

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10521

研究課題名(和文) 免疫チェックポイントを阻害したiPS細胞由来樹状細胞による新規癌免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of the new cancer immunotherapy using iPS-DC which inhibited immune checkpoint

研究代表者

中村 公紀(Nakamura, Masaki)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80364090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前より樹状細胞(dendritic cell;DC)を用いた細胞傷害性T細胞(CTL; cytotoxic T lymphocyte)による抗腫瘍効果の有用性を報告してきた。今回、消化器固形癌患者から樹立したiPS細胞よりDCを分化誘導させ(iPSDC)、その機能解析を行った。さらに生体内でCTL誘導能の高いDCであるXCR1+ DCに特異的に遊走されるXCL1に連結させたペプチドワクチンを作成し、腫瘍増殖抑制効果の検討を行った。結果、消化器固形癌患者iPSDCはMonocytes由来DC以上の機能を有し、さらに連結ワクチン療法と抗PD-1抗体併用による抗腫瘍効果の増強を証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、消化器固形癌患者から樹立したiPS細胞からDC(iPSDC)を分化誘導し、その機能を明らかにした。さらに細胞傷害性T細胞(CTL)誘導能の高いペプチドワクチンの作成に成功し、免疫チェックポイント阻害併用による腫瘍増殖抑制の上乗せ効果を証明した。本研究の結果は、ヒト消化器癌に対する免疫チェックポイント阻害機構を併用したDCワクチン療法の臨床応用を立ち上げることに極めて重要な根拠となると考える。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we induced the iPSDCs from gastrointestinal solid cancer patients, and compared those iPSCs with MoDC from those patients. Moreover, we improved cancer peptide vaccination by targeting Ag peptides selectively to a DC subset, XCR1-expressing DCs (XCR1+ DCs), with high ability to support CD8+ T-cell responses. We have generated a fusion protein, consisting of an Ag peptide presented with MHC class I, and an XCR1 ligand, XCL1, and examined its effects on antitumor immunity in mice. Our results showed that the iPSCs from gastrointestinal solid cancer patients had increased cytokine production and migration ability compared to MoDC from those patients. Moreover, we showed that the fusion protein plus poly(I:C) inhibited the tumor growth efficiently in the prophylactic and therapeutic tumor models. Furthermore, the fusion protein plus poly(I:C) showed suppressive effects on tumor growth in synergy with anti-PD-1 Ab.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：樹状細胞 iPS細胞 癌免疫療法

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、以前より癌特異的ワクチン療法として、樹状細胞(dendritic cell;DC)を用いた細胞傷害性 T 細胞(CTL;cytotoxic T lymphocyte)による抗腫瘍効果の有用性を報告してきた。マウス大腸癌細胞株 CT26 の腫瘍抗原遺伝子 gp70 を GM-CSF 遺伝子と同時に DC に導入し、この DC をマウスに投与することでCT26に対する極めて強いCTLの抗腫瘍免疫反応が誘導されることを報告した (*Clin Cancer Res* 8:2742-2749, 2002, *Oncology* 68: 163-170, 2005)。さらに改良を加え、IL-12 の遺伝子やユビキチン遺伝子を腫瘍抗原遺伝子導入 DC に同時導入し、強力な CTL の誘導を証明した (*Int J Cancer* 120:585-593, 2006, *Int J Oncol* 28:947-953, 2006, *Int J Oncol* 31:931-939, 2007, *Cancer Sci.* 99:407-13, 2008, *Cancer Lett.* 305:32-9, 2011)。また、さらには DC の安定した増幅を目的とし、iPS(induced pluripotent stem cell)細胞から DC を分化させ、その機能が骨髄細胞由来の DC(BMDC)の機能を担保することも証明した (*Int J Cancer.* 134:332-41, 2014.)。このように DC を用いた癌免疫治療は特異的に癌細胞を攻撃する最も有効な癌治療法の一つである。

