

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：17K10806

研究課題名（和文）1型IFN産生ミエロイド細胞を用いた肺がん治療法の開発

研究課題名（英文）Type I IFN-producing myeloid cells as a cell preparation for lung cancer

研究代表者

福田 恭子（張エイ）（Fukuda, Kyoko）

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

研究者番号：00643719

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）：人工多能性幹細胞（iPSC）由来の増殖ミエロイド系細胞の遺伝子改変により、IFN- γ を産生する細胞（IFN- γ -iPSC-pMC）を作製した。IFN- γ -iPSC-pMCをがんの局所に投与すると局所のみならず遠隔部位のがんを制御した。この効果は、XCR1+ DCの活性化を介して、がん反応性T細胞が効率よく誘導されることに起因していた。また、免疫チェックポイント阻害剤（ICI）との併用により、ICI抵抗性のがんを制御できることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IFN- γ -pMCの抗腫瘍効果の詳細なメカニズムを明らかにしたところに学術的意義を有する。特にIFN- γ -pMCによって産生される1型IFNの作用点を決定した点は注目に値する。また、免疫チェックポイント阻害剤抵抗性のがんを克服するための新たな医療技術が提案され社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Type I interferons (IFNs) play important roles in antitumor immunity. We generated

IFN- γ -producing cells by genetically engineering induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived proliferating myeloid cells (iPSC-pMCs). Local administration of IFN- γ -producing iPSC-pMCs (IFN- γ -iPSC-pMCs) alters the tumor microenvironment and propagates the molecular signature associated with type I IFN. The gene-modified cell actively influences host XCR1+ dendritic cells to enhance CD8+ T cell priming, resulting in CXCR3-dependent and STING-IRF3 pathway-independent systemic tumor control. Administration of IFN- γ -iPSC-pMCs in combination with immune checkpoint blockade overcomes resistance to single-treatment modalities and generates long-lasting antitumor immunity. These preclinical data suggest that IFN- γ -iPSC-pMCs might constitute effective immune-stimulating agents for cancer that are refractory to checkpoint blockade.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：外科 がん 免疫 インターフェロン 人工多能性幹細胞 がん免疫療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺がんは早期発見が困難であり、進行がんとして発見されることが多く、本邦ではがん死亡率の第一位を占めている。一部の肺がんにおいては分子標的薬が奏効するがその多くは再発する。また、近年注目を浴びている免疫学的チェックポイント阻害薬 (ICB) の肺がんにおける奏効率は 20%程度と推定され、未だ多くの患者で効果が認められず予後不良の疾患であり、新たな治療法の開発が期待されている。

1 型インターフェロン (IFN) は、「ウイルス感染」や「がん」に対する細胞性免疫応答を惹起する重要なサイトカインの1つとして知られている。しかしながら、投与時の副作用に比べて抗腫瘍効果が弱いことから広く応用されていないのが現状である。

人工多能性幹細胞 (iPSC) から分化誘導した細胞は、規格化された細胞製剤としてのポテンシャルを有している。私達は iPSC から、サイトカイン依存性に増殖するミエロイド細胞 (iPSC-derived proliferating myeloid cell: iPSC-pMC) の構築に成功した。これによって少ない費用と労力で機能的に安定したミエロイド細胞を短期間で大量に提供することが可能となった。本システムは、iPSC-pMC の段階で遺伝子改変操作が容易であり、機能修飾によって効果と安全性を向上させることができる。すでに 1 型 IFN 産生能を賦与した iPSC-pMC を構築し、これを担がんマウスモデルに投与すると局所のみならず、遠隔腫瘍までも制御できることを確認している。

2. 研究の目的

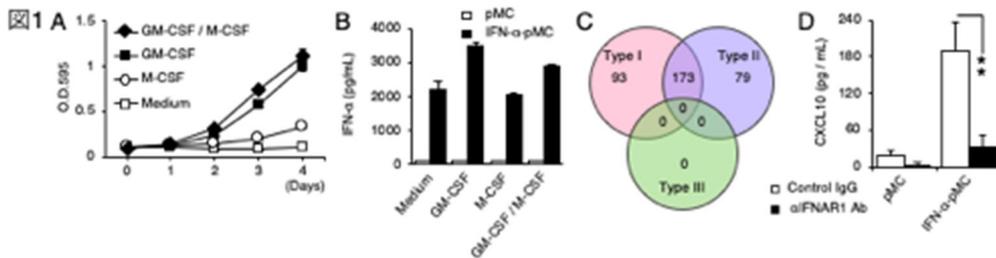
本研究課題は、私達が構築した 1 型 IFN 産生 iPSC-pMC の肺がんへの臨床応用を予見して、抗腫瘍効果の詳細なメカニズムを明らかにするとともに ICB との併用効果を検討する。これらを応用して患者に投与することで、持続的で強力な抗腫瘍免疫応答を惹起して、肺がんを免疫学的に排除する新たな治療法を開発する。

