

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10717

研究課題名(和文) iPS細胞由来NKT細胞をベースとした抗腫瘍T細胞の構築と膵臓癌治療への応用

研究課題名(英文) Generation of tumor-reactive T cells from iPS cell-derived NKT cells and application for pancreatic cancer therapy

研究代表者

植村 靖史 (Uemura, Yasushi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・ユニット長

研究者番号：40364781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：iPSC誘導技術を用いて再生したinvariant NKT細胞(re-iNKT)は、ヒト由来の多くのがん細胞株をin vitroで傷害した。この活性はNK受容体に依存するものであった。また、ゼノグラフトマウスモデルにおいて、がんの成長を抑制して、マウス生存を延長した。がん反応性キメラ抗原受容体を発現するre-iNKT細胞は、がんに対して明らかな傷害活性の増強を示さなかった。re-iNKT細胞は優れた抗腫瘍活性を示し、がん免疫療法に広く応用可能と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iNKT細胞は、アロ拒絶反応を惹起しないIT細胞受容体を持つ為、iPSCから再生したiNKT細胞は、がん治療を目的とした他家投与用のエフェクター細胞プラットフォームとして有望である。再生iNKT細胞が抗腫瘍効果を示す「がん細胞」の情報は、学術的、及び臨床的に重要である。

研究成果の概要(英文)：The re-iNKT cells by themselves showed the NK cell-like cytotoxicity against all of the tested cancer cell lines, which was mediated by NKG2D and DNAM-1. They inhibited the growth of K562 chronic myelogenous leukemia in a xenografted mouse model and prolonged the mouse survival. We generated the re-iNKT cells expressing a glypican-3 (GPC3)-reactive chimeric antigen receptor (CAR). The GPC3-CAR-transduced re-iNKT cells revealed a cytotoxicity against a GPC3-expressing SK-Hep1 cancer cell line. However, the strength of the cytotoxicity was equal to that of wild-type re-iNKT cells. To clarify the function of GPC3-CAR, we used peripheral blood-derived T cells for GPC3-CAR gene transfer. The GPC3-CAR-transduced T cells revealed the enhanced cytotoxicity against the GPC3-expressing JHH7 cell line compared to the wild-type T cells, indicating that the CAR construct is intact. re-iNKT cells can be a cell platform potentially utilized for cancer immunotherapy.

研究分野：がん免疫療法

キーワード：外科 がん 免疫 再生医療 人工多能性幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は最も予後の悪い消化器癌の1つであり、有効な治療法がなく診断された患者の生存期間は、今日でも10年前とほとんど変わっていない。また、分子標的薬の恩恵を受けている他の癌と比較して、膵臓癌患者の治療選択肢は極めて限られている為、より効果的な治療法の開発が切望されている。

近年、細胞傷害性T細胞(CTL)の遺伝子改変により「がん抗原特異性」を賦与して「がん」の排除を誘導する免疫細胞療法が開発され、一部の患者で優れた抗腫瘍効果が認められ着実に進歩を続けている。しかしながら、多くの進行がん患者では、免疫細胞が疲弊しており、安定した抗腫瘍効果が得られない、免疫抑制性のがん微小環境を改善できない、免疫不全状態に陥っているがん患者から大量の成分採血を必要とし、患者採血の負担が大きい等の問題を抱えている。また、個別化医療としての自己細胞治療の費用は極めて高額であり、普遍的に投与可能な免疫細胞プラットフォームを応用した低コスト化技術の開発が切望されている。

私達は、iPS細胞誘導技術を用いてインバリアントナチュラルキラーT(iNKT)細胞と呼ばれる特殊なT細胞サブセットの再生に成功した。このiPSC-iNKT細胞は、iPSCを経由する前のiNKT細胞と同様に、均一なT細胞受容体(TCR)を発現して、CD1d分子に提示された特定の糖脂質抗原(-GalCer)を認識する-GalCerを負荷した白血病細胞に対して強力な細胞傷害活性を示す樹状細胞(dendritic cell: DC)との相互作用により、IL-12/IL-23産生バランスを制御して免疫抑制性のがん微小環境を改善する等の機能を有している。iPSC-iNKT細胞は、DCを活性化することにより免疫系を賦活化する細胞アジュバントとしての機能に優れているが抗原特異的に癌細胞を傷害することはできない。したがって、癌抗原を特異的に認識する受容体をiPSC-iNKT細胞に発現させ、これの強力な細胞傷害活性を癌細胞に向けることができれば、免疫抑制性のがん微小環境を改善するとともに、癌細胞の選択的排除を誘導する新たな治療法の開発に資することができる。

## 2. 研究の目的

本研究は、iPSC-iNKT細胞に癌抗原を認識する受容体(キメラ抗原受容体: chimeric antigen receptor)を人為的に発現させ、癌細胞を特異的に傷害する抗腫瘍エフェクター細胞を作製する。このiPSC-iNKT細胞をベースとしたエフェクター細胞の機能を明らかにして、これを癌患者に投与することで、免疫抑制性のがん微小環境を改善するとともに、持続的で強力な膵臓癌の排除を誘導する新たな免疫療法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

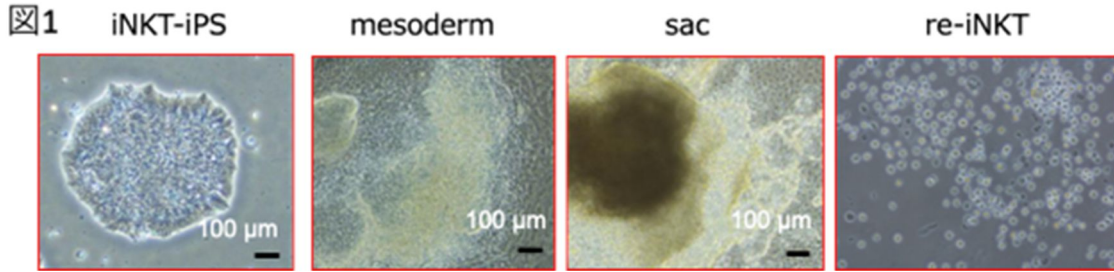
健常人末梢血単核球を-GalCerを用いて複数回刺激することでiNKT細胞株を樹立した。これにセンダイウイルスベクターを用いてリプログラミング因子を導入してiNKT細胞由来iPS細胞を作製した。これから中胚葉分化、造血系分化を経由してT細胞分化を誘導して、再生iNKT細胞(re-iNKT細胞)を構築した。野生型のiNKT細胞とre-iNKT細胞の抗原非特異的細胞傷害活性を比較した。パーキットリンパ腫細胞株(Daudi)、肝臓癌細胞株(JHH7)、非小細胞肺癌細胞株(PC9)、口腔扁平上皮癌細胞株(SAS)、卵巣癌細胞株(RMG-1)に対する細胞傷害活性を51Cr遊離試験によって評価した。また、慢性骨髄性白血病細胞株(K562)を皮下移植した免疫不全マウス(BALB/c-Rag2<sup>-/-</sup>-Jak3<sup>-/-</sup>)に、野生型のiNKT細胞、あるいはre-iNKT細胞を局所投与して腫瘍の成長、及び生存期間を評価した。

一方、GPC3特異的キメラ抗原受容体を遺伝子導入する為のレトロウイルスベクターを構築して、末梢血CD3<sup>+</sup>T細胞あるいはre-iNKT細胞の遺伝子改変によりGPC3特異的キメラ抗原受容体を発現させた抗腫瘍エフェクター細胞を作製した。これらの細胞傷害活性を51Cr遊離試験で評価した。細胞傷害性試験のターゲット細胞としてGPC3を発現する肝臓癌細胞(SK-Hep1-GPC3, JHH7)を用いた。

## 4. 研究成果

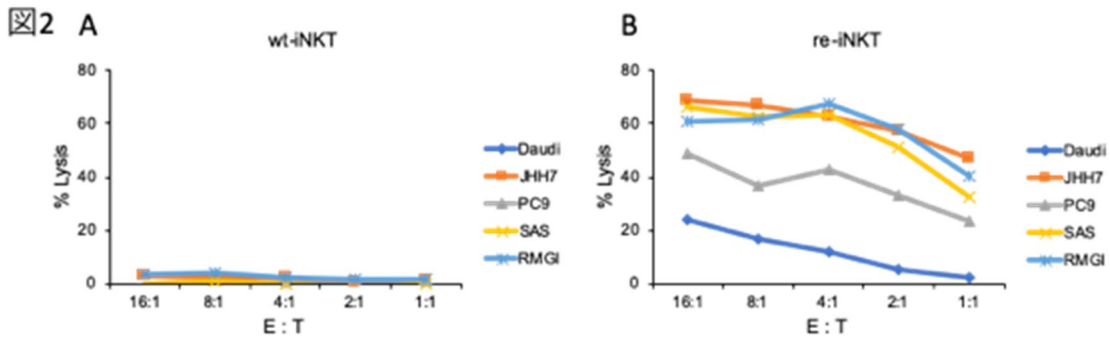
### (1) iNKT細胞のリプログラミングと再生iNKT細胞の構築

健常人末梢血単核球より樹立したiNKT細胞は、CD1d拘束性に-GalCerを認識して増殖応答を示すと共にIFN- $\gamma$ を産生した。樹立したiNKT細胞株にセンダイウイルスベクター(SeVdb(KOSM), 302L/SeV18, SV40LTA/TS)を用いて、リプログラミング因子を導入することにより、ヒトiNKT細胞由来iPS細胞を樹立した(図1)。このiPS細胞をフィーダー細胞(C3H10T1/2)上に播種してVEGF, SCF, Flt3Lを添加して14日間培養することで中胚葉分化、造血系分化を誘導した。その後、フィーダー細胞OP9-DLL1上に播種してFlt3L, IL-7, IL-2, IL-15を添加して21日間培養することで、再生iNKT細胞(re-iNKT細胞)を誘導した。re-iNKT細胞は、CD1d拘束性に-GalCerを認識してIFN- $\gamma$ を産生した。



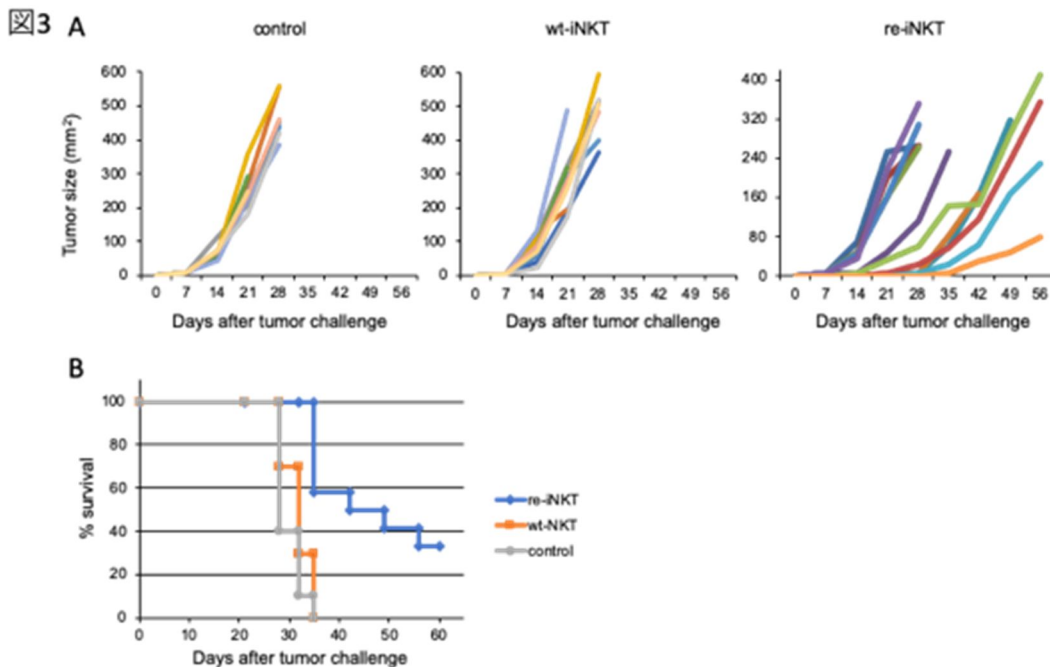
(2) 癌細胞株に対する細胞傷害活性

野生型の iNKT 細胞あるいは re-iNKT 細胞の細胞傷害活性を評価した。re-iNKT 細胞は、パーキットリンパ腫細胞株 (Daudi)、肝臓癌細胞株 (JHH7)、非小細胞肺癌細胞株 (PC9)、口腔扁平上皮癌細胞株 (SAS)、卵巣癌細胞株 (RMG-1) に対して細胞傷害活性を示したが、野生型の iNKT 細胞 (wt-iNKT 細胞) は、これらの癌細胞株に対して全く細胞傷害活性を示さなかった (図 2)。re-iNKT 細胞の細胞傷害活性は、抗 CD1d 抗体、抗 HLA-I 抗体で阻害することができず、抗 NKG2D 抗体、抗 DNAM-1 抗体を添加することで阻害した。従って、re-iNKT 細胞は各種癌細胞株に対して NK 受容体依存性の細胞傷害活性を有することが示唆された。



(3) 再生 iNKT 細胞の in vivo における抗腫瘍効果

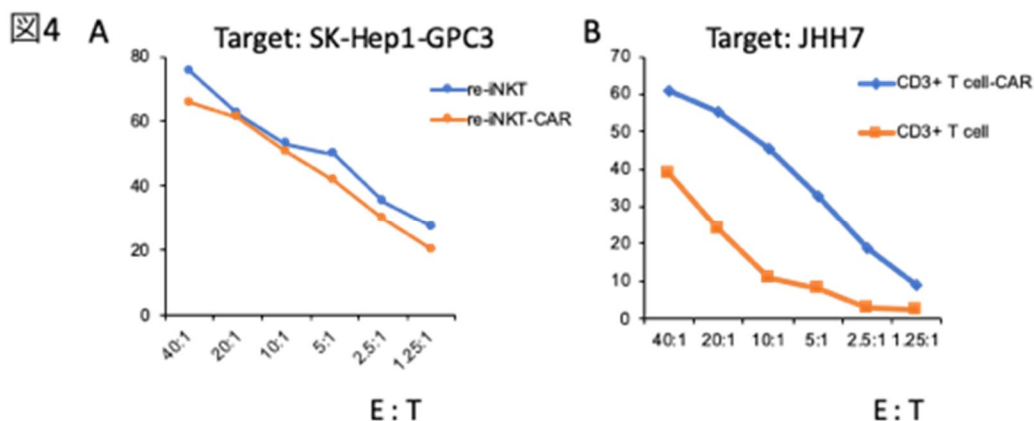
re-iNKT 細胞の抗腫瘍効果を免疫不全マウス (BALB/c-Rag2<sup>-/-</sup>-Jak3<sup>-/-</sup>) を用いたゼノグラフトモデルで評価した。慢性骨髄性白血病細胞株 (K562) を皮下移植して野生型の iNKT 細胞、あるいは re-iNKT 細胞を局所投与して腫瘍の成長、及びマウス生存を評価したところ、野生型の iNKT 細胞を投与した群は未治療群と同等の腫瘍の成長が認められ、全く抗腫瘍効果が観察されなかった。一方、re-iNKT 細胞を投与した群は、腫瘍成長の明らかな抑制が観察された (図 3)。



また、re-iNKT 細胞を投与した群は、マウス生存を延長した (図 3)。

#### (4) キメラ抗原受容体を導入した再生 iNKT 細胞の抗腫瘍活性

Glypican-3 (GPC3) 特異的抗体の scFv を T 細胞活性化シグナルドメイン (CD28-4-1BB-CD3 ) に接続した第三世代型キメラ抗原受容体 (CAR) を遺伝子導入する為のレトロウイルスベクターを作製した。これを用いて re-iNKT 細胞に GPC3 特異的 CAR 遺伝子を導入した。CAR の発現は、バイシストロニック配列 T2A にて共発現するタグに対する抗体を用いて確認した。GPC3 特異的 CAR を発現する re-iNKT 細胞は、GPC3 を発現する肝臓癌細胞株 (SK-Hep1-GPC3) に対して強力な細胞傷害活性を示したが、GPC3 特異的 CAR を発現しない re-iNKT 細胞も同等の細胞傷害活性を示し、CAR 発現による傷害活性の増強は観察されなかった (図 4A)。GPC3 特異的 CAR の性能を評価するために、健康人末梢血由来 CD3+ T 細胞に GPC3 特異的 CAR を導入して細胞傷害活性を評価したところ、CAR 遺伝子を導入することにより、GPC3 陽性肝臓癌細胞株 JHH7 に対する細胞傷害活性が上昇し、作製した CAR 構造に問題がないことが分かった (図 4B)。



以上より、re-iNKT 細胞は、強力な NK 活性を示して *in vitro*, *in vivo* において癌の排除を誘導できる。これにキメラ抗原受容体を発現させることで更なる抗腫瘍効果の向上は観察されなかったが、NK 活性介在性の細胞傷害活性を回避する癌に対しては、キメラ抗原受容体を介して癌を排除すると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Minagawa A, Yoshikawa T, Yasukawa M, Hotta A, Kunitomo M, Iriguchi S, Takiguchi M, Kassai Y, Imai E, Yasui Y, Kawai Y, Zhang R, Uemura Y, Miyoshi H, Nakanishi M, Watanabe A, Hayashi A, Kawana K, Fujii T, Nakatsura T, Kaneko S	4. 巻 23
2. 論文標題 Enhancing T cell Receptor Stability in Rejuvenated iPSC-derived T cells improves their use in cancer immunotherapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 850-858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2018.10.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda N, Uemura Y, Zhang R, Kitayama S, Iriguchi S, Kawai Y, Yasui Y, Tatsumi M, Ueda T, Liu TY, Mizoro Y, Okada C, Watanabe A, Nakanishi M, Senju S, Nishimura Y, Kuzushima K, Kiyoi H, Naoe T, Kaneko S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Generation of TCR expressing innate lymphoid-like helper cells that induces cytotoxic T cell-mediated anti-leukemia cell response	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 213-227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.stemcr.2018.04.025.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liu H, Chen L, Liu J, Meng H, Zhang R, Ma L, Wu L, Yu S, Shi F, Li Y, Zhang L, Wang L, Feng S, Zhang Q, Peng Y, Wu Q, Liu C, Chang X, Yang L, Uemura Y, Yu X, Liu T.	4. 巻 411
2. 論文標題 Co-delivery of tumor-derived exosomes with alpha-galactosylceramide on dendritic cell-based immunotherapy for glioblastoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Lett.	6. 最初と最後の頁 182-190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.canlet.2017.09.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsuchiya N, Zhang R, Iwama T, Ueda N, Liu T, Tatsumi M, Sasaki Y, Shimoda R, Osako Y, Sawada Y, Kubo Y, Miyashita A, Fukushima S, Cheng Z, Nakaki R, Takubo K, Okada S, Kaneko S, Ihn H, Kaisho T, Nishimura Y, Senju S, Endo I, Nakatsura T, Uemura Y.	4. 巻 29
2. 論文標題 Type I Interferon Delivery by iPSC-Derived Myeloid Cells Elicits Antitumor Immunity via XCR1+ Dendritic Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 162-175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.08.086.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Zhang R, Kitayama S, Liu T, Ueda N, Tokumitsu Y, Mashima H, Ohdan H, Kaneko S, Uemura Y.	4. 巻 2048
2. 論文標題 In Vitro Detection of Cellular Adjuvant Properties of Human Invariant Natural Killer T Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 121-130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9728-2_13.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 張 エイ, 土屋 伸広, 得光 友美, 千住 覚, 遠藤 格, 中面 哲也, 植村 靖史
2. 発表標題 人工多能性幹細胞に由来する1型IFN産生ミエロイド細胞を用いたがん免疫療法
3. 学会等名 癌免疫外科研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rong Zhang, Nobuhiro Tsuchiya, Tianyi Liu, Yosuke Kubo, Satoshi Nakahara, Azusa Miyashita, Satoshi Fukushima, Hironobu Ihn, Satoru Senju, Itaru Endo, Tetsuya Nakatsura, Yasushi Uemura
2. 発表標題 Type 1 IFN-delivery by myeloid cells from induced pluripotent stem cells elicits systemic antitumor immunity via dendritic cells
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rong Zhang, Syuichi Kitayama, Tianyi Liu, Tatsuaki Iwama, Tetsuya Nakatsura, Shin Kaneko, Yasushi Uemura
2. 発表標題 Cellular adjuvant properties and direct cytotoxicity in re-differentiated V 24 invariant NKT cells from human induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 第36回 札幌国際がんシンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tatsuaki Iwama, Nobuhiro Tsuchiya, Rong Zhang, Tianyi Liu, Miwa Haruta, Yosuke Kubo, Azusa Miyashita, Satoshi Fukushima, Hironobu Ihn, Yasuharu Nishimura, Satoru Senju, Itaru Endo, Tetsuya Nakatsura, Yasushi Uemura
2. 発表標題 Induction of CD8 T cell-mediated anti-tumor immunity by type 1 IFN-producing myeloid cell therapy
3. 学会等名 第36回 札幌国際がんシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩間 達章、土屋 伸広、張 エイ、得光 友美、春田 美和、劉 天懿、吉川 聡明、澤田 雄、久保 陽介、宮下 梓、福島 聡、田久保 圭誉、阪上-沢野 朝子、宮脇 敦史、尹 浩信、西村 泰治、千住 覚、遠藤 格、中面 哲也、植村 靖史
2. 発表標題 IFN 産生ミエロイド細胞を用いたがん免疫療法
3. 学会等名 第21回 日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 IWAMA Tatsuaki, TSUCHIYA Nobuhiro, ZHANG Rong, LIU Tianyi, KUBO Yosuke, MIYASHITA Azusa, FUKUSHIMA Satoshi, IHN Hironobu, ENDO Itaru, SENJU Satoru, NAKATSURA Tetsuya, UEMURA Yasushi
2. 発表標題 Induction of T cell-mediated anti-tumor immunity by type 1 IFN-producing myeloid cells
3. 学会等名 第76回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 張 エイ、得光 友美、土屋 伸広、岩間 達章、下村 真奈美、澤田 雄、遠藤 格、中面 哲也、千住 覚、植村 靖史
2. 発表標題 1型IFNを産生するiPS細胞由来ミエロイド細胞を用いたがん免疫療法
3. 学会等名 第46回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 真島宏聡, 張エイ, 小林剛 岩間達章, 大段秀樹, 中面哲也, 植村靖史
2. 発表標題 iPSCに由来するプロフェッショナル抗原提示細胞を用いた新規がんワクチン療法の開発
3. 学会等名 第40回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真島宏聡, 張エイ, 小林剛, 岩間達章, 大段秀樹, 中面哲也, 植村靖史
2. 発表標題 人工多能性幹細胞に由来するプロフェッショナル抗原提示細胞を用いた新規がんワクチン療法の開発
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Zhang R, Tsuchiya N, Liu T, Kubo Y, Miyashita A, Fukushima S, Ihn H, Senju S, Endo I, Nakatsura T, Uemura Y.
2. 発表標題 Type I interferon-delivery by iPSC-derived myeloid cells elicits antitumor immunity via XCR1+ dendritic cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mashima H, Zhang R, Kobayashi T, Liu T, Iwama T, Ohdan H, Nakatsura T, Uemura Y.
2. 発表標題 Generation of proliferating professional antigen-presenting cells from induced pluripotent stem cells for cancer immunotherapy
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Fukuda K, Tsuchiya N, Liu T, Kubo Y, Miyashita A, Fukushima S, Ihn H, Senju S, Endo I, Nakatsura T, Uemura Y
2. 発表標題 Type I interferon-delivery by iPSC-derived myeloid cells elicits antitumor immunity via XCR1+ dendritic cells.
3. 学会等名 17th International Congress of Immunology, Beijing China (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	福田 恭子 (張エイ)  (Fukuda Kyoko)  (00643719)	国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・研究員    (82606)	