

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07273

研究課題名(和文) 難治性子宮頸がんに対するiPS技術を用いた免疫細胞療法の開発

研究課題名(英文) The development of immune cell therapy using iPSC-derived T cells targeting refractory cervical cancers

研究代表者

安藤 純 (ANDO, JUN)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：60348943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：健康人ドナーの末梢血よりヒト・パピローマウイルス特異的細胞傷害性T細胞(HPV-CTL)の誘導に成功した。更に、末梢血由来HPV-CTLからiPS細胞を作製し、このiPS細胞から再びT細胞へ分化誘導してiPS細胞由来HPV-CTLを作製した。このiPS細胞由来HPV-CTLは、*in vitro*では子宮頸がん細胞株に対し持続的で強力な細胞傷害活性を示した。また、免疫不全マウスに子宮頸がん細胞株を腹腔内注射した*in vivo*の系では、iPS細胞由来HPV-CTL治療群は、末梢血由来HPV-CTL治療群に比較して、腫瘍量及び生存率に有意な効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS技術を用いた免疫細胞療法には大きな可能性がある。子宮頸がんの進行期や再発した症例では、根治的手術や放射線治療の適応とならず、根治は望めず予後不良である。そのため新たな治療戦略が求められている。本研究は健康人ドナーの末梢血からT細胞を誘導し、iPS技術を用いて若返りT細胞を作製し*in vitro*と*in vivo*で抗腫瘍効果を証明した。iPS細胞からT細胞へ分化誘導したT細胞は、腫瘍を継続的に根絶し、*in vivo*で若いメモリーT細胞として長期間生存することが出来た。これらの若返ったT細胞は、持続的な腫瘍抑制効果を認め、将来的に子宮頸癌に対する有望な免疫細胞療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We reprogrammed human papilloma virus (HPV)-specific CTLs by Sendai virus vector. The iPSCs efficiently differentiated into HPV-specific rejuvenated CTLs that demonstrated robust cytotoxicity against cervical cancer. The tumor-suppressive effect of rejuvenated CTLs was stronger and more persistent than that of original peripheral blood CTLs. These rejuvenated HPV-specific CTLs provide a sustained tumor-suppressive effect and constitute promising immunotherapy for cervical cancer.

研究分野：免疫細胞療法

キーワード：子宮頸がん 免疫細胞療法 iPS技術 ヒト・パピローマウイルス特異的細胞傷害性T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

子宮頸がん再発例での生存期間の中央値は約1年で、5年生存率は5%以下で極めて予後が悪い。子宮頸がんは、ヒト・パピロームウイルス (HPV) の持続感染により引き起こされ、がん細胞においても HPV の発現が認められている。子宮頸がん細胞中では HPV E6、E7 遺伝子が発現しており、発がんおよびがん形質の維持に重要な役割を果たしている。すなわち E6、E7 遺伝子は発がんにおける責任遺伝子であり、免疫細胞療法の良いターゲットとなる。HPV 陽性の子宮頸がん患者の末梢血から、E6/E7 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を増殖、再活性化できることが報告されているが (Carlos Ramos et al. *J Immunother* 2013)、臨床試験での有効性の報告はまだ少ない。また、E6/E7 DNA で免疫する方法、RNA を用いる方法、E6/E7 を組み込んだアデノウイルスベクターを直接接種する方法やサルモネラ菌のベクターを用いる方法など、数多くの免疫療法の研究は行われているが、いずれも動物実験レベルでの効果は認められているものの、臨床試験での有効性のエビデンスはない。そこで、子宮頸がん患者の末梢血から HPV 特異的細胞傷害性 T 細胞 (HPV-CTL) を誘導し、抗腫瘍効果を検討する。

## 2. 研究の目的

子宮頸がんは、HPV の感染により発症する。子宮頸がんワクチンは、HPV の感染を予防することにより、がん発症の予防に有効であるが、がん発症後の治療には効果はない。また、根治的手術や放射線治療の適応とならない症例は全身化学療法が用いられるが、根治は望めず予後不良である。そのため新たな治療戦略が求められている。そこで、子宮頸がん患者の末梢血から HPV-CTL を誘導し、抗腫瘍効果を検討し、免疫細胞療法の有効性を改善するため、本研究では iPS 技術を用いて機能的に若返り、強力な抗腫瘍効果を持つ T 細胞を作製し、再発・難治性の子宮頸がんに対する免疫細胞療法の基礎的研究を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 末梢血由来 CTL と iPS 細胞由来 CTL の作製と機能解析

