

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20834

研究課題名（和文）ユビキチンプロテアソーム系を介した新規iPS細胞由来樹状細胞ワクチン療法の開発

研究課題名（英文）Induced pluripotent stem cell-derived dendritic cell vaccine therapy genetically modified on the ubiquitin-proteasome system

研究代表者

富永 信太（Tominaga, Shinta）

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：10868722

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：iPS細胞由来樹状細胞ワクチン（iPSDCs）において、抗腫瘍効果を増強する工夫として、樹状細胞の抗原提示において重要なユビキチンプロテアソーム系によるプロセッシングに着目した。iPSDCsにユビキチンと腫瘍関連抗原（TAA）の融合遺伝子を導入することで、ユビキチンプロテアソーム系を介するTAAのプロセッシングが亢進し、iPSDCsの抗原提示能が亢進して抗腫瘍効果が増強されることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPSDCsワクチン療法はもともと生体内に備わっている抗腫瘍免疫を増強する、アクセラの働きをする。iPSDCsのワクチン効果を増強するメカニズムを解明することで、iPSDCsワクチンを臨床応用に導くことができる。それにより、既存の治療に不応の癌患者さんに対する新たな治療の開発の一助となる。今後さらにiPSDCsワクチンの抗腫瘍効果増強のための研究を継続し、臨床応用につなげていきたい。

研究成果の概要（英文）：We focused on the ubiquitin-proteasome-mediated processing of ubiquitin and tumor-associated antigen (TAA) as a means of enhancing the anti-tumor effect of iPS cell-derived dendritic cell vaccines (iPSDCs). This study demonstrated that the introduction of a fusion gene of ubiquitin and tumor-associated antigen (TAA) into iPSDCs enhances TAA processing through the ubiquitin-proteasome system, thereby increasing the antigen-presenting ability of iPSDCs and enhancing their antitumor effects.

研究分野：消化器外科学

キーワード：癌免疫 樹状細胞ワクチン iPS細胞 ユビキチンプロテアソーム系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞 dendritic cells (DCs) は、T 細胞依存性の獲得免疫応答の始動及び増幅、さらには免疫監視機構を多方面から統御する最もプロフェッショナルな抗原提示細胞であり、抗腫瘍免疫においては中心的な役割を果たしている。ただ樹状細胞ワクチン療法を臨床応用する場合、樹状細胞を得るためには複数回のアフエーシスを要するため患者さんの負担が大きいこと、さらに担癌患者由来の樹状細胞は成熟能が低く、抗原提示能や遊走能も低いとされる。これらの問題を解決するために、安定した数と機能の DCs を供給できる新規ツールとして iPS 細胞に着目した。当教室ではこれまで、マウス iPSDCs は骨髄由来 DCs と同等の抗原提示能を有していることを報告した。また、健常人を用いた *in vitro* 系において、carcinoembryonic antigen (CEA) 遺伝子を導入した iPSDCs は CEA 特異的な cytotoxic T lymphocytes (CTLs) が誘導可能であった。さらに CEA トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 系において、CEA 遺伝子導入マウス iPSDCs ワクチンの抗腫瘍効果を認めた。また、担癌患者由来 iPSDCs に同患者の腫瘍由来 RNA を導入し、*in vitro* においてその抗腫瘍効果を示した。さらに、この腫瘍由来 RNA を導入した iPSDCs により誘導された CTLs が、neoantigen に対し免疫応答可能であることを報告した。

2. 研究の目的

iPSDCs ワクチンの抗腫瘍効果をさらに増強させるべく、本研究において、より免疫原性の高い TAA として Mesothelin (MSLN) をターゲットとした。また、iPSDCs の抗原提示能を増強する工夫として、ユビキチンプロテアソーム系による抗原プロセッシングに着目した。ユビキチン (Ub) MSLN 融合遺伝子を iPSDCs に導入することで、MSLN 蛋白分解が亢進して抗原提示能が増強され、効率的に大量の MSLN 特異的 CTLs が誘導され、抗腫瘍効果も増強することを検証した。

3. 研究の方法

iPSDCs の分化誘導

3 名の健常人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 ステップ法にて 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 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 にて分離した。第 5 に回収した細胞を GM-CSF, IL-4 を加え 5 日間培養した。

遺伝子組換えアデノウイルスベクターの構築と DCs への遺伝子導入

MSLN をコードする組換えアデノウイルスベクター AxCAMSLN は、既報の通り、COS-TPC (cosmid-terminal protein complex) 法により作製した。β-gal をコードする AxCALacZ も COS-TPC 法により作製した。ユビキチン遺伝子は、PBMC ゲノム DNA から、5'プライマー (5' AGT CCG CTA GCC ACC ATG CAG ATC TTC GTG AAG ACC 3') と 3'プライマー (5' TAG TCC GTC GAC GTA TTT AAA TCG ACC CCC CCT CAA GCG CAG GAC 3') を用いて PCR により増幅させた。5'プライマーは Nhe I 制限部位、Kozak 配列 (CGCCACC), ATG 開始コドン を設けた。3'プライマーは、ユビキチンタンパク質の N 末端にリンカーとしてアルギニンを付加し、Swa I 制限部位を設けた。このモノマーユビキチン cDNA をコスミドベクター pAxCAwt に挿入し、ユビキチンを発現する遺伝子組換えコスミドを作製した。MSLN 遺伝子を Swa I 制限部位に挿入し、Ub-MSLN 遺伝子発現コスミドを作製した。Ub-MSLN をコードする AxCAubiquitin-MSLN は、COS-TPC 法により作製した。未熟な DCs に、遠心分離法を用いて、100 multiplicity of

infection (MOI)で各組換えアデノウイルスベクターを感染させ、遺伝子改変 DCs を作製した。遺伝子組換え DC は、最終成熟を誘導するために rhIL-6, rhIL-1 β , rhTNF- α , PGE2 の存在下で 2 日間培養した。

遺伝子改変 iPSDCs の成熟能の評価

単球由来樹状細胞 Monocyte-derived DCs (MoDCs)と iPS 細胞由来樹状細胞(iPSDCs)の表面マーカー (CD11c, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-ABC, HLA-DR) の発現をフローサイトメトリにて評価した。遺伝子導入前, MSLN 遺伝子導入後, Ub-MSLN 融合遺伝子導入後のそれぞれの表面マーカーを比較検討した。

MSLN 特異的 CTLs の誘導と検出

PBMCs を MSLN 遺伝子導入 DCs と 20:1 の割合で 1 週毎に 3 回共培養刺激した。得られた細胞から auto MACS Pro にて CD8(+) CTLs を抽出した。CTLs は, HLA-A2 結合 MSLN エピトープペプチドの SLLFLLFSL (A2₂₀₋₂₈)および VLPLTVAEV (A2₅₃₀₋₅₃₈)のそれぞれ PE 標識ペンタマーと FITC 標識抗 CD8 抗体を組み合わせて染色し, フローサイトメトリを用いて解析した。

細胞傷害活性の評価

誘導した MSLN 特異的 CTLs と ⁵¹Cr をとりこませたターゲット細胞を用いて, ⁵¹Cr-release assay にて細胞傷害活性を解析した。ターゲット細胞はそれぞれのドナーから樹立した Epstein-Barr virus (EBV)-transfected B-lymphoblastoid cell lines (LCLs)を用いた。

4. 研究成果

MoDCs と iPSDCs の表面マーカーの発現

CD11c, CD86, HLA-ABC, HLA-DR の発現は MoDCs と iPSDCs で同等であったが, CD40, CD80, CD83 の発現は MoDCs と比べて iPSDCs では低かった。MSLN 遺伝子や Ub-MSLN 遺伝子導入前後で表面マーカー発現に変化はなかった。

MSLN 遺伝子導入 DCs により誘導した CTLs の細胞傷害活性

3 名の健常人ドナーから MSLN 遺伝子導入 MoDCs (MoDCs-MSLN)を作成した。いずれのドナーにおいても MoDCs-MSLN により誘導した CTLs は, MSLN 発現 LCLs に対する細胞傷害活性を示した。また, 3 名の健常人ドナーから MSLN 遺伝子導入 iPSDCs (iPSDCs-MSLN)も作成した。いずれのドナーにおいても iPSDCs-MSLN により誘導した CTLs は, MSLN 発現 LCLs に対する細胞傷害活性を示した。

MSLN 由来ペプチドパルス LCLs に対する細胞傷害活性

iPSDCs-MSLN により誘導した CTLs が, MSLN 由来エピトープペプチドを認識していることを検証するため, これまでに同定されている複数の MSLN エピトープペプチドをそれぞれパルスした LCLs に対する細胞傷害活性を ⁵¹Cr-release assay にて評価した。HLA-A2/A24 陽性ドナー (ドナー A, B) では, HLA-A2 結合 MSLN ペプチド (A2₍₂₀₋₂₈₎, A2₍₅₃₀₋₅₃₈₎) と HLA-A24 結合 MSLN ペプチド (A24₍₄₄₂₋₄₅₁₎, A24₍₄₃₅₋₄₄₃₎, A24₍₄₇₅₋₄₈₃₎) それぞれを発現させた LCLs に対する細胞傷害活性を認めたのに対し, HLA-A2/A24 陽性ドナー (ドナー C) では, HLA-A2 結合 MSLN ペプチド (A2₍₂₀₋₂₈₎, A2₍₅₃₀₋₅₃₈₎) を発現させた LCLs に対してのみ細胞傷害活性を認めた。

ユビキチンと MSLN の融合遺伝子を DCs に導入する効果

(1) DCs 内での MSLN 蛋白分解の評価

免疫染色と FACS にて DCs 内 MSLN 蛋白発現を評価した。Ub-MSLN 融合遺伝子を導入すると MSLN 蛋白分解が亢進するため, MSLN 単独遺伝子導入 DCs と比べて DCs 内の MSLN 蛋白発現は低下した。一方, プロテアソーム阻害薬 (MG132) で処理した Ub-MSLN 融合遺伝子導

入 DCs ではプロテアソームによる MSLN 蛋白分解が阻害され、DCs 内の MSLN 蛋白発現が回復した。

(2) 誘導される CTLs 数の評価

MSLN 由来ペプチド発現 CTLs を認識する Pentamer により、誘導される MSLN 特異的 CTLs 数を評価した。MSLN 単独遺伝子導入 iPSCs では検出される CTLs は 1.17%であったのに対し、Ub-MSLN 融合遺伝子導入 iPSCs では検出される CTLs は 2.27%と約 2 倍に増加した。

(3) 細胞傷害活性の評価

MSLN 単独遺伝子導入 iPSCs で CTLs を誘導するよりも Ub-MSLN 融合遺伝子導入 iPSCs で CTLs を誘導した方が、細胞傷害活性が上回るという結果が得られた。

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 Tominaga Shinta, Ojima Toshiyasu, Miyazawa Motoki, Iwamoto Hiromitsu, Kitadani Junya, Maruoka Shimpei, Hayata Keiji, Yamaue Hiroki	4. 巻 -
2. 論文標題 Induced pluripotent stem cell-derived dendritic cell vaccine therapy genetically modified on the ubiquitin-proteasome system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41434-023-00388-z	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富永信太
2. 発表標題 ユビキチンプロテアソーム系を応用した遺伝子改変iPS樹状細胞ワクチン療法の開発
3. 学会等名 第36回 日本バイオセラピィ学会学術集会総会
4. 発表年 2023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
---------	---------