しかしながら、これまでの研究は、CTL を中心とするエフェクター機能の増強に重点を置いて研究を行ってきたが、担癌状態では免疫逃避メカニズムが働き、腫瘍免疫療法の大きな障害となっている。その要因となるのが免疫チェックポイントである。つまり、癌細胞は免疫チェックポイント分子を活性化することによって、免疫システムの監視から巧妙に逃れていると考えられる。重要な免疫チェックポイント分子として、PD-1(programmed death-1)および CD47 が報告されている (*Science.* 352:227-31, 2016)。PD-1 は T 細胞の表面に発現し、一方 PD-1 のリガンドである PD-L1 および PD-L2 は、通常抗原提示細胞、つまり樹状細胞の表面上に発現する。PD-1 は、PD-L1 あるいは PD-L2 と相互作用することにより T 細胞の活性化を抑制し、腫瘍免疫に対する腫瘍細胞の抵抗性を示すことが明らかにされている (*Nat. Immunol.* 14:1212-18, 2013)。一方、CD47 は、“don't eat me” シグナルとして知られ、癌細胞に高く発現し、樹状細胞およびマクロファージによる貪食から自らを逃避させ、免疫担当細胞からの攻撃を回避していると報告されている (*Nat Med.* 21:1209-1215, 2015)。DC にはそのリガンドである signal regulatory protein- $\alpha$  (SIRP $\alpha$ )が高発現しており、CD47-SIRP $\alpha$  系の作用が DC による貪食の抑制、免疫機能の制御に大きく関与しているとされている。したがって、これらの二つの免疫チェックポイントを腫瘍局所において阻害し免疫逃避機構を抑制することは、抗腫瘍免疫の抑制の制御につながり、さらなる抗腫瘍効果の増強が期待できると考えた。

### 2. 研究の目的

癌局所の免疫環境において、CTL の誘導を増強させる一方、免疫抑制作用を有する PD-1/PD-L1、PD-L2 系、CD47/SIRP $\alpha$  系の免疫チェックポイントを、iPS 細胞から誘導した DC 上で阻害し免疫逃避機構を破壊することにより、消化器癌の癌免疫療法の有効性を高めることを目的として研究を開始した。しかし、PD-L1siRNA、PD-L2siRNA を組み込んだアデノウイルスベクターの作製・調整および iPS 細胞から CTL への誘導に難渋したため、治療計画を一部変更し、消化器固形癌患者由来の iPS 細胞由来 DC(iPSDC)を用いた癌ワクチン療法の検討およびケモカインを利用した DC サブセットへの癌抗原送達システムと免疫チェックポイント阻害剤併用による抗腫瘍効果の検討を行なった。

### 3. 研究の方法

#### I. 消化器固形癌患者由来 iPSDC の分化誘導とその機能解析

(1) 健常人由来 iPSDC と消化器固形癌患者由来 iPSDC の誘導効率、成熟性における比較検討

(a) 消化器固形癌患者 PBMC から iPS 細胞の樹立:

患者から採取した採血 30~50ml より、Ficol 法を用いて PBMC を分離抽出し、7 日目に Yamanaka4 因子の遺伝子導入を行い laminin coating dish に播種。day18 以降に colony が確認された後に約 3 週間拡大培養を行い、iPS 細胞の分化誘導を行った。

(b) 消化器固形癌患者 iPSDC の分化誘導:

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<sup>®</sup>-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<sup>®</sup>-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<sup>®</sup>-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 2 日間 maturation cocktail として prostaglandin E2 (PGE2)、IL-1 $\beta$ 、IL-6、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  を添加し浮遊細胞を回収した。

(c) 消化器固形癌患者 iPSDC、健常人 iPSDC の細胞表面マーカー比較検討:

表面マーカーの発現 (CD11c、CD80、CD83、CD86、CD40、HLA-ABC、HLA-DR)に関して、未成熟、

成熟 DC についてフローサイトメトリーにて比較検討した。

(2) 消化器固形癌患者の iPSDC、および Monocytes 由来 DC (MoDC) の成熟能、遊走能について比較検討

(a) 消化器固形癌患者 iPSDC, MoDC の細胞表面マーカーの比較 :

表面マーカーの発現 (CD11c, CD80, CD83, CD86, CD40, HLA-ABC, HLA-DR) に関して、未成熟、成熟 DC についてフローサイトメトリーにて比較検討した。

(b) 消化器固形癌患者由来 iPSDC と MoDC の cytokine 産生能の比較 :

それぞれの未成熟、成熟 DC にてサイトカインの分泌 (IFN- $\gamma$ 、IL-12p70) を ELISA 法にて比較検討した。

(c) 消化器固形癌患者 MoDC と iPSDC の遊走能の比較 :

8.0  $\mu$ m pore transwell plate (Corning) の lower chamber に 100ng/ml macrophage inflammatory protein (MIP)-3 $\beta$  を添加した AIM-V medium を 1ml 加えた。未成熟、成熟ヒト iPSDC または、MoDCs を 1.5x10<sup>6</sup> cells/ml の細胞濃度で AIM-V medium に suspend し、0.1ml を upper chamber に添加した。37°C, 5% CO<sub>2</sub> で 2 時間インキュベートし、lower chamber 内に遊走してきた DC をセルカウントし、それぞれ比較検討した。

