

令和元年5月27日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15623

研究課題名(和文) 免疫抑制機構克服とオートファジー誘導ウイルス療法を併用した新規膵癌治療の開発

研究課題名(英文) Novel pancreatic cancer treatment combining immune suppression mechanism and autophagy induction virus therapy

研究代表者

山上 裕機 (Hiroki, Yamaue)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20191190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：切除不能膵癌患者3例からiPS細胞を誘導した。膵癌患者から得られたiPS由来DCの細胞表面マーカーの相違、抗原提示能および遊走能を指標とした成熟能の相違をFACS、IL-12 ELISA、IFN-gamma ELISAで確認した。結果、膵癌患者iPS細胞由来樹状細胞は健常人と同様に細胞表面マーカーの発現ならびに成熟能を認めた。癌抗原遺伝子の発現は全例にWT1を認めた。WT1遺伝子をiPS-DCにadenovirus vectorで導入し、同一患者から採取した末梢血単核球を混合培養し、WT1特異的なCTLを誘導した。CTL誘導能はクロムリリースアッセイを用いて測定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は5年生存率が10%以下と難治癌であることは周知の事実である。私達は、以前より膵癌に対する癌ワクチン療法の基礎研究を行ってきた。今回、膵癌患者においてiPS細胞由来樹状細胞を誘導し、WT1遺伝子を導入し、CTLを誘導した。CTLはWT1発現腫瘍細胞を特異的に攻撃することを確認した。現在臨床試験に向けてさらなる検討を行っている。本研究が臨床応用されれば、世界初のiPS細胞を用いた膵癌ワクチン療法となり、難治癌で苦しむ患者さんに希望を与えたとともに、現在停滞している日本の癌遺伝子免疫治療においてブレークスルーとなる。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether genetically modified human induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived dendritic cells (hiPSCDCs) expressing WT1 could induce WT1-specific cytotoxic T cells in pancreatic cancer patients. We differentiated hiPSCDCs from iPSCs of three pancreatic cancer patients and transduced the WT1 cDNA into hiPSCDCs. The surface marker expression, cytokine secretion and migratory capacity of hiPSCDCs were equivalent in healthy donors. After three cycles of stimulation of autologous peripheral blood mononuclear cells by genetically modified hiPSCDCs, cytotoxicity was assessed using 51Cr release assay. The cytotoxic T cells induced by hiPSCDCs-WT1 exhibited WT1-specific cytotoxic activity against the target cells expressing WT1. Genetically modified iPSCDCs expressing WT1 is a promising tool for clinical application on vaccine therapy against pancreatic cancer patients.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：iPS細胞 樹状細胞 膵癌 WT1 癌ワクチン 免疫遺伝子治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、膵癌の治療成績向上のために、科学研究費補助金基盤研究基盤B-23390331 (2011-2013) および基盤B-26293308 (2014-2017)でHLA-A*2402 拘束性のエピトープペプチドを同定した (*Cancer Sci*, 2009, *Pancreas* 2010, *Cancer Sci*, 2010, *J Biomed Biotechnol* 2012, *Cancer Sci* 2012, *Genome Res* 2012, *Cancer Sci* 2014)。また、腫瘍溶解性ヘルペスウイルスの遺伝子改変に取り組み、腫瘍特異的なOncolytic virus の作成に成功した(*Int J Cancer* 2012)。また、科学研究費補助金 (2011-2012) 萌芽研究23659622 では、網羅的遺伝子解析により膵癌転移・浸潤を規定する遺伝子群を同定し、遺伝子改変ヘルペスウイルスに導入すると同時に (*Int J Cancer* 2012)、さらにオートファジー (Autophagy) 促進の鍵となるBeclin-1 遺伝子 (Pattingre et al. *Cell* 2005) 導入により、さらに治療効果を上げる基礎研究を行ってきた。また、induced pluripotent stem cell (iPS 細胞)からオートファゴソーム発現遺伝子導入樹状細胞 (dendritic cell; DC) を分化誘導させた (*Int J Cancer* 2013)。さらに、近年、免疫抑制機構を担う分子であるCTLA-4, PD-1, PD-L 1 に対する抗体療法が着目されているが (Topalian et al, *NEJM* 2012)、膵癌に対する治療効果は報告がなく、ウイルス免疫療法との併用も本研究が全く初めてのものである。

