

Life Science Key Notes

— 基礎研究から臨床に向けて —

がんの新しい免疫療法： がん免疫研究から見えてきた次の戦略

赤澤 隆

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター研究所 がん創薬部 主任研究員

田原 秀晃

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター研究所 がん創薬部 部長
東京大学 医科学研究所 がん生体分子治療社会連携研究部門 特任教授

はじめに

1890年代、微生物の死菌をがん治療へ応用した、コーリーのワクチン（毒素）から始まった「がん免疫療法」は、現在、免疫チェックポイント阻害剤へと形を変え、臨床の現場で、がん治療における重要な地位を確立している。1970年代からの非特異的免疫賦活剤、1990年代からのペプチドワクチン、こうした背景から、その当時「免疫療法」は、外科手術・化学療法・放射線療法に次ぐ、第4のがん治療として注目された。

1990年代、ジム・アリソン博士らのCTLA-4、本庶佑博士らのPD-1といった、免疫制御分子の発見があった（後に免疫チェックポイント分子とよばれる）。ここまで実臨床の場では大きな治療効果が得られなかった免疫療法であるが、「免疫抑制の阻害によるがん治療法の発見、その阻害抗体の応用」は大きなブレイクスルーとなり、研究者のみならず一般にまで認知される研究成果・治療効果として、2018年ノーベル賞が授与された。今では「免疫療法＝第4のがん治療」という言葉すら聞かなくなったほど、中心的な存在となっている。

がん免疫療法の歴史

いわゆる自然免疫系の応答を非特異的免疫賦活と一括りにしていた1970年代、日本でもビシバニール・丸山ワクチン・クレスチンといった微生物成分をがん治療に応用する試みが盛んにおこなわれていた。とりわけ牛結核菌の弱毒化ワクチン株（BCG）を用いた研究は、その核酸成分・細胞骨格成分に免

疫活性化能・抗がん活性が認められた。非特異的免疫療法という名づけがされたように、当時は科学的根拠に乏しく（メカニズム不明）、有効成分についても精製度や分子を単離していくにつれ、その活性が失われるという背景もあり、十分な解析が進まなかった。

1990年頃からは、がん免疫研究は獲得免疫系、とりわけ、細胞傷害性T細胞（CTL）の解析とがん抗原の単離・同定が盛んに行われるようになった。これらの成果は「がんペプチドワクチン」という挑戦へと進んでいくことになる。ペプチドワクチン療法、すなわち、抗原提示の概念に基づき、HLA（ヒト主要組織適合抗原）に結合する抗原ペプチドの同定、結合モチーフを基にしたT細胞の認識配列予測などから、人工的に合成したペプチドを投与することでCTLを教育する治療法である。2000年代に入ると、日本国内の研究はペプチドワクチン療法にかなり大きく傾いた流れがあったと思われる。しかしながら、臨床試験におけるその奏効率はわずか0.9%といった報告もあり、研究者は、ペプチド単独治療の限界を認識するとともに、次なる一手として自然免疫と獲得免疫のリンク、樹状細胞（DC）の応用を考察し始めていた。

ショウジョウバエに存在する免疫システムのプロトタイプとされるToll、そのヒトホモログであるtoll-like receptor（TLR）が1997年に発見された。そのリガンドが次第に明らかになるとともに、非特異的免疫についても理解が深まることになる。微生物中に含まれるPAMPs（Pathogen associated molecular patterns）は単体だけでなく、その重合体がパターンとして、自然免疫系の樹状

細胞などに認識され、免疫系の活性化・初期免疫応答を起動する。こうした分子レベルでの自然免疫の解明により、微生物成分の単離精製を進めるにつれて免疫賦活作用が失われていった当時の研究成果も説明されることとなる。そして樹状細胞の抗原提示能、微生物成分による自然免疫の活性化はCTLの活性化に応用され始める。

