

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18131

研究課題名（和文）Neoantigenを標的とした個別化iPSCs癌ワクチン療法の基礎研究

研究課題名（英文）Basic research on personalized iPSCs cancer vaccine therapy targeting neoantigen

研究代表者

北谷 純也（Kitadani, Junya）

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30596979

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：研究への参加の同意が得られた3名の大腸癌担癌患者の末梢血単核球からiPS細胞を樹立し、分化誘導したiPSCsに腫瘍から抽出したmRNAを増幅したivtRNAを遺伝子導入した。iPSCs-ivtRNAの刺激により得られたCTLsは、CTOS法でライン化した患者自身の癌細胞に対し、癌細胞特異的な細胞傷害性を示すことが、いずれの患者においても証明された。さらに、このワクチンシステムは、candidate neoantigen peptideを用いたELISPOT assayにより、neoantigenを介した免疫応答を誘導することを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、担癌患者における成熟能や抗原提示能の低下といった樹状細胞療法の弱点を克服するために、iPS細胞由来樹状細胞（iPSCs）を用いた癌ワクチン療法の基礎研究を行ってきた。本研究の目的は、正常細胞には発現せず、腫瘍における遺伝子変異によってのみ発現するneoantigenを標的とした、副作用が少なく、且つ強力な抗原提示が可能な個別化癌ワクチン療法の基礎的研究を行うことであった。本研究の結果からivtRNAワクチンは、neoantigenを介した強力な腫瘍特異的細胞傷害活性を示すことが証明でき、これは、難治癌克服への第一歩となると考える。

研究成果の概要（英文）：iPS cells were established from peripheral blood mononuclear cells of 3 patients with colorectal cancer who agreed to participate in the study. The ivtRNA amplified from the mRNA extracted from the tumor was introduced into the iPSCs. It was demonstrated in all patients that the CTLs obtained by stimulation with iPSCs-ivtRNA showed cancer-specific cytotoxicity to the patient's own cancer cells established by the CTOS method. Furthermore, this vaccine system was demonstrated to induce a neoantigen-mediated immune response by ELISPOT assay with candidate neoantigen peptide.

研究分野：癌免疫治療

キーワード：iPS細胞 iPSC 樹状細胞療法 癌免疫療法 ネオアンチゲン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年癌治療の第4の柱としてCTLA-4やPD-1といった免疫共抑制分子を標的とした免疫療法が臨床導入され、目覚ましい発展を遂げている (*Science* 2013;342:1432-3). しかし、治療効果のある患者は約2割とされ、免疫チェックポイント阻害剤が全ての癌患者の治療に貢献できるわけではない。すなわち、免疫逃避機構を阻害するだけでは、癌の根治は望めず、腫瘍を攻撃する効果的な細胞障害性T細胞(CTLs)が癌の根絶には非常に重要と言える。私達はこれまで、プロフェッショナルな抗原提示細胞である樹状細胞(DCs)にTAAを導入しワクチン担体として生体に投与し、TAA特異的免疫応答を効果的に活性化することで癌細胞を破壊するTAA遺伝子導入DCs癌ワクチン療法の基礎研究に取り組んできた (*Int J Cancer* 2007;120:585-93)。しかし、DCs癌ワクチン療法の弱点として、担癌患者から誘導したDCsは成熟能が低く、さらに抗原提示能が低い点があげられる (*Int J Mol Sci* 2013;14:22022-41, *Oncoimmunology* 2015;5:e1100791)。そこで、当教室は2010年から今日のDCs癌ワクチン療法の問題点を克服するために、治療に有効なDCsを作成するツールとしてiPS細胞に着目した。その研究成果として、マウスiPS細胞から誘導されたDCs(iPSDCs)が、bone marrow DCsと同等のTAA特異的抗腫瘍効果を有することを報告し、TAA遺伝子導入iPSDCs癌ワクチン療法という新たな治療戦略を立てた (*Int J Cancer* 2014;134:332-41)。さらに、ヒトへの臨床応用を行うため、健康人皮膚線維芽細胞からヒトiPS細胞を樹立し、feeder free下に樹状細胞への分化誘導に成功した。誘導したヒトiPSDCsはMoDCsと類似する表面マーカーの発現、サイトカイン産生能、遊走能を示した。さらにヒト消化器固形癌に高率に発現するCarcinoembryonic antigen(CEA)を遺伝子導入したヒトiPSDCsは、CEA特異的な細胞傷害活性を示し、CEA transgenic miceを用いた*in vivo*での検討では、CEA発現大腸癌細胞株に対し、腫瘍増殖抑制効果を認めることを報告した (*Sci Rep* 2018;8:4569)。しかし、CEA transgenic miceにおける皮下腫瘍モデルでは腫瘍増殖抑制効果を認めなかったもの、iPSDCs-CEAにより完全に腫瘍消失を認めることはなかった。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、より強力な抗原として、Neoantigenに着目し、腫瘍根治を目指した究極の個別化癌ワクチン療法としてNeoantigen発現iPSDCsの抗腫瘍効果について検討することとした。実際に担癌患者の末梢血単核球からiPS細胞を樹立し、分化誘導したiPSDCsに腫瘍細胞から抽出したwhole RNAを遺伝子導入することでNeoantigenを発現させ、抗原提示させるという全く新しいアプローチを用いた新規癌免疫遺伝子治療の構築を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)担癌患者iPSDCsの分化誘導

3名の大腸癌患者ドナーの末梢血単核細胞 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)へ、センダイウイルスベクター (ID Pharma)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ステップ法でiPSDCsへ分化誘導を行った。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)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 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$ を添加し2日間培養後に浮遊細胞を回収した。

#### (2)担癌患者iPSDCsとMoDCsの抗原提示細胞としての機能の評価

##### 成熟能の比較検討

担癌患者iPSDCsと単球由来樹状細胞 Monocyte-derived DCs (MoDCs)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, CD40, HLA-ABC, HLA-DR)をflow cytometryにて比較検討した。

##### サイトカイン分泌能の比較検討

担癌患者iPSDCsとMoDCs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- $\gamma$ , IL-12p70, TNF- $\alpha$ )をELISA法にて比較検討した。

#### (3)担癌患者由来癌スフェロイド Cancer tissue-originated spheroids (CTOS)の樹立

3名の大腸癌患者ドナーよりCTOS法にて、癌スフェロイドを樹立した。ドナーより抽出した癌組織を細断したのちに、Liberase DH solution (Roche Diagnostics)を加え2時間溶解分離した。この溶解過程でsingle cellとならず細胞間接着を維持したままの細胞塊を100 $\mu$ mおよび40 $\mu$ mのcell strainerを用いて回収し、培養することで癌スフェロイドの樹立を行った。

#### (4)腫瘍RNAの*in vitro*における増幅と評価

3名の大腸癌患者ドナーから樹立したCTOSよりRNeasy plus micro kit (Qiagen)を用いて、total RNAを抽出した。oligo-dT primer [5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30)VN-3']およびT7 strand switch primer [5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCGGG-3']を加え、SuperScript II reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific)を用いた逆転写反応にてcDNAを作成した。このcDNAをPCRで増幅した。増幅したcDNAをT7 mMESSAGE mMACHINE Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いることで、in vitro 転写し、in vitro transcriptional RNA (ivtRNA)を作成した。ivtRNAは変性アガロースゲル電気泳動と、2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)を用いて品質の確認を行った。

#### (5) エレクトロポレーション法を用いたiPSCsへのivtRNA導入効率の検討

導入効率の検討に先立ち、green fluorescent protein (GFP)のivtRNAを作成した。エレクトロポレーションはGene Pulser Xcell (Bio-Rad)を用いて、square-wave pulse, 500 V, 0.5 msの条件にて実施した。GFP ivtRNAを20 $\mu$ g/mLから160 $\mu$ g/mLまでの各濃度でiPSCsへエレクトロポレーションした際のGFPタンパクの発現率をflow cytometryにて検討した。

#### (6) 腫瘍RNA導入iPSCsによるin vitroにおける細胞障害活性誘導能の検討

回収した成熟iPSCsへ腫瘍由来ivtRNAをエレクトロポレーションしiPSCs-CTOS ivtRNAを得た。Responderをドナー患者のPBMCs, stimulatorを腫瘍由来ivtRNA導入iPSCsとし、20:1の割合で1週毎に3回刺激した。得られた細胞からauto MACS ProにてCD8(+) CTLsを抽出した。ターゲット細胞として、CTOSを用い、<sup>51</sup>Cr-release assayにて特異的細胞傷害活性を解析した。また、3名の大腸癌患者ドナーのうち1名から樹立したCTOSには高いCEA発現を認めため、CTOS ivtRNAを導入したiPSCs (multiple antigenをターゲットとするワクチン)とCEAのみ発現するCEA ivtRNAを導入したiPSCs (single antigenをターゲットとするワクチン)を作成し、どちらが高い細胞障害活性が誘導されるかを検討した。

