

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20828

研究課題名（和文）メラノーマに対する4-1BBL遺伝子改変iPS細胞を用いた細胞医薬開発

研究課題名（英文）Development of Induced pluripotent stem cell expressing 4-1BBL against melanoma

研究代表者

栗山 春香（Kuriyama, Haruka）

熊本大学・病院・診療助手

研究者番号：70879882

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）：我々は、MO4細胞を腹腔播種したB6マウスをiPS-ML投与群、iPSC-ML-41BBL投与群、抗PD-1抗体+ iPS-ML投与群、抗PD-1抗体+ iPS-ML-41BBL投与群、コントロール群の5群に分け、抗PD-1抗体単独での治療と比較して、抗PD-1抗体と4-1BBL遺伝子改変iPS細胞の併用により、治療効果が上乗せされることを確認した。さらに治療後の腫瘍組織を採取し、抗PD-1抗体と4-1BBL遺伝子改変iPS細胞の併用により治療を行なった腫瘍組織にて、腫瘍浸潤CD8+ T細胞数が有意に増加していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害薬（ICI）の導入によりメラノーマは長期生存が見込めるように大きく変化したが、日本人ではICIの奏効率は3割程度とその効果は限定的である。ICIの無効例ではT細胞の浸潤していない腫瘍が増殖していることが報告されている。

我々は4-1BBL遺伝子改変iPS細胞が腫瘍微小環境をcold tumorからhot tumorに変化させ、ICIである抗PD-1抗体の効果をより高いものにする可能性を示すことができた。さらにiPS-ML-41BBLは強い抗原提示能力も有しているためICIの効果を強固なものにする、メラノーマに対する新しい治療戦略となりうると考える。

研究成果の概要（英文）：We divided B6 mice peritoneally seeded with MO4 cells into 5 groups: iPS-ML group, iPS-ML-41BBL group, anti-PD-1 antibody + iPS-ML group, anti-PD-1 antibody + iPS-ML-41BBL group and control group. We confirmed that the combination of anti-PD-1 antibody and 4-1BBL gene-modified iPS cells increased the efficacy of the treatment compared to treatment with anti-PD-1 antibody. Furthermore, we collected tumor tissues after treatment and confirmed that the number of tumor-infiltrating CD8+ T cells was significantly increased in the tumor tissues treated with the combination of anti-PD-1 antibody and 4-1BBL gene-modified iPS cells.

研究分野：melanoma

キーワード：41BB-L iPS-ML melanoma

1. 研究開始当初の背景

手術不可能な進行期メラノーマに対して、以前はダカルバジンなどの殺細胞性抗がん剤のみが治療選択肢であり、その長期寛解率は2%と非常に予後不良であった。2014年に免疫チェックポイント阻害薬(ICI)である抗PD-1抗体、抗CTLA抗体が導入されて以降長期生存が見込めるように大きく変化した。しかしながら、ICIの日本人における奏効率は約3割程度であり、今後進行期メラノーマに対するさらなる治療開発が必要である(Robert C et al. *N Engl J Med.* 2019)。ICIと同時に注目されているがん免疫療法であるACTは、腫瘍内浸潤リンパ球を患者毎に採取し、培養後に再び体内に投与する治療法であり、メラノーマに対する奏効率は7割を超える(Phan GQ et al. *Cancer Control*, 2013)。しかし、その作業の困難さやコストの観点から限られた専門施設のみでしか治療を受けることができず、汎用化は極めて困難である。進行期メラノーマの治療にはこれらの問題を解決できるACTが必要とされており、ACTとICIの併用により効果の高い治療が可能になると考える。

2. 研究の目的

我々はこれまで不死化したiPS細胞由来ミエロイドライン(iPS-ML)を用いた細胞移入療法について研究を行ってきた。iPS細胞からミエロイド細胞、マクロファージへの分化誘導法は、共同研究者であった熊本大学免疫識別学講座の故千住覚が開発したものであるが、他に英国および米国の計3つの研究グループからも報告されている。しかし、我々のグループは、マウス、サルおよびヒトのES細胞、さらにはヒトiPS細胞を用いて免疫制御能を有する遺伝子改変マクロファージを作製する手法を確立しており、この分野において先んじている。将来的にはiPS細胞バンクから事前に各種HLAのiPS-MLを作成しておき、速やかにクオリティーの保証された細胞を供給することを想定しており、次世代的な細胞移入療法と言える。

