

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18445

研究課題名(和文) iPS細胞と遺伝子操作技術によるがん微小環境中免疫細胞再活性化の試み

研究課題名(英文) Reactivation of tumor-associated immune cells by gene manipulated iPSCs

研究代表者

入口 翔一(Iriguchi, Shoichi)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：50737442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞はそれだけでは腫瘍を維持できず、その維持には周囲を取り巻く微小環境との相互作用が極めて重要である。最近、腫瘍中のある種類の免疫細胞を除去することで難治性のがんを治療できることが明らかとなり、腫瘍中の免疫細胞への治療介入が注目されている。本研究ではiPS細胞技術を用いることで、がん微小環境中の免疫細胞を再活性化する事が可能か検証した。その結果、がんを特異的に認識して他の免疫細胞を助けるヘルパーT細胞と呼ばれる免疫細胞からiPS細胞を作成し、再びT細胞に戻すことで、がんを複合的に排除する免疫を誘導できる可能性を示す事に成功した。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells cannot maintain itself without the presence of the stromal cells including fibroblasts and the cells of the immune system. Recent clinical studies have demonstrated the possibility of manipulating immune cells in the tumor for the treatment of otherwise refractory cancers. In the present study, we evaluated the potential of T cells differentiated from a T cell with a tumor-specific helper activity for the reactivation of immune cells in the tumor microenvironment. The results suggest the feasibility of inducing a strong tumor-specific immunity by using iPS technology.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：iPS細胞 がん免疫療法

1. 研究開始当初の背景

がん細胞はそれだけでは腫瘍を維持できず、その維持には周囲を取り巻く微小環境との相互作用が極めて重要である。例えば、本来はがん細胞を排除する能力を有する腫瘍浸潤マクロファージや T 細胞等の免疫細胞は、臨床的に検出される段階ではその能力が抑制されているだけでなく、がんの進展を促進する役割を果たす。最近、腫瘍中に存在する抑制性機能を有する免疫細胞の一部を除去することが難治性がん治療に有効である事が示された。一方で、炎症性サイトカイン IFN

を介したマクロファージの活性化は *in vitro* にて高い抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。IFN はリンパ球に発現する転写因子 T-bet によって転写調節・産生される。特に抗原特異的に活性化した 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) や invariant Natural killer T 細胞 (iNKT 細胞) は、T-bet による発現促進を介して高い IFN 産生能を獲得する。申請者らは最近、T-bet を過剰発現した T 細胞がマウス生体内にて肺組織中マクロファージを強制活性化することを報告した (Iriguchi *et al.* *Blood*, 2014)。また、先行報告より T-bet を過剰発現する T 細胞は周囲のサイトカイン環境に影響されずに IFN を過剰産生することが示された (Ishizaki *et al.* *Journal of Immunology*, 2007)。以上より、申請者は T-bet 等のサイトカイン産生を司る転写因子を抗原特異的な T 細胞で過剰発現させることで、腫瘍中の免疫抑制環境に影響されずにマクロファージを活性化しがん細胞を排除することが可能ではないかと考えた。

しかしながら、担がん生体に存在するがん抗原特異的 T 細胞は、数が少ない上に長期間の抗原への暴露によって機能不全 (疲弊) 状態になっている。さらに体外での人為的な増幅・活性化や遺伝子操作は T 細胞を疲弊させる。この事よりたとえがん抗原特異的 T 細胞を得られたとしても、遺伝子操作に必要な培

養工程で機能 (免疫細胞再活性化) を最大限に発揮できなくなると予想される。これらの問題を解決するために本研究計画では、申請者らが開発した、iPS 細胞技術を用いて抗原特異性が保たれたまま、機能が回復した T 細胞クローンを大量に作製する技術 (T-iPSC テクノロジー) を応用する事を考えた (Nishimura, Kaneko, Iriguchi *et al.* *Cell Stem Cell*, 2013)。また、iPS 細胞の段階で遺伝子操作を行うことで、染色体異常などの遺伝子異常が起きていない安全なクローンの選択が可能になる。