ワクチンには抗原とアジュバントが必須である。これは抗体だけでなくCTL誘導にも言える。もちろん免疫アジュバントの種類によって、抗体・CTLそれぞれに対する指向性があり、TLRをはじめとした樹状細胞の応答がその初期の方向性を運命づけることになる。免疫アジュバント単体で治療を模索した時代、がん抗原という概念が足りなかった。ペプチドワクチンで治療を模索した際は、自然免疫と獲得免疫のリンク、科学的根拠に基づいた免疫アジュバントの補充が足りなかったと考えられる。いずれも日本では医薬品として承認に至ることができなかったチャレンジであった。

抗原とアジュバントのトライが行われた時代、既に次のハードルの存在が確認されていた。このハードルを乗り越えることが、がん治療において、どれだけ有効なものであったか、当時はまだ知る由もなかった。すなわちソフト面（抑制性のシグナル分子・免疫チェックポイント分子）とハード面（制御性T細胞・抑制性マクロファージの存在）のブレーキの存在である。チェックポイント阻害による有効性は、現時点では抗原も免疫アジュバントも投与の必要はなく、有効な治療効果を示している。もちろん動物実験レベルでは併用の有効性を示

す論文は多々あるが、実臨床において、それ単独で有効性を示し、医薬品としての地位を確立するほどのものであった。

免疫チェックポイント阻害剤は抗体工学の発展が後押しした部分もあるが、遺伝子工学によって生み出された人工T細胞の構築技術は、CAR-T細胞療法として、血液がんでの有効性が認められている。また、制御性の免疫細胞の排除については、様々な角度から考案・トライがなされている。CTLペプチドワクチンの後に展開された創薬標的は、他にも、腫瘍局所の微小環境改善・代謝変調による免疫細胞の制御などがあり、今後どのような臨床効果を示していくか期待される。

大阪国際がんセンター （大阪府立成人病センター） で取り組まれてきた免疫療法

筆者の赤澤が大阪国際がんセンターの前身である大阪府立成人病センターに赴任したのがおよそ20年前であるが、その当時から挑戦的に免疫療法に取り組んでいた施設であった。

病院では林昭先生・児玉憲先生、そして研究所では瀬谷司先生らがBCG-CWS（細胞骨格成分）の臨床・基礎研究を行っていた。そもそもBCGの研究は核酸成分（BCG-ODN）と細胞骨格成分（BCG-CWS）へと発展したが、BCG-CWS研究の第一人者であった東市郎先生の協力を得て瀬谷先生はBCG-CWSがTLR2およびTLR4によって認識され免疫細胞・樹状細胞を活性化することを見出した[1]。林先生・児玉先生は臨床研究を長期にわたり進め、肺がん患者の術後生存率を改善することを報告した[2]。TLRの発見・樹状細胞の活性化メカニズム・獲得免疫系の活性化メカニズムが明らかになり始めたこの頃に、獲得免疫系（Adaptive immunity）という言葉と対比して、非特異的免疫から自然免疫（Innate immunity）とよばれるようになっていた。

こうした背景もあり、免疫系の中核を担う樹状細胞を活性化するTLRリガンドの研究が大阪府立成人病センターで進められた。瀬谷先生はTLR3リガンドpoly (I:C)の抗腫瘍効果に注目し[3]、

その後、北海道大学でDNA-RNAハイブリッド化合物ARNAXを開発した。

一方、筆者はTLR2リガンドに着目し、樹状細胞に親和性の高いリポペプチドh11cを開発している（図1）。TLR2リガンドの構造は、N末端システインがパルミチン酸2分子または3分子により特殊修飾された構造を持つ微生物由来のペプチド（アシル化リポペプチド）として知られる。化学合成する限り、TLR2の認識において明確な立体障害とならないよう、小さなアミノ酸をシステインの隣に配置することが必須であるが、他はかなり自由に改変できることを見出した。ここに機能的ペプチドを接続する「アジュバント・エンジニアリング」を展開し、これまでに複数の人工設計TLR2リガンドを作製した[4-6]。その抗がんアジュバント活性を評価したところ、樹状細胞のマーカーとして知られるCD11cに親和性を持つ配列を応用した化合物h11cが、非常に興味深い活性を示した。h11cは、コントロールとしてよく使用される人工TLR2リガンド（P2CSK4）とは異なり、マウス皮膚の接種部位に過剰な炎症応答を誘導しないこと、しかし抗がん効果は同等以上にあることが分かった。これは、h11cがマクロファージよりも樹状細胞に優先的に反応することに起因する。P2CSK4はマクロファージを刺激してMIP-2を産生させることで（樹状細胞はMIP-2を産生しない）、投与部位に