3. 研究の方法

1 型 IFN 受容体 (IFNAR-1) 欠損がん細胞株、IFNAR-1 ノックアウト (KO) マウス、IFNAR-1 欠損骨髓キメラマウス等を用いて、iPSC-pMC に由来する 1 型 IFN の作用点を決定すると共に、STING-KO マウス等を用いて効果のメカニズムを明らかにする。また、がん組織浸潤 T 細胞 (TIL) の TCR レパトア解析により「がんの排除」に関与する T 細胞の多様性を明らかにする。一方、がん組織 RNA シーケンス (RNAseq) 解析により効果予測因子の候補を多角的に探索・同定する。また、ICB との併用により相乗効果が得られるかを検討する。

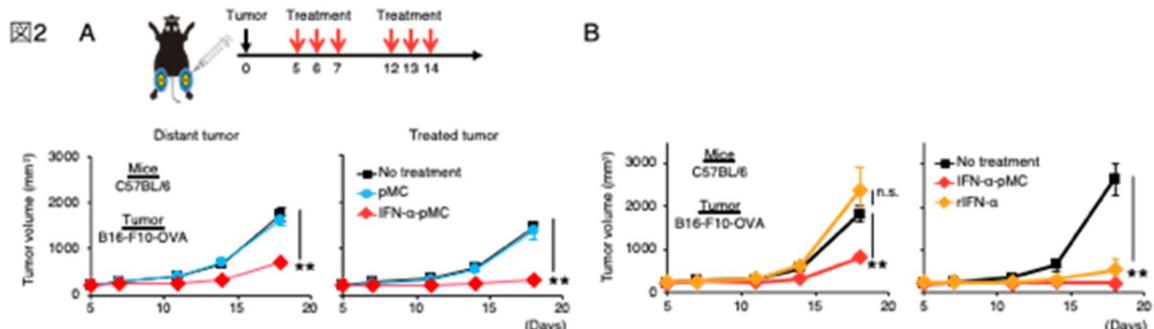
4. 研究成果

(1) 1 型 IFN を産生する iPSC-pMC



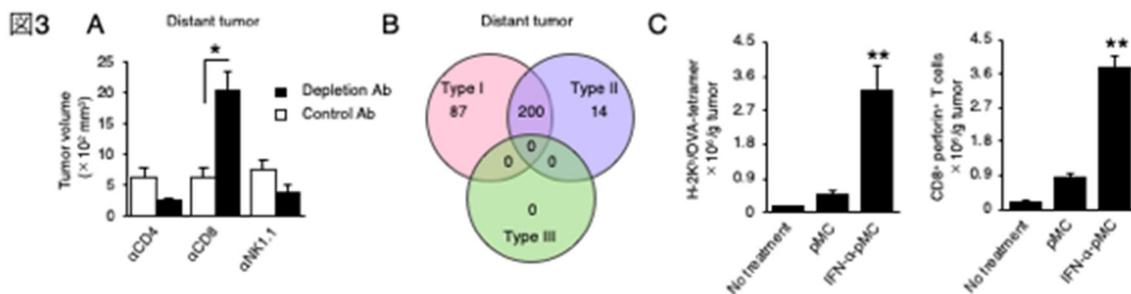
iPSC-pMC を基盤として 1 型 IFN (IFN- α) 産生能を付与した IFN- α -pMC は、GM-CSF 依存性に増殖し、GM-CSF が存在しない状態でも IFN- α を産生した (図 1A,B)。RNAseq 解析の結果、この細胞自体が 1 型 IFN 応答遺伝子群の発現が上昇していた (図 1C)。この細胞の 1 型 IFN 受容体 (IFNAR-1) をゲノム編集で欠損、あるいは、抗体で阻害すると、Irf7, Cxcl10 などの 1 型 IFN 応答遺伝子発現が低下したことから、IFNAR-1 シグナルを介して 1 型 IFN 応答遺伝子群の発現が上昇したと考えられた (図 1D)。

