

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461583

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞をもちいた小児悪性腫瘍に対する新規免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development new immunotherapy for pediatric cancer using human iPSCs

研究代表者

宮村 能子 (Miyamura, Takako)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20379796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：小児悪性腫瘍細胞に対する免疫学的治療法として、WT1ワクチン療法とヒトiPS細胞技術を組み合わせ、治療抵抗性の悪性腫瘍に対するより効果的ながん免疫療法の開発を目指した。患者末梢血から効率よくiPS細胞を樹立する方法を確立することができた。しかしながら数の少ない末梢血WT1-CTLからiPS細胞を樹立することは困難であり、さらに改善が必要と考えられた。一方で、WT1によるワクチン効果をより侵襲性強く、小児においても患者への負担が少なくなる効果を目指して、WT1を発現する町内細菌を経口投与することによるがん免疫療法の確立を目指しある程度の効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop more efficient immunotherapy for pediatric cancer, using WT1 cancer vaccines and human iPSCs. We established the method to generate iPSCs more efficiently using Sendai virus. In addition, we developed oral cancer vaccine method using Bifidobacterium longum displaying WT1 protein.

研究分野：小児血液学

キーワード：iPS細胞 ガン免疫療法

### 1. 研究開始当初の背景

小児悪性腫瘍は化学療法や放射線治療、外科的手術などの集学的治療の進歩に伴いその予後は飛躍的に向上しているが、依然として多くの治療抵抗例および再発例が存在する。これらの難治症例に対する有効な治療法は現在見あたらず、新たな治療戦略の確立が望まれている。近年、腫瘍細胞の有するがん抗原を利用した免疫学的治療法が注目されており、成人症例を中心にさまざまな治験が行われているが、当大学で開発された WT1 ワクチン療法もその 1 つである。WT1 蛋白質は多くの腫瘍細胞の核・細胞質に存在し、そのペプチド断片は HLA class I 分子と複合体を形成して細胞表面に提示され、キラー T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte : CTL) により認識され攻撃を受ける。WT1 ワクチン療法はこの機序を利用し、WT1 ペプチドを外因性に接種することで WT1 特異的キラー T 細胞 (WT1-CTL) を誘導・活性化し、腫瘍細胞への攻撃をより強く発揮させる。すなわち生体のもつがん免疫監視機構を強制的に活性化することにより腫瘍細胞を排除しようとするものである。この治療法はすでに多くの成人症例で有効性が確認されており、米国がん研究所 (NCI) による報告では、臨床効果・特異性など 9 項目について有用性評価を行った結果、75 種のがんワクチンのうち WT1 ワクチンが第 1 位にランク付けされており、その効果に期待が集まっている (Cheever MA et al., Clin Cancer Res. 2009)。

### 2. 研究の目的

当科ではこれまで、再発リスクの高い白血病および悪性固形腫瘍の小児患者に対して WT1 ワクチンの臨床試験を行い、その効果についての検討を行ってきた。そして同治療法により小児症例においても良好な治療効果が認められ、今後安全で期待しうる治療法であるという結果を世界に先駆けて報告することができた。しかしながら腫瘍細胞は本来抗原刺激による T 細胞の活性化を抑制する作用をもっており、WT1-CTL の細胞数は血中にごく少数である。またワクチン投与後に活性化された T 細胞の寿命は 1 週間程度と非常に短い。WT1-CTL を体外に取り出し、in vitro で細胞数を増やそうとする試みは行われているが、CTL の培養は容易でなく、長期培養と十分な細胞数への増殖は現在のところ成功していない。当科では WT1 ワクチンを頻回・複数箇所接種することで効果の向上を図っているが、小児においては精神的・身体的苦痛が強い。また症例によっては WT1-CTL の数が期待されるレベルに達せず、十分な免疫活性を得られないケースもある。このような症例では確かに治療効果が乏しく、今後この免疫賦活機能の向上が必須と考えられる。

最近の研究により、腫瘍細胞には、生体のもつがん免疫監視機構に対して抵抗性を獲

得する能力があり、それが '免疫逃避' と呼ばれる治療抵抗性につながっていることが分かってきた。これらのことから、WT1 ワクチン療法とより効果的な T 細胞賦活法を組み合わせ、さらにはがん細胞の免疫逃避の解除を目指すことによる新たな治療法の開発を模索してきた。