好中球を集積させて、皮膚の過剰炎症を起すことを明らかにした。アジュバント投与部位の過剰炎症は、BCG-CWSを投与された患者が長年に渡り悩まされた副作用であり、それを解消するものと考えられた。

また、後にCTLに対して効率よく抗原提示（クロスプレゼンテーション）を行えるヒト樹状細胞サブタイプ（CD141⁺, clec9a⁺, XCR1⁺）にはTLRの中でもTLR3（一部でTLR2）だけが発現していることが話題となり、奇しくも、大阪府立成人病センターを出発点として選択・開発されたTLR2およびTLR3のリガンドには、抗原提示細胞の刺激を介したヒトでの抗がん活性・臨床応用の可能性が残されているとわかり、安堵した記憶がある。なお、このh11cは大阪国際がんセンターで特許を取得している化合物である。

一方、筆者が所属した腫瘍免疫学部の井上徳光先生は、Warburg効果により解糖系が亢進した腫瘍組織において、乳酸が大量に産生されていることに注目し、この乳酸こそが腫瘍の微小環境において、マクロファージの性質を変化させるimmuno-modulating factorであることを突き止めている[7]。免疫抑制性のマクロファージの存在、腫瘍の代謝、腫瘍環境の変化が大きく注目されはじめた初期の話であり、井上先生は現在も和歌山県立医大でこの研究を継続・発展させている。

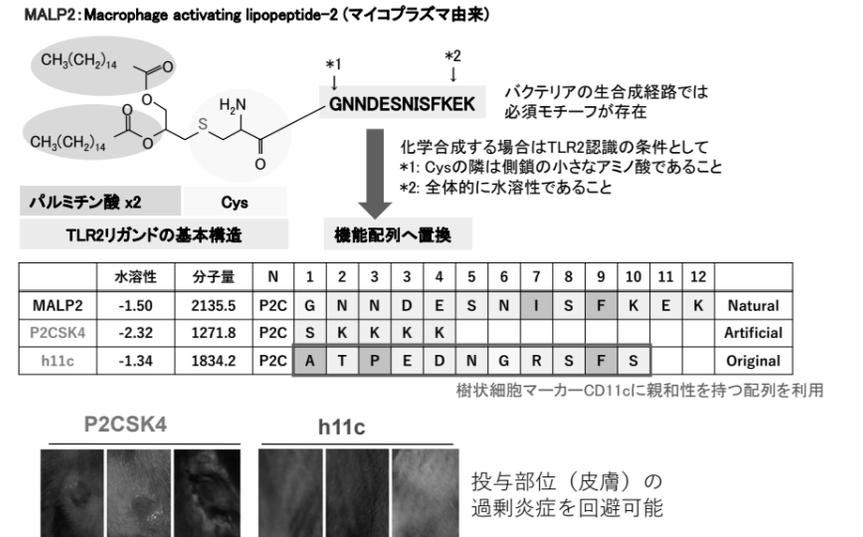


図1 アジュバント・エンジニアリング

ごく最近だが、筆者は大阪府立大学(現:大阪公立大学)の杉浦喜久弥先生・弓場英司先生との共同研究により、pH感受性ポリマーと樹状細胞標的化リポペプチドを組み合わせたリポソームワクチンの開発に成功し、論文報告している(図2) [8]。

