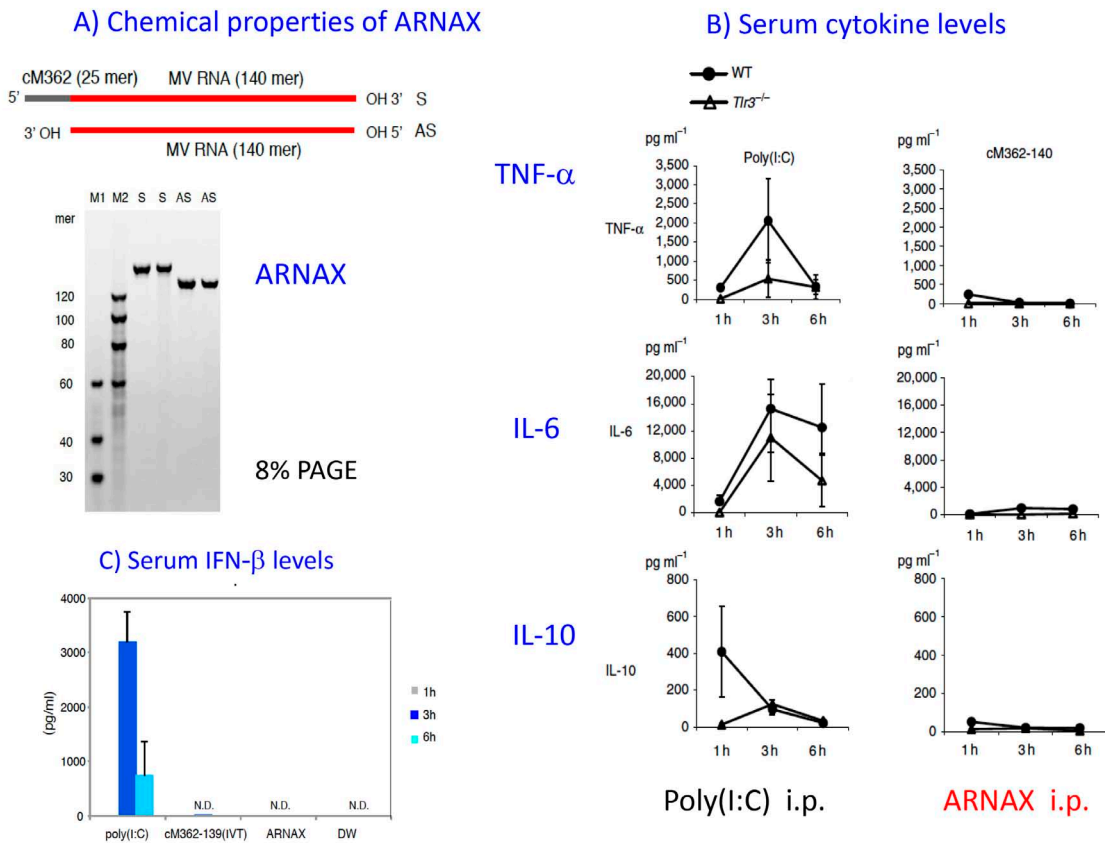


図 4. ARNAX の製造と非サイトカイン誘導性

A) RNA 化学合成による ARNAX の製造と精製度 (SDS-PAGE)。B) サイトカイン誘導活性 (非担がんマウス)。polyI:C と ARNAX をそれぞれ腹腔内投与し、血中サイトカインレベルを ELISA にて測定。横軸は時間。図には示さないが IL-12p40 は ARNAX が polyI:C より数倍高く誘導した。C) インターフェロン (IFN- β) 誘導活性。polyI:C は高い IFN- β 誘導を示したが、ARNAX は血液中の IFN を有意に上げなかった。

B16 メラノーマの OVA 発現株、MO5 を用いた腫瘍内微環境の解析から CD8⁺ の樹状細胞と T リンパ球が ARNAX/OVA 抗原と PD-L1 抗体の併用療法で最も強く腫瘍内に浸潤することが判明した (図 3D、F)。腫瘍退縮も併用療法のとくに加速した (図 3C)。以上のデータは Matsumoto *et al.* (Nat Commun 2015)、Takeda *et al.* (Cell Rep 2017) に公表した^{1,2)}。

同様の実験を ARNAX の代わりに polyI:C アジュバントで行うと 6 時間以内に炎症性サイトカイン、TNF- α 、IL-6 が血中高値を示した⁴⁾。I 型 IFN も急増した。マウスはサイトカイン血症で死には到らなかったが憔悴した (図 4)。ARNAX ではサイトカイン血症が全く見られず元気であった (図 4)。腫瘍退縮は polyI:C 投与群と ARNAX 投与群で差がなかった (data not shown)。