2. 研究の目的

膵癌切除症例 3 例より、iPS 細胞を CiRa protocol を用いて誘導し、樹状細胞へと分化誘導する。膵癌切除標本より候補 TAA を免疫染色、FACS を用いて検討し、iPS 細胞由来樹状細胞に遺伝子導入する。TAA 遺伝子導入 iPS 細胞由来樹状細胞を用いて、*in vitro* 細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) を誘導する。この CTL が膵癌腫瘍細胞に対して、殺腫瘍効果を発揮するか否かを検討する。本基礎研究にて、難治性膵癌に対する新規がん遺伝子免疫治療を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は当大学の倫理委員会の承諾を得た後、膵癌患者を用いた研究を行った。研究プロトコールは UMIN 登録 (UMIN000021105) した。

(1) 膵癌患者 3 症例の末梢血単核球よりセンダイウイルスベクターを用いて Yamanaka 4 factor を導入し iPS 細胞を誘導した。

3 名の膵癌患者 (HLA-A24/02, HLA-A24/02, HLA-A24/11) の末梢血単核球の初代培養を行い、センダイウイルスベクター (DNAVEC Corporation) にて山中 4 因子を遺伝子導入し、iPS 細胞の樹立を行った。得られた iPS 細胞を Matrigel コートした dish でフィーダーレス培養を行い、その後 5 ステップで分化誘導を行った。第 1 に bone morphogenetic protein (BMP)4 を添加し 4 日間培養した。第 2 に vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (b-FGF), stem cell factor (SCF) を添加した StemPro-34 (Thermo Fisher Scientific) に置き換え 2 日間培養した。第 3 に SCF, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), thrombopoietin (TPO), Fms-related tyrosine kinase (Flt) -3 ligand, interleukin (IL) -3 を添加した StemPro-34 に変更し、7 日間培養した。第 4 に M-CSF, Flt-3 ligand, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) を添加した StemPro-34 に変更し、3 日間培養した。浮遊してくる細胞を CD14 抗体で標識し、auto MACS Pro (Miltenyi Biotec) にて分離した。第 5 に回収した細胞を GM-CSF, IL-4 を加え 5 日間培養し、その後 maturation cocktail として prostaglandin E2 (PGE2), IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF) - α を添加し 2 日間培養後に浮遊細胞を回収した。

(2) iPS からの DC への分化誘導を 5 step 法を用いて行った。膵癌患者で得られた iPS 細胞由来 DC

の細胞表面マーカー, 抗原提示能, サイトカイン産生能, および遊走能を測定した.

膵癌患者 iPSDCs と健常人 iPSDCs の成熟能を比較検討するためにそれぞれの未成熟, 成熟 DCs にて表面マーカーの発現(CD11c ,CD80 ,CD83 ,CD86 ,CD40 ,HLA-ABC ,HLA-DR) を flow cytometry にて比較検討した .

膵癌患者 iPSDCs と健常人 iPSDCs のサイトカイン分泌能を比較検討するためそれぞれの未成熟, 成熟 DCs にてサイトカインの分泌 (IFN- γ , IL-12p70) を ELISA 法にて比較検討した .

- (3) 膵癌切除標本より CTOS 法を用いて, cell line 化し, TAA の発現を FACS にて確認した .
- (4) 膵癌患者 iPS-DC に WT1 遺伝子をアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入し, *in vitro* で CTL を誘導した . WT1 発現膵癌腫瘍を Target とし, Cr-release assay を用いて, CTL の殺腫瘍効果を検討した .