一方で、ヒト腫瘍微小環境を狙う治療の開発における問題点として、ヒトの腫瘍微小環境を持つ動物モデルの不在があげられる。古くからヒト腫瘍を移植された免疫不全動物モデルは存在するが、その腫瘍微小環境中免疫細胞はマウス・ヒトの異種間免疫反応によって動員されるため、マウス免疫細胞によって構築される。マウス・ヒト間における免疫細胞の違いを考慮すると、これらのモデルは実際の治療応用を考えた際には現実的なモデルとは言いがたい。この問題の解決策として、申請者らは免疫不全マウスへのヒト臍帯血移植 (ヒト化マウス) とヒト腫瘍移植を併用して、ヒト腫瘍とヒト免疫細胞が混在する腫瘍微小環境を持つマウスを (ヒト化がんモデルマウス) 作製することを考えた。

2. 研究の目的

上述の背景および申請者らの研究成果より、本研究は T-iPSC テクノロジーと遺伝子操作技術を組み合わせることで、腫瘍微小環境中免疫細胞の再活性化を標的とした新規がん免疫療法開発のための基盤研究を行う事とした。具体的にはヒト化マウスがんモデルを用いて、以下のことを明らかにする事を目的とした。

1) ヒト化マウス生体内でのヒト腫瘍微小環

境の構築

ヒト化マウスは、マウスとヒトのサイトカイン活性の相違より、ヒト由来単球や好中球の割合が低だけでなく未成熟であることが知られている。さらに最近ヒト化マウスにがん細胞を移植しても、がん組織中にヒトのマクロファージが浸潤しないことが示された (Rongvaux *et al.* Nature Biotechnology, 2014)。この問題点を解決する為、ヒト化マウスにヒト型サイトカインの補充する系を確立する。

作製したヒト化マウスにヒトがん細胞株の移植を行い、ヒト造血幹細胞由来免疫細胞が移植がん細胞に移入し腫瘍微小環境を再現できるかの評価を免疫組織染色法等で行う。

2) T-iPSC への抗原特異的 IFN 産生能の増強機構確立と in vitro での機能評価

抗原特異的 T-iPSC を樹立後、遺伝子操作技術を用いて T-bet 遺伝子導入を行うなどの IFN 産生効率を高める機構を組み込んだ後、T 細胞へと分化誘導 (再分化 T 細胞) 出来る事を明らかにする。

分化誘導した T 細胞の抗原特異的 IFN 産生能を、遺伝子発現解析とサイトカイン産生能にて評価する。マクロファージ、がん細胞と T 細胞の in vitro 共培養実験を行い、マクロファージの活性化状態を検討する。また、樹状細胞も含めた共培養系を用いてヘルパー機能も評価する。

3) IFN 産生増強した T-iPSC 由来 T 細胞のがんモデルマウスにおける抗腫瘍効果の検証

ヒト化がんモデルマウスに、抗原特異的 IFN 産生能を増強した再分化 T 細胞を移植

後、各組織への浸潤と共に腫瘍の縮退効果と延命効果を in vivo モニタリングの手法等と共に評価する。また、フローサイトメーター法で腫瘍中の抑制性免疫細胞の解析を行う。また、がん細胞を移植した臓器以外への浸潤も解析を行い、移植細胞の安全性を評価する。

3. 研究の方法

1) ヒト化マウス生体内でのヒト腫瘍微小環境の構築

ヒト化マウス内単球系細胞の成熟化機構の確立

現在までに申請者らは、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を重度免疫不全マウス NOD/Shi-scid, IL-2R null (NOG) マウスに移植する事でヒト化マウスを作製することに成功している。作製されたヒト化マウスは末梢血液中白血球の内の約半分がヒト由来血液細胞で占められていた。しかしながら、ヒト化マウスは、マウスとヒトのサイトカイン活性の相違より、ヒト由来単球や好中球の割合が低だけでなく未成熟であることが知られている。さらに最近、現行のヒト化マウスにがん細胞を移植しても、がん組織中にヒトのマクロファージが浸潤しないことが示された (Rongvaux *et al.* Nature Biotechnology, 2014)。この問題点を解決する為、ヒト化マウスにヒト型サイトカインの補充する系を確立することを目指した。具体的には、サイトカインを含有する浸透圧ポンプや、in vivo ハイドロダイナミック法による肝臓への in vivo でのヒト型サイトカイン遺伝子導入による補充を検討した。導入する遺伝子はマクロファージや樹状細胞成熟分化に必須である、M-CSF を選択した。経時的に回収したマウス血清中でのヒトタンパク定量を行う事で実験系を評価した。補充したサイトカインの in vivo 中マクロファージと樹状細胞への成熟に対する影響は、フローサイトメーターによる末梢血液の細胞表面マーカー発現解

