

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2015～2016  
課題番号：15K19694  
研究課題名(和文) 遺伝子改変ヒトiPS細胞由来ミエロイドラインを用いた進行期悪性黒色腫の免疫療法  
  
研究課題名(英文) Immunotherapy against Metastatic Melanoma with Human iPS Cell-Derived Myeloid Cell Lines Producing Type I Interferons  
  
研究代表者  
宮下 梓 (Miyashita, Azusa)  
  
熊本大学・医学部附属病院・病院教員  
  
研究者番号：20467989  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：進行期悪性黒色腫に対する新規免疫治療を開発すべく研究を行った。ヒトiPS細胞からマクロファージ様の細胞を誘導し、その細胞に遺伝子改変によりI型インターフェロンを遺伝子導入・産生できるようにし、マクロファージ様細胞に抗腫瘍効果を持たせた細胞(iPS-ML-IFN、iPS-ML-IFN)を作製した。この細胞を用いて、ヒトメラノーマ細胞に対する抗腫瘍効果を免疫不全マウスを用いて腹膜播種モデルで評価したところ、未治療群と比較し治療群では有意な腫瘍増殖抑制効果が得られた。本研究結果により、新たな免疫細胞療法としてiPS-ML療法が進行期メラノーマの有効な治療オプションとなり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop new immune cell therapy using iPS cells for malignant melanoma. We focused on macrophages for immune cell therapy because the macrophage infiltration is frequently observed in solid cancers. We have decided to use iPS cell-derived macrophage which genetically modified to express type I IFNs for treatment against melanoma. We call them iPS cell-derived myeloid cell lines expressing type I IFNs (iPS-ML-IFNs). In this study, we examined the efficacy of human iPS-ML-IFNs against human melanoma cells. The iPS-ML-IFNs exhibited significant effects in inhibiting the growth of the tumors against the disseminated human melanoma cells in SCID mice. On the other hand, treatment with iPS-ML without IFNs demonstrated no inhibitory effect on cancer cell growth. We believe this method will provide a new therapeutic modality for metastatic melanoma.

研究分野：皮膚悪性腫瘍

キーワード：癌免疫療法 悪性黒色腫 iPS細胞

### 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は、診断された時点で既に 10~15%に転移を有し皮膚癌の中で最も予後が悪い癌であり、その発生率は増加傾向にある。進行期悪性黒色腫に対しては、最も多く用いられてきた化学療法 (DTIC) の奏効率は 5~12%、長期寛解率は 2%以下と、その治療効果は十分とはいえなかった。新たな治療法の開発が望まれ、近年、進行期悪性黒色腫に対する免疫療法に期待が集まっている。2011年に抗 CTLA-4 抗体の ipilimumab と BRAF 阻害剤の vemurafenib が米国 FDA に認可された。そして 2014 年、本邦において世界に先駆けて抗 PD-1 抗体の nivolumab が認可された。このように、進行期悪性黒色腫に対する治療は転換期を迎えており、免疫療法の有効性が示されている。しかし上記薬剤のみで進行期悪性黒色腫の全ての患者を治癒させることは困難であり、免疫療法の有用性が示された今こそ、新たな免疫療法の開発が求められている。

悪性黒色腫では、その原発巣が自然消退する現象をよく目にすることから、免疫原性が高くその癌特異抗原を認識して攻撃する T 細胞が他の癌より多く存在することが言われており、免疫療法のターゲットとして種々の免疫療法が研究されてきた。免疫細胞療法のひとつである養子免疫療法の悪性黒色腫に対する効果は、奏効率 72%、完全寛解率 40%と現在存在する治療法の中で最も高い効果が示されてきたが (Rosenberg SA, *et al. Curr Opin Immunol.* 2009、Goff SL, *et al. J Immunother* 2010)、治療に用いる TIL の培養が難しいことや、患者ごとに細胞を準備する必要がありコストがかかるため、汎用化が困難な状況である。