4 . 研究成果

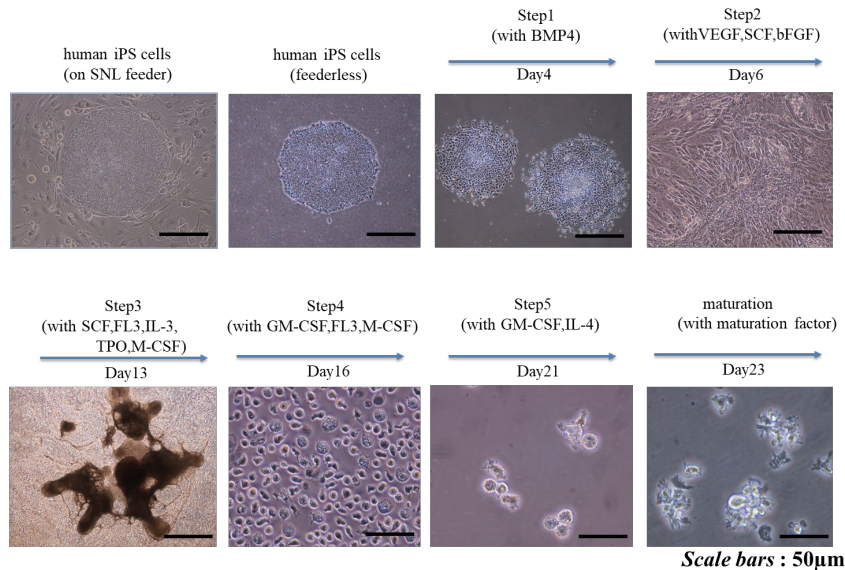
- (1) 膵癌患者 3 症例より iPS 細胞を誘導 .

iPS 細胞の未分化能を各種蛍光染色 (Nanog Oct3/4 Sox2 等)を用いて確認した .

- (2) iPS からの DC への分化誘導

- 1. 5 step 法を用いて誘導

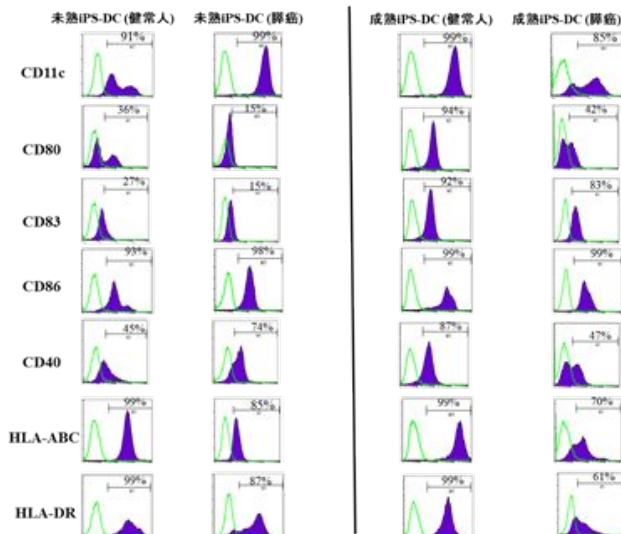
形態学的には樹状細胞と相違なかった .



Scale bars : 50 μ m

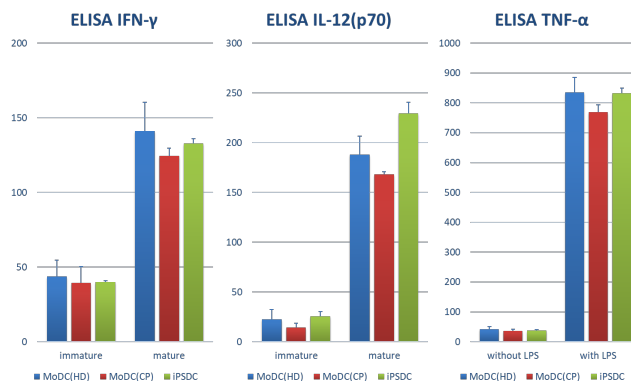
2. 細胞表面マーカー

健常人 膵癌の iPSDC の細胞表面マーカーを FACS で検討したところ, 同等の発現であった .



