

令和 2 年 6 月 28 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10645

研究課題名(和文) WT1特異抗原を標的としたiPSDCs癌ワクチン療法の基礎研究

研究課題名(英文) A basic research of Cancer vaccine therapy using genetically modified iPSDCs expressing WT1 gene

研究代表者

岩本 博光 (Iwamoto, Hiromitsu)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60756592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：健康人末梢血単核球に山中4因子をセンダイウィルスベクターで導入し、iPS細胞を樹立した。この際はこれまで当科にて行ってきた皮膚線維芽細胞由来のiPS細胞に準じて行った。そしてこれをこれまでに当科で検討、報告してきた、サイトカインカクテルのよりiPS細胞由来樹状細胞(iPSDCs)へ分化誘導を行った。そしてこのiPSDCsが抗原提示細胞として十分な機能を有していることを確認した。次にこのiPSDCsにWT1遺伝子を導入し、その抗腫瘍効果を仮想抗原とヒトの癌細胞株を用いてCr release assayで評価し、腫瘍抗原特異的な抗腫瘍効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではiPSDCs癌ワクチン療法の標的として、消化器固形癌の80%以上で発現を認め、治療標的として最も有効であると言われている、WT1特異抗原を用いている。iPSDCsにWT1遺伝子を導入し、その抗原提示細胞としての機能を確認した。そしてその十分な抗腫瘍効果も確認した。今後は恒常的にWT1遺伝子を発現しているiPSDCsの分化誘導を確立し、より有効な癌ワクチンの開発を目指す。そして今日の治療法では治癒しない難治性消化器固形癌の新たな治療戦略の確立を目指す。

研究成果の概要(英文)：Yamanaka 4 factors were introduced into normal human peripheral blood mononuclear cells by Sendai virus vector to establish iPS cells. In this case, it was performed according to the iPS cells derived from dermal fibroblasts that have been performed in this department up to now. Then, this was induced and differentiated into iPS cell-derived dendritic cells (iPSDCs) by using the cytokine cocktail, which had been studied and reported in our department. Then, it was confirmed that these iPSDCs have a sufficient function as antigen presenting cells.

Next, the WT1 gene was introduced into the iPSDCs, and the antitumor effect was evaluated by the Cr release assay using a virtual antigen and a human cancer cell line, and the tumor antigen-specific antitumor effect was confirmed.

研究分野：消化器外科

キーワード：iPSDCs WT1特異抗原 癌ワクチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

今日、全世界で難治性癌に対する治療法の研究が盛んに行われているが、人類は今をもって「癌」を克服できないでいる。近年の癌研究の一つの柱が「第四の治療」として注目されている癌免疫治療であり、worldwide な臨床試験で治療効果が報告され、「Science」誌の Breakthrough of the year 2013 に選ばれるなどその可能性が以前より期待されていた。特に免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-1 抗体(オプジーボ)は、本邦においても 2014 年に悪性黒色腫に対し、2015 年には非小細胞肺癌に対し保険適応が認められた。その一方で消化器固形癌においてはまだ有効性を十分には示せておらず、腫瘍免疫学的な次の一手が必要とされている。唯一のプロフェッショナルな抗原提示細胞である樹状細胞(DCs)を用いた DCs 癌ワクチンは以前から有望視されてきた。しかし臨床レベルでは 2010 年に sipuleucel-T が IMPACT 試験によってその有効性を認められ FDA から認可されたのみである。

私達はこれまで DCs に TAA 遺伝子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, Int J Oncol 2007;31:931, 2008;32:459)。さらには今日の DCs 癌ワクチン療法の問題点を克服するために私達は iPS 細胞に着目し、マウス iPS 細胞から誘導された DCs (iPSDCs) が、naive な 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(Iwamoto H et al. Int J Cancer 2014;134:332-41)。私達はさらに研究を進め、ヒト体細胞からヒト iPS 細胞を樹立し、iPSDCs に分化誘導することに成功した。現在この癌ワクチン療法の有効性の検証を様々な角度から行っている。

