

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890199

研究課題名（和文） iPS 細胞由来樹状細胞を用いた新規癌免疫療法の開発

研究課題名（英文） The development of novel cancer-immunotherapy utilizing dendritic cells derived from iPS cells.

研究代表者

福島 聡 (FUKUSHIMA SATOSHI)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50398210

研究成果の概要（和文）：

いまだ有効な治療法のない進行期悪性黒色腫（メラノーマ）に対する新規細胞ワクチンを開発するために、遺伝子改変 iPS 細胞由来樹状細胞を用いた抗原特異的免疫療法の基礎実験を行った。マウス iPS 細胞の様々な細胞株から樹状細胞が誘導できることが確認した。一方、新規メラノーマ抗原の探索については KIF20A を見出した。また、microRNA-221 が新たなメラノーマの腫瘍マーカーとなりうることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

To develop the novel cell-vaccine against the advanced malignant melanoma, we conducted the experiments using the genetically modified iPS cell derived dendritic cells. We found that the dendritic cells could be generated from any clones of mouse iPS cells. We found that KIF20A is highly expressed in malignant melanoma. In addition, we found that micro RNA-221 could be a new tumor marker of malignant melanoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：iPS 細胞、樹状細胞、癌免疫療法

1. 研究開始当初の背景

手術不適応な進行期メラノーマは多くの場合において、抗癌剤や放射線の感受性も低く、第 4 の治療法として有効な免疫療法の開発が熱望されている。ワクチン療法のなかでは、ペプチド、ウイルスベクター、腫瘍細胞自体を用いるものに比べて、樹状細胞を用いたワクチンの奏効率が最も高いと報告されているが、それでもその奏効率は 9.6%であり、

十分であるとはいえない。(Banchereau et al. Nat Rev Immunol, 2005) つまり、より強い効果を持ち、かつ一般の病院でも広く、用いられるような癌ワクチンの開発が求められている。

これまで樹状細胞療法は、アフエレーシスにより採取した末梢血単核球から作成した樹状細胞を用いて行われてきた。その奏効率が上がらない理由のひとつとしては、すでに

抗癌剤治療で骨髄抑制を来した末期癌患者からは治療に必要な量の、また安定したクオリティーの樹状細胞を準備するのが困難であること、抗原を負荷する方法としては遺伝子導入が望ましいにもかかわらず、ウイルスベクターを使用する必要があるため行えず、実際にはペプチドや自己腫瘍細胞などが用いられていることなどが挙げられる。これらの問題を解決するために、研究代表者らはこれまでに ES 細胞由来樹状細胞樹状細胞 (ES-DC : Embryonic Stem cell-derived Dendritic Cells)の研究を行ってきた。ES 細胞は無限増殖能を有し、遺伝子導入も電気穿孔法のみで施行できるため改変が容易であり、より強力な効果を有する樹状細胞を無限に *in vitro* で作成することが可能である。ES 細胞由来の分化細胞を用いた医療技術の実用化を考慮した場合、ヒト ES 細胞の使用に伴う倫理的問題に加えて、レシピエントと ES 細胞の間の遺伝的背景の差に起因する HLA 型の不一致をはじめとする組織不適合性の問題が、非常に大きな障壁となっていた。しかしながら、これらの問題点は、最近の iPS(induced pluripotent stem)細胞作製技術の開発により解決される見込みとなり、多能性幹細胞からの分化誘導技術を応用した医療技術が実現される可能性が高まった。

2. 研究の目的

(1) これまでの ES 細胞を使用した研究より得ている成果を iPS 細胞へ応用し、医療技術としての実用化へ向けた研究を進めることを目的とした。マウスにおいて ES 細胞と同等の多能性を有する iPS 細胞からも、樹状細胞(iPS-DC)が作成できることを確認する。また iPS 細胞に抗原遺伝子あるいは、免疫調整遺伝子を導入が可能であるかどうかを検討する。そうして得られた iPS-DC のフェノタイプおよび機能を *in vitro* および *in vivo* にて解析する。

