

京都大学	博士（医学）	氏名	岡田浩和
論文題目	In situ vaccination using unique TLR9 ligand K3-SPG induces long-lasting systemic immune response and synergizes with systemic and local immunotherapy (新規 TLR9 リガンド K3-SPG を用いた in situ ワクチン療法は長期間持続する全身性免疫応答を誘導し、全身または局所免疫療法と相乗効果を示す)		
(論文内容の要旨)			
【背景】 近年免疫チェックポイント阻害剤(Checkpoint inhibitor: CPI)によりがん治療にパラダイムシフトがもたらされたが、奏効例は一部に限られ、多彩で重篤な副作用も問題となる。腫瘍局所で自然免疫を賦活化する in situ ワクチン療法(in situ vaccination: ISV)は、①局所療法で副作用を最小限に抑えつつ全身性免疫を誘導できる、②煩雑な抗原同定作業を経ずに患者固有のがん抗原をそのままワクチン抗原に利用できる、等の利点から有望な治療戦略である。中でも消化器がんでは実臨床で腫瘍の直接穿刺が可能であり ISV の臨床応用が期待される。 新規 TLR9 リガンド K3-SPG は、従来型の K 型 TLR9 リガンドである K3 とシゾフィランの複合体からなるナノ粒子で、既存の TLR9 リガンドにはない「強いI型 IFN 誘導能」と「臨床応用可能な安定性」の両者を備え、がん免疫でも有効なアジュバントとなることが期待される。			
【目的】 膵がん・大腸がん同種皮下移植マウスモデルを用いて K3-SPG-ISV の有効性を明らかにすることを目的とした。			
【方法・結果】 (1) K3-SPG による in vitro 刺激実験でのサイトカイン産生 ヒト末梢血単核細胞やマウス脾細胞への in vitro 刺激実験で、K3-SPG は従来型 TLR9 リガンドに比べ、腫瘍免疫に重要とされる IFN- α と IL-12 を著明に産生させた。 (2) K3-SPG-ISV の局所免疫応答と抗腫瘍効果 膵がん細胞株の同種皮下移植マウスモデルで K3-SPG-ISV を行い、腫瘍局所の免疫応答を RT-qPCR で解析するとI型 IFN や IL-12 等の発現上昇を認めた。また、腫瘍増殖を有意に抑制し、生存期間も有意に延長した。別の膵がん細胞や大腸がん細胞の皮下移植モデルでも同様の結果が得られた。膵がんマウスモデルで K3-SPG-ISV を K3-ISV や K3-SPG 静脈投与と比較したところ、ともに腫瘍増殖を有意に抑制し生存期間も有意に延長した。 (3) K3-SPG-ISV と CPI の併用による抗腫瘍効果 膵がん・大腸がん皮下移植マウスの K3-SPG-ISV に、抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体全身投与を併用すると、それぞれの単独群に比べ併用群は腫瘍増殖を抑制した。 (4) K3-SPG-ISV による免疫記憶誘導 K3-SPG-ISV で腫瘍が退縮した膵がんモデルマウスに、同じ細胞株を皮下移植しても生着しなかった。一方、このマウスに大腸がん細胞株を移植すると生着し増大した。また、K3-SPG-ISV と抗 PD-1 抗体で腫瘍退縮した大腸がんマウスに同じ細胞株を再移植しても生着しなかった。 (5) K3-SPG-ISV による全身性抗腫瘍効果と CD8+ T 細胞の解析 膵がん細胞を両側皮下に移植し片側のみ K3-SPG-ISV を行うと、治療側のみでなく無治療の対側も腫瘍増殖抑制を認めた。大腸がんマウスモデルでも同様であった。膵がんマウスの免疫染色では、腫瘍浸潤 CD8+ T 細胞は K3-SPG-ISV により有意に増加し、無治療の対側も増加傾向を認めた。脾臓 CD8+ T 細胞を分離し、同じ細胞株と共培養して IFN- γ ELISPOT を行うと IFN- γ 産生上昇を認めた。また膵がんと大腸がんのモデルマウスに CD8 除去抗体を投与すると K3-SPG-ISV は抗腫瘍効果がキャンセルされた。			

(6) 抗 CD40 抗体併用 K3-SPG-ISV による抗腫瘍効果

膵がんモデルマウスにて、抗 CD40 抗体の腫瘍内投与を併用する K3-SPG-ISV (K3-SPG/抗 CD40-ISV) は全身性の抗腫瘍効果を増強し、脾臓 CD8+ T 細胞の FACS 解析で naïve phenotype や memory phenotype から effector phenotype への移行を認めた。また、K3-SPG/抗 CD40-ISV は、ルシフェラーゼ発現大腸がん肝転移マウスでも全身性の抗腫瘍効果を認めた。

【考察】

K3-SPG-ISV は、膵がんや大腸がんの同種皮下移植マウスモデルで、CD8+ T 細胞依存性に全身性の抗腫瘍効果を示し、免疫記憶を誘導した。K3-SPG-ISV は、CPI との併用効果を示したことから、現在のがん免疫療法の標準治療である CPI の奏効率を改善することが期待される。一方、K3-SPG-ISV は、単独療法、もしくは抗 CD40-ISV との併用でも抗腫瘍効果を示したことから、CPI を要さず局所療法のみで完結する K3-SPG-ISV を軸とした新たながん免疫療法の開発が期待される。

(論文審査の結果の要旨)

免疫チェックポイント阻害剤(Checkpoint inhibitor: CPI)は奏効率の低さや多彩で重篤な副作用が問題となる。腫瘍局所で自然免疫を賦活化する in situ ワクチン療法(in situ vaccination: ISV)は①患者固有のがん抗原をワクチン抗原に転用でき、②副作用を最小限に抑えつつ全身性の抗腫瘍免疫を誘導できる、等の利点を有し、腫瘍の直接穿刺が可能な消化器がん臨床応用が期待される。また新規 TLR9 リガンド K3-SPG はI型 IFN 誘導能と臨床応用可能な安定性を備える。本研究では消化器がんマウスモデルで K3-SPG-ISV の有効性を明らかにすることを目的とした。

膵がんや大腸がんモデルで K3-SPG-ISV は有意に腫瘍増殖を抑制し、抗 PD-1・抗 CTLA-4 抗体と相乗効果を認めた。さらに K3-SPG-ISV で腫瘍が退縮したマウスにはがん特異的な免疫記憶が成立していた。また膵がん両側皮下モデルで片側に K3-SPG-ISV を行うと両側の腫瘍増殖を抑制し、免疫染色にて CD8+ T 細胞浸潤の有意な増加を認め、膵がん・大腸がんモデルに CD8 除去抗体を投与すると K3-SPG-ISV の抗腫瘍効果がキャンセルされたことから CD8+ T 細胞依存性に全身性の抗腫瘍効果を示すことが示唆された。また膵がん皮下や大腸がん肝転移モデルで K3-SPG と CD40 刺激抗体併用 ISV にて全身性の抗腫瘍効果を認めた。

以上から、K3-SPG-ISV は CPI の奏効率を改善することが期待できる一方、CPI を要さず局所療法のみで完結する新たながん免疫療法の開発が可能であると示唆された。

以上の研究は K3-SPG in situ ワクチン療法の抗腫瘍効果解明に貢献し、新たながん免疫療法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 4 年 7 月 1 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降