本研究では iPSDCs 癌ワクチン療法の標的として、消化器固形癌の 80%以上で発現を認め、治療標的として最も有効であると言われている、WT1 特異抗原を用いて、今日の治療法では治癒しない難治性消化器固形癌の新たな治療戦略の確立を目指す。これまでヒト iPS 細胞のゲノム編集は非常に難しいと言われ、私達も iPSDCs への遺伝子導入はすべて iPSDCs へ分化誘導してから行ってきた。しかしこれでは導入効率も低く、導入の際の iPSDCs の喪失も大きな問題であった。近年になり CRISPR 法による効率で簡便なゲノム編集システムが開発され、iPS 細胞への遺伝子導入でも成果が報告されている。そこでより強力な抗腫瘍効果を得るために、樹立した iPS 細胞に直接特異抗原を導入し、これから iPSDCs へ分化誘導を行う。これにより高率に特異抗原を発現している多くの iPSDCs を得ることができる。本研究が臨床応用されれば、数多くの難治性消化器固形癌患者に大きな希望を与える治療戦略となると確信する。

2. 研究の目的

WT1 特異抗原を恒常的に発現する iPS 細胞を iPSDCs へ分化誘導する。この WT1 特異抗原導入 iPS 細胞由来樹状細胞(iPSDCs)刺激で誘導された in vitro 細胞傷害性リンパ球(CTLs)は、通常の iPSDCs 刺激から得られた CTLs よりも高い細胞傷害活性を発揮する。また in vivo でより腫瘍の増殖を抑制する。さらには高率に WT1 特異抗原を発現している iPSDCs はより強力な TAA 特異的な抗腫瘍効果を発揮することを証明する。

3. 研究の方法

WT1 特異抗原を恒常的に発現する iPS 細胞(iPS-WT1)の樹立

健康人(sample 1-5)末梢血単核球(PBMCs)にセンダイウィルスベクターより山中4因子を導入し、iPS 細胞を樹立する。次に当科にて所蔵している WT1 特異抗原遺伝子を carry する adenovirus vector より制限酵素にて WT1 特異抗原遺伝子を切り出し、PCR にて鋳型 DNA を調製する。そして In vitro transcription にて sgRNA を合成し、PCR にて切断確認用のターゲット DNA 調製し、sgRNA と Cas9 でターゲット DNA を切断する。そして Lipofectamine を用いてリポフェクション法にて WT1 特異抗原遺伝子を導入する。同様にコントロールである GFP 遺伝子導入も行う。その後 Puromycin による薬剤選択培養によりクローニングを行い、それぞれの導入遺伝子の安定発現株を樹立する。導入遺伝子の発現、導入効率の評価は intracellular-FACS にて測定する。

高率に WT1 特異抗原を発現している iPSDCs-WT1 の分化誘導

これまででは遺伝子導入は iPSDCs へ分化誘導してから、adenovirus vector にて遺伝子導入をしていたため、導入効率が低く、長時間の遠心操作のため生存率も低く、多くの導入遺伝子を発現している DCs を得ることはとても困難であった。しかし本研究では WT1 特異抗原を導入した iPS 細胞から iPSDCs を分化誘導することで、理論上は 100%導入した WT1 特異抗原を発現している iPSDCs を得ることができる。これによりより強力な抗腫瘍効果を得ることができると考えられる。研究で得られた iPS-WT1 及びコントロールの iPS-GFP を、前述の当科のプロトコルにより分化誘導し、iPSDCs-WT1 及びコントロールの iPSDCs-GFP を得る。このプロトコルは 5 Step から成り、Step1 では BMP4 を用いて iPS 細胞から streak-like cell を誘導する。Step2 では VEGF, basic FGF, SCF を用い KDR⁺CD34⁺の血管芽球様細胞への分化誘導を行う。Step3 では造血サイトカインにより造血細胞への分化を行う。Step4 では Flt-3 ligand, GM-CSF, M-CSF による単球への分化を行う。Step5 では CD14 陽性細胞から immature-iPSDCs への分化誘導を行う。そして GM-CSF, IL-4, TNF- α , LPS により mature-iPSDCs を得る。それぞれの遺伝子導入 iPSDCs の成熟能を、細胞表面マーカーの発現率を FACS にて測定し、サイトカイン分泌能を ELISA 法にて測定することにより、これまでに当科で蓄積してきた iPSDCs のデータと比較検討する。