#### (7) 腫瘍RNA導入iPSCsによるin vitroにおけるneoantigenをターゲットとしたCTLs誘導能の検討

腫瘍(CTOS)および正常組織(PBMCs)を次世代シーケンサーによりwhole exome解析し、腫瘍特異的な遺伝子変異を同定した。遺伝子変異により発生しうる変異ペプチドをin silicoにて予測した。これらの予測された変異ペプチドの中から、HLA分子との親和性が高く、RNAシーケンスにより発現量が多いと予測されたペプチドを選出し合成を行った。選出した変異ペプチドに対して、ELISpot assayを用いたバリデーショナルスタディを実施した。ELISpot assayでは腫瘍由来のRNAを導入したiPSCs (iPSCs-CTOS ivtRNA)により誘導されたCTLsが、変異ペプチドに対して免疫応答するかを検証した。また、選出した変異ペプチドをiPSCsに直接パルスすることでiPSCs-neoantigen peptideを作成し、これにより誘導したCTLsが変異ペプチドに対し免疫応答するかについても検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 担癌患者iPSCsの分化誘導

3名の大腸癌ドナーのPBMCsからいずれもiPS細胞の樹立が可能であり、分化開始後23日目で成熟したiPSCsが分化誘導された。第1ステップでは、平坦で粗なコロニーとなり、第2ステップでは血管内皮様の紡錘形の細胞集塊を形成した。第3ステップの後半になると、ドーム状のCD45陽性細胞からなる細胞集塊を認め、第4ステップでは単球様の小円形の浮遊細胞を多数認めた。これらのほとんどはCD14陽性細胞であった。第5ステップでは、樹状突起を持つ淡明な細胞が現れ、成熟化によりその数も多くなった。形態をMoDCsと比較すると樹状突起の数や長さ、細胞サイズは類似するものであった。

### (2) 担癌患者iPSCsとMoDCsの抗原提示細胞としての機能の評価

#### 成熟能の比較検討

担癌患者より樹立したiPSCsはMoDCsと同様にmaturation cocktailにて成熟し、表面マーカーであるCD11c, CD83, HLA-ABCの同程度の発現を認めた。CD80, CD40, HLA-DRについてはiPSCsにおいて発現が低かった。

#### サイトカイン分泌能の比較検討

担癌患者より樹立したiPSCs, MoDCsいずれも、未成熟なDCsでは、ほとんどIFN- $\gamma$ やIL-12p70の産生を認めなかったが、成熟したDCsでは、IFN- $\gamma$ , IL-12p70は共に高い産生を認め、iPSCsとMoDCsで同等であった。また、TNF- $\alpha$ の産生に関しても同等であった。

### (3) 患者由来癌スフェロイド Cancer tissue-originated spheroids (CTOS)の樹立

3名の大腸癌ドナーの癌組織からいずれもCTOSの樹立が可能であった。腫瘍細胞マーカーであるEpCAMの高い発現を確認した。またCD45の発現は認めなかった。3名のドナーのうち1名においてCEAの高い発現を認めた。

### (4) 腫瘍RNAのin vitroにおける増幅と評価

腫瘍(CTOS)よりRNAを抽出し、増幅することにより、iPSCsへ導入するための十分な量のivtRNAが得られた。ivtRNAは変性アガロースゲル電気泳動にてスメア状に分布した。また2100 Bioanalyzerによる検討では、正規分布の形を示した。

### (5) エレクトロポレーション法を用いたiPSCsへのivtRNA導入効率の検討

GFPタンパクをコードしたivtRNAをiPSCsへエレクトロポレーションしflow cytometryにて発現率を検討し、GFPの発現率は、エレクトロポレーション時に加えたGFP ivtRNAの容量依

存的に増加し 80 µg/mL 以上での発現率は 90% 程度で一定となった。この結果より以降の ivtRNA の投与量を 80 µg/mL とした。

#### (6) 腫瘍 RNA 導入 iPSCs による in vitro における細胞障害活性誘導能の検討

3 名の担癌患者ドナーから腫瘍 RNA 導入 iPSCs (iPSCs-CTOS ivtRNA) を作成した。いずれのドナーにおいても iPSCs-CTOS ivtRNA での刺激により誘導された CTLs は自己仮想ターゲットである CTOS に対し、細胞傷害活性をみとめたが、コントロールである iPSCs-GFP ivtRNA により誘導された CTLs は細胞傷害活性を認めなかった。CTOS に CEA の発現を認めた Case 1 においては、single antigen (この場合 CEA) をターゲットとした iPSCs-CEA ivtRNA により誘導された CTLs にも細胞傷害活性を認めた。しかし、multiple antigen をターゲットとした iPSCs-CTOS ivtRNA による細胞傷害活性よりも低かった。

#### (7) 腫瘍 RNA 導入 iPSCs による in vitro における neoantigen をターゲットとした CTLs 誘導能の検討

*In silico* による neoantigen 解析を実施し 12 個の候補変異タンパクを選出した。ELISpot assay において、腫瘍由来 ivtRNA を導入した iPSCs-CTOS ivtRNA は、遺伝子変異の結果生じると予測された変異ペプチドの 1 つである No.9 neoantigen (STTA p.Arg300Gln QQFEVLFQSV) に対し免疫応答を示した。予測ペプチドを iPSCs にパルスすることで作成した iPSCs- neoantigen peptide により誘導した CTLs では、2 つの予測ペプチドに対して免疫応答し、うち 1 つは上記 No.9 neoantigen と同じペプチドであった。

#### (8) 成果のまとめ

今回のわれわれの研究により、担癌患者より作成した iPSCs は、MoDCs と同等の CD83, HLA-ABC の発現、およびサイトカイン産生能を有することが立証された。しかし、他の細胞表面マーカーについては iPSCs における発現が低く、成熟化の方法等についてさらなる検討と改善が必要と考えられた。腫瘍由来 RNA を導入した iPSCs により誘導された CTLs は、高い腫瘍特異的細胞傷害活性を誘導することが証明された。また、single antigen のみをターゲットとしたワクチンモデルよりも、multiple antigen をターゲットとしたワクチンモデルの方がより高い細胞傷害活性を示した。さらに、腫瘍由来 RNA を導入した iPSCs により誘導された CTLs は、neoantigen に対する免疫応答が可能であることが示唆された (*Sci Rep* 2022;12:3295)。

近年、immune check point inhibitor の登場により、癌免疫治療の有用性は明らかとなったが、それでも有効な症例は限られている。neoantigen のような強力な抗原を提示することによる陽性の癌免疫療法の適応が必要である。われわれは、iPS 細胞は、癌免疫治療の分野において有用な材料であると考え、iPSCs がんワクチン療法は、臨床応用されれば、癌免疫療法においてこれまでの DC ワクチン療法の問題点を克服するものと確信している。

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 1件）

1. 著者名 Maruoka S, Ojima T, Iwamoto H, Kitadani J, Tabata H, Tominaga S, Katsuda M, Hayata K, Takeuchi A, Yamaue H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Tumor RNA transfected DCs derived from iPS cells elicit cytotoxicity against cancer cells induced from colorectal cancer patients in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-07305-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾島 敏康, 北谷 純也, 岩本 博光, 丸岡 慎平, 田端 宏堯, 中村 公紀, 中森 幹人, 勝田 将裕, 早田 啓治, 福田 直城, 富永 信太, 竹内 昭博, 本林 秀規, 山上 裕機
2. 発表標題 再生医療の実現-外科医に期待される役割- iPS細胞由来樹状細胞を用いた癌ワクチン療法
3. 学会等名 第120回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸岡 慎平, 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, 山上 裕機
2. 発表標題 iPS細胞由来樹状細胞(iPSDCs)を用いた新規免疫療法の確立
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北谷純也, 尾島敏康, 岩本博光, 丸岡慎平, 富永信太, 宮澤基樹, 勝田将裕, 中村公紀, 山上裕機
2. 発表標題 消化器固形癌を対象としたiPS細胞由来樹状細胞療法の基礎研究
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北谷 純也, 尾島 敏康, 岩本 博光, 丸岡 慎平, 富永 信太, 中村 公紀, 勝田 将裕, 宮澤 基樹, 山上 裕機
2. 発表標題 消化器癌を標的としたiPS細胞由来樹状細胞療法の基礎研究
3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富永 信太, 尾島 敏康, 宮澤 基樹, 岩本 博光, 北谷 純也, 丸岡 慎平, 山上 裕機
2. 発表標題 ユビキチンプロテアソーム系を応用した新規iPS細胞由来樹状細胞ワクチン療法の研究
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関