

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06553

研究課題名(和文) 癌幹細胞を標的としたiPSDCs癌ワクチン療法の基礎研究

研究課題名(英文) A basic study of Cancer vaccine therapy using genetically modified iPSDCs targeting for a Cancer Stem Cell

研究代表者

岩本 博光 (Iwamoto, Hiromitsu)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：60756592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：健康人末梢血単核球(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。そしてこれをさまざまな方法によりiPSDCs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iPSDCs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。次にこのiPSDCsにCEA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。

研究成果の概要(英文)：We induced Yamanaka four factors into healthy human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with Sendai virus vector, and iPS cells were established. In this case, it was carried out according to iPS cells derived from fibroblasts which we have carried out in our department. We induced differentiation into iPSDCs by various methods. As a result, it became clear that it is most efficient to induce differentiation with cytokine cocktail. It was found that iPSDCs obtained thereby had sufficient function as antigen presenting cells. Next, the CEA gene was introduced into this iPSDCs and its antitumor effect was evaluated with a virtual antigen and a human cancer cell line with a Cr release assay to confirm tumor antigen specific antitumor effect.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腫瘍免疫 iPSDCs 癌ワクチン 再生医療 癌幹細胞

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。そのような中、近年の癌研究の一つの柱が既存の治療法に抵抗性を示す「癌幹細胞」であり、癌幹細胞自身の研究は勿論、これを標的とした治療法の研究も盛んに行われるようになってきた。その中で癌幹細胞に特異的に発現する抗原も多く報告され、さらには癌幹細胞特異抗原を標的とした免疫治療が有効である可能性が報告された。

癌免疫療法は近年になり worldwide な臨床試験で治療効果が報告されるようになり、「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。なかでも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 癌ワクチンは有望視されていた。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り、それ以降は有効性を示せていない。私達はこれまで DCs に腫瘍抗原 (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 (図 1)。現在この癌ワクチン療法の有効性の検証を行っている。

本研究では iPSDCs 癌ワクチン療法の標的として、癌幹細胞特異抗原を用いて今日の治療法では治癒しない難治性癌の新たな治療戦略の確立を目指す。さらに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、本研究が臨床応用されれば、数多くの難治性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

癌幹細胞に発現を認める特異抗原を恒常的に発現するヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞を樹立し、これを iPS 細胞由来樹状細胞 (iPSDCs) へ分化誘導する。そしてこの特異抗原を発現している iPSDCs を用いた癌

ワクチン療法の有効性を検討する。従来の抗腫瘍治療に抵抗性を持つ癌幹細胞は転移・再発において大きな役割を果たしており、これに対する治療戦略の探求は今日研究の重要な柱である。私達は以前マウス iPSDCs が naive な DCs と、抗原提示細胞として同等機能を有し、さらに同等の腫瘍抗原 (TAA) 遺伝子特異的抗腫瘍効果を有することを報告した。そこでこの結果を応用し、癌幹細胞特異抗原を導入した iPSDCs を用いた癌ワクチン療法の有効性を検討する。そして同時に臨床応用を見据えて、iPS 細胞の段階で遺伝子を導入し、より高率に導入遺伝子を発現している iPSDCs の樹立を目指す。

3. 研究の方法

癌幹細胞特異抗原を恒常的に発現する iPS 細胞の樹立

健康人 (sample 1-5) 末梢血単核球 (PBMCs) より iPS 細胞を樹立し、これに癌幹細胞特異抗原 2 種 (DNAJB8 と Survivin) をそれぞれ遺伝子導入し、これら癌幹細胞特異抗原を恒常的に発現している iPS 細胞株 (iPS-DNAJB8, iPS-Survivin) を樹立する。それぞれの特異抗原遺伝子を carry する adenovirus vector より制限酵素にて特異抗原遺伝子を切り出し、pEF1-AcGFP1-N1 Vector (図 3) に ligation し、特異抗原遺伝子導入 vector を作製する。iPS 細胞への遺伝子導入は Neon Transfection System (Life technologies) を用いた electroporation 法にて行う。同様にコントロールである GFP 遺伝子導入も行う。その後それぞれを neomycin にて選択培養を行い、安定発現株を樹立する。それぞれの導入遺伝子の発現率を FACS にて測定する。