我々は免疫チェックポイントのアクセラレーター遺伝子である4-1BBに着目した。4-1BBはTNF受容体スーパーファミリーに属する遺伝子であり、T細胞に発現し、4-1BB ligand (4-1BBL)の刺激により、CD4⁺、CD8⁺T細胞の活性化を起こす。4-1BBはIL2、IFN- γ などのサイトカインを誘導することが明らかにされており、有望な分子として研究が進んでいる。しかしながら、抗4-1BB抗体の臨床試験ではFc γ Rの相互作用による臓器障害が問題になっており、臨床試験はここ10年進展していない。そこで、4-1BB分子を標的として、かつ抗体製剤ではない方法として、iPS-MLへ4-1BBのligandである4-1BBLを遺伝子導入することを考えた。本研究の目的は、iPS-MLに4-1BBLを強発現させ、iPS-MLの腫瘍局所への遊走能と抗原提示細胞としての働きを増強させることで、マウスメラノーマに対する治療効果が増強されることを確認し、さらにICIとの併用による乗せ効果を確認することである。また、iPS-MLの臨床実用では、進行期メラノーマの患者を治療するためにヒト同種iPS-MLを使用する予定である。したがって、同種幹細胞由来C57BL/6マウスとはMHCクラスIIが一種のみ異なる129Svマウス系統から樹立されたiPS-MLがマウスメラノーマモデルでICIの効果を乗せできるかも同様に確認する。

3. 研究の方法

本研究の具体的な実験計画としては、MO4細胞を腹膜播種したマウスをiPS-ML投与群、iPS-ML-

41BBL 投与群、抗 PD-1 抗体+ iPS-ML 投与群、抗 PD-1 抗体+ iPS-ML-41BBL 投与群、コントロール群の 5 群に分け、併用による治療の上乗せ効果を検証する。さらに、治療後の脾臓や腫瘍を採取し、リンパ球の免疫染色およびフローサイトメトリーでの解析を行い、制御性 T 細胞、メモリー T 細胞、エフェクター T 細胞の分布を確認することで、生体内での免疫応答の機能解析を行う。さらに、治療後の腫瘍をマクロファージのマーカーである CD68、CD163、CD204、CD206 等の免疫染色を行い、腫瘍浸潤マクロファージの性状を確認する。また腫瘍微小環境について種々のサイトカインを網羅的に測定し、その状態の治療による変化を検討する。

4 . 研究成果

我々は、MO4 細胞を腹膜播種した B6 マウスを iPS-ML 投与群、iPSC-ML-41BBL 投与群、抗 PD-1 抗体+ iPS-ML 投与群、抗 PD-1 抗体+ iPSC-pMCs-41BBL 投与群、コントロール群の 5 群に分け、抗 PD-1 抗体単独の治療と比較して、抗 PD-1 抗体と 4-1BBL 遺伝子改変 iPS 細胞の併用により、治療効果が上乗せされることを確認した。さらに治療後の腫瘍組織を採取し、免疫染色を行った。抗 PD-1 抗体と 4-1BBL 遺伝子改変 iPS 細胞の併用により治療を行なった腫瘍組織にて、腫瘍浸潤 T 細胞数が有意に増加していた。さらに flowcytometer にて T 細胞の分布を調べることにより、CD8+T 細胞の割合が有意に増加していることを確認した。我々は、上記の結果は 4-1BBL 遺伝子改変 iPS 細胞が腫瘍微小環境を cold tumor から hot tumor に変化させ、免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) である抗 PD-1 抗体の効果をより高いものにする可能性を示唆するものと考えている。また、実用化にむけて、アロ環境の治療効果や副作用についても検討しており、129 系統の iPS 細胞から樹立した iPS-ML に 41BBL を遺伝子導入した 129iPS-ML-41BBL と抗 PD-1 抗体の併用における上乗せ効果も確認した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------