II. ケモカインを利用した樹状細胞サブセットへのがん抗原送達システムと免疫チェックポイント阻害剤併用による抗腫瘍効果の検討

(1) XCL1-がん抗原ペプチド連結ワクチンの作成 :

抗原として卵白アルブミン (Ovalbumin, OVA) 由来の MHC class I 拘束性ペプチドである OT-I (OVA<sub>257-264</sub>) を用いマウス XCL1 と連結させたワクチン (XCL1-OT-I) を作成

(a) XCL1-OT-I 発現 Vector の構築

(b) XCL1-OT-I の精製 :

293T 培養細胞に Vector を Transfection し、培養上清から発現タンパクである XCL1-OT-I を精製

(c) XCL1-OT-I 精製後の確認 :

Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining と western blotting を用いて確認

(2) XCL1-OT-I 連結ワクチンの機能解析 :

XCL1-OT-I が XCL1 としての機能を保持しているかどうか、XCR1+DC の遊走を migration assay で検討 : 上層に Flt3L で誘導された骨髄由来樹状細胞 (BMDC: Bone marrow DC) を入れ、XCL1-OT-I を下層として、下層に migration した BMDC を FACS で評価した。

(3) XCL1-OT-I 連結ワクチンによる XCR1+DC 上での OT-I 抗原提示能の検討 :

XCL1-OT-I 連結ワクチンにより XCR1+DC の MHC class I 上に OT-I 抗原が提示されるかを検討した。

(a) XCR1 ヘテロマウス (control) と、XCR1-欠損マウスを用いて BMDC を誘導

(b) BMDC を 0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 $\mu$ g/ml に濃度を振った XCL1-OT-I を含む medium で 6 時間培養

(c) MHC class I に発現した OT-I を FACS で解析

(4) XCL1-OT-I 連結ワクチンと他のがんワクチンとの抗原特異的 CD8+T 細胞誘導能の比較検討 :

C57BL/6 マウスに、濃度を振った XCL1-OT-I のみ、または poly (I:C) : 20 $\mu$ g を併用して皮下投与し、7 日目に脾細胞を採取・調整し、OVA<sub>257-264</sub> ペプチド 1 $\mu$ g/ml で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で 6 時間刺激して回収した細胞を用いて抗 IFN- $\gamma$  抗体で細胞内染色を行い、誘導された抗原特異的 CD8+T 細胞を FACS で評価した。次に、この抗原特異的 CD8+T 細胞の誘導が XCR1 依存性であるかどうかを検討した。

(5) XCL1-OT-I 連結ワクチンの腫瘍増殖抑制効果の検討 :

予防モデル、治療モデルにて検討した。

(6) XCL1-OT-I 連結ワクチンにより誘導された抗原特異的 CD8+T 細胞における PD-1 分子の発現と抗 PD-1 抗体併用による腫瘍増殖抑制効果の検討 :

XCL1-OT-I により誘導された抗原特異的 CD8+T 細胞における PD-1 の発現を評価した。

#### 4. 研究成果

##### I. 消化器固形癌患者由来 iPSDC の分化誘導とその機能解析

(1) 健常人由来 iPSDC と消化器固形癌患者由来 iPSDC の誘導効率、成熟性における比較検討

・ 消化器固形癌患者由来 iPSDC は健常人由来 iPSDC と比較して、形態的に全く差は認められなかった。

- ・ 分化誘導効率として、10cm dish から得られた細胞数には有意な差は認めなかった。
- ・ 消化器固形癌患者と健常人の iPSDC の細胞表面マーカーの比較にて、いずれの表面マーカーも差は認められず、同等の成熟能を有すると考えられた (図 1)。

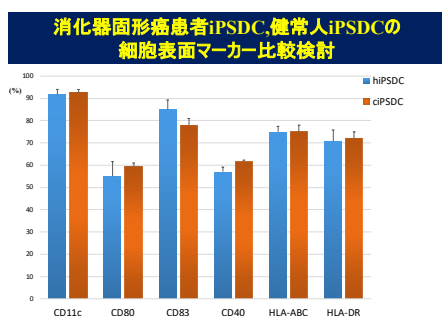


図 1

(2) 消化器固形癌患者由来 iPSDC と MoDC の成熟能、遊走能における比較検討

(a) 消化器固形癌患者 iPSDC, MoDC の細胞表面マーカーの比較 (図 2) :

