

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 16 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861675

研究課題名(和文) iPS細胞由来樹状細胞と放射線治療を組み合わせた、新たながん治療の提案

研究課題名(英文) Novel cancer treatment by the combination of the iPS cells-derived dendritic cells therapy and the radiation therapy

研究代表者

平野 啓 (Hirano, Hiroshi)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・移植免疫研究室・共同研究員

研究者番号：00414334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではまず、ヒトiPS細胞からの樹状細胞誘導法(ヒトiPS-DC)の確立を目指した。既に確立したマウスiPS-DC誘導法を応用し、ストローマ細胞株であるOP9との共培養法にてDC様抗原提示細胞を作成した。その過程で、従来方法よりも迅速なマウスiPS-DC分化誘導の方法を見出した。そのメカニズム解析や、ヒトiPS細胞への応用等は今後の課題である。

またiPS-DCと放射線照射の併用による新たながん治療法の開発のために、メラノーマ細胞を用いた担癌モデルマウスを作成した。しかしながら、その治療効果検証まで至ることは出来なかった。

研究成果の概要(英文)：First, this research developed a differentiation method of human iPS cells-derived dendritic cells (human iPS-DC). Based on the method to generate murine iPS-DC, which we reported in a previous work, we established the method to generate the dendritic cells from human iPS cells by the co-culture with OP9 cells, which is one of stromal cell lines. In this process, we established a new method to generate murine iPS-DC. This method needs less period than the previous methods. The investigation of the mechanism and the application of this new technology to human iPS cells will be issues to be addressed in the future.

Second, we developed a method to prepare tumor-bearing model mice by the injection of a melanoma cell line, to investigate a new treatment method of cancer by the combination of the iPS-DC injection and the radiation therapy. However, we could not verify the therapeutic effect.

研究分野：細胞生物学

キーワード：がん 樹状細胞 腫瘍免疫学 iPS細胞 再生医療

1. 研究開始当初の背景

昨今、次世代のがん治療法の一つとして免疫細胞治療の開発に注目が集まっている。様々な方法が提案される中に、樹状細胞 (Dendritic Cell: DC) を用いるものがある。強力な抗原提示細胞である DC に腫瘍特異的抗原を提示させ、患者体内に戻すことで強力な抗腫瘍免疫応答を誘導する治療法である。

しかしながら、DC を用いる治療法には二つの大きな問題があった。一つは腫瘍特異的抗原の提示効率が低く、治療効果を得にくいことである。さらに一つは細胞材料入手の困難さである。治療に必要な大量の DC を作成するためには、大量の細胞材料 (血液細胞に含まれる骨髄前駆細胞) を必要とするが、患者から採取する際に多大な負担を強いることが大きな問題であった。

近年、我々は、腫瘍組織への未熟 DC の局所注入と放射線局所照射との併用に基づく治療法が、悪性腫瘍治療に高い効果を示したことを報告した (Hasumi *et al.* *Cancers* 2011; 3: 2223)。治療に至る詳細なメカニズムはまだ明らかでないが、放射線照射による腫瘍組織の壊死が、DC による腫瘍組織の貪食と抗原提示に効率的にはたらいたことが推測された。このことから、DC を用いるがん治療における腫瘍特異的抗原提示能の低さを補い得ることが期待できた。

また、昨今研究の伸張が著しい人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、その増殖能力の無限性と、理論上いかなる細胞・組織へも分化し得る分化多能性から、細胞を用いる様々な治療法における巨大な供給源として期待することができる。

そこで我々は、iPS 細胞から分化誘導した樹状細胞 (iPS-DC) の腫瘍組織への局所注入と、放射線局所照射とを併用することによる、新たながん治療法の開発を目指して、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、大きく分けて下記の二つを目指して研究を進めた。

(1) iPS-DC の分化誘導技術に基づく未熟 DC の大規模な培養法の確立

(2) 腫瘍組織への未熟 DC の注入と放射線局所照射との併用に基づく治療法の検証

最終的には、上記(1)(2)を組み合わせ、iPS-DC の局所注入と放射線局所照射との併用による抗腫瘍効果の検証を目指すこととした。

3. 研究の方法

(1) iPS-DC の分化誘導に基づく未熟 DC の大規模な培養

マウス iPS 細胞からの未熟 DC の大規模培養

我々は、マウス iPS 細胞から制御性樹状細胞 (DC-reg) への分化誘導法を確立し報告している (Zhang *et al.* *Sci. Rep.* 2014; 4: 3979)。この方法は、マウスストロマ細胞株の一つである OP9 細胞をフィーダー細胞として、マウス iPS 細胞を共培養することにより血液細胞系譜へと分化誘導させ、さらに GM-CSF, IL-10, TGF- β を作用させることで DC-reg へと分化誘導を促す。