がんワクチン療法を用いて十分な治療効果を得るために重要なポイントは、'がん細胞を認識・攻撃することのできる WT1-CTL を血液中に持続的に十分量出現させ' かつ 'がん細胞における免疫逃避シグナルを解除する' ことであろう。当教室ではこれまで、患者検体からのヒト iPS 細胞を数多く樹立し、小児難治性疾患の病態解明と治療法の開発を進めてきた。そこで本研究では、これまで積み重ねてきた WT1 ワクチン療法についての臨床知見と、当教室のもつ高いヒト iPS 細胞技術を組み合わせることにより、治療抵抗性の悪性腫瘍に対する、より効果的ながん免疫療法の開発を目指すこととした。

そのためにまず、患者の末梢血に少数存在している WT1-CTL をもとに WT1-ヒト iPS 細胞を樹立し、この WT1-iPS 細胞上に発現する免疫抑制性分子 (PD-1 および CTLA-4) に対し遺伝子改変を行うことのできる系を確立し、腫瘍細胞の免疫逃避作用を解除する方法を模索する。そのうえでこの WT1-iPS 細胞を再度 T 細胞 (WT1-iPS-CTL) へと分化誘導させることによって、長期に十分量の WT1 特異的 CTL を得ることを目指した。

一方で、WT1 によるワクチン効果をより侵襲性強く、小児においても患者への負担が少なくなる効果を目指して、WT1 を発現する町内細菌を経口投与することによるガン免疫療法の確立を目指した。

### 3. 研究の方法

患者末梢血からの WT-CTL の採取

まず iPS 細胞を樹立するための WT1-CTL の採取を行った。多くの小児悪性腫瘍 (血液・固形) では WT1 が発現されており、患者は末梢血中に WT1-CTL を有しているため、この内因性 WT1-CTL を、MHC テトラマー試薬を用いたフローサイトメトリーによって採取をおこなった。

臍帯血からの疾患特異的ヒト iPS 細胞の樹立

ヒト iPS 細胞の作成にあたっては、当初はレトロウイルスをもちいた初期化因子の導入を行っていたが、上述の WT1-CTL 細胞の数が予想以上に少なかったため、より効率の高いと言われるセンダイウイルスベクターをもちいて iPS 細胞樹立方法の確立を行った。

このセンダイウイルスベクターは産総研の中西真人らによって作成されたものであり、C1.15 株という持続感染型変異株である (図 1)。この株ではセンダイウイルス遺伝子上の P, M 遺伝子に変異を入れて細胞障害性

を低下させる改変を加えてある。また iPS 細胞樹立後にこのウイルスを除去させる必要があるが、SeV の L 遺伝子 (ウイルスポリメラーゼ遺伝子でありウイルス発現に必須) に対する siRNA を加えることで L 遺伝子発現を抑制させている。さらに L 遺伝子の末端に miR302a target sequence を 4 つならべたものを付加してあり、感染させた細胞が iPS 細胞の状態になると未分化細胞特異的 microRNA である miR302a によって L 遺伝子の発現が抑制されることになる。

このセンダイウイルスと臍帯血をもちいて、以下のように iPS 細胞を樹立した。

- ✓ 血液中の単核球分画に、山中 4 因子を搭載した持続発現型センダイウイルスベクターを感染させることで遺伝子導入を行う
- ✓ 感染 7~10 日後に iPS 細胞様コロニーをピックアップ
- ✓ センダイウイルスに対する shRNA を投与することによりベクターを除去し QRT-PCR により多能性の確認を行う

Sendavirus C1.15株 (産総研 中西ラボ作成)

SeV-KOSM302L\_vector



図 1. iPS 細胞樹立のために使用する持続発現型センダイウイルスベクター (産総研中西ラボ作成) 細胞傷害性と持続性に関する変異・欠失を導入し持続感染型としてある。

- ・ 4 つの初期化転写因子を同一ベクターに包含
- ・ iPS 細胞樹立後のウイルス除去；
  - L 遺伝子の末端に miR302a 標的配列を付加
  - L 遺伝子に対する siRNA を投与

#### 4. 研究成果

患者末梢血から、MHC テトラマー試薬を用いたフローサイトメトリーによって 内因性 WT1-CTL の採取をおこなったが、1 回の採血により  $1-2 \times 10^5$  個程度の CTL しか得られず、これまで行っていたレトロ・レンチウイルスをもちいた初期化因子導入法では iPS 細胞のコロニーは得られなかった。そこでより樹立効率の高い導入法の確立を目指し、上述のセンダイウイルスベクターによる iPS 細胞樹立を行った。

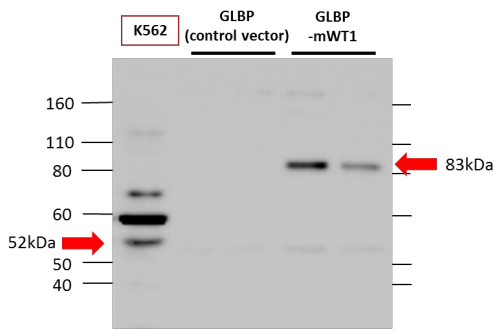
まずは臍帯血の血液細胞単核球をもちいた。単核球分画の細胞  $7.0 \times 10^5$  個をもちいて、これに SeV-KOSM302L ウイルスを MOI=3 で 2h 感染したところ、感染 5 日目前後と非常に早くからコロニーが出現し、そのコロニー数も多くみられた。感染後 7 日~12 日でピックアップ可能となり、各 10-20 個のコロニーをピックアップした。これらの iPS 細胞クローンに対してセンダイウイルスを除去するために siRNA 処理を行った。siRNA 処理および miR302a target sequence を加え

ない状態では半年経っても SeV は消失していなかったのに対し、1 回の siRNA 処理によって 30% の SeV が消失し、さらに miR302a 配列の付加によって 50% の SeV が消失した。このようにセンダイウイルスベクターをもちいたヒト iPS 細胞の作成技術の確立を行うことができた。しかしながら患者末梢血から得られた WT1-CTL からの樹立にはいまだ成功しておらず、現在、患者末梢血を WT1 ペプチドで直接刺激し、WT1-CTL を作製する方法に取り組んでいる。すなわち、患者末梢血単核球を WT1 ペプチドで 3 回刺激を行い、その都度細胞を濃縮していく方法である。この方法は数ヶ月という時間がかかるものの、iPS 細胞を樹立するには十分量の WT1-CTL を得ることが可能と考えられる。

#### WT1 経口ワクチンの開発

小児に対する侵襲をより少なくするために WT1 の経口ワクチンの開発を行った。WT1 タンパク質を発現・提示する菌として、ビフィズバクテリウム (Bifidobacterium) 属に属する微生物 (ビフィズス菌) に注目した。ビフィズス菌は、ヒトや他の動物の小腸の下流または大腸で見られる常在菌であり、偏性嫌気性のグラム陽性菌であるため、培養における選択性が高い。そして、生体親和性も高く、グラム陰性菌にあるエンドトキシンが存在しないため、安全性が高い。したがって、ビフィズス菌は食品の安全性に関する審査制度による基準により GRAS 認証されている。一方、GNB/LNB 基質結合膜タンパク質 (GL-BP: Galacto-n-biose-lacto-n-biose I-binding Protein) は、ビフィズス菌が有するラクト-N-ピオースおよびガラクト-N-ピオースを輸送する ABC タンパク質ファミリーに属する膜タンパク質である。ABC タンパク質は ATP をエネルギーとしてすべての生物の細胞膜上で特異的な物質の輸送を能動的に行う重要な膜タンパク質であり、細胞膜上に多種の ABC タンパク質が存在している。そのため、ABC タンパク質の一種である GL-BP は、GL-BP 表層発現のための細胞機能が備わっているビフィズス菌において、適切なプロモーターを利用すれば普遍的に発現する。そこでこのビフィズス菌を用いて、WT1 タンパク質をコードする DNA と、ビフィズス菌由来の GNB/LNB 基質結合膜タンパク質をコードする DNA を含み、ビフィズス菌表層に抗原としての WT1 タンパク質を提示するよう設計された形質転換ビフィズス菌をもちいてその有効性を確認した。

まず WT1 (117-439AA) の部分と GLBP との融合タンパクを発現するベクターを作成した。これをビフィズス菌に導入し、Western blott にてタンパク発現を確認した。