弓場先生はpH感受性ポリマーを含む抗原封入リポソームを開発し、新しいワクチン・マテリアル、抗原送達システムを既に報告していた [9]。リポソーム複合体は樹状細胞に取り込まれた後、エンドソームが酸性化していく際に、pH依存的にエンドソーム内膜との親和性を高め、融合する。リポソームとエンドソーム膜の融合により、その構造は崩壊し、細胞質中にエンドソーム及びリポソーム内容物を放出することができる。これが樹状細胞の特別な機能であるクロスプレゼンテーションを模倣する。細胞質に放出された抗原は、MHC class Iに提示される経路をたどるため、樹状細胞に高効率でクロスプレゼンテーションを誘導しCTLを活性化することができる。

筆者と10年来の共同研究者であった杉浦先生は獣医師でもあり、イヌの自然発症がんに対して、様々な免疫療法を検討していた。そして、弓場先生のマテリアルと、筆者らの樹状細胞標的化リポペプチド(TLR2リガンド)の相乗効果

を期待し、2機能を併せ持つリポソームの開発を計画した。樹状細胞標的化リポペプチドにおけるCD11c親和性配列とTLR2リガンド構造は、樹状細胞によるリポソームの取り込み効率を促進し、加えてTLRの活性化シグナルは樹状細胞の活性化・サイトカイン産生などを増強する。これまでTLR2リガンドを用いた抗がん効果の検討では、ほとんどのマウス実験モデルで完全寛解を期待することなどできなかったが、このリポソーム複合体は60%のマウスで完全寛解を誘導するほどの効果を認めた。本研究は、杉浦先生が大阪公立大学にて、実際の臨床開発で使用可能な抗原・タンパクを選定するステップに進めている。

**大阪国際がんセンターでの新たな取り組み：
In situ vaccination 戦略の実現と Immunogenic cell death (免疫原性細胞死) の理解へ**

2018年、筆者の赤澤は、大阪国際がんセンター研究所内で、がん創薬部に籍を移し田原秀晃先生の下、新たながん免疫療法の開発に取り組み始めた。筆者らが特に注目する戦略として *in situ vaccination* を掲げている。すなわち、がん細胞に対して「元ある場所」で細胞死を起こさせることにより免疫応答を

誘導する戦略である。この考えは生体内で Immunogenic cell death (免疫原性細胞死) を誘導することが前提となり、その理解が必要となる。

免疫原性細胞死の標準的な評価方法として、そのままの実験系が提唱されている(図3) [10]。1. *In vitro* でがん細胞を抗がん剤処理する。2. 処理後のがん細胞(死細胞)をマウスにワクチンとして接種する。3. 生きたがん細胞を移植し、生着するか拒絶するかを確認する。単純な評価系であるが、化合物のスクリーニングなどでこうした実験は難しく、代替的な *in vitro* のスクリーニング系が模索されていた。その代表的なものが、免疫原性細胞死に関連する典型的3 signalである(図4) [11]。これらの「がん細胞が死んだ時に放出される樹状細胞活性化因子・シグナル」として「Eat me signal」「Find me signal」「Danger signal」の3つは古くから免疫原性細胞死の定義に近い形で提唱されていた。樹状細胞ががん細胞を発見し、貪食・抗原提示、そしてCTLの活性化にいたるまでの一連の経緯が端的にまとめられており、これまでの研究背景からも免疫原性細胞死を紐解く上で理にかなったものであった。この3 signalを基に新たな免疫原性細胞死誘導性抗がん剤のスクリーニングなども試みられたが、3 signalの全てが揃うことは必須条件ではなかったと思われる [12]。現在では典型的な3 signalに加えて、Don't eat me signalや種々のサイトカインなど、様々な因子やシグナルが追加され、免疫原性細胞死に見られる候補現象が列挙されているに過ぎず、定義とは少し意味合いが変わってきている。また、近年の論文では *in vivo* の標準評価をなさないまま、*in vitro* でのこうした因子の誘導を持って、免疫原性細胞死を提唱する報告も多くなり、検索や判断が難しくなっている。

