

平成 30 年 7 月 23 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293308

研究課題名(和文) 膵癌に対するiPS細胞由来樹状細胞を応用した革新的ペプチドワクチン療法の開発

研究課題名(英文) Development of innovative peptide vaccine therapy using iPS cell-derived dendritic cells against pancreatic cancer patients

研究代表者

山上 裕機 (Yamaue, Hiroki)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20191190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,600,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌患者3症例の末梢血単核球よりセンダイウイルスベクターを用いてYamanaka 4 factorを導入しiPS細胞を誘導した。その後iPS細胞からの樹状細胞(DC)への分化誘導を行った。健康人と膵癌患者で得られたiPS細胞由来DCの細胞表面マーカー、抗原提示能および遊走能は同等であった。さらに膵癌患者iPS-DCにカクテルペプチド(KIF20A, MUC16, Mesothelin, VEGFR1/R2)をパルスし、in vitroで細胞傷害性Tリンパ球を誘導したところ、患者由来の膵癌細胞を特異的に傷害することを世界で初めて確認した。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether human induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived dendritic cells (hiPSDCs) pulsed with cocktail peptide (KIF 20 A, MUC 16, Mesothelin, VEGFR 1, R 2) could induce pancreatic cancer cell-specific cytotoxic T cells in a preclinical model using pancreatic cancer patients. The surface marker expression, cytokine secretion and migratory capacity of the hiPSDCs were equivalent between pancreatic cancer patients and healthy volunteers. Cytotoxic T cells activated by cocktail peptide pulsed hiPSDCs exhibited pancreatic cancer cells-specific cytotoxic activity against the target cells. This was the first study to show an antitumor effect on pancreatic cancer cells by vaccination with iPSDCs. This innovative cocktail peptide pulsed hiPSDCs is a promising tool for clinical applications of vaccine therapy for treating pancreatic cancer patients.

研究分野：膵臓外科

キーワード：iPS細胞 樹状細胞 がんワクチン療法 細胞傷害性Tリンパ球

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、膵癌の治療成績向上のために、科学研究費補助金 (2007-2009) 基盤研究 B-19390341 で細胞傷害性 T リンパ球を誘導する HLA-A*2402 拘束性のエピトープペプチドを同定して新規免疫療法の開発を行った (*Cancer Sci*, 2009, *Pancreas* 2010, *Cancer Sci*, 2010, *J Biomed Biotechnol* 2012, *Cancer Sci* 2012, *Genome Res* 2012). さらに、科学研究費補助金 (2011-2013) 基盤研究 B-23390331 で、2 方向性に作働するペプチドによる膵癌治療、すなわち、1)膵癌細胞の増殖・転移を抑制する KIF20A 由来ペプチド (*Br J Cancer* 2011, *J Biomed Biotechnol* 2012) と網羅的遺伝子解析で新たに同定した膵癌浸潤に關与する MUC16 および Mesothelin 分子由来ペプチド (*Pharmacogenet Genomics* 2012, *Cancer Sci* 2012, *Pancreas* 2012) のカクテルペプチドにより膵癌細胞の増殖を抑制することと、2) VEGFR1, R2 由来ペプチド (*Cancer Res* 2005, *Cancer Sci* 2010) で腫瘍新生血管を抑制する新規ワクチン療法を開発するに至った。しかし、樹状細胞 (DC) の抗原提示機能と所属リンパ節への遊走能は膵癌患者では抑制されていることがペプチド免疫療法の問題点であり、その解決が臨床的な急務であった。

DC は、T 細胞への最も効果的な抗原提示能力をもった免疫細胞である。これまで申請者らは、多くの DC ワクチン療法に関する研究を行ってきた。しかしながら、臨床的に用いる場合、担癌患者から誘導した DCs は成熟能が低く、さらに抗原提示能が低いとされる。われわれは、iPS 細胞 induced pluripotent stem cells (iPSCs) が細胞療法に用いる DC を作製する材料として有用ではないかと考えた。申請者らは、マウス iPS 細胞由来 DC (iPSDC) は、bone marrow-derived DCs (BMDCs) と同等の樹状細胞としての機能及び抗原提示能を有していることを報告した (*Int J Cancer* 2014, *Sci Rep* 2018)。これまでの申請者らの研究結果は、iPSDC は細胞医薬としての DC ワクチンの臨床応用可能性を示唆するとともに、難治性膵癌に対し、強力な抗腫瘍効果を発揮するツールとなりうることを示した。

2. 研究の目的

腫瘍抗原ペプチドで刺激した (パルスした) iPS 細胞由来 DC を用いたワクチンシステムは膵癌患者における免疫寛容機構を克服する全く新しい免疫療法になり得ることを提唱する。

作業仮説: 膵癌患者から作成した iPS 細胞を DC へと分化誘導し、腫瘍抗原ペプチドで DC を刺激することで誘導された細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) は、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) 由来の DC により誘導された CTL と同等の腫瘍抗原特異的な細胞傷害活性を発揮する。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPSDCs の分化誘導

健康人ドナー (HLA-A24/02) の皮膚組織からヒト皮膚線維芽細胞の初代培養を行い、センダイウイルスベクター (DNAVEC Corporation) にて山中 4 因子を遺伝子導入し、iPS 細胞の樹立を行った。得られた iPS 細胞を Matrigel コートした dish でフィーダーレス培養を行い、その後 5 ステップで分化誘導を行った。第 1 に bone morphogenetic protein (BMP) 4 を添加し 4 日間培養した。第 2 に vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (b-FGF), stem cell factor (SCF) を添加した StemPro[®]-34 (Thermo Fisher Scientific) に置き換え 2 日間培養した。第 3 に SCF, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), thrombopoietin (TPO), Fms-related tyrosine kinase (Flt)-3 ligand, interleukin (IL) -3 を添加した StemPro[®]-34 に変更し、7 日間培養した。第 4 に M-CSF, Flt-3 ligand, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) を添加した StemPro[®]-34 に変更し 3 日間培養した。浮遊してくる細胞を CD14 抗体で標識し、auto MACS Pro (Miltenyi Biotec) にて分離した。第 5 に回収した細胞を GM-CSF, IL-4 を加え 5 日間培養し、その後 2 日間 maturation cocktail として prostaglandin E2 (PGE2), IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF) - α を添加し浮遊細胞を回収した。

(2) ヒト iPSDCs の機能評価

成熟能の比較

ヒト iPSDCs と MoDCs の表面マーカーの発現 (CD11c, CD80, CD83, CD86, CD40, HLA-ABC, HLA-DR) に関して、未成熟、成熟 DCs についてフローサイトメトリーにて比較検討した。

サイトカイン産生能の比較

ヒト iPSDCs と MoDCs のサイトカイン産生能の比較のため、それぞれの未成熟、成熟 DCs にてサイトカインの分泌 (IFN- γ , IL-12p70) を ELISA 法にて比較検討した。

遊走能の比較

まず、8.0 μ m pore transwell plate (Corning) の lower chamber に 100ng/ml macrophage inflammatory protein (MIP)-3 β を添加した AIM-V medium を 1 ml 加えた。未成熟、成熟ヒト iPSDCs または MoDCs を 1.5x10⁶ cells/ml の細胞濃度で AIM-V medium に suspend し、0.1ml を upper chamber に添加した。37°C, 5% CO₂ で 2 時間インキュベートし、lower chamber 内に遊走してきた DCs をセルカウントし、それぞれ比較検討した。

(3) 膵癌患者からの iPS-DC の誘導

当科を受診した切除不能膵癌患者から健康人と同様の CiRA protocol で iPS 細胞を誘導す

る。健常人と膵癌患者で得られた iPS 由来 DC の細胞表面マーカーの相違、抗原提示能および遊走能を指標とした成熟能の相違を FACS, IL-12 ELISA, IFN-g ELISA で確認する。さらに、癌抗原遺伝子の発現がないか RT-PCR で慎重に検討する。

(4) カクテルペプチド刺激と細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導

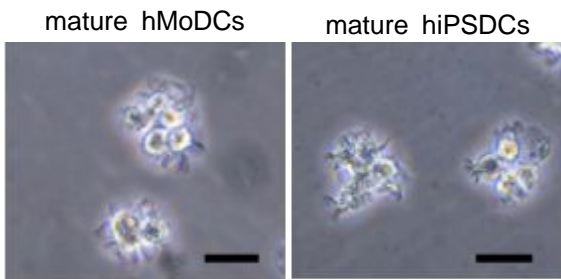
使用するペプチドは、標的タンパク (KIF20A, MUC16, Mesothelin, VEGFR1, R2) のアミノ酸配列から HLA-A*2402 拘束性エピーペプチド (9 mer) をコンピューター解析により 10 種類のペプチドを作成する (HLA 結合モチーフ: 2nd portion; tryptophan, tyrosine, 9 th; leucine, tryptophan, isoleucine, methionine)。HLA への親和性解析は以前よりわれわれが報告している HLA-Binding assay で行う (*Int J Cancer* 1999, *Cancer Res* 2001, *Cancer Res* 2005)。これらはすべて HLA-A24 拘束性 9mer ペプチドであり、GMP 基準の製剤を実験に使用する。誘導した iPS-DC に 5 種類のペプチドを *in vitro* でパルスし、2 日間培養する。ペプチド刺激後の DC の表面マーカー CD80, CD83, CD86, MHC-class I, class II および CCR7, Toll-like receptor (TLR)2, 4 の発現確認を flow cytometry で検討し、カクテルペプチドの DC 活性化能を検討する。膵癌患者自己 PBMC から CTL を誘導し、その機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) 健常人 iPSDCs の分化誘導

第 3 ステップの後半になると、ドーム状の胚様体を形成し、第 4 ステップでは小円形の浮遊細胞を多数認めた。第 5 ステップでは、樹状突起を持つ淡明な細胞が現れ、maturation によりその数も多くなった。形態的にも MoDCs と同様であった。

図 1 健常人 iPSDCs の分化誘導



(2) 健常人 iPSDCs の機能評価

成熟能の比較

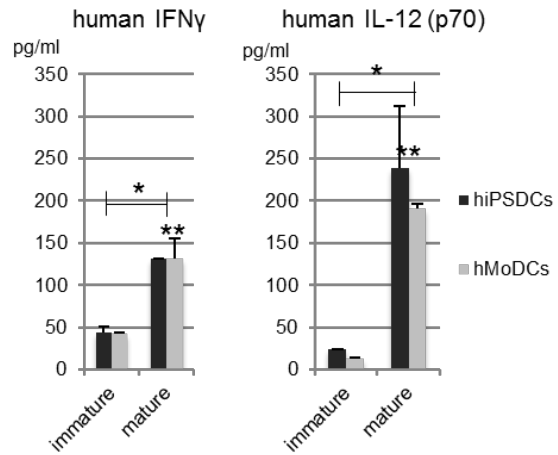
iPSDCs は MoDCs と同様に maturation cocktail にて成熟し、表面マーカーである CD80, CD83, CD86, CD40, HLA-ABC, HLA-DR の同程度の発現を認めた。

サイトカイン産生能の比較

iPSDCs, MoDCs いずれも、未成熟な DCs

では、ほとんど IFN- γ や IL-12p70 の産生を認めなかったが、成熟した DCs では、IFN- γ , IL-12p70 共に高い産生を認めた (IFN- γ において iPSDCs: MoDCs=131pg/mL:132pg/mL, IL-12p70 において iPSDCs: MoDCs=239pg/mL:191pg/mL)。

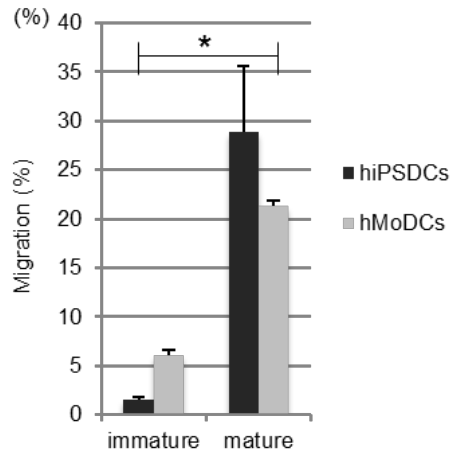
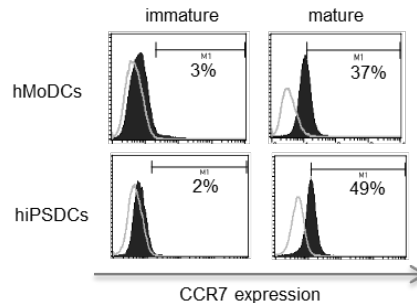
図 2 ヒト iPSDCs のサイトカイン産生能



遊走能の比較

健常人 iPSDCs, MoDCs いずれも、未成熟な DCs では、ほとんど遊走を認めなかったが、成熟した DCs では、同等な遊走能を認めた。

図 3 ヒト iPSDCs の CCR7 発現 遊走能



(3) 膵癌患者 iPSDCs の機能評価

同様に 5 step 法を用いて膵癌患者より iPSDCs を分化誘導した。誘導効率は同等であり、形態学的にも差異は認めなかった。また表面マーカーやサイトカインの産生能に関しても、健常人と膵癌患者に差は認めなかった。

図4 膵癌患者のiPSDCsの形態
健康人 iPSDCs 膵癌患者 iPSDCs

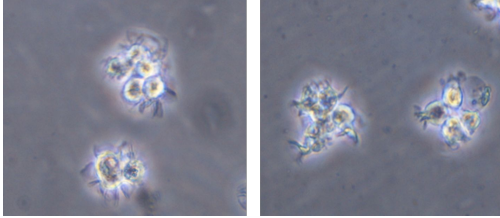
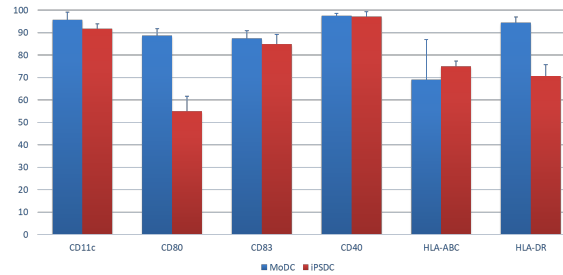


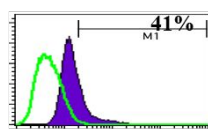
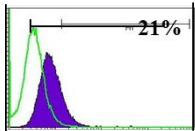
図5 膵癌患者のiPSDCsの表面マーカー



MoDC of Donor C (HLA-ABC)

immature

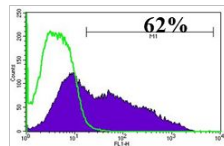
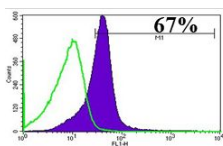
mature



iPSDC of Donor C (HLA-ABC)

immature

mature

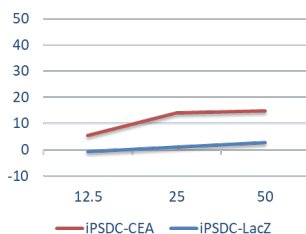


(4) 膵癌患者由来 iPSDCs を用いた CTL 誘導能の解析

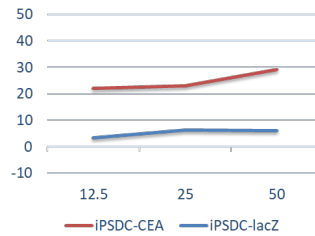
膵癌患者4症例より iPSDCs を分化誘導し, PBMC と co-culture し, in vitro での刺激を3回おこない, CTL を誘導した. 膵癌患者より採取した膵癌細胞を CTOS 法を用いて cell-line 化し, これらを target にした Cr-release assay を用いて CTL の細胞傷害活性を解析した. 結果, 全症例より膵癌特異的な細胞傷害活性が確認された.

図5 膵癌患者由来 iPSDCs にて得られた CTL の膵癌特異的な細胞傷害活性

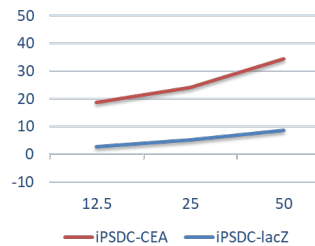
Donor A(A24;02)
TAA:CEA



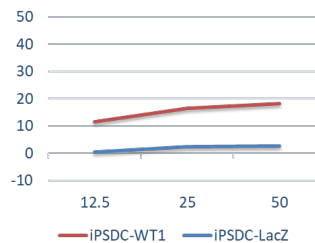
Donor C(A24;02)
TAA:CEA



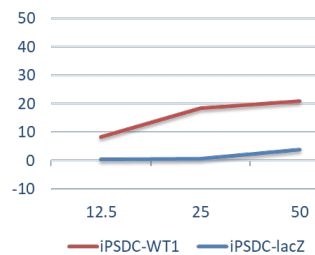
Donor D(A02;01)
TAA:CEA



Donor A(A24;02)
TAA:WT1



Donor C(A24;02)
TAA:WT1



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4件)

1. Kitadani J, Ojima T, Iwamoto H, Tabata H, Nakamori M, Nakamura M, Hayata K, Katsuda M, Miyajima M, Yamaue H. Cancer Vaccine Therapy Using Carcinoembryonic Antigen - expressing Dendritic Cells generated from Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Rep*. 2018;8:4569. doi: 10.1038/s41598-018-23120-z. 査読
2. Hirono S, Kawai M, Okada KI, Miyazawa

M, Kitahata Y, Hayami S, Ueno M, **Yamaue H**. Modified Blumgart Mattress Suture Versus Conventional Interrupted Suture in Pancreaticojejunostomy During Pancreaticoduodenectomy: Randomized Controlled Trial. *Ann Surg*. 2018 Apr 24. doi: 10.1097/SLA.0000000000002802. 査読有

3. Kitadani J, Ojima T, Iwamoto H, Tabata H, Nakamori M, Nakamura M, Katsuda M, Miyazawa M, Hayata K, **Yamaue H**. Cancer Immunotherapy Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Dendritic Cells(iPSCs)Expressing Carcinoembryonic Antigen. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2016;43:1071-3. 査読有
4. Fujimoto A, Furuta M, Totoki Y, Tsunoda T, Kato M, Shiraishi Y, Tanaka H, Taniguchi H, Kawakami Y, Ueno M, Gotoh K, Ariizumi S, Wardell CP, Hayami S, Nakamura T, Aikata H, Arihiro K, Boroevich KA, Abe T, Nakano K, Maejima K, Sasaki-Oku A, Ohsawa A, Shibuya T, Nakamura H, Hama N, Hosoda F, Arai Y, Ohashi S, Urushidate T, Nagae G, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Ojima H, Hiraoka N, Okusaka T, Kubo M, Marubashi S, Yamada T, Hirano S, Yamamoto M, Ohdan H, Shimada K, Ishikawa O, **Yamaue H**, Chayama K, Miyano S, Aburatani H, Shibata T, Nakagawa H. Whole-genome mutational landscape and characterization of noncoding and structural mutations in liver cancer. *Nat Genet*. 2016 May;48(5):500-9. doi: 10.1038/ng.3547. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

1. Ojima T, Kitadani J, Iwamoto H, Nakamori M, Nakamura M, and **Yamaue H**: Feasibility of Cancer Vaccine Therapy using Dendritic Cells Generated from Induced Pluripotent Stem Cells Expressing Carcinoembryonic Antigen. 2017 ASCO. 2017. 6.2 Chicago USA
2. Ojima T, Nakamori M, Nakamura M, Katsuda M, Hayata K, Matsumura S, Kato T, **Yamaue H**: Expression of ERCC1, TUBB3, BRCA1, and TS as predictive markers of neoadjuvant chemotherapy for squamous cell carcinoma of the esophagus. 2016 ASCO-Gastrointestinal Cancers Symposium. 2016. 1.16 San Francisco USA
3. Ojima T, Nakamori M, Nakamura M, Iwahashi M, Katsuda M, Hayata K, Matsumura S, **Yamaue H**: A phase I/II study of divided-dose docetaxel, cisplatin and fluorouracil (DCF) for patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the esophagus. 2015 ASCO-Gastrointestinal Cancers Symposium.

2015. 1.15 San Francisco USA

〔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
https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr_view.cgi?recptno=R000024348

6. 研究組織

(1)研究代表者

山上 裕機 (YAMAUE, Hiroki)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20191190

(2)研究分担者

清水 敦 (SHIMIZU, Atsushi)
和歌山県立医科大学・医学部・学内助教
研究者番号: 00637910

川井 学 (KAWAI, Manabu)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 40398459

岡田 健一 (OKADA, Ken-ichi)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50407988

尾島 敏康 (OJIMA, Toshiyasu)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 60448785

廣野 誠子 (HIRONO, Seiko)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 60468288

宮澤 基樹 (MIYAZAWA, Motoki)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90549734