(2) 局所投与による遠隔部位がんの制御



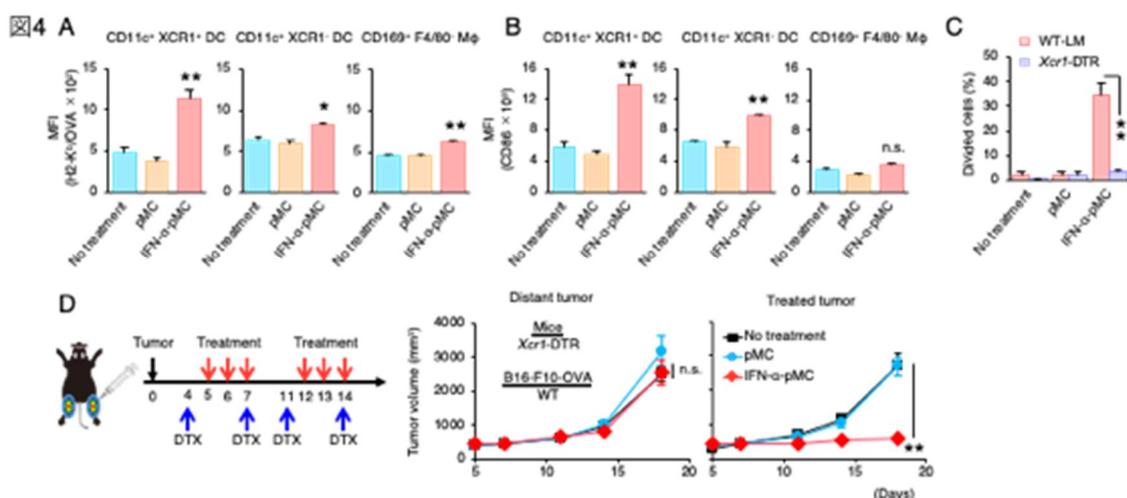
マウス両脚皮下にがん細胞を移植して、片側の腫瘍周辺に IFN- γ -pMC を投与したところ、IFN- γ -pMC は投与局所に留まりながら局所のみならず、遠隔部位のがんまでも制御した(図 2A)。この効果は、高濃度のリコンビナント 1 型 IFN を局所投与した場合には観察されなかった(図 2B)。IFN- γ -pMC を投与したマウスの血中には低レベルの 1 型 IFN が 24 時間後まで検出された。一方、高濃度のリコンビナント 1 型 IFN を局所投与した場合には、投与直後に急激に上昇したが 3 時間以内に消失した。従って、1 型 IFN の動態が効果に關与する可能性が示唆された。IFNAR-1 欠損がん細胞株、IFNAR-1-KO マウス、IFNAR-1 欠損骨髓キメラマウス等を用いた解析により、遠隔がんの制御には、がん細胞そのものではなく、骨髓由来細胞における 1 型 IFN シグナルが重要であることを見出した。