析にて評価した。

in vivo におけるがん細胞へのヒト由来免疫細胞浸潤能の評価

で作製したヒト化マウスに種々のがん細胞を移植後、個体におけるヒト及びマウス由来の免疫細胞の移植がん細胞への浸潤をフローサイトメーター法と免疫組織染色法で評価した。

2) T-iPSC への抗原特異的 IFN 産生能の増強機構確立と in vitro での機能評価

遺伝子操作を行った T-iPSC 細胞クローンの樹立

複数の癌に対する腫瘍抗原として知られている抗原特異的ヘルパー T 細胞クローンを分離後、iPS 細胞を樹立した (T-iPSC)。遺伝子導入方法は、所属研究室で安定的に T 細胞への遺伝子導入が確認されているレンチウイルスベクターを用いて行う。導入効率や外来遺伝子発現の維持確認をフローサイトメーターや蛍光顕微鏡で経時的に評価するために、Kusabira Orange 等の蛍光タンパク質マーカー遺伝子が組み込まれたベクターを選択した。外来遺伝子の発現制御はサイレンシングを受けにくいと報告されているユビキチンプロモーターを使用した。

分化誘導した T 細胞の抗原特異的 IFN 産生能の評価

で作出した遺伝子改変 T-iPSC を T 細胞分化の培養系にて培養を行い、作出した細胞の細胞表面抗原発現と T 細胞受容体特異的 IFN 産生能を評価した。また、それぞれの条件下で RNA-seq 法による mRNA 発現解析を行い、分化誘導した細胞の遺伝子発現プロファイルを得た。さらに、樹状細胞や CD8 陽性 T 細胞とがん細胞を共培養することで、in vitro でのヘルパー機能と抗腫瘍効果を評価した。

3) T-iPSC 由来 T 細胞のがんモデルマウスに

おける抗腫瘍効果の検証

1) にて確立した in vivo 実験系を用いてヒト化マウスがんモデルを作成後、2) にて樹立した T-iPSC 由来 T 細胞の移植を行った。同時に末梢血液検査、体重変化、非侵襲的イメージングなどの手法を用いて個体の経時的観察を行った。

4. 研究成果

1) ヒト化マウス生体内でのヒト腫瘍微小環境の構築

我々はこれまでに重度免疫不全マウスに臍帯血由来造血幹細胞移植を行う事で、ヒトの免疫系を持つマウス (ヒト化マウス) の作成に成功している。この実験系を進展させて、ヒト化マウスに腫瘍株を移植する事で移植がん細胞部位にヒト由来免疫細胞が浸潤するかの評価を行った。その結果、僅かではあるが腫瘍部位へのヒト免疫細胞の浸潤が検出された。ヒト M-CSF をハイドロダイナミック法で補充したヒト化マウス内での単球系細胞への分化・成熟の検討を行ったところ、血清中にヒト M-CSF タンパクが検出され、ヒト化マウス血液中にて単球が増える事が確認された。しかしながら、担がん部位への単球・マクロファージの浸潤の有意な促進効果は確認できなかった。一方で組織学的解析より、本実験に使用したがん細胞株は皮下移植にて間質細胞を誘導しないことが分かった。実際の腫瘍に浸潤する免疫細胞は間質に存在することから、皮下移植にて間質を取り込むがん細胞株の選択やそれを促進する移植手法の確立が重要であることが明らかとなった。今後は上記の検討項目をふまえて、よりヒト免疫細胞が腫瘍部位に浸潤するマウスモデルの作成を進める必要がある。