考 察

ARNAX とがん抗原によるワクチン治療は抗 PD-L1 治療に不応性の腫瘍に対して有効であり、抗 PD-L1 抗体との併用で更に強力な抗腫瘍効果が誘導できる。PD-1/PD-L1 阻害療法は CTL が既に存在する腫瘍には有効だが、クロスプライミング促進作用は無い。治療効果の嵩上げには CTL 誘導を促進する必要がある⁵⁾。ARNAX は強力なプライミング能により PD-1/PD-L1 阻害療法に必須の CTL を供給できる^{5,6)}。ARNAX と抗 PD-L1 抗体の併用はリンパ組織でのプライミングと同時に腫瘍組織の免疫改善も促す²⁾。ARNAX と抗 PD-L1 抗体との併用は両者の特性を互いに増強する有効な治療法であると言える。がんの微小環境は TLR3 アジュバント依存性に免疫感受性に転換することが

知られている^{7,8)}。TLR3 アジュバントは IgA 抗体産生も強く促進する⁹⁾。サイトカイン毒性の無い TLR3 アジュバントの ARNAX がヒトに適用できれば、がんは免疫療法で治る病気になりうる。

共同研究者

本研究の共同研究者は北海道大学大学院医学研究院ワクチン免疫学分野の松本美佐子特任教授、武田洋平特任助教である。またワクチン免疫学分野の代表、北海道大学大学院医学研究院分子病理学分野の笠原正典教授に深謝する。

文 献

- 1) Matsumoto, M., M. Tatematsu, F. Nishikawa, M. Azuma, N. Ishii, A. Morii-Sakai, H. Shime, and T. Seya. Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and cytotoxic T cell activation without significant cytokine production in vivo. *Nat Commun.* 2015; 6: e6280. doi: 10.1038/ncomms7280.
- 2) Takeda, Y., K. Kataoka, J. Yamagishi, S. Ogawa, T. Seya, and M. Matsumoto. The TLR3-specific adjuvant relieves innate resistance to PD-L1 blockade without cytokine toxicity in tumor vaccine immunotherapy. *Cell Rep.* 2017; (in press).
- 3) Azuma, M., Y. Takeda, H. Nakajima, H. Sugiyama, T. Ebihara, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. Biphasic function of TLR3 adjuvant on tumor and spleen dendritic cells promotes tumor T cell infiltration and regression in a vaccine therapy. *Oncoimmunol.* 2016; 5: e1188244. doi: 10.1080/2162402X.2016.1188244.
- 4) Kataoka, K., Y. Shiraishi, Y. Takeda, S. Sakata, M. Matsumoto, S. Nagano, Y. Nagata, A. Kitanaka, S. Mizuno, H. Tanaka, K. Chiba, Y. Watatani, H. Suzuki, T. Yoshizato, K. Yoshida, M. Sanada, H. Itonaga, Y. Imaizumi, Y. Totoki, W. Munakata, H. Nakamura, N. Hama, K. Shide, Y. Kubuki, T. Hidaka, T. Kameda, K. Masuda, N. Minato, K. Kashiwase, K. Izutsu, A. Takaori-Kondo, Y. Miyazaki, S. Takahashi, T. Shibata, H. Kawamoto, Y. Akatsuka, K. Shimoda, K. Takeuchi, T. Seya, S. Miyano, and S. Ogawa. Aberrant PD-L1 expression via 3' -UTR disruption in multiple cancers. *Nature.* 2016; 534: 402-406. doi: 10.1038/nature18294.
- 5) Seya, T., H. Shime, Y. Takeda, M. Tatematsu, K. Takashima, and M. Matsumoto. Adjuvant for vaccine immunotherapy of cancer - focusing on TLR2 and TLR3 agonists for safe enhancing antitumor immunity. *Cancer Sci.* 2015; 106: 1659-1668. (review) doi: 10.1111/cas.12824.
- 6) Seya, T., Y. Takeda, and M. Matsumoto. Tumor vaccines with dsRNA adjuvant ARNAX induces antigen-specific tumor shrinkage without cytokinemia. *Oncoimmunology.* 2015; 5: e1043506. (review) PMID: 27057425
- 7) Takemura, R., H. Takaki, S. Okada, H. Shime, H. Oshiumi, T. Akazawa, M. Matsumoto, T. Teshima, and T. Seya. PolyI:C-induced, TLR3/RIP3-dependent necroptosis backs up immune effector-mediated tumor elimination in vivo. *Cancer Immunol Res.* 2015; 3: 902-914. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0219.
- 8) Shime, H., M. Matsumoto, and T. Seya. Double-stranded RNA promotes CTL-independent tumor cytolysis supported by CD11b+Ly6G+ intratumor myeloid cells through the TICAM-1 signaling pathway. *Cell Death Differ.* 2016; 24: 385-396. doi: 10.1038/cdd.2016.131.
- 9) Takaki, H., S. Kure, H. Oshiumi, H. Hasegawa, M. Matsumoto, and T. Seya. Enhanced antibody production against influenza vaccine by the TICAM1 pathway in nasal associated lymph tissue. *Mucosal Immunol.* 2017; Jun 14. doi: 10.1038/mi.2017.48. [Epub ahead of print].