我々は、適用するサイトカインを GM-CSF, IL-4 とすることで、DC と同様の抗原提示細胞 (iPS-DC) へ分化誘導させ得るかどうか、検討した。

ヒト iPS 細胞からの未熟 DC の大規模培養
上記(1)で検討したマウス iPS-DC 分化誘導法を基本として、ヒト iPS 細胞からの DC 様抗原提示細胞 (ヒト iPS-DC) の誘導法を検討した。具体的には、マウス iPS-DC 分化誘導法と同様に、ヒト iPS 細胞を OP9 と共培養して血液細胞系譜へと分化誘導させ、その後、GM-CSF および IL-4 等のサイトカインを適用することで iPS-DC へ誘導させ得るかどうか、検証を進めた。

サイトカイン濃度や細胞処理の方法等については、今回検討した OP9 との共培養による方法を採用する千住らの手法 (Senju *et al.* *Gene Therapy* 2011; 18: 874) や Choi らの手法 (Choi *et al.* *J. Clin. Invest.* 2009; 119: 2818) を参考にした上で、本研究で使用した iPS 細胞株 (201B7 株・253G1 株等) に適する条件・方法を模索した。

(2) 腫瘍組織への未熟 DC の注入と放射線局所照射との併用に基づく治療法の検証

マウス iPS-DC を用いた治療モデル実験のために、担癌モデルマウスの作製を試みた。腫瘍細胞株には、治療効果を視覚的に確認しやすくするために、マウスメラノーマ細胞株 (B16-F10) にルシフェラーゼを導入した細胞株 (B16-F10-luc2) を選択した。培養した B16-F10-luc2 を、C57BL/6 マウスに皮下注射して移植した。細胞数や移植後日数を検討することで、担癌モデルとしての性質を検討した。

4. 研究成果

(1) iPS-DC の分化誘導に基づく未熟 DC の大規模な培養

マウス iPS 細胞からの未熟 DC の大規模培養

マウス iPS 細胞を OP9 と 7 日間共培養することで、造血前駆細胞を含む細胞集団へと分化させた。得られた細胞集団をさらに OP9 と共培養させつつ GM-CSF を作用させることで、DC 前駆細胞を含む骨髄細胞系譜へと分化させた。ここで得られた浮遊細胞集団に GM-CSF および IL-4 を作用させることで、DC 様の性質を持つ抗原提示細胞へと分化させることが出来た。

この検討過程で、OP9 との共培養を経るこ

となく、マウス iPS 細胞に直接 GM-CSF および IL-4 を作用させることでも、マウス iPS-DC を分化誘導させ得ることが見出された（下図）。この新たな手法で作成したマウス iPS-DC は、従来法で作製されるマウス iPS-DC に比べて、極めて旺盛な増殖能力を長期間維持した。したがって、本研究が目指す大量の細胞材料の取得に、大きく寄与する可能性が示唆された。

- Conventional method



- New method



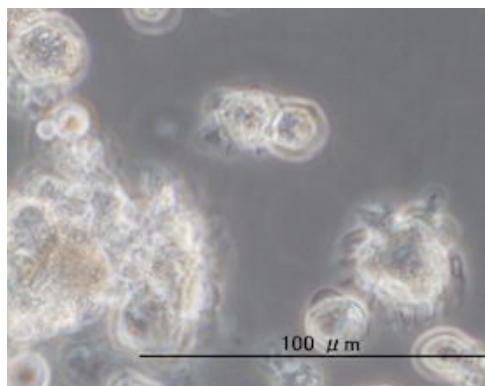
その一方で、この新たなマウス iPS-DC 作製法は、特定の iPS 細胞株にのみ適用可能なものであった。適用可能であった細胞株を更に詳細に検討したところ、未分化性の指標となるマーカー群（Nanog, SSEA1 等）の発現を示しつつ維持培養されているにも関わらず、CD11b 陽性の細胞集団を一定の割合で含むことが分かった。さらに、新規マウス iPS-DC 作製法は、この CD11b 陽性集団に対してのみ適用可能であり、CD11b 陰性集団を材料とした場合には iPS-DC への分化が見られなかった。