WT1 特異抗原を発現している iPSDCs の抗腫瘍効果の比較検討

iPSCs-WT1, iPSCs-GFP を stimulator として PBMCs を responder として, in vitro で 3 回刺激し, bulk CTLs を誘導する. この CTLs を CD8+CTLs のみソートし, 導入した WT1 特異抗原を発現しているもの, していないものを含む各種の癌細胞株に対し, Negative control として用意する iPSCs-GFP 由来の CTLs と抗腫瘍効果を in vitro の Cr-release assay 及び in vivo の Winn assay で比較検討する.

1) 各種癌細胞株における WT1 特異抗原の発現の確認

intracellular FACS で当科が所蔵している癌細胞株での WT1 特異抗原の発現の有無を確認する. これとそれぞれの iPS 細胞, 癌細胞株の HLA typing の結果を基に, WT1 特異抗原を発現している細胞株, 発現していない細胞株をターゲットとして抗腫瘍効果の評価を行うこととする. また Positive target として PBMCs 由来 LCL に特異抗原遺伝子を導入した仮想自己特異抗原発現株を作製し用いる. またこれまで癌免疫治療の研究に利用する iPS 細胞由来の各免疫細胞は自己 iPS 細胞由来のものであり, HLA 適合の状況による有効性, 副作用等の差異を検討されたことはない. 現在 iPS 細胞由来網膜色素細胞の臨床研究が行われているが, これも自己のものであり, 非自己 iPS 細胞 (一部だけのもも含む HLA 不適合) 由来の細胞, 組織による研究はまだない. 今回可能であればこの点についても検討したい. そのため日本人に多いとされる HLA 24*2 マッチでの iPS 細胞と癌細胞株の組み合わせは必ず含むようにして, 可能な限り多くの HLA タイプのヒト iPS 細胞を樹立する.

2) Cr-release assay による in vitro での抗腫瘍効果の比較検討

それぞれの導入遺伝子発現 iPSCs を stimulator, PBMCs を responder として, 供培養を行い, in vitro 刺激にて bulk CTLs を得る. そして CD8+CTLs をソートし, 導入した癌幹細胞特異抗原に特異的な細胞傷害活性を Cr release assay を用いて比較検討する. Positive target は PBMCs 由来 LCL に癌幹細胞特異抗原遺伝子を導入した仮想自己 WT1 特異抗原発現株を用いる.

3) Winn assay による in vivo での抗腫瘍効果の比較検討

iPSCs-WT1, iPSCs-GFP を stimulator, PBMCs を responder として, 供培養 (iPSCs:PBMCs=1:20) を行い, in vitro 刺激を 3 回繰り返すことにより bulk CTLs を得る. 次に MACS Pro を用いて CD8+CTLs をソートする. そして標的癌細胞株 1 に対し CD8+CTLs が 10 の割合で混ぜ合わせ, 最終的に 100 μ L につき標的癌細胞株 1×10^5 cells と CD8+CTLs が 1×10^6 cells になるように PBS にて調整する. そしてこれを予め背中 of 毛を剃っておいた NOD/SCID mice の背中に皮下投与する. Negative control としてそれぞれの標的癌細胞株を 5 匹ずつに 1×10^5 cells のみ投与する. そして腫瘍のサイズを継時的に評価する. (short diameter)² \times long diameter \times 0.52 を指標とし, その値が 2000 を超えた場合はマウスの苦痛を考慮し, 安楽処置とする. すべてのマウスを解剖し, 腹膜播種, 肝転移, 脾臓転移などの転移の有無を確認し, ある場合はその数, 大きさを記録する.