**In situ vaccination 戦略の可能性：
Abscopal effect と 2 周目の Cancer Immunity Cycle**

実際の臨床の間では様々な抗がん剤が応用されており、生体内で多くのがん細胞が細胞死に至っている訳だが、*In*

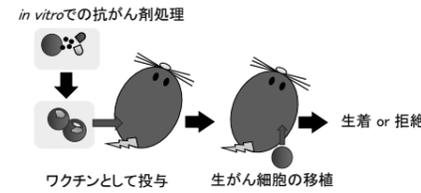


図3 Immunogenic cell deathの標準評価

situ vaccination に相当する現象、免疫誘導による間接的な抗がん作用が本当に起こっているのか疑問が残るところである。しかし、臨床やいくつかの実験系において確かにその現象が確認されている例を紹介したい。

その一つが Abscopal effect である(図5)。PubMedで調べる限り Abscopal effect というキーワードは1950年代より見つけることができる。2010年まで年間数本レベルしかこのキーワードでヒットしないが、この10年で飛躍的にその本数が増加している。原発層と転移層が存在する患者において、原発層に対して治療処置を行い、部分的に細胞死を誘導すると、転移層に対しても免疫系を介した抗がん効果が引き起こされるという現象である。典型的な Abscopal effect は原発層を放射線処理したものであったが、「遠くにその効果を送達する」という語源が示すように、近年では原発層に対する処置は、抗がん剤、免疫アジュバント、樹状細胞の注入なども含まれているようだ。

マウスにおいては、背部皮下・両脇に移植した独立腫瘍に対して、片側を原発巣、もう片側を転移巣に見立てた実験系が多々報告されている。仮想原発巣に対する直接的な処置により、がん細胞に細胞死が誘導され、樹状細胞などの抗原提示細胞がこれを捕食・抗原提示することによってCTLを活性化し、遠隔転移層に到着したCTLが抗がん効果・腫瘍の縮小に働く。まさに、*In situ vaccination* と同じ作用機序に基づく現象と言える。

また、放射線照射がん細胞の周辺細胞に対しては bystander 効果と呼ばれる現象が研究されている。放射線照射細胞から放出される細胞外小胞(EV)や活性酸素種が周辺のがん細胞に対して、放射線を浴びた細胞と同等の効果を誘導する現象

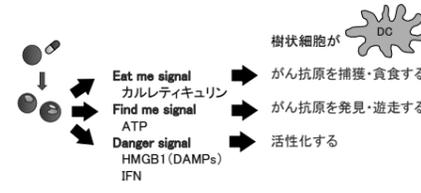


図4 Immunogenic cell deathの典型的3シグナル

である。EVは周辺のがん細胞のみならずマクロファージに作用することなどが報告されており、がん免疫に有効に働く傾向があるとみられている。

一方、先に紹介した我々の報告：リポソームワクチンにおいても興味深い結果が得られている。すなわち Cancer Immunity Cycle が2周目に入ることにより認められる現象である。Cancer Immunity Cycle は多くの研究者に認知された仮説であり、一般に、最初の免疫応答によって、がん組織に死細胞が誘導され、がん抗原が放出される。そこから2周目の免疫応答として新たな抗原応答が増幅するというものである。しかし、理屈は分かるが本当にサイクルになっているのか？ 実際におこっているのか？ 多くの研究者が疑問を持つ部分であり、筆者もその一人であった。

筆者らの研究では、胸腺細胞腫由来の元株EL4へ疑似がん抗原としてOVA(卵白アルブミン)を遺伝子導入したがん細胞株E.G7-OVAを用いた検討において、それが見られている。E.G7-OVA移植マウスに対して、リポソームワクチン内にOVAタンパクを封入してワクチン治療を行うと、OVA特異的CTLが誘導され、OVA遺伝子導入株E.G7-OVAの退縮が認められる。その際、脾臓細胞を回収して、E.G7-OVAおよび元株のEL4に対する細胞傷害活性を測定する