分化多能性を維持しながら培養され続けている iPS 細胞の中から、なぜこのような性質を持つ、ミエロイド系譜への分化がある程度進んでいるかのような細胞が生じたのかは、不明のままである。また継代を経る中で、このような細胞がどのように維持され続けているのか、さらには、どのようなメカニズムで iPS-DC へと分化が進んでいるのかが、今後の検討課題である。

ヒト iPS 細胞からの未熟 DC の大規模培養

OP9 と 15~18 日間共培養させることで、ヒト iPS 細胞のコロニーは嚢胞状の構造を持つ細胞集団へと分化した。ここで回収される細胞混合物から付着性の細胞を除くことで造血前駆細胞を含む細胞集団を得ることができた。得られた浮遊性細胞集団をさらに 7~10 日間 OP9 と共培養し、同時に GM-CSF, M-CSF を作用させることで、ミエロイド細胞系譜の前駆細胞集団を得ることができた。これらは、CD11b 陽性集団および CD14 陽性集団を一定割合で含むことを特徴とした。得られたミエロイド系前駆細胞を低付着性容器へ移し、GM-CSF, IL-4 を作用させながら 5 日間程度培養することで、DC に特徴的な突起構造などを持つ浮遊細胞（DC 様細胞）を得た（次図）。

得られた DC 様細胞は、CD11b, CD11c,



CD86, HLA-DR 等の樹状細胞関連分子を発現しており、古典的なミエロイド系樹状細胞に近い性質を持つことが予想された。LPS や TNF の刺激によって CD80, CD83, CD86, HLA-DR の発現が強まる等、成熟化の特徴も確認された。オバルブミンを用いた検討から抗原貪食能力も確認でき、LPS, TNF による成熟化刺激を受けることで失われることも観察された。樹状細胞の特徴とされるその他の生理活性も現在検討中であるが、これまでに得られたデータからは、この DC 様細胞が樹状細胞に近い性質を持つことを示唆された。

ただし、実際にヒト末梢血から得られる DC や、または末梢血細胞から *in vitro* で分化誘導されて作成される DC (myeloid derived dendritic cells) と比較すると、マーカー発現や個々の生理活性において相違も見られた。厳密な意味でのヒト樹状細胞とは異なる細胞であるとも考えられる。

この方法は、201B7 株以外の複数のヒト iPS 細胞株に対しても適用可能であったことから、ヒト iPS-DC 分化誘導法としての普遍性・再現性も確認できた。

なお、OP9 との共培養を経てヒト iPS 細胞造血前駆細胞へと分化誘導させるには、iPS 細胞に対して一定数以上の、十分な細胞数の OP9 を用意することが肝要であった。

また一方で、上記の方法とは異なるが、前述した Choi らの方法を参考にして、造血前駆細胞からミエロイド系前駆細胞までの分化誘導に、iPS 細胞由来細胞集団と OP9 とのスフェロイド培養を経由する方法でも、iPS-DC を作成し得ることを確認できた。この方法では、培養に要する期間が短い利点がある一方で、得られる細胞数が少なくなる欠点があった。

(2) 腫瘍組織への未熟 DC の注入と放射線局所照射との併用に基づく治療法の検証

移植する B16-F10-luc2 の細胞数や、移植後の腫瘍体積についての検討を経て、C57BL/6・B16-F10-luc2 による担癌モデルマウス実験系を確立した。

しかしながら、骨髄細胞由来 DC やマウス iPS-DC を用いての治療効果検証、さらには放射線照射法との併用治療効果の検証までは至ることが出来なかった。

また当初の研究計画では、免疫不全マウスにヒト造血幹細胞を移植して免疫ヒト化マウスを作成し、この免疫ヒト化マウスにヒトがん細胞を移植してヒト担癌モデルマウスを作成した上で、ヒト iPS-DC によるがん治療効果検証することを念頭に置いていた。しかしながら、この検討も実施まで至ることが出来なかった。ヒトおよびマウス iPS-DC の大量培養系の確立が出来た現在、これらの治療モデルを用いた検証を進めることが、今後の課題である。

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)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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)研究代表者

平野 啓 (HIRANO, Hiroshi)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター

移植免疫研究室

共同研究員

研究者番号：00414334

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：