患者から MoDC と iPSDC を分化誘導し比較した結果、HLA-ABC の発現が MoDC で低下し、iPSDC ではその発現の上昇を認めた。この結果から、免疫機能が安定した iPSDC を用いてワクチンすることにより、疲弊した癌免疫の回復が望める可能性があることが示唆された。

(b) 消化器固形癌患者由来 iPSDC と MoDC の cytokine 産生能の比較 (図 3) :

いずれの検討においても、MoDC と比較して、iPSDC の cytokine 産生能はほぼ同等、もしくは上昇を認めた。この結果から iPSDC が MoDC よりも cytokine 産生能が優れていることが示唆された。

(c) 消化器固形癌患者 MoDC と iPSDC の遊走能の比較 (図 4、5) :

iPSDC において MoDC と比較して遊走能が上昇し、iPSDC において CCR7 の発現が上昇していた。

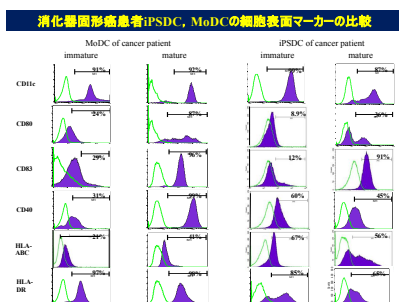


図 2

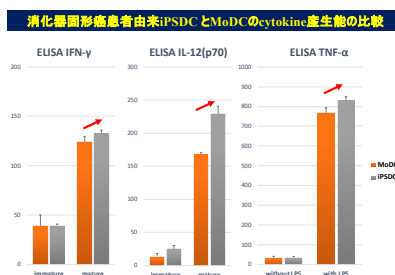


図 3

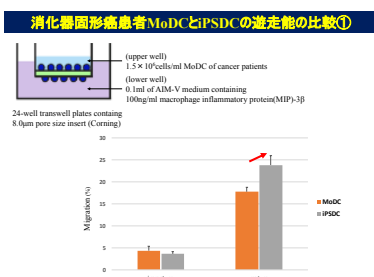


図 4

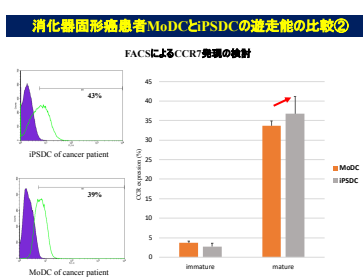


図 5

## II. ケモカインを利用した樹状細胞サブセットへのがん抗原送達システムと免疫チェックポイント阻害剤併用による抗腫瘍効果の検討

(1) Migration assay :

XCL1-OT-I に対する XCR1+DC の遊走は XCL1 に対する遊走と同様であり、XCL1-OT-I は XCL1 と同様の機能を有すると考えられた。

(2) XCL1-OT-I 連結ワクチンによる XCR1+DC 上での OT-I 抗原提示能の検討 :

XCL1-OT-I 連結ワクチンは、濃度依存的に class I 上に提示された OT-I 抗原の増加が認められた。

OT-I 抗原を、XCR1 依存的に XCR1+DC に提示することが示された。

(3) 抗原特異 CD8+T 細胞の誘導を OVA tetramer、または抗 IFN- $\gamma$  抗体で細胞内染色を行って検討したところ、PBS や OT-I ペプチド+poly(I:C)、また OVA タンパク+poly(I:C)と比較して XCL1-OT-I+poly(I:C)群で有意に抗原特異的 CD8+T 細胞が誘導された (図 6)。

(4) XCL1-OT-I 投与群では、予防モデル、治療モデルともに有意に腫瘍の増殖が抑制された (図 7)。

(5) XCL1-OT-I 連結ワクチン投与群で、抗原特異的 CD8+T 細胞の 90%以上に PD-1 発現の増加を認めた。さらに XCL1-OT-I 連結ワクチンに 抗 PD-1 抗体を併用投与することで腫瘍増殖抑制の上乗せ効果が認められた (図 8、9)。