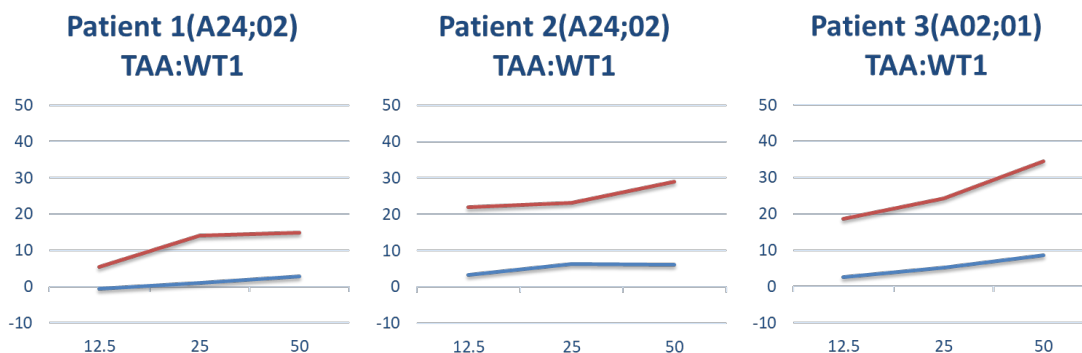
3. サイトカイン産生能

健常人 膵癌の iPSDC のサイトカイン産生能を ELISA にて測定したところ、同等であった。



(3) CTL 誘導および殺腫瘍効果

膵癌切除 3 症例とも CTOS 法で得た cell line は WT1 を発現していた。3 症例の iPS 細胞由来樹状細胞にアデノウイルスベクターを用いて WT1 遺伝子を導入し、*in vitro* CTL を誘導した。3 症例とも、WT1 遺伝子導入 iPSDC で得られた CTL は WT1 を発現する腫瘍に対して殺腫瘍効果を認めた (赤ライン) が、コントロール遺伝子 LacZ 刺激で得られた CTL は殺腫瘍効果を認めなかった (青ライン)。本研究にて、iPS 細胞由来樹状細胞は TAA 特異的な CTL が誘導可能であることことを膵癌患者を用いて世界で初めて立証した。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

尾島敏康, 山上裕機: 癌免疫カンファレンスルーム, TOPICS 3 iPS 細胞の癌免疫療法への応用, 消化器外科 41 (1): 77-80 2018

Umez D, Okada N, Sakoda Y, Adachi K, Ojima T, Yamaue H, Eto M, Tamada K. Inhibitory functions of PD-L1 and PD-L2 in the regulation of anti-tumor immunity in murine tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother.* 2019 Feb;68(2):201-211.

Tsukagoshi M, Wada S, Hirono S, Yoshida S, Yada E, Sasada T, Shirabe K, Kuwano H, Yamaue H. Identification of a novel HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope peptide derived from mesothelin in pancreatic cancer. *Oncotarget.* 2018 Jul 31;9(59):31448-31458.

Sundar R, Rha SY, Yamaue H, Katsuda M, Kono K, Kim HS, Kim C, Mimura K, Kua LF, Yong WP. A phase I/II study of OTSGC-A24 combined peptide vaccine in advanced gastric cancer. *BMC Cancer.* 2018 Mar 27;18(1):332.

Kitadani J, Ojima T, Iwamoto H, Tabata H, Nakamori M, Nakamura M, Hayata K, Katsuda M, Miyajima M, Yamaue H. Cancer Vaccine Therapy Using Carcinoembryonic Antigen - expressing Dendritic Cells generated from Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Rep.* 2018 Mar 15;8(1):4569.

Yokoyama S, Takeuchi A, Yamaguchi S, Mitani Y, Watanabe T, Matsuda K, Hotta T, Shively JE, Yamaue H. Clinical implications of carcinoembryonic antigen distribution in serum exosomal fraction-Measurement by ELISA. *PLoS One.* 2017 Aug 17;12(8):e0183337.

Yamaue H, Shimizu A, Hagiwara Y, Sho M, Yanagimoto H, Nakamori S, Ueno H, Ishii H, Kitano M, Sugimori K, Maguchi H, Ohkawa S, Imaoka H, Hashimoto D, Ueda K, Nebiki H, Nagakawa T, Isayama H, Yokota I, Ohashi Y, Shirasaka T. Multicenter, randomized, open-label Phase II study comparing S-1 alternate-day oral therapy with the standard daily regimen as a first-line treatment in

patients with unresectable advanced pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017 Apr;79(4):813-823.

Miyazawa M, Katsuda M, Maguchi H, Katanuma A, Ishii H, Ozaka M, Yamao K, Imaoka H, Kawai M, Hirono S, Okada KI, Yamaue H. Phase II clinical trial using novel peptide cocktail vaccine as a postoperative adjuvant treatment for surgically resected pancreatic cancer patients. *Int J Cancer.* 2017 Feb 15;140(4):973-982.