4. 研究成果

健常人 (sample 1-3) 末梢血単核球 (PBMCs) に山中 4 因子をセンダイウィルスベクターで導入し iPS 細胞を樹立した. この際はこれまで当科にて行ってきた線維芽細胞由来の iPS 細胞に準じて行った. 今後当科ではこの方法により iPS 細胞を樹立していく. そしてこれをさまざまな方法により iPSCs に分化誘導した. その結果サイトカインカクテルにより分化誘導することがもっとも効率がいいことが明らかになった. そしてこれにより得られた iPSCs は抗原提示細胞として十分な機能を有していることが分かった. 今後当科ではこの方法により iPSCs を分化誘導していく.

次にこの iPSCs に WT1 遺伝子を導入し, その抗腫瘍効果を仮想抗原とヒトの癌細胞株を用いて Cr release assay で評価し, 腫瘍抗原特異的な抗腫瘍効果を確認した.

一方で iPS 細胞への腫瘍抗原遺伝子の導入は実現しなかった. クリスピー法など新しい方法を検討したが, 恒常的に WT1 遺伝子を発現している iPSCs は得られなかった. 今後は RNA レベルの導入などを検討し実現を目指したい.

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 Kitadani Junya, Ojima Toshiyasu, Iwamoto Hiromitsu, Tabata Hirotaka, Nakamori Mikihito, Nakamura Masaki, Hayata Keiji, Katsuda Masahiro, Miyajima Masayasu, Yamaue Hiroki	4. 巻 8
2. 論文標題 Cancer Vaccine Therapy Using Carcinoembryonic Antigen - expressing Dendritic Cells generated from Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-23120-z	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7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、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、早田啓治、辻俊明、丸岡慎平、竹内昭博、山上裕機
2. 発表標題 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118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 出口真彰、尾島敏康、岩本博光、北谷純也、田端宏堯、早田啓治、勝田将裕、宮澤基樹、中村公紀、中森幹人、山上裕機
2. 発表標題 iPS細胞由来樹状細胞を用いた癌ワクチン療法の基礎研究
3. 学会等名 第77回日本癌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾島敏康、北谷純也、岩本博光、田端宏堯、出口真彰、中森幹人、中村公紀、丸岡慎平、勝田将裕、早田啓治、山上裕機
2. 発表標題 CEA遺伝子導入iPS-DCを用いたがんワクチン療法の基礎研究
3. 学会等名 第77回日本癌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾島敏康、北谷純也、岩本博光、田端宏堯、出口真彰、中森幹人、中村公紀、勝田将裕、早田啓治、丸岡慎平、山上裕機
2. 発表標題 iPS細胞由来樹状細胞を用いたテラーメード癌ワクチン療法
3. 学会等名 第56回癌治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩本 博光、尾島 敏康、北谷 純也、田端 宏堯、出口 真彰、山上 裕機
2. 発表標題 腫瘍抗原 (TAA) 遺伝子導入iPS細胞由来樹状細胞 (iPSDCs) 癌ワクチン療法に最適なTAA遺伝子の探求
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾島 敏康、岩本 博光、北谷 純也、田端 宏堯、出口 真彰、山上 裕機
2. 発表標題 iPS細胞由来樹状細胞を用いたテラーメード癌ワクチン療法
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北谷 純也、尾島 敏康、岩本 博光、田端 宏堯、中森 幹人、中村 公紀、早田 啓治、勝田 将裕、宮嶋 正康、山上 裕機
2. 発表標題 CEA遺伝子導入iPS細胞由来樹状細胞を用いた癌免疫治療の実現可能性
3. 学会等名 第72回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2017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
研究分担者	山上 裕機 (Yamaue Hiroki) (20191190)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	
研究分担者	尾島 敏康 (Ojima Toshiyasu) (60448785)	和歌山県立医科大学・医学部・講師 (24701)	
研究分担者	早田 啓治 (Hayata Keiji) (90637654)	和歌山県立医科大学・医学部・助教 (24701)	