(2) iPS-DC が実際、ヒトで臨床応用される際には、さらに効率良く抗原特異的 CTL を誘導できる癌抗原の同定が望ましいと考えられる。cDNA マイクロアレイ解析から最近同定された新規癌抗原である KIF20A、CDCA1、FOXM1 等について、その発現をヒトメラノーマ組織で確認する。メラノーマでの発現が確認されれば、患者末梢血とすでに同定されている HLA-A2 あるいは A24 拘束性エピトープペプチドを用いて、それぞれの抗原特異的 CTL が誘導できるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 平成 21 年度は、これまでに樹立された入手可能な様々なマウス iPS 細胞からも樹状細胞が作成できることを確認する。また

iPS 細胞に癌抗原あるいはケモカインやサイトカイン遺伝子などの導入を試みる。クローニングした遺伝子改変 iPS 細胞から樹状細胞を誘導し、*in vitro* および *in vivo* の解析を行うことを計画した。

平成 22 年度は、作成した iPS-DC を用いてマウスでの抗腫瘍実験にてその効果を検証することとした。

(2) 平成 21 年度は、新規メラノーマ抗原の同定のため、メラノーマ組織での新規抗原の発現解析を行う。

平成 22 年度は、*in vitro* での抗原特異的 CTL 誘導を患者末梢血から行う計画であった。

(3) さらに上述の新規抗原の中で、血清中に検出できたものに関しては、患者血清中でのタンパク質定量を ELISA 法にて行い、症例を蓄積して新規腫瘍マーカーとして有用であるかどうかを検討する計画とした。

4. 研究成果

(1) RIKEN の CELL BANK から提供を受けた iPS 細胞株、APS0001、APS0002、APS0003、APS0004 について、樹状細胞への分化誘導を確認行った。マウス胎児線維芽細胞上で LIF 存在下にメンテナンスし、適切な大きさのコロニーを形成した時点で、フィーダー細胞である OP9 細胞上にパッセージ、GM-CSF を加えて、骨髄系前駆細胞に分化させた。最終的に浮遊してきた細胞に GM-CSF のみでの培養期間を加えて樹状細胞に誘導した。いずれの細胞株もほぼ遜色なく、樹状細胞に分化誘導できることを確認できた。

これらのマウス iPS 細胞由来樹状細胞 (miPS-DC) 遺伝子導入を行って、抗腫瘍効果を増強するために、IL-15 を産生する発現ベクターの作成を行った。クローニングしたマウス IL-15 遺伝子を発現ベクターである pCAGGS-IRES-neo に組み込み、その機能性の確認を行った。cos7 細胞にリポフェクションで遺伝子導入を行って見たところ、その培養上清中にマウス IL-15 を ELISA 法にて確認できた。さらに、この IL-15 が生理活性を持つかどうかを、CTLL 細胞を用いた細胞増殖アッセイによって確認を試みた。トリチウムでラベルした CTLL 細胞に、リコンビナントマウス IL-15 を希釈濃度ごとに、また cos7 に IL-15 遺伝子を導入した培養上清を加え、その増殖を測定した。対照としては、マウス IL-2 を用いた。結果として、IL-15 は 300ng/ml の濃度では、100U/ml の IL-2 と同等に CTLL を増殖させたが、30ng/ml ではその効果は確認できなかった。cos7 細胞の培養上清の IL-15 の濃度が約 30ng/ml であったので、このアッセイ法では、検出感度が十分でないと考えられた。今後、さらに適切に遺伝子導入

による IL-15 の効果を測定するバイオアッセイを検討していく方針である。

(2) 従来のがん抗原よりもさらに強力に免疫反応を誘導することができる理想的な抗原探索のために、KIF20A にターゲットを絞り、発現解析を行った。結果として、悪性黒色腫の各種細胞株において、KIF20A が高発現していることを、RT-PCR およびウエスタンブロット法にて確認した。また実際の患者検体においても、悪性黒色腫の原発巣のみならず、転移巣にも KIF20A が高発現していることを RT-PCR、免疫染色を用いて確認した。また KIF20A の発現と腫瘍の厚さ (tumor thickness) が相関することを確認した。また KIF20A の発現の有無が悪性黒色腫患者の無再発生存期間と関連があることを見出した。その成果は第 14 回日本がん免疫学会総会にて報告した。(論文作成中)

(3) 我々は上述の KIF20A が血清中にタンパク質として検出できるかどうかを検討してみたが、検出できなかった。さらに KIF20A を制御する microRNA が患者血清中で変化していないか検討したが、やはり検出できなかった。一方他の癌において、最近血清マーカーになるといわれていた microRNA-221 に着目し、悪性黒色腫患者の血清中で、健常人に比べて有意に上昇していることを初めて見出し報告した。microRNA-221 が tumor thickness に相関すること、術前に比べ、術後に低下、また再発時に再上昇してくることも見出し、報告した。(J Dermatol Sci. 2011)

以上のように、マウス iPS 細胞の様々な細胞株から樹状細胞が誘導できることが確認できた。本研究では導入する遺伝子に IL-15 を選択したが、その機能をバイオアッセイによって評価する点でいまだ安定したデータを得られておらず、本研究期間中に遺伝子導入樹状細胞でマウスモデルでの実験を行うには至らなかった。よって引き続き、研究を継続する方針である。一方、新規メラノーマ抗原の探索については KIF20A を見出した。今後免疫療法のターゲットとして、検討を進める。また、microRNA-221 が新たなメラノーマの腫瘍マーカーとなりうることを見出した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(1) [雑誌論文] (計 14 件)

1. The circulating microRNA-221 level in patients with malignant melanoma as a new tumor marker. Kanemaru H, Fukushima S, Yamashita J, Honda N,

Oyama R, Kakimoto A, Masuguchi S, Ishihara T, Inoue Y, Jinnin M, Ihn H. J Dermatol Sci. 2011, 61 巻, 187-93. (査読有)

2. Circulating microRNA associated with TNF- α signaling pathway in patients with plaque psoriasis. Oyama R, Jinnin M, Kakimoto A, Kanemaru H, Ichihara A, Fujisawa A, Honda N, Masuguchi S, Fukushima S, Maruo K, Ihn H. J Dermatol Sci. 2011, 61 巻, 209-11. (査読有)

3. Circulating miR-29a levels in patients with scleroderma spectrum disorder. Kawashita Y, Jinnin M, Makino T, Kajihara I, Makino K, Honda N, Masuguchi S, Fukushima S, Inoue Y, Ihn H. J Dermatol Sci. 2011, 61 巻, 67-9. (査読有)

4. Expression of matrix metalloproteinase-13 is controlled by IL-13 via PI3K/Akt3 and PKC- δ in normal human dermal fibroblasts. Moriya C, Jinnin M, Yamane K, Maruo K, Muchemwa FC, Igata T, Makino T, Fukushima S, Ihn H. J Invest Dermatol. 2011, 131 巻, 655-61. (査読有)

5. Cutaneous hyalohyphomycosis by *Scedosporium apiospermum* in an immunocompromised patient. Makino K, Fukushima S, Maruo K, Egawa K, Nishimoto K, Ihn H. Mycoses. 2011, 54 巻, 259-61. (査読有)

6. Related citations Pluripotent stem cell-derived dendritic cells for immunotherapy. Senju S, Matsunaga Y, Fukushima S, Hirata S, Matsuyoshi H, Nishimura Y. Front Biosci. 2010, 2 巻, 1520-7. (査読無)

7. Transglutaminase1 Preferred Substrate Peptide K5 Is an Efficient Tool in Diagnosis of Lamellar Ichthyosis. Akiyama M, Sakai K, Yanagi T, Fukushima S, Ihn H, Hitomi K, Shimizu H. Am J Pathol. 2010, 176 巻, 1592-9. (査読有)

8. Pluripotent stem cells as source of dendritic cells for immune therapy. Senju S, Hirata S, Motomura Y,

- Fukuma D, Matsunaga Y, Fukushima S, Matsuyoshi H, Nishimura Y. *Int J Hematol.* 2010, 91 巻, 392-400. (査読無)
9. Down-regulation of mir-424 contributes to the abnormal angiogenesis via MEK1 and cyclin E1 in senile hemangioma: its implications to therapy. Nakashima T, Jinnin M, Etoh T, Fukushima S, Masuguchi S, Maruo K, Inoue Y, Ishihara T, Ihn H. *PLoS One.* 2010, 5 巻, e14334. (査読有)
 10. Serum levels of soluble CD163 in patients with systemic sclerosis. Nakayama W, Jinnin M, Makino K, Kajihara I, Makino T, Fukushima S, Inoue Y, Ihn H. *Rheumatol Int.* 2010, [Epub ahead of print] (査読有)
 11. Dual effects of TRAIL in suppression of autoimmunity: the inhibition of Th1 cells and the promotion of regulatory T cells. Ikeda T, Hirata S, Fukushima S, Matsunaga Y, Ito T, Uchino M, Nishimura Y, Senju S. *J Immunol.* 2010, 185 巻, 5259-67. (査読有)
 12. Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, Fukushima S, Inoue Y, Muchenwa FC, Yonemura Y, Komohara Y, Takeya M, Mitsuya H, Ihn H. *Arthritis Res Ther.* 2010, 12 巻, R128. (査読有)
 13. 福島聡 ES 細胞由来樹状細胞を用いたメラノーマの免疫療法 *医薬の門*, 2009, 49 巻, 355-359. (査読無)
 14. 福島聡, 西村泰治, 千住覚 ES 細胞、iPS 細胞由来の樹状細胞を利用したワクチン臨床免疫・アレルギー科, 2009, 52 巻, 331-338. (査読無)
- (2) [学会発表] (計 10 件)
1. Fukushima S, Analysis of serum secreted protein acidic and rich in cysteine levels in patients with localized scleroderma. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 12/3-5/2010, 和歌山県立文化ホール
 2. 福島 聡, 新規癌関連抗原 KIF20A のメラノーマにおける発現解析、平成 22 年度厚生労働省がん助成金「悪性黒色腫に対する新しい診療体系の確立に関する研究」第 2 回班会議、10/16/2010、国立がん研究センター中央病院
 3. Fukushima S, Increased serum levels of secreted protein acidic and rich in cysteine in patients with localized scleroderma. 40th Annual ESDR Meeting, 9/8-11/2010, Marina Congress Center • Finland
 4. S Fukushima, Immunotherapy with genetically modified dendritic cells derived from stem cells against mouse melanoma, 14th International Congress of Immunology, 8/25/2010, 神戸国際会議場
 5. 福島 聡, 肺転移巣に対するラジオ波焼灼療法 (RFA)、平成 22 年度厚生労働省がん助成金「悪性黒色腫に対する新しい診療体系の確立に関する研究」第 1 回班会議、7/31/2010、国立がん研究センター中央病院
 6. 山下淳二、福島 聡他、メラノーマにおける新規癌関連抗原 RAB6KIFL の発現解析、第 14 回日本がん免疫学会総会、7/22-23/2010、KKR ホテル熊本
 7. 福島 聡, 口蓋悪性黒色腫の 1 例、第 26 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会、6/4-5/2010、京王プラザ
 8. 福島 聡, 遺伝子改変 iPS 細胞由来樹状細胞およびマクロファージによるメラノーマの免疫療法、第 109 回日本皮膚科学会総会、4/16-18/2010、大阪国際会議場
 9. 福島聡, 多能性幹細胞由来樹状細胞を用いた免疫療法、第 73 回日本皮膚科学会東部支部学術大会、9/26-27/2009、甲府富士屋ホテル
 10. Fukushima S, Immunotherapy with Multiple Antigen-Targeted and Genetically Modified Dendritic Cells Derived from Pluripotent Stem Cells

Against Mouse Melanoma, 7th World
Congress on melanoma 5th Congress of
European Association of
Dermato-Oncology (EADO), 5/12-16/2009,
Hofburg Viena • Austria

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 聡 (FUKUSHIMA SATOSI)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 50398210