ドナー末梢血から末梢血単核球を分離し、ペプチドを使用し、末梢血由来 HPV-CTL の誘導を行う。末梢血由来 HPV-CTL から iPS 細胞を樹立し (T-iPS 細胞)、T-iPS 細胞から再び HPV-CTL を誘導する。作製した末梢血由来 HPV-CTL と iPS 細胞由来 HPV-CTL の機能を比較するため、HPV 抗原に対する抗原特異性をインターフェロン- $\gamma$  ELISpot アッセイを用い評価する。また、子宮頸がん細胞株をターゲットにして、抗腫瘍効果を Cytotoxic Assay (51Cr release assay) を用いて評価する。

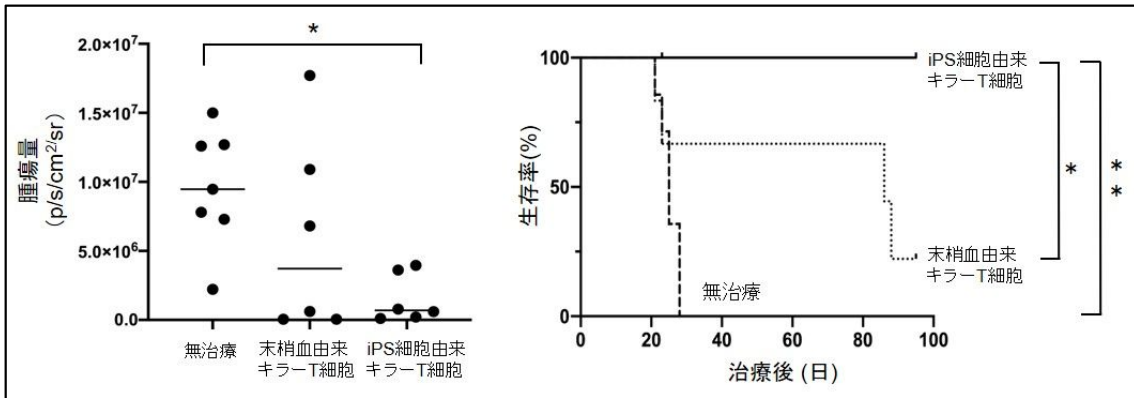
### (2) マウスモデルでの殺細胞効果の比較検討

免疫不全マウスにルシフェラーズで標識した子宮頸がん細胞株を腹腔内に移植し、定期的に腫瘍量をモニターする。腫瘍樹立後にコントロール群 (無治療群) と治療群 (末梢血由来 HPV-CTL と iPS 細胞由来 HPV-CTL の2群) に分け、治療群にはそれぞれの HPV-CTL を腹腔内注射する。その後、腫瘍量を IVIS (In Vivo Imaging System) を用いてモニターし、抗腫瘍効果判定を行う。また、3つのグループ間で生存期間、生存率を比較する。

## 4. 研究成果

### (1) 子宮頸がん患者の末梢血より HPV-CTL の作製を試みたが、抗がん剤や放射線、ステロイドの影響で T 細胞は疲弊により減少していたため、作製できなかった。そこで、健康人ドナーの末梢血より作製を試みたところ、非常に少ない頻度でしか誘導できなかったが、HPV-CTL の誘導に成功した。次に、末梢血由来 HPV-CTL から iPS 細胞の作製を試みた。山中4因子の遺伝子を導入するだけでは末梢血由来 HPV-CTL から iPS 細胞を作製できなかった。従来の方法では、SV40 large T 抗原を同時に遺伝子導入する必要があった。そのため本研究では、SV40 large T 抗原を使用せず他の2つの因子 (LIN28 と NANOG) を追加した。その結果、健康人ドナーの末梢血を使用して、末梢血由来 HPV-CTL から iPS 細胞を作製することに成功した。この6因子を導入した iPS 細胞から再び T 細胞へ分化誘導して iPS 細胞由来 HPV-CTL を作製した。この iPS 細胞由来 HPV-CTL は、子宮頸がん細胞株に対し持続的で強力な細胞傷害活性を示した。

### (2) iPS 細胞由来 HPV-CTL の抗