2) T-iPSC への抗原特異的 IFN 産生能の増強機構確立と in vitro での機能評価

ヘルパー機能を持つ抗原特異的 T 細胞とし

て、臨床にて抗腫瘍効果の増強が報告されていること、抗原認識が多様性と種差の少ない CD1d 分子を介して行われることより、invariant NKT (iNKT) 細胞を選択した。また、ある特定のがん抗原特異的ヘルパーT細胞クローンからの iPS 樹立も行った。複数の iNKT 細胞クローンを我々が以前報告した方法で初期化を行った。樹立した iPS 細胞クローンの多能性及び特性解析を行うとともに、造血前駆細胞を介した T 細胞への分化誘導を行った。その結果、元の細胞と同じ T 細胞受容体を発現するとともに、同等以上のサイトカイン産生とヘルパー機能を持つ細胞を大量に作出することに成功した。更にこの細胞は in vitro にて抗原特異的に樹状細胞を介したがん抗原特異的キラーT細胞を活性化させる能力(ヘルパー機能)を有していた。iNKT-iPS 細胞の成果は Stem Cell Report 誌に掲載された。また、別のがん抗原特異的ヘルパーT細胞由来 iPS 細胞から分化誘導した T 細胞も同様の能力を示すことも明らかとなった。以上の結果より、T-bet を強制発現しなくても iPS 技術を介して再生した T 細胞は高い IFN 産生能を有する事が示された。今後の展開としては免疫抑制環境下での機能解析が必要と思われる。

3) T-iPSC 由来 T 細胞のがんモデルマウスにおける抗腫瘍効果の検証

樹立した iNKT 細胞由来 T 細胞を再分化誘導して免疫不全マウスに経静脈的に移入し、体内動態の評価を実施した。その結果、移入した細胞は移植後早期に消失することが分かった。引き続き、担がん免疫不全マウスに in vitro にて再分化ヘルパーT細胞様細胞の活性化を受けた移植がん細胞株特異的キラーT細胞を移入する事で、ヘルパー機能を評価した。その結果、ヘルパーT細胞様細胞は移入したキラーT細胞の in vivo 抗腫瘍能を増幅させることが分かった。以上の成果は現在、

論文にまとめて投稿中である。

以上の結果は T-iPS 細胞技術を用いることで、ヘルパー機能と高い IFN 産生能を有する T 細胞作成が可能であることを示唆している。一方で、再分化 T 細胞の生体内の生存能を向上させるためには、更なる分化誘導系の改善と免疫不全マウスの移植系の最適化が今後の課題となることが明らかとなった。

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2件)

Kitayama S, Zhang RT, Ueda N, Iriguchi S, Yasui Y, Kawai Y, Tatsumi M, Hirai N, Mizoro Y, Iwama T, Watanabe A, Nakanishi M, Kuzushima K, Uemura Y, and Kaneko S Cellular Adjuvant Properties, Direct Cytotoxicity of Re-differentiated V 24 Invariant NKT-like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 査読有、 **6**, 213-227 (2016). DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.01.005

Karagiannis, P, Iriguchi, S. & Kaneko, S. Reprogramming away from the exhausted T cell state. *Semin. Immunol.* 査読有、 **28**, 35-44 (2016). DOI: 10.1016/j.smim.2015.10.007

[学会発表](計3件)

入口翔一、菊池教大、野口恵美子、森島裕子、松山政史、楊景堯、高橋智、中内啓光、石井幸雄、金子新、T cell-restricted overexpression of T-bet induces functional conversion of macrophages in the lung、第11回血液学若手研究者勉強会、2015/7/11、東京

Iriguchi S, Kikuchi N, Noguchi E, Morishima Y, Matsuyama M, Yoh K, Takahashi S, Nakauchi H, Ishii Y, Kaneko S、T cell-restricted overexpression of T-bet induces functional conversion of macrophages in the lung、44th Annual Scientific Meeting of the International Society for Experimental Hematology、2015/9/18、京都
三宅康行、入口翔一、三浦智行、立川愛、上田樹、田谷かほる、今井映里、石井洋、尾上浩隆、寺倉精太郎、俣野哲郎、金子新、iPS細胞由来再生T細胞の臨床応用に向けた霊長類前臨床モデルの開発、第16回日本再生医療学会総会、2017/3/9、宮城

〔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

- 金子研究室ホームページ

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/kaneko/index.html>

- 京都大学 iPS 細胞研究所

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入口 翔一 (IRIGUCHI, Shoichi)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：50737442

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし