

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16811

研究課題名(和文) iPS細胞から誘導された樹状細胞によるDNAJB8を標的とした癌免疫療法

研究課題名(英文) Establishment of the DNAJB8 targeting dendritic cell immunotherapy induced from iPS cells

研究代表者

西澤 哲(NISHIZAWA, SATOSHI)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90458076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Balb/cマウス由来線維芽細胞株balb/3T3にセンダイウイルスベクターを用いてSox2, Oct3/4, Klf4, L-mycを遺伝子導入し、iPS細胞を誘導した。誘導したiPS細胞から樹状細胞への誘導を試みたが、FACSでCD11b、MHC class II、CD80/86の発現を確認できなかった。DNAJB8の臨床的役割を検証するために当院で根治的腎摘除術を施行された52例の腎癌組織サンプルからmRNAを抽出し、定量PCRで臨床的予後との関連を評価した。DNAJB8の発現を認めない14例からは癌の再発を認めず、病理学的にはDNAJB8の発現の有無により静脈浸潤について有意差を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当研究においてDNAJB8を標的とした免疫療法の確立のため、iPS細胞から誘導した樹状細胞を用いてその癌抑制効果を評価する予定であったが、樹状細胞の誘導が困難で断念せざるを得なかった。当研究と並行してDNAJB8の臨床的意義についても評価を行ったが、DNAJB8は根治治療後の癌再発とも臨床的に相関し、癌起始能を有すると考えられる癌幹細胞との関連を臨床的にも確認でき、DNAJB8を標的とした治療戦略の有用性を再評価できたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Sox2, Oct3/4, Klf4, and L-myc were introduced into Balb/c mouse-derived fibroblast cell line balb/3T3 using Sendai virus vector to induce iPS cells. We tried to induce dendritic cells from induced iPS cells, but we could not confirm the expression of CD11b, MHC class II, and CD80/86 by FACS. To examine the clinical role of DNAJB8, mRNA was extracted from tissue samples of 52 renal cancer patients who underwent radical nephrectomy in our hospital, and its association with clinical prognosis was evaluated by quantitative PCR. No recurrence was observed in 14 cases with no expression of DNAJB8, and pathologically, there was a significant difference in venous invasion depending on the expression of DNAJB8.

研究分野：泌尿器科癌

キーワード：DNAJB8

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎癌は薬剤が奏功しにくく、主要な泌尿器癌の中で最も死亡率の高い癌腫である。1990年頃より IL2 や IFN といった非特異的な免疫療法が転移性腎癌に対して用いられるようになり、一部の症例で優れた治療効果を示す症例があるものの全体としての治療成績は満足できるものではなかった。近年、種々の分子標的薬が開発され臨床応用されてからは治療の選択肢は格段に広がったものの、完全寛解となる症例が少ないことや副作用の観点から、さらなる治療成績の改善が望まれている。今回、我々は癌幹細胞に着目し、この細胞群に必須な分子を標的とした新しい免疫療法の確立を計画した。癌は形態学的、機能的に heterogeneous な細胞集団であり、その中に癌幹細胞 (Cancer stem-like cells/Cancer initiating cells; CSCs/CICs) と呼ばれる造腫瘍性の高い細胞集団の存在が報告されている (癌幹細胞仮説)。癌幹細胞は化学療法や放射線療法への抵抗性と関連し、治療後の再発・転移の原因と考えられている。さらに癌幹細胞は造腫瘍性が高く、癌幹細胞を標的とした治療は現在の癌治療の課題を克服する一助となり得る可能性がある。具体的には腫瘍起始 (Tumor-initiation) に関与する癌幹細胞が死滅すれば癌の再発、転移の予防が可能と予測され、また莫大な腫瘍細胞が存在する進行癌において、限られた CTL を有用に活用するために少数の造腫瘍性の高い癌幹細胞を標的とすることは治療戦略として理にかなない、高い臨床効果が見込める。

これまでに我々は新規抗原 DNAJB8 が腎癌幹細胞に高発現しかつ癌幹細胞の機能維持に関与することを確認し、癌幹細胞を標的とした理想的な分子であることを証明した。またマウスの実験系で DNAJB8 をコードするプラスミドワクチンにより高い抗腫瘍活性を誘導することを報告した (Cancer Res.2012;72:2844)。さらに、CTL を誘導可能な DNAJB8 由来抗原ペプチドを同定し、誘導された CTL クローンが癌幹細胞を特異的に傷害することを示した (Cancer Sci.2014;105:389)。このようにペプチド刺激のみでも DNAJB8 を標的とする CTL の誘導が可能であることを報告したが、実臨床では担癌患者は腫瘍関連抗原 (TAA) に対して免疫寛容にあり、ペプチド免疫療法のみでは期待する臨床効果が得られないことが予測される。樹状細胞 (DC) は T 細胞依存性の獲得免疫応答の始動及び増幅、さらには自然免疫応答の活性化をも含めて、免疫監視機構を統御する抗原提示細胞であることが知られており、樹状細胞が提示する抗原を T 細胞が認識すると MHC classI 依存性のみならず、classII 依存性の活性化も誘導し、多方面から細胞性免疫を賦活する。これまでに我々は前立腺特異抗原 (PSA) 遺伝子を DC に導入し、前立腺癌に対する極めて強い抗腫瘍免疫反応が誘導される多価ワクチンの可能性を報告してきており (BJU Int. 2009;104:1766)、さらに survivin 遺伝子導入 DC を用いた免疫療法の開発に取り組み、種々の泌尿器癌に対して極めて強い抗腫瘍免疫応答を誘導することを報告してきた (Urology 2009;74:222)。同様に DNAJB8 を DC に遺伝子導入すれば、癌幹細胞を傷害することができる DNAJB8 特異的な CTL を誘導できる可能性がある。一方で担癌患者から採取できる DC は抗原提示能が一定せず、かつ採取できる量が限られており、抗原を強制発現できたとしても臨床効果を期待できるほどの CTL の誘導が可能かどうかについては疑問が残る。近年、iPS 細胞より従来と同等の遊走能、抗原提示能を有する DC を誘導することが可能との報告がなされた。iPS 細胞は無限に増殖可能であるため、iPS 細胞より安定した DC の供給が可能となる。

2. 研究の目的

今回、我々はマウスを用いて DNAJB8 を恒常発現する iPS 由来樹状細胞 (iPS-DC) を作成し、効率的に DNAJB8 特異的な CTL が誘導可能であるかどうか評価し、その細胞傷害活性、抗腫瘍効果について、in vivo、in vitro 両面から検討する。

癌幹細胞は癌の起始に関わるとされ、少数の細胞の残存もその再発に関与する可能性が考慮される。臨床的なアプローチを目的に免疫原性が高いとされる腎癌症例において癌幹細胞抗原 DNAJB8 の発現と根治術後の再発との関連についての評価を行う。

3. 研究の方法

1. Balb/c マウス由来 iPS 細胞の樹立と DC の誘導

Balb/c マウス胎児線維芽細胞よりセンダイウイルスベクターを用いて iPS 細胞を樹立する。(CytoTune®-iPS 2.0) マウス胎児線維芽細胞を 6 ウェルプレートに播種し、一晚培養後に KOS、KLF4、c-MYC を含むセンダイウイルスベクターを加える。CO2 インキュベーターで培養後に 3 日目に LIF 培地を添加する。LIF 培地で 3 - 4 日間培養後にトリプシンで細胞をはがし、マイトマイシンで処理したフィーダー細胞上に重層する。24 時間培養後に LIF 培地に培地交換し、以後、同培地にて毎日培地交換しながら 16-21 日目に iPS 細胞を得る。DC への分化誘導は ES 細胞から DC へ誘導する Senju らの方法 (Blood 2003;101:3501) により行う。OP-9 をフィーダー細胞として 6 日間培養後、さらに OP-9 フィーダー細胞上に播き直し、GM-CSF を加え 6 日間培養する。浮遊細胞を回収し、GM-CSF を加えて 10 日間培養後、IL-4、TNF- α 、LPS を加えて成熟化させる。一方でマウス骨髓細胞より GM-CSF 下に 8 日間培養し DC を誘導、IL-4、TNF- α 、LPS で成熟化させ、iPS から誘導した DC と骨髓細胞から誘導された DC とで CD11c、CD11b、MHC classII や co-stimulatory molecule である CD80/86 の発現の差を Flow cytometer で確認する。

2. Dnajb8 を発現するレトロウイルスベクターの作成と Dnajb8 恒常発現 iPS 細胞の作製

マウス Dnajb8 の cDNA をレトロウイルスベクターである pMXspuro へ BamHI、XhoI で挿入し、それぞれ PLAT-E パッケージング細胞へ lipofection 法によりプラスミドを導入し、レトロウイル

ス液を得る。レトロウイルス液をポリブレン混在下で iPS 細胞に感染させ、puromycin による選択で Dnajb8 恒常発現 iPS 細胞株を樹立する。遺伝子導入した細胞株は幹細胞未分化マーカーの再測定を行い、多能性が維持されていることを確認する。

3 . Dnajb8 恒常発現 iPS-DC の作成

上記で iPS 細胞より誘導された DC が従来の DC と同様の発現形態、機能を有することを確認できれば、同様の方法で Dnajb8 を恒常発現する iPS 細胞より DC を誘導する (iPS-DC-Dnajb8)。DC 誘導後、再度、CD11c、CD11b、MHC classII や co-stimulatory molecule である CD80/86 の発現を評価する。

4 . iPS-DC-Dnajb8 を用いた CTL の誘導

Balb/c マウスより脾臓とリンパ節を採取し脾細胞とリンパ球を得る。脾細胞は塩化アンモニウムで赤血球を処理後に 12 時間 incubation し、浮遊細胞を回収してリンパ球を得る。リンパ球とマイトマイシンで処理した iPS-DC-Dnajb8 を 20:1 で共培養することにより in vitro で 3 回刺激し、CTL を誘導する。MACS separation system (Miltenyi Biotech) を用いて CD8 陽性細胞を分離し、effector 細胞とする。Balb/c マウス由来腎癌細胞株 RenCa と Dnajb8 恒常発現腎癌細胞株 (RenCa/Dnajb8) を target 細胞とし、細胞傷害活性は LDH release assay を用いて評価する。抗原特異的な IFN- γ の産生は Flow cytometer で評価する。iPS-DC-Dnajb8 に対する誘導した CTL による MHC 拘束性の IFN- γ 産生を検討するために H-2Kd、H-2Dd に対する blocking 抗体を用いて IFN- γ の産生が減弱するかどうかを検討する。

5 . In vivo での iPS-DC-Dnajb8 を用いた CTL の誘導

Balb/c マウスの皮下へ iPS-DC-Dnajb8 を週に 1 回、計 3 回免疫し、その 1 週間後にマウスを sacrifice してリンパ節、脾臓を摘出し Single cell suspension を作成する。MACS separation system によるマグネットビーズで CD8 陽性細胞を分離し、同系マウスの腎癌細胞株 RenCa と Dnajb8 恒常発現腎癌細胞株 (RenCa/Dnajb8) を標的とした細胞傷害活性を LDH release assay で評価する。抗原特異的な IFN- γ の産生は Flow cytometer で評価する。iPS-DC-Dnajb8 に対する誘導した CTL による MHC 拘束性の IFN- γ 産生を検討するために H-2Kd、H-2Dd に対する blocking 抗体を用いて IFN- γ の産生が減弱するかどうかを検討する。In vivo の抗腫瘍効果については iPS-DC-Dnajb8 で免疫したマウスに同系の腎癌細胞株 (RenCa、RenCa/Dnajb8) を接種し、継時的に腫瘍径を測定して腫瘍増大抑制効果の評価する。In vivo の抗腫瘍効果が認められれば、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体を免疫時に腹腔内投与し、DC 免疫による抗腫瘍効果が CD4 依存性、CD8 依存性であることを再確認する。

6 . 臨床検体を用いた DNAJB8 の臨床的意義の評価

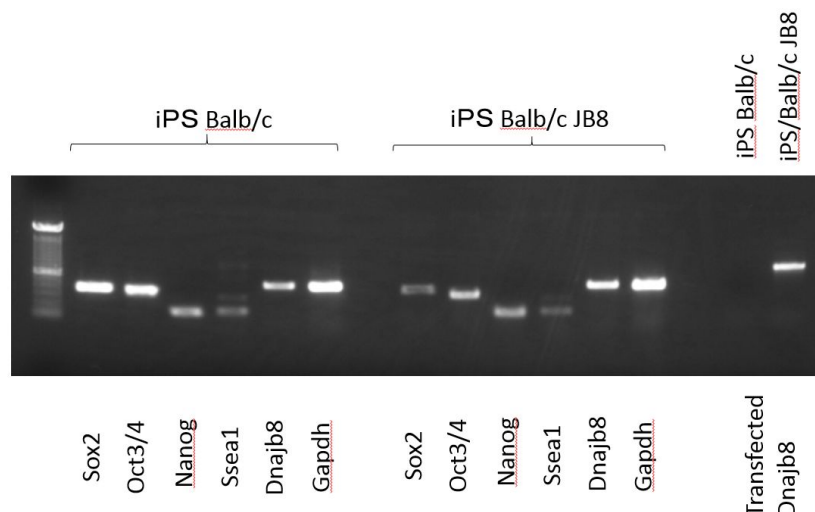
腎癌に対して手術を施行された患者を対象に腎癌組織サンプルにおける DNAJB8 の発現と臨床的予後との評価を行う。

対象患者には書面による同意を得たうえで、腎癌術後、癌組織の一部を病理診断の影響のない程度に採取し、速やかに RNA later (Qiagen) に浸し、-80 で保存しておく。Total RNA を RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) を用いて採取し、mRNA は定量 PCR を用いて測定する。DNAJB8 の発現と病理学的所見、再発との関連について評価を行う。

4 . 研究成果

1 . Balb/c マウス由来 iPS 細胞の樹立

センダイウイルスベクターを用いて Balb/c マウス由来 iPS 細胞の樹立を行った (iPS/Balb/c)。遺伝子発現は RT-PCR を行い、Sox2、Oct3/4、Nanog、Ssea1 の発現を確認した。iPS/Balb/c は Dnajb8 をレトロウイルスにて強制発現させた細胞株 (iPS/Balb/c JB8) とともに Dnajb8 の発現を認めた。Transfection させた Dnajb8 (Flag tag あり) が発現していることを確認するために、Flag tag を含むプライマーで PCR を行い、両者の差を確認した。

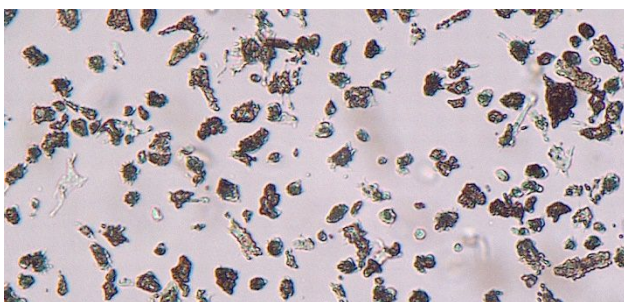


ALP 染色を行い、iPS 細胞の未分化を確認した。



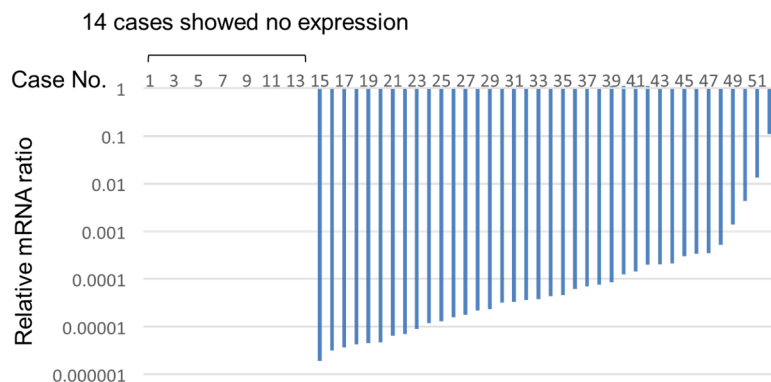
2. 樹状細胞への誘導

樹立した iPS 細胞を樹状細胞へと誘導を試みたが、FACS で CD11c、CD11b、MHC classII、CD80/86 の発現は確認できなかった。



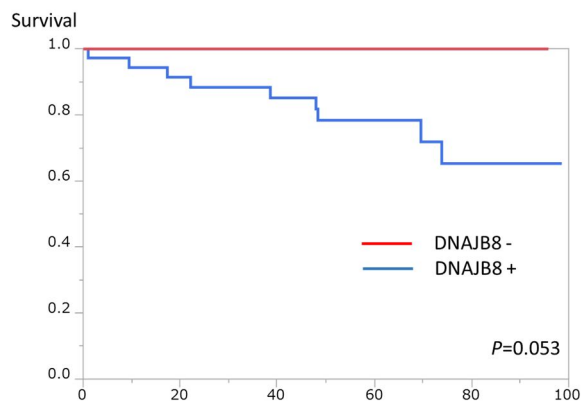
3. 臨床検体を用いた DNAJB8 の臨床的意義の評価

52 例の腎細胞癌患者サンプルを採取し、定量 PCR を行った。14 例で DNAJB8 の発現を全く認めない症例を確認した。



DNAJB8 を発現しない症例からの再発は一例も認めなかった。

DNAJB8の発現の有無による無再発生存曲線



病理組織学的に DNAJB8 の発現の有無で静脈浸潤に有意な差を認めた。

DNAJB8の発現の有無による臨床的評価

N=52		DNAJB8 +	DNAJB8 -	P value
T	1	22	12	0.06
	2	6	1	
	3	9	1	
	4	1	0	
N	0	36	14	1.00
	1,2	2	0	
M	0	35	13	1.00
	1	3	1	
Stage	1	21	12	0.05
	2	5	1	
	3	8	0	
	4	4	1	
Grade	1	4	3	0.09
	2	28	11	
	3	6	0	
INF	a	33	11	0.43
	b	5	2	
	c	0	1	
v	0	24	13	0.04
	1	14	1	
Subtype	Clear cell	34	14	0.56
	Papillary	4	0	
MSKCC risk factor	Favorable	15	8	0.35
	Intermediate	23	6	

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishizawa S, Hirohashi Y, Kusumoto H, Wakamiya T, Iguchi T, Yamashita S, Iba A, Kikkawa K, Kohjimoto Y, Torigoe T, Hara I.	4. 巻 494
2. 論文標題 Identification of antigenic peptides from novel renal cancer stem-like cell antigen, DNAJB8.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical Biophysical Research Communication	6. 最初と最後の頁 693-699
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.10.146.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nishizawa S, Iwahashi I, Miyai H, Ueda Y, Wakamiya T, Iguchi T, Yamashita S, Iba A, Kohjimoto Y, Hara I
2. 発表標題 DNAJB8 expression is associated with recurrence of renal cell carcinoma
3. 学会等名 AUA 2018（国際学会）
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----