高率に癌幹細胞特異抗原を発現している iPSDCs の分化誘導

これまでは遺伝子導入は 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。しかし本研究では癌幹細胞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% 導入した癌幹細胞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-DNAJB8, iPS-Survivin 及びコントロールの iPS-GFP を、前述の当科のプロトコールにより分化誘導し、iPS-DNAJB8-DCs, iPS-Survivin-DCs 及びコントロールの iPS-GFP-DCs を得る。このプロトコールは 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-iPSCs への分化誘を行う。そして GM-CSF, IL-4, TNF- α , LPS により mature-iPSCs を得る。それぞれの遺伝子導入 iPSCs 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 iPSCs のデータと比較検討する。

癌幹細胞特異抗原を発現している iPSCs の抗腫瘍効果の比較検討

iPS-DNAJB8-DCs, iPS-Survivin-DCs, iPS-GFP-DCs 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, 導入した癌幹細胞特異抗原を発現しているもの, していないもの, 両方を発現しているもの, いずれも発現していないもの全て含む各種の癌細胞株に対し, Negative control として用意する iPS-GFP-DCs 由来の CTLs と抗腫瘍効果を in vitro の ^{51}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 DNAJB8, Survivin の発現の確認

intracellular FACS で当科が所蔵している癌細胞株での DNAJB8, Survivin 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, DNAJB8 のみ発現している細胞株 2 種, Survivin のみ発現している細胞株 2 種, どちらも発現している細胞株 2 種, さらにどちらも発現していない細胞株 2 種の合計 8 種の癌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 (一部だけのものも含む 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。その場合は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。

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癌幹細胞特異

抗原発現株を用いる (図 4)。

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

iPS-DNAJB8-DCs, iPS-Survivin-DCs, iPS-GFP-DCs 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 μL につき標的癌細胞株 1×10^6 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 1×10^6 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よ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 CEA 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。

HLA のタイピングについてはまず HLA (24, 02) の 2 名で行い, 前述の結果を得た後, HLA (31, 11) でも実験を行ったが, 一定の見解は得られなかった。

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。当初はプラスミドベクターを用いてエレクトロポレーション法を用いていたが, 様々なプラスミドベクターを試したが導入できなかった。腫瘍抗原遺伝子も CEA 遺伝子, gp100 遺伝子など種類を変えたができなかった。さらに導入法もリポフェクションなど他の方法も施行したができなかった。今後はクリスパー法など新しい方法を検討し, 実現を目指したい。

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)

北谷純也、尾島敏康、岩本博光、田端宏堯、中森幹人、中村公紀、勝田将裕、宮澤基樹、早田啓治、山上裕機：
CEA 遺伝子導入ヒト iPS 細胞由来樹状細胞 (iPSDCs) を用いた癌ワクチン療法の検討.
癌と化学療法、43(9):1071-1073、2016

〔学会発表〕(計 4 件)

岩本博光、尾島敏康、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：
iPS 細胞由来樹状細胞 (iPSDCs) 癌ワクチン療法の基礎研究の成果と臨床応用を見据えた今後の課題.
第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016.4、大阪

岩本博光、尾島敏康、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：
臨床応用に向けた腫瘍抗原 (TAA) 遺伝子導入 iPS 細胞由来樹状細胞 (iPSDCs) 癌ワクチン療法の改善点.
第 15 回日本再生医療学会総会、2016.3、大阪

Iwamoto H, Ojima T, Kitadani J, Tabata H, Hayata K, Katsuda M, Miyazawa M, Nakamura M, Nakamori M, Yamaue H:
The cancer vaccine therapy using DCs derived from iPS cells (iPSDCs) expressing TAA gene.
Gastrointestinal Cancers Symposium (ASCO-GI), 2016.1, San Francisco

岩本博光、尾島敏康、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：
iPS 細胞由来樹状細胞 (iPSDCs) 癌ワクチン療法の基礎研究と臨床応用への道筋.
第 53 回日本癌治療学会学術集会、2015.10、京都

〔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

岩本 博光 (IWAMOTO, Hiromitsu)
和歌山県立医科大学・医学部・学内助教
研究者番号：60756592

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()