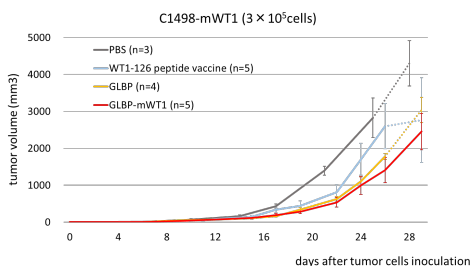


この経口ワクチン療法の効果を見るために、腫瘍細胞を形成させたマウスにワクチン接種を行った。マウスは C57BL/6J、6-7 週齢、メスを使用し、腫瘍細胞はマウス白血病細胞株(C1498)に mWT1 を強制発現させた細胞株をもちいた。 $3 \times 10^5$  細胞を PBS で  $100 \mu\text{l}$  にして day0 に皮下投与した。

Day1 より治療を開始し、*B. Longum* を PBS で  $2 \times 10^9$  CFU/ $100 \mu\text{l}$  に調整して連日経口ゾンデを用いて投与した。Day1 から 1 週間ごとに、WT1126 ペプチド  $100 \mu\text{g}$  + モンタナイドを腋窩リンパ節の辺りに皮内投与した。

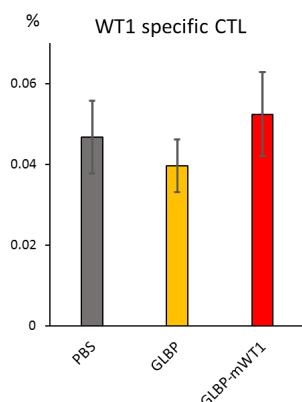


治療期間中、定期的に腫瘍径を測定し、day29 に脾臓などのサンプルを回収した。



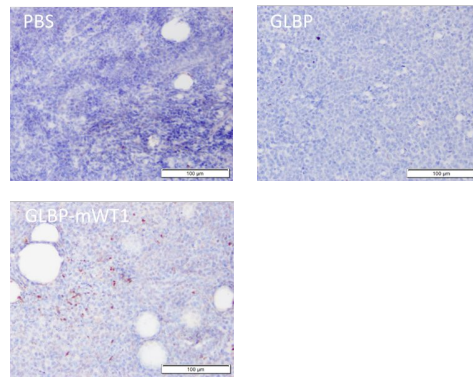
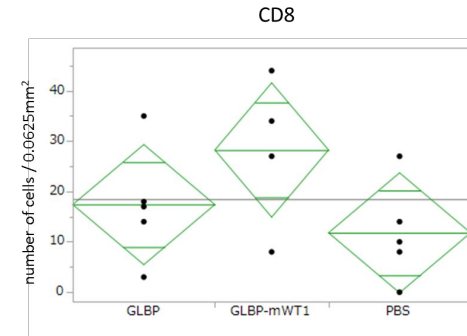
PBS 群で 1 匹、WT1-126 peptide vaccine 群で 2 匹、GLBP 群で 1 匹が死亡したが、平均腫瘍サイズとしては、PBS 群と比較して、GLBP-mWT1 群で最も小さくなり、ワクチン効果はみられなかった。

つぎに WT1 tetramer assay をもちいて、



WT1 特異的な CTL を FCM で検出した。Day29 にマウスから回収した脾細胞を使った tetramer assay を行った結果、まだ有意差は見られないものの、GLBP-mWT1 において %CTL が高い傾向が見られた。

さらに腫瘍細胞内の CD8 陽性細胞を確認したところ、GLBP-mWT1 群において CD8 陽性細胞の増加が認められた。



これらの結果から、経口 WT1 ワクチンの系についてまだ十分でないものの効果が見られることが分かってきた。今後投与の条件を検討することによってさらに有効な方法を確認したいと考えている。

## 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 1 件)

- Banno K, Omori S, Hirata K, Nawa N, Nakagawa N, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Sakuma T, Yamamoto T, Toki T, Ito E, Yamamoto T, Kokubu C, Takeda J, Taniguchi H, Arahori H, Wada K, Kitabatake Y, Ozono K. Systematic Cellular Disease Models Reveal Synergistic Interaction of Trisomy 21 and GATA1 Mutations in Hematopoietic Abnormalities. *Cell Rep.* 15(6):1228-41, 2016 (査読あり) doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.031.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮村 能子 (MIYAMURA, Takako)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：20379796

### (2) 研究分担者

橋井 佳子 (HASHII, Yoshiko)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：60343258

北島 康司 (KITABATAKE, Yasuji)  
大阪大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：80506494

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )