

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650609

研究課題名（和文）

iPS 細胞より誘導した樹状細胞と理想的がん抗原を利用したがんの細胞免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of cellular cancer immunotherapy by using human iPS-cell-derived dendritic cells and ideal cancer-associated antigens

研究代表者 西村 泰治 (NISHIMURA YASU HARU)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：10156119

研究成果の概要（和文）：

がんを手術、抗がん剤および放射線療法などの既存の確立された治療法に加えて、患者さんが持っている免疫力で治す治療法を、開発するための研究を実施しています。樹状細胞と言う血液細胞の一種は、異物を排除する T 細胞と言う免疫系の細胞に異物の侵入を知らせ、異物を排除すべく T 細胞に強力な免疫反応を誘導します。本研究はヒト iPS 細胞から樹状細胞を作り出し、これにがん細胞を攻撃する T 細胞を活性化する能力を賦与する方法を開発し、がんの免疫療法に応用するための基礎研究に成功いたしました。

研究成果の概要（英文）：

We established a method by which we can obtain a large number of functional dendritic cells (DC) with a simple procedure from human iPS cells. We transduced iPS cell-derived CD11b⁺ myeloid cells with *cMYC* and *BMI1* genes associated with proliferative or anti-senescence effects. This made the cells capable of propagating for more than 4 months in an M-CSF-dependent manner while retaining the capacity to differentiate into DC. We named the iPS cell-derived proliferating myeloid cells “iPS-ML”, and the iPS-ML-derived dendritic cells “ML-DC”. In addition, we generated TAP2-deficient iPS cell clones by zinc finger nuclease-aided targeted gene disruption. TAP2-deficient iPS-ML avoided recognition by pre-activated allo-reactive CD8⁺ T cells. The TAP2-deficient ML-DC expressing exogenously introduced HLA-A2 genes stimulated HLA-A2-restricted tumor antigen-specific CD8⁺ T cells obtained from HLA-A2-positive allogeneic donors, resulting in generation of tumor antigen-specific CTL lines. TAP-deficient iPS-ML introduced with various HLA class I genes may serve as an unlimited source of DC for vaccination therapy. Based on the present study, we propose a DC-producing system, which is simple, safe, and applicable to any patients irrespective of their HLA types. This technology will pave the way for the mass production of DC for therapeutic use. We have also succeeded in inhibition of tumor growth of intraperitoneal dissemination of human cancer cells in immune-deficient mice by intraperitoneal injection of human iPS-macrophage genetically modified to secrete interferon-beta.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：iPS 細胞、樹状細胞、がん抗原、腫瘍免疫、がん免疫療法、T 細胞

1. 研究開始当初の背景

マウスでは、がん抗原ペプチドをそのまま *in vivo* に投与するよりも、体外でがん抗原またはがん抗原由来のペプチドを負荷、あるいはがん抗原遺伝子の導入により、がん抗原を発現させた樹状細胞(DC)を投与する方法が、がん免疫療法として有効であることが示されている。ヒトのがん治療においても、前立腺がんに対する自己 DC を用いた細胞ワクチン療法の有効性が、大規模な臨床試験の結果をもとに報告されている。しかし一般的に、がん患者自身の末梢血の単球から樹状細胞を大量に調製することは困難である。

一方、我々はすでに、マウス、サル、ヒト ES 細胞およびマウス iPS 細胞から、十分な抗原提示機能を有する樹状細胞 (ES-DC あるいは iPS-DC) や、食食機能を有するマクロファージ(iPS-MP)を分化誘導することに成功している。さらに ES 細胞あるいは iPS 細胞に抗原ならびに免疫調節分子の遺伝子を強制発現させた後に、ES-DC あるいは iPS-DC を分化誘導して、抗原特異的な免疫応答を増強、あるいは抑制 (*J. Immunol.* 174:1888, 2005, *J. Immunol.* 178: 918, 2007) させることにより、マウスの *in vivo* における腫瘍免疫の増強、あるいは実験自己免疫疾患の発症抑制に成功している。

そこで、これらのヒト iPS-DC/MP を、がん免疫療法に応用できるか否かを検討するために、前臨床研究を実施することにした。

2. 研究の目的

上述した手法の臨床応用を目指して、ヒト T 細胞に抗腫瘍免疫を誘導できる iPS-DC や、腫瘍を直接攻撃する iPS-MP を作成し、その臨床応用に向けた開発研究を実施することを、本研究の目的とした。

3. 研究の方法

平成 23 年度は、研究代表者らがすでに同定した T 細胞性がん免疫療法の標的として、理想的な新規がん精巢(CT)抗原に特異的な T 細胞を、iPS-DC を用いて誘導できるか否かを検討した。このために iPS-DC に申請者らが同定した CT 抗原由来の、HLA-A2 あるいは A24 拘束性 CTL エピトープペプチドを負荷した後に、我々が既に樹立した当該抗原ペプチドに特異的な CTL、あるいは Th1 細胞に対して、*in vitro* で抗原提示を出来るか否かを検討した。

また将来のヒト iPS-DC の臨床応用を目指して、ヒト iPS-DC を大量に作成するために、ヒト iPS 細胞から血球細胞に分化した細胞に、細胞増殖を促進する種々の遺伝子を強制発現させ、このようにして得た大量培養可能な細胞から、機能を有する iPS-DC や iPS-MP を誘導できるか否かについて検討した。またヒト iPS-DC を無血清かつフィーダ

ー細胞を用いることなく誘導するための、培養条件について検討した。

平成 24 年度は、ヒト iPS 細胞より *in vitro* において分化誘導した樹状細胞 (iPS-DC) を、免疫細胞療法に実用化する際に障壁となる、iPS-DC ドナーと患者(レシビエント)との間の HLA を主とする、組織不適合性の問題をクリアするための研究を行った。このために、HLA クラス I 分子に結合するペプチドを、細胞質から小胞体の中に輸送する機能を有する、TAP2 遺伝子を標的破壊した iPS 細胞の樹立を試みた。さらに TAP2 欠損 iPS 細胞に任意の HLA クラス I 遺伝子を強制発現させ、この HLA クラス I 分子に特異的に結合する抗原ペプチドの負荷により、当該 HLA クラス I と抗原ペプチドの複合体のみを発現する、iPS-DC の樹立を試みた。そして、この iPS-DC が特異的 CTL を誘導できるか否かを検討した。

さらに、iPS-MP に IFN- β 遺伝子を強制発現させた細胞を用いて、免疫不全マウスを利用して、ヒトの胃癌や膵臓癌細胞株を腹腔内に移入して作成した、癌の腹膜播種モデルに対する治療効果を検討した。

4. 研究成果

CT 抗原ペプチドを負荷した HLA-A2 あるいは A24 陽性のヒト iPS-DC が、当該 HLA により CTL に提示されることが証明されている、CT 抗原ペプチドを負荷した際に、特異的な CTL を誘導できることを証明した(論文 5, 6, 7)。さらにヒトの皮膚線維芽細胞にレンチウイルスベクターを用いて Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 の 4 つの初期化遺伝子を発現させ、リプログラミング後にミエロイド系細胞に分化させて c-Myc の発現を失った細胞に、再度 c-Myc および BMI1 を強制発現させることにより、大量の iPS 細胞由来のミエロイド系細胞 (iPS-ML) を得ることに成功した。この iPS-ML を GM-CSF や IL-4 を用いて培養することにより、iPS-DC を大量に樹立できた(論文 1. 4)。

また、ヒト iPS 細胞が有する内因性の HLA クラス I 関連分子の発現を欠損させるために、TAP2 遺伝子を標的破壊したヒト iPS 細胞を作製した。この TAP2 欠損 iPS 細胞より分化させた iPS-DC は、内因性の HLA クラス I 分子の発現が著明に低下しており、アロ HLA クラス I 反応性細胞傷害性 T 細胞による拒絶反応から逃避できることが判明した。この細胞に日本人で頻度が高い HLA クラス I 遺伝子を発現させ、当該 HLA に特異的に結合する抗原ペプチドを負荷することにより、当該 HLA クラス I 分子・ペプチド複合体のみを発現する iPS-DC を作製する方法を開発した(論文 3, 4)。

また将来、iPS-DC を臨床応用する際には、

OP9 フィーダー細胞と血清を使用せずにヒト iPS 細胞から iPS-DC を分化誘導する方法を確立する必要がある。そこで、種々の無血清培養液や特殊な表面加工を施した培養用容器を利用してヒト iPS-DC を分化誘導する方法について検討し、これが可能であることを示したが、iPS-DC の収量が少ないことが、今後解決すべき問題点として残された。

さらに、iPS-MP に IFN- β 遺伝子を強制発現させた細胞を、ヒトの胃癌あるいは膵臓癌細胞株を免疫不全マウスの腹腔内に移入して作成した、腹膜播種モデルマウスの腹腔内に投与したところ、著明な腫瘍の縮小とマウスに延命効果を誘導することに成功した(論文 2)。

以上より、HLA が適合したアロ iPS-ML 細胞を、あらかじめ大量にストックし、これより iPS-DC や iPS-MP を分化誘導して、がん免疫療法に応用すれば、患者自身より iPS 細胞を樹立する時間を短縮することができ、臨床応用に適した方法になると考えられた。

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 7 件)

- 1) Haruta, M., Tomita, Y., Imamura, Y., Matsumura, K., Ikeda, T., Takamatsu, K., Nishimura, Y., and Senju, S. Generation of a large number of functional dendritic cells from human monocytes expanded by forced expression of cMYC plus BMI1. *Human Immunology* in press 査読有
- 2) Koba, C. Haruta, M. Matsunaga, Y. Matsumura, K. Haga, E. Sasaki Y. Ikeda, T. Takamatsu, K. Nishimura, Y. and Senju, S. Therapeutic effect of human iPS-cell-derived myeloid cells expressing IFN- β against peritoneally disseminated cancer in xenograft models. *PLOS ONE* in press. 査読有
- 3) Haruta, M. Tomita, Y. Yuno A. Matsumura K. Ikeda T. Takamatsu K. Haga E. Koba C. Nishimura Y. TAP-deficient human iPS cell-derived myeloid cell lines as unlimited cell source for dendritic cell-like antigen presenting cells. *Gene Therapy* 20: 504-513, 2013. 査読有 DOI:10.1038/gt.2012.59
- 4) 富田雄介、千住覚、入江厚、西村泰治 HLA 多型を考慮したがん免疫療法の開発 日本組織適合性学会誌、20 巻 45-56、2013 査読無

5) Senju S, Haruta M, Matsunaga K, Fukushima S, Ikeda T, Takamatsu K, Irie A, Nishimura Y. Generation of dendritic cells and macrophages from human induced pluripotent stem cells aiming at cell therapy. *Gene Therapy* 18: 847-883, 2011 査読有 DOI:10.1038/gt.

6) Seju S, Matsunaga K, Fukushima S, Hirata S, Motomura Y, Fukuma D, Matsuyoshi H, Nishimura Y. Immunotherapy with pluripotent stem cell-derived cells. *Seminars in Immunopathology* 33: 603-612, 2011 査読有 DOI:10.1007/s00281-011-0263-y

7) 福島聡、千住覚、尹浩信、西村泰治 がん抗原と α -GalCer を負荷した樹状細胞による腫瘍免疫の増強 臨床免疫・アレルギー科、55 巻 262-268、2011 査読無

[学会発表] (合計 8 件)

- 1) 千住覚、西村泰治 TP2-deficient human iPS cell-derived dendritic cells. 第 41 回日本免疫学会学術集会、2012.12.05~2012.12.07、神戸国際会議場(神戸市)
- 2) Senju S., 他 9 名, Nishimura Y. Cancer immunotherapy using ideal Tumor-associated antigenic peptides and human iPS cell derived dendritic cells. Centennial of Hashimoto Disease 2012.12.01~2012.12.04、アクロス福岡(福岡市)
- 3) 西村泰治 TAP 欠損ヒト iPS 細胞を用いた HLA オーダーメイド樹状細胞療法の開発、日本人類遺伝学会第 57 回大会、2012.10.25~2012.10.27、京王プラザホテル(東京都)
- 4) Nishimura Y. 他 3 名 Cancer Immunotherapy using ideal tumor-associated antigenic peptides and human iPS cell-derived dendritic cells. The 16th International HLA and Immunogenetics Conference, 2012.5.31~2012.6.03 リバプール(英国)
- 5) Senju S., 他 2 名, Nishimura Y. Targeted disruption of the TAP2 gene in human iPS cells and generation of an infinite dendritic cell source that is applicable to vaccination therapy irrespective of HLA types of the patients. The 16th International HLA and Immunogenetics Conference, 2012.5.31~2012.6.03 リバプール(英国)

- 6) 西村泰治、中面哲也、富田雄介、中村祐輔、千住寛 HLA 多型に基づく、がん免疫療法・個別化医療の実践 第 56 回日本人類遺伝学会・第 11 回東アジア人類遺伝学会共同大会、2011. 11. 10、幕張メッセ (千葉市)
- 7) 西村泰治、中面哲也、富田雄介、中村祐輔、千住寛 理想的な癌抗原と ES/iPS 細胞を利用した癌免疫療法の開発、第 70 回日本癌学会学術総会、2011. 10. 03、名古屋国際会議場 (名古屋市)
- 8) 西村泰治 がん免疫療法：基礎から臨床への橋渡し研究、第 32 回癌免疫外科研究会、2011. 05. 19、和歌山マリーナシティロイヤルパインズホテル (和歌山市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.immgenet.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 泰治 (NISHIMURA YASUHARU)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：10156119

(2) 研究分担者

粟井 博丈 (AWAI HIROTAKE)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：10433020

(3) 連携研究者

なし