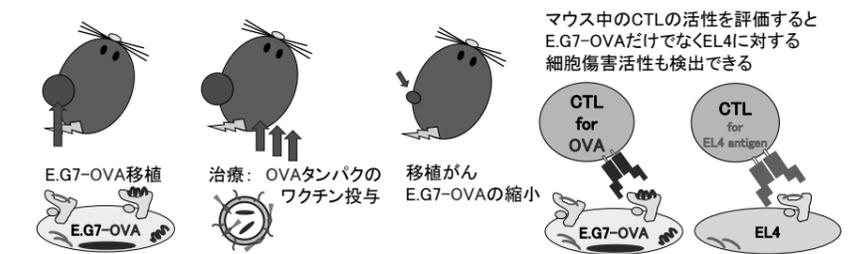


図6 標的細胞から放出される抗原への2次的な免疫応答

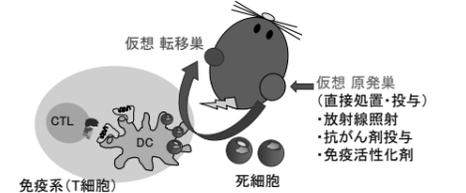


図5 Abscopal Effect

と、EL4に対しても特異的な細胞傷害活性を持つことが明らかとなった(図6)。すなわち、OVA抗原に対する免疫誘導を処置しただけの実験系において、マウスがEL4に対する傷害活性を獲得したことは、OVA遺伝子導入株が殺傷された際に元株由来の内因抗原が放出され、新たな免疫応答が誘導されたことを意味する(図7)。これが2周目の Cancer Immunity Cycle であり、まさに、*In situ vaccination* や免疫原性細胞死に関連する現象と捉えることができる。

おわりに

Abscopal effect や2周目の Cancer Immunity Cycle の結果から鑑みれば、生体内で免疫原性細胞死を誘導し、*in situ vaccination* を成立させることは可能と考えられる。しかし、通常の抗がん剤治療・放射線治療において出現している細胞死と何が異なるのか？ その切り口はあらゆる角度から講じることが可能で、筆者らもまた、いくつかのアプローチを試みている。また、この分野に関していえば、*in vitro* 評価系のみで落とし込めるほど理解が進んでいないと考えるべきであり、免疫研究の難しさ、動物実験の重要性を痛感する課題でもある。それゆえ、まだ評価されていない新しい発見が多く眠っていると期待している。

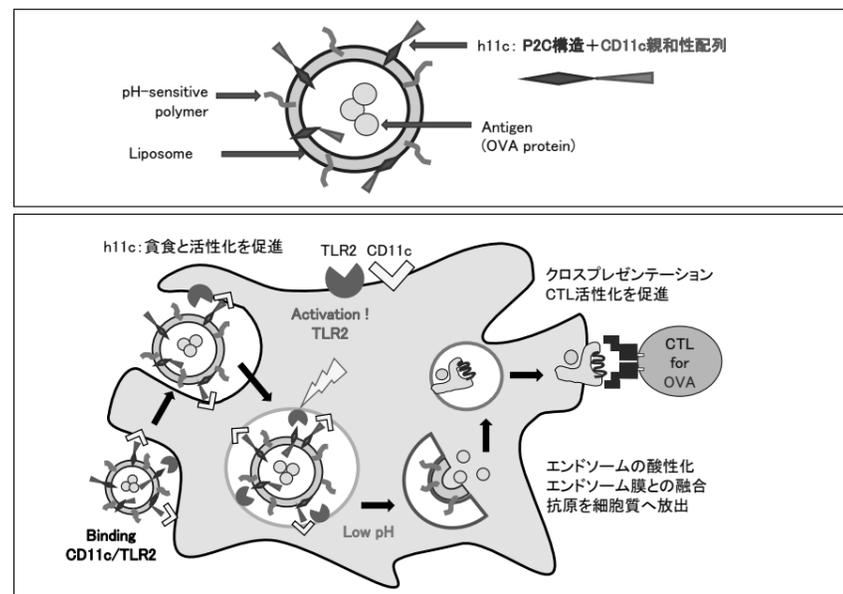


図2 pH感受性ポリマーとTLR2リガンドを持つ新規リポソームワクチン

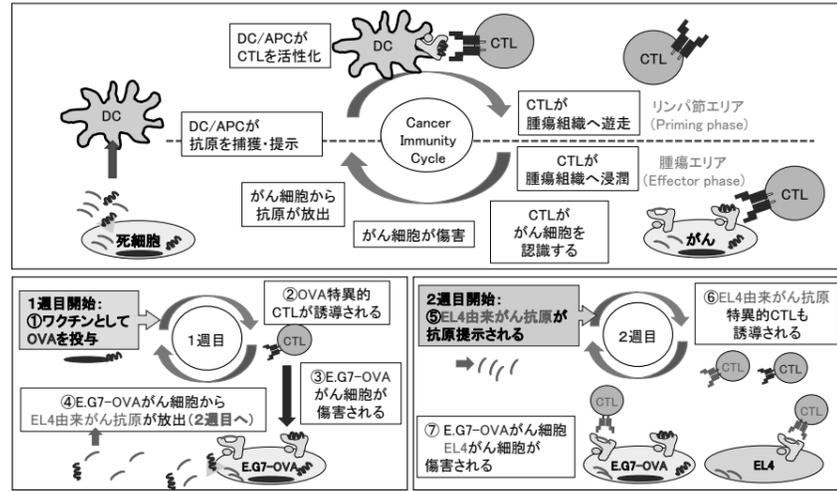


図7 2週目の Cancer Immunity Cycle

Reference

- 1.Akazawa T, et al. Cancer Res. 2004 Jan 15;64(2):757-64.
- 2.Kodama K, et al. Surg Today. 2009;39(3):194-200.
- 3.Akazawa T, et al. PNAS. 2007 Jan 2;104(1):252-7.
- 4.Akazawa T, et al. Int J Cancer. 2014 Dec 15;135(12):2847-56.
- 5.Akazawa T, et al. Cancer Sci. 2010 Jul;101(7):1596-603.
- 6.Akazawa T, et al. Cancer Sci. 2018 May;109(5):1319-1329.
- 7.Shime H, et al. J Immunol. 2008 Jun 1;180(11):7175-83.
- 8.Watanabe S, et al. Vaccine. 2022 Mar 1;40(10):1448-1457.
- 9.Yuba E, et al. Biomaterials. 2013 Apr;34(12):3042-52.
- 10.Kepp O, et al. Oncoimmunology. 2014 Dec 13;3(9):e955691.
- 11.Bezu L, et al. Front Immunol. 2015 Apr 24;6:187.
- 12.Sukkurwala AQ, et al. Oncoimmunology. 2014 Apr 16;3:e28473.



赤澤 隆

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター研究所 がん創薬部 主任研究員
 大阪府立大学（大阪公立大学）生命環境科学研究科 客員教授

1994年 北海道大学 薬学部 卒業
 1999年 北海道大学 薬学研究科 博士課程修了
 2002年 大阪府立成人病センター 疫学部門 研究員
 2012年 大阪府立成人病センター 分子遺伝学 主任研究員
 2017年 地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター研究所 腫瘍免疫学 主任研究員
 2019年 地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター研究所 がん創薬部 主任研究員
 2019年 大阪府立大学 生命環境科学研究科 客員教授（兼任）



田原 秀晃

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター研究所 がん創薬部 部長
 東京大学 医科学研究所 がん生体分子治療社会連携研究部門 特任教授

1983年 大阪大学医学部卒業、大阪大学医学部第二外科（現 消化器外科） 研修医
 1984年 大阪府立成人病センター外科 レジデント
 1987年 大阪大学医学部第二外科（現 消化器外科） 医員
 1991年 ビッツバーグ大学医学部外科 Research Fellow
 1992年 同 Assistant Professor
 1995年 同 分子遺伝生化学科 Assistant Professor（併任）
 1999年 東京大学医科学研究所外科 助教授
 2000年 東京大学医科学研究所附属病院外科・先端医療研究センター臓器細胞工学分野 教授
 2018年 東京大学医科学研究所 がん生体分子治療社会連携研究部門 特任教授
 2018年 地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター研究所 がん創薬部 部長（兼任）