そこで我々は iPS 細胞をソースとした免疫細胞、なかでもマクロファージを用いた悪性黒色腫に対する新規免疫細胞療法を中心に研究を進めていく。iPS 細胞を用いることのメリットは、治療に必要な十分な数の細胞を *in vitro* で作成、準備できること、遺伝子改変を用いて細胞に機能を持たせることができることである。研究代表者が在籍する当教室の福島聡講師と研究協力者である熊本大学免疫識別分野の千住覚准教授らは、ヒト iPS 細胞から免疫調整機能を持った樹状細胞および抗腫瘍効果を有するマクロファージへの分化誘導に成功している (Senju S, *et al. Gene Ther.* 2011)。マクロファージは以前より種々の癌組織の周囲に浸潤する性質を持つことが知られており、癌の増殖を促進する TAM (tumor-associated-macrophages) の存在が報告されている。腫瘍組織に浸潤するマクロファージの性質を活かし、かつ腫瘍組織局所で強力な抗腫瘍効果を発揮できる細胞治療法の開発を目指して、ヒト iPS 細胞から分化誘導したミエロイドライン (iPS-cell-derived myeloid cell line (iPS-ML)) に遺伝子改変により I 型インターフェロン

(IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ ) を遺伝子導入してインターフェロン産生能を持たせ、腫瘍局所で抗腫瘍効果を発揮できる細胞を作製し、この細胞を用いて悪性黒色腫に対する腫瘍抑制効果の実験を進めていく。また、II 型インターフェロンは本邦や欧米で悪性黒色腫の治療として認可されており、腫瘍細胞表面に結合して細胞死を誘導し、増殖を抑制すること、樹状細胞等に作用して免疫を賦活化することが知られている。研究協力者である熊本大学免疫識別分野の千住覚准教授らは、胃癌と膵癌の細胞株を使った実験を用いて IFN- $\alpha$  を遺伝子導入した iPS-ML の抗腫瘍効果を確認している (Koba C, *et al. Plos one* 2013)。悪性黒色腫においても、同様の実験を進めていく予定であるが、iPS-ML に遺伝子導入する抗腫瘍効果を高める分子として IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  等を検討している。さらに、効果が認められた場合はその腫瘍抑制作用のメカニズムを解明していく。

### 2. 研究の目的

iPS 細胞をソースとした免疫細胞治療として、遺伝子改変により I 型インターフェロン産生能を持たせたヒト iPS 細胞由来ミエロイドライン (iPS-ML) を用い、ヒト悪性黒色腫に対する有効性をマウスモデルで検討する。

### 3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞からミエロイド系細胞を分化誘導し、さらにこの細胞に cMYC、BMI1、MDM2 をレンチウイルスで導入し *in vitro* で増殖可能なミエロイド系細胞ラインを樹立した (iPS-ML)。この iPS-ML がメラノーマ細胞をより効果的に傷害するために、遺伝子改変で IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  などの腫瘍増殖抑制効果を持つ分子を遺伝子導入し、抗腫瘍効果を持たせた細胞でヒトメラノーマに対する腫瘍抑制効果を *in vitro*、*in vivo* において検討した。*In vivo* での評価は将来的な臨床応用を目標とし、免疫不全マウスを用いたヒトメラノーマ xeno-graft model においてその腫瘍抑制効果を評価することとした。

**(1) iPS-ML に IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  遺伝子などの抗腫瘍効果を高める分子の遺伝子を導入し、これらの細胞からマクロファージ様細胞を分化誘導し、その抗腫瘍効果を *in vitro* において検討した。**