(3) 1 型 IFN シグネチャー拡大と CD8+T 細胞介在性の抗腫瘍免疫応答



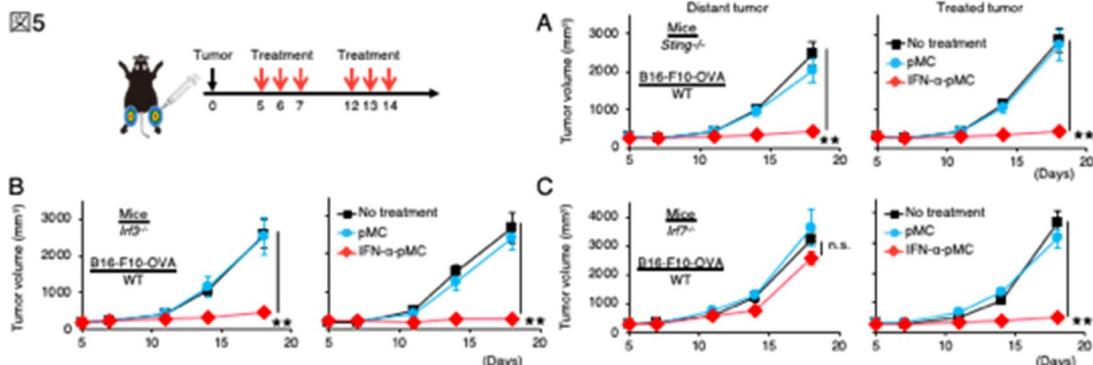
遠隔がん制御に免疫応答の関与が示唆されたため、CD4+, CD8+, あるいは NK1.1+細胞を抗体で除去して責任細胞の検討を行った(図 3A)。その結果、CD8+細胞を除去した場合に遠隔がんに対する効果がキャンセルされた。がん組織 RNAseq 解析の結果、IFN- γ -pMC 投与マウスでは局所のみならず遠隔がんにも 1 型 IFN 応答遺伝子群の発現が上昇していた(図 3B)。また、宿主 IFNAR-1 に依存して CD3e, CD8a, Gzmb, Prf1, Cxcl9, Cxcl10, Ccl3, Ccl4, Ccl5 遺伝子発現が上昇していた。GO 解析において、T 細胞介在性の免疫応答、細胞傷害、免疫細胞の浸潤などがアノテーション付加された。さらに、遠隔部位では、抗原特異的 CD8+T 細胞、及びパーフォリン陽性 T 細胞のがん組織内浸潤が増加していた(図 3C)。TCR レパトア解析の結果、治療局所と遠隔がんの両者に同じ TCR 鎖をもつ T 細胞が増加していた。この観察より治療局所から遠隔部位にがん反応性 T 細胞が移動したと考えられた。そこで FTY720 を用いてリンパ節から T 細胞が出るのを阻害すると遠隔がんに対する効果が消失した。一方、CXCR3 抗体を投与して CXCR3 依存性の細胞遊走を阻害したところ、遠隔がんに対する効果が消失した。以上より、IFN- γ -pMC を投与するとがん組織に 1 型 IFN 応答遺伝子群の発現を拡大して、リンパ節を経由して、CXCR3 依存性に遠隔部位に移動した抗原特異的 CD8+T 細胞が抗腫瘍効果を発揮すると考えられた。

(4) 宿主 XCR1+DC における 1 型 IFN シグナルの重要性



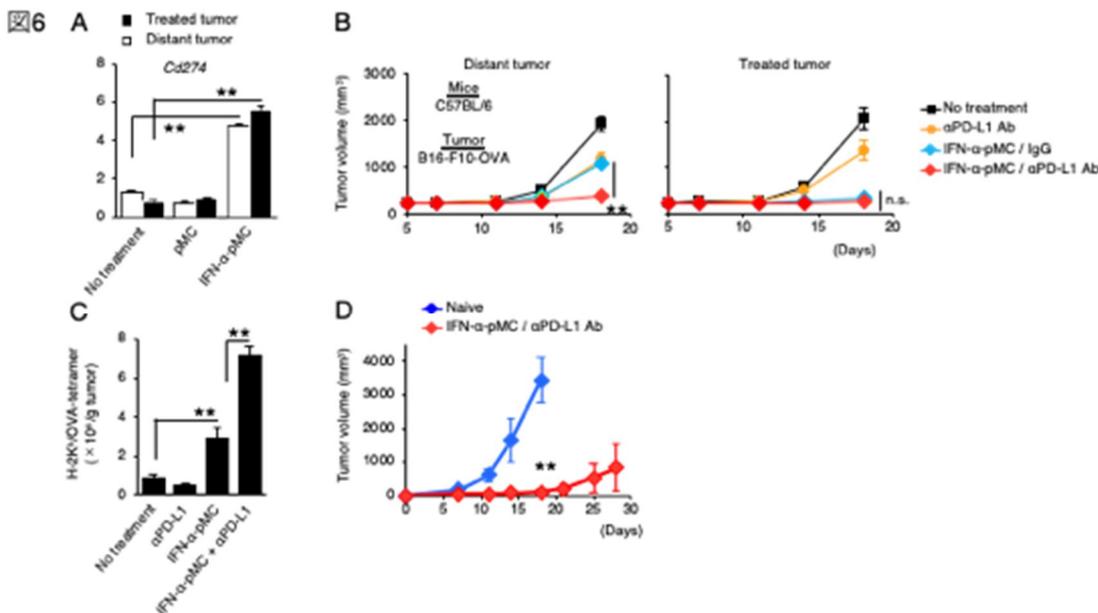
所属リンパ節に存在する抗原提示細胞のクロスプレゼンテーション機能を評価した。IFN- γ -pMC 投与後に XCR1+DC におけるがん抗原の提示と共刺激分子 CD86 の発現が他の抗原提示細胞と比較して著しく上昇していた(図 4A,B)。IFNAR-1 欠損マウスでは XCR1+DC におけるがん抗原提示と CD86 の上昇は観察されなかった。また、XCR1+DC をジフテリアトキシンで除去すると、がん反応性 T 細胞の増殖と遠隔部位への抗腫瘍効果が著しく低下した(図 C,D)。以上より、XCR1+DC における 1 型 IFN シグナル、及び それに伴うクロスプレゼンテーション機能の上昇と共刺激分子発現の上昇ががん反応性 T 細胞の初期活性化を促進して遠隔がんを制御していることが明らかとなった。

(5) STING 経路非依存性の抗腫瘍効果



細胞質内 DNA 応答経路 (cGAS/STING/IRF3 経路) の活性化に伴って産生誘導される 1 型 IFN は、抗腫瘍免疫応答を惹起する上で重要である。その一方で、この経路は、がん関連炎症に誘導されるインフラマソーム活性化によって抑制されることが知られている。野生型マウスに観察された IFN- α -pMC 投与後の遠隔がんの制御は、Sting 欠損マウスと Irf3 欠損マウスにおいても観察された (図 5A,B)。ところが Irf7 欠損マウスでは抗腫瘍効果が消失した (図 5C)。つまり、IFN- α -pMC を用いた細胞療法は、STING-IRF3 経路をスキップし、がん微小環境における細胞質内 DNA 応答経路に対する抑制機構を回避できると考えられた。

(6) PD-1/PD-L1 阻害の併用効果



IFN- α -pMC 投与するとがん組織に PD-L1 (CD274) が上昇した (図 6A)。この PD-L1 上昇は宿主 IFNAR-1 に依存していた。PD-L1 発現は、がん反応性 T 細胞ががん細胞あるいは DC と相互作用するがん辺縁部と所属リンパ節に観察された。抗 PD-L1 抗体を腹腔内投与した群では、僅かながんの退縮が観察された。一方、IFN- α -pMC 治療と抗 PD-L1 抗体併用群では著しいがんの退縮が観察された (図 6B)。IFN- α -pMC 単独治療群と併用群では、遠隔がん組織にがん反応性 T 細胞が数多く浸潤していた (図 6C)。特に併用群では、パーフォリン陽性 T 細胞が数多く存在し、完全奏効が何例か観察された。これらのマウスに同じがん細胞を移植するとがんの生着を抑制した (図 6D)。この観察から、がん抗原に対する免疫学的記憶が成立していると考えられた。効果的ながん免疫応答は、がんの遺伝子変異に起因するがんネオアンチゲン反応性 T 細胞の存在に関連することが知られている。実際に、併用群でがんが消失したマウス体内にがんネオアンチゲン反応性 T 細胞を検出した。

(7) IFN- α -pMC 治療の安全性

1 型 IFN の全身投与は抗腫瘍効果が少ない上に重篤な副作用を招くことがある。持続的で過剰な 1 型 IFN シグナルは、休止状態の造血幹細胞 (HSC) を過剰に増殖させて最終的には枯渇させる。そこで、IFN- α -pMC 治療が HSC に及ぼす影響を解析した。骨髄キメラマウスを用いて解析した。超高濃度のリコンビナント 1 型 IFN 投与マウス骨髄から産生されるリンパ球系、ミエロイド系細胞は著しく減少したが、IFN- α -pMC 治療施行マウス骨髄から産生されるリンパ球系、ミエロイド系細胞の減少は観察されず、骨髄抑制を誘導しないことが示唆された。骨髄移植を 3 次移植まで行った実験においても、IFN- α -pMC 治療施行マウス骨髄の長期生着抑制は観察されなかった。また、IFN- α -pMC 治療を実施した同

系マウスの体重減少、及び明らかな自己免疫様の反応は観察されなかった。さらに、治療プロトコルの5倍量のIFN- γ -pMCを免疫不全マウス(BALB/c Rag2-/-Jak3-/-)に投与した際にIFN- γ -pMCの造腫瘍性は観察されず、マウスモデルにおける安全性が示唆された。

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) doi: 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 1935-1946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 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) 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 1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
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	千住 覚 (Senju Satoru) (50274709)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授 (17401)	