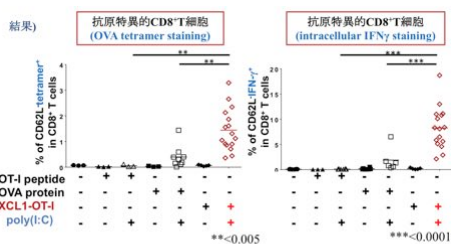


図 6

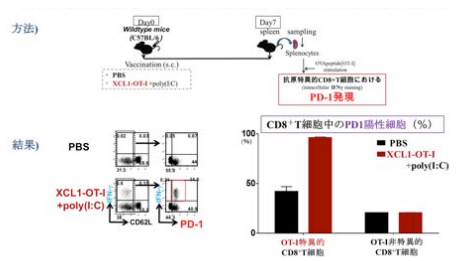


図 8

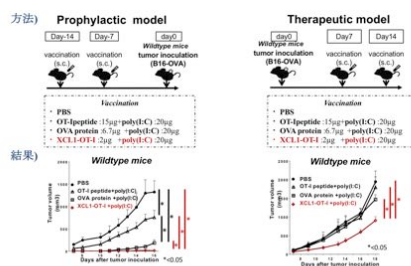


図 7

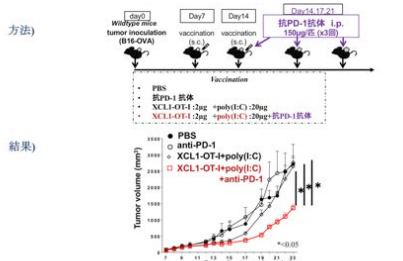


図 9

### 小括 (I)

- ・ 消化器固形癌患者由来 iPSDC の分化誘導を行った。消化器固形癌患者 MoDC と比較して cytokine 産生能、遊走能が上昇していた。
- ・ 消化器固形癌患者の MoDC は成熟能、遊走能が低下しており、iPSDC にリプログラミングを行うことでそれらの回復が期待できると考えられた。

### 小括 (II)

- ・ がん抗原ペプチドを、XCL1 を介して生体内で XCR1+DC に送達させるシステムは、著明に抗原特異的 CD8+T 細胞を誘導し、強力な腫瘍増殖抑制効果を示した。
- ・ XCL1-OT-I 連結ワクチンと抗 PD-1 抗体を併用投与することで、腫瘍増殖抑制効果を相乗的に高めることができた。

## 5. 総括

今後、ヒト消化器癌に対して免疫チェックポイント阻害機構を併用した DC ワクチン療法の臨床応用を目指し、さらに強力な癌免疫療法の開発を進めていく予定である。

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 0件）

1. 著者名 Yuki Mizumoto, Hiroaki Hemmi, Masahiro Katsuda, Yuji Kitahata, Atsushi Miyamoto, Mikihiro Nakamori, Toshiyasu Ojima, Kenji Matsuda, Masaki Nakamura, Yuri Fukuda-Ohta, Masanaka Sugiyama, Tomokazu Ohta, Takashi Orimo, Soichiro Okura, Izumi Sasaki, Koji Tamada, Hiroki Yamaue, Tsuneyasu Kaisho	4. 巻 122
2. 論文標題 Anticancer effects of chemokine-directed antigen delivery to a cross-presenting dendritic cell subset with immune checkpoint blockade	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1185-1193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-0757-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 勝田 将裕、宮澤 基樹、中森 幹人、中村公紀、川井学、尾島 敏康、北畑 裕司、水本 有紀、宮本篤、山上 裕機
2. 発表標題 膵臓癌に対するがんワクチン療法開発の現状と展望
3. 学会等名 第 73 回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 勝田将裕、宮澤基樹、中森幹人、中村公紀、川井 学、尾島敏康、岡田健一、廣野誠子、早田啓治、北畑裕司、水本有紀、宮本 篤、小林良平、山上裕機
2. 発表標題 がん免疫療法のUp to Date がんワクチン療法開発の現状と展望
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勝田将裕、宮澤基樹、水本有紀、中村公紀、川井 学、尾島敏康、廣野誠子、岡田健一、早田啓治、北畑裕司、宮本篤、小林良平、山上裕機
2. 発表標題 がんワクチン療法・複合免疫療法における創薬研究 膵臓に対するがんワクチン療法の創薬研究
3. 学会等名 第32回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮澤基樹 勝田将裕 水本有紀 中村公紀 川井 学 尾島敏康 廣野誠子 岡田健一 早田啓治 北畑裕司 宮本 篤 小林良平 山上裕機
2. 発表標題 肺癌に対するがんワクチン療法の創薬研究
3. 学会等名 第32回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	中森 幹人  (Nakamori Mikihiro)  (10322372)	和歌山県立医科大学・医学部・非常勤講師   (24701)	
研究分担者	山上 裕機  (Yamaue Hiroki)  (20191190)	和歌山県立医科大学・医学部・教授   (24701)	
研究分担者	尾島 敏康  (Ojima Toshiyasu)  (60448785)	和歌山県立医科大学・医学部・講師   (24701)	