〔学会発表〕(計 11 件)

尾島敏康：iPS 細胞由来樹状細胞を用いた癌ワクチン療法 日本消化器癌発生学会特別推進研究 理事長直轄プロジェクト 2017, 3 博多

尾島敏康, 岩本博光, 北谷純也, 田端宏堯, 中森幹人, 中村公紀, 勝田将裕, 早田啓治, 竹内昭博, 山上裕機：Cancer Vaccine Therapy using iPS-derived Dendritic Cells 第 25 回日本癌病態治療研究会, 2016.6. 千葉

尾島敏康 岩本博光 北谷純也 田端宏堯 中森幹人 中村公紀 勝田将裕 早田啓治 加藤智也 竹内昭博 山上裕機：iPS 細胞由来樹状細胞を用いた癌ワクチン療法 第 54 回日本癌治療学会学術集会, 2016. 10. 横浜

Ojima T, Kitadani J, Iwamoto H, Nakamori M, Nakamura M, Yamaue H: Feasibility of Cancer Vaccine Therapy using Dendritic Cells Generated from Induced Pluripotent Stem Cells Expressing Carcinoembryonic Antigen. *ASCO 2017*, 2017. 6. Chicago

尾島敏康, 岩本博光, 北谷純也, 田端宏堯, 出口真彰, 中森幹人, 中村公紀, 勝田将裕, 早田啓治, 山上裕機：iPS 細胞由来樹状細胞を用いたテラーメード癌ワクチン療法．第 30 回 日本バイオセラピィ学会学術集会 <シンポジウム> 2017.11. 岐阜

尾島敏康, 岩本博光, 北谷純也, 田端宏堯, 出口真彰, 中森幹人, 中村公紀, 勝田将裕, 早田啓治, 山上裕機：iPS 細胞由来樹状細胞を用いた癌ワクチン療法 第 118 回日本外科学会学術集会 <外科学の新知見> 2018. 4. 東京

尾島敏康, 岩本博光, 北谷純也, 田端宏堯, 出口真彰, 山上裕機：iPS 細胞由来樹状細胞を用いたテラーメード癌ワクチン療法．第 17 回日本再生医療学会総会 2018. 3. 横浜

尾島敏康, 岩本博光, 北谷純也, 田端宏堯, 出口真彰, 中森幹人, 中村公紀, 勝田将裕, 早田啓治, 山上裕機：iPS 細胞由来樹状細胞を用いたテラーメード癌ワクチン療法．第 39 回癌免疫外科研究会 2018. 5. 岐阜

尾島敏康 岩本博光 北谷純也 田端宏堯 出口真彰 丸岡慎平 中森幹人 中村公紀 勝田将裕 早田啓治 山上裕機：iPS 細胞由来樹状細胞を用いた新規がんワクチン療法の構築．第 119 回日本外科学会定期学術集会 <ワークショップ> 2019. 4. 大阪

尾島敏康 岩本博光 北谷純也 田端宏堯 出口真彰 中森幹人 中村公紀 勝田将裕 早田啓治 丸岡慎平 山上裕機：Cancer vaccine therapy using iPS-derived dendritic cells．第 56 回日本癌治療学会学術集会 2018. 10. 大阪

尾島敏康 岩本博光 北谷純也 田端宏堯 出口真彰 中森幹人 中村公紀 勝田将裕 早田啓治 丸岡慎平 山上裕機：Cancer vaccine therapy using iPS-derived dendritic cells．第 77 回日本癌学会学術総会 2018. 9. 大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中森幹人

ローマ字氏名：Nakamori Mikihito

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：外科学第2講座

職名：准教授

研究者番号（8桁）：10322372

研究分担者氏名：川井 学

ローマ字氏名：Kawai Manabu

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：外科学第2講座

職名：准教授

研究者番号（8桁）：40398459

研究分担者氏名：尾島敏康

ローマ字氏名：Ojima Toshiyasu

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：外科学第2講座

職名：講師

研究者番号（8桁）：60448785

研究分担者氏名：廣野誠子

ローマ字氏名：Hirono Seiko

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：外科学第2講座

職名：講師

研究者番号（8桁）：60468288

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：