図 1 に、本研究で用いるヒト iPS 細胞からマクロファージ様細胞 (iPS-MP) への分化誘導法を示す。ヒト iPS 細胞を OP9 フィーダー細胞と GM-CSF、M-CSF 下に培養するとミエロイド系細胞に分化誘導できる (Step2)。さらにこの細胞を M-CSF 下に培養すると iPS-MP となる (Step3)。ミエロイド系細胞の寿命は約 2 週間であり得られる細胞の数も限られているため、我々はこのミエロイド系細胞に、細胞増殖を促進する因子の cMYC と細胞老化を抑制する因子の BMI1、MDM2 を導入することで *in vitro* で 2-3 ヶ月間増殖可能なミエロ

イド系細胞ライン(iPS-ML)を樹立した。この手技は研究協力者である熊本大学免疫識別分野の千住准教授らによって確立されており(Haruta M, *et al. Gene Ther.* 2013)、本研究においても支援を得ることで合意している。この手法により、治療に必要な十分な数の細胞を *in vitro* で作成、準備することが可能となった。さらに、iPS-ML に遺伝子改変により機能性をもたせるため、レンチウイルスベクターシステムを用いて I 型インターフェロン(IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ )を遺伝子導入し、抗腫瘍効果を持たせた細胞(iPS-ML-IFN $\alpha$ 、iPS-ML-IFN $\beta$ )を作成した。

I 型インターフェロンは本邦や欧米で悪性黒色腫の治療に用いられており、その抗腫瘍効果が示されている。これらの細胞を用いて、メラノーマに対する腫瘍抑制効果の実験を行った。

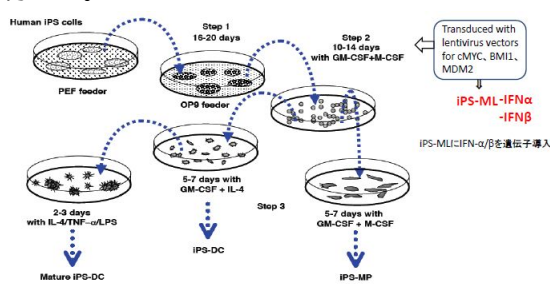


図 1

樹立した iPS-ML、iPS-ML-IFN $\alpha$ 、iPS-ML-IFN $\beta$  については、マクロファージとしての特性を確認するため、フローサイトメトリー解析による細胞表面分子の解析、ザイモサン貪食能解析による貪食能の解析、ELISA によるサイトカイン産生能の解析等についての解析を行った。一般的にマクロファージは、免疫を活性化し抗腫瘍的に働く phenotype(M1 マクロファージ)と癌の増殖に関与する TAM(Tumor-associated macrophage)と呼ばれる phenotype(M2 マクロファージ)に分類されることが知られている。本研究で樹立した iPS-ML、iPS-ML-IFN $\alpha$ 、iPS-ML-IFN $\beta$  がいずれの phenotype であるかを、フローサイトメトリー解析による細胞表面分子の解析や ELISA によるサイトカイン産生能等を検討し、さらに腫瘍組織のサイトカイン環境(IL-4 や TGF- $\beta$  等)でその phenotype が変化するかを検討した。その結果は、iPS-ML の腫瘍増殖・抑制に関わるメカニズム解明の一助になると考える。

*In vitro* での抗腫瘍効果の検討は、本研究ではヒトメラノーマ細胞株を iPS-ML の標的とするが、腫瘍抑制効果の評価法としてはルシフェラーゼ定量システムを用いた。ルシフェラーゼ遺伝子をレンチウイルスシステムでメラノーマ細胞株に導入し、解析時にルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを投与すると ATP の存在下でルシフェリンが酸化され発光反応を起こすため、生存腫瘍細胞を発光を定量化することで評価することができる。iPS-ML、iPS-ML-IFN $\alpha$ 、iPS-ML-IFN $\beta$  の

それぞれの腫瘍抑制効果を比較検討した。

(2) iPS-ML の抗腫瘍効果の評価を *in vivo* で行った。将来的な臨床応用を目標とし、SCID マウスにヒトメラノーマ細胞株を移植し、iPS-ML、iPS-ML-IFN $\alpha$ 、iPS-ML-IFN $\beta$  の腫瘍抑制効果を検討した。

図 2 のようなプロトコルで、ルシフェラーゼ遺伝子を導入したヒトメラノーマ細胞株を SCID マウスに腹膜播種させ、腫瘍の生着を確認後、マウスを未治療群と治療群に分け、治療群には iPS-ML、iPS-ML-IFN $\alpha$ 、iPS-ML-IFN $\beta$  をそれぞれ腹腔内投与し治療した。腫瘍の生着と治療効果は、ルシフェラーゼ定量システムを用い *in vivo* imaging で評価した。マウスが生きた状態でルシフェラーゼ定量が可能な Night Owl システムを用いて腹膜播種したメラノーマを経時的に定量、観察した。



図 2

腹腔内投与した iPS-ML が、腹膜に生着したメラノーマ細胞の腫瘍組織局所に集積することができているかを確認するため、治療後のマウスを解剖し腫瘍組織部の凍結標本を作成し、蛍光免疫染色によって評価を行った。投与する iPS-ML は投与直前に PKH 等の蛍光色素でラベルし、腫瘍細胞は凍結切片作成時にメラノーマの細胞質蛋白である MART-1 に対する蛍光免疫染色を行い、二重染色法で評価した。

なお、本研究に用いる iPS-ML は、cMYC や BMI1、MDM2 を遺伝子導入することで、M-CSF 依存性に *in vitro* で 2-3 ヶ月間増殖が可能であり、これは治療に必要な十分な数の細胞を準備できるという点で利点がある。しかし、白血化のリスクが危惧される点ではあるため、我々はこの問題を解決するために、allogeneic な iPS-ML を用いる。HLA を適合させた allogeneic な iPS-ML を用いれば、投与直後にはホストの免疫機序によって排除はされず、抗腫瘍効果を発揮した後に、マイナー組織適合抗原に対するホストの免疫反応により拒絶されると考える。本研究のマウスの実験系においても、投与した iPS-ML の白血化の有無を評価した。

4. 研究成果

研究期間全体を通して、研究実施計画書に沿った実験を進めることができた。ヒト iPS 細胞由来のミエロイド系細胞に、細胞増殖促進因子の cMYC と細胞老化抑制因子の BMI1、MDM2 を導入し *in vitro* で 2-3 ヶ月間増殖可能なミエロイド系細胞ライン(iPS-ML)を樹立し、さらに、iPS-ML に遺伝子改変により機能性を持たせるため、I 型インターフェロン(IFN-

、IFN- )を遺伝子導入し抗腫瘍効果を持たせた細胞(iPS-ML-IFN $\alpha$ 、iPS-ML-IFN $\beta$ )を作製し、これらの細胞からマクロファージ様細胞を分化誘導できた。これらの樹立した細胞は、フローサイトメトリー解析による細胞表面分子の解析、ザイモサン貪食能解析による貪食能の解析、ELISAによるサイトカイン産生能の解析等についての解析を行い、その形態や細胞表面抗原、貪食能などが、生理的なマクロファージ様性質を持つ細胞となることが確認できた。興味深いことには、I型インターフェロンを導入したiPS-MLは抗腫瘍的に働くM1マクロファージの性質を持つようになることが確認できた。ヒト悪性黒色腫の細胞株を使ったin vitroの実験を用いて、iPS-ML-IFN $\alpha$ 、iPS-ML-IFN $\beta$ の抗腫瘍効果を確認することができた。

さらには、免疫不全マウス(SCID)を用いたxeno-graft modelでin vivoでの評価を行った。免疫不全マウスにヒトメラノーマ細胞株を腹腔内移植し、iPS-ML-IFN $\alpha$ 、iPS-ML-IFN $\beta$ 投与により治療を行ったところ、未治療群と比較し治療群では有意な腫瘍増殖抑制効果が得られた。(図3)

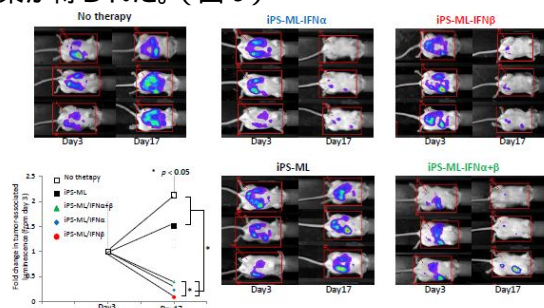


図3

さらに、治療後の腫瘍組織の免疫組織学的解析により、腫瘍組織へのiPS-ML-IFNsの浸潤を確認することができた。インターフェロンの副作用やiPS-MLの腫瘍化によって死亡したマウスは認めなかった。これらの結果により、腹腔内投与したiPS-ML-IFNsは、腫瘍局所に集積し、腫瘍局所で高い抗腫瘍効果を発揮できることが示唆された。本研究で得られた結果は論文として発表した。本研究により、新たな免疫細胞療法としてiPS-ML療法が有効な進行期メラノーマの治療オプションとなり得ることが示唆された。

#### 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 8 件)

1. Miyashita A, Fukushima S, et al. Immunotherapy with human iPS cell-derived myeloid cell lines producing type I interferons against metastatic melanoma. *Cancer Immunol Res.* 4(3), 248-58 (2016) [査読有] DOI: 10.1158/2326-6066

2. Kimura T, Fukushima S, Miyashita A, et al. Myasthenic crisis and polymyositis induced by one dose of nivolumab. *Cancer Sci.* 107(7), 1055-8 (2016) [査読有] DOI: 10.1111/cas.12961
3. Tokuzumi A, Fukushima S, Miyashita A, et al. Cell division cycle-associated protein 1 as a new melanoma-associated antigen. *J Dermatol.* 43(12), 1399-1405 (2016) [査読有] DOI: 10.1111/1346-8138.13436
4. Nakahara S, Fukushima S, Yamashita J, Kubo Y, Tokuzumi A, Miyashita A, et al. AT-rich Interaction Domain-containing Protein 3B is a New Tumour Marker for Melanoma. *Acta Derma Venereol.* 97(1), 112-114 (2016) [査読有] DOI: 10.2340/00015555-2449
5. Ichigozaki Y, Fukushima S, Jinnin M, Miyashita A, et al. Serum long non-coding RNA snoRNA host gene 5 level as a new tumor marker of malignant melanoma. *Exp Dermatol.* 25(1), 67-9 (2016) [査読有] DOI: 10.1111/exd.12868
6. Miyashita A, Fukushima S, et al. Investigation of FOXM1 as a potential new target for melanoma. *PLOS ONE.* 10(6), 539-41 (2015) [査読有] DOI: 10.1371/journal.pone.0144241
7. Inada T, Fukushima S, Murai M, Jinnin M, Miyashita A, et al. Hair shaft miRNA-221 levels as a new tumor marker of malignant melanoma. *J Dermatol.* 42(2), 198-201 (2015) [査読有] DOI: 10.1111/1346-8138.12730
8. Saito Y, Ohnishi K, Miyashita A, et al. Prognostic Significance of CD169+ Lymph Node Sinus Macrophages in Patients with Malignant Melanoma. *Cancer Immunol Res.* 3(12), 1356-63 (2015) [査読有] DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0180

[学会発表](計 1 件)

Immunotherapy with human iPS cell-derived myeloid cell lines producing type I interferons against metastatic melanoma  
Miyashita A, Fukushima S, Senju S, Nishimura Y, Jinnin M, Ihn H  
The 16<sup>th</sup> World Congress on Cancers of the skin (WCCS)  
August 31-September 4, 2016, Vienna, Austria

[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

宮下 梓 (MIYASHITA, Azusa)  
熊本大学・医学部附属病院・病院教員  
研究者番号：20467989

##### (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

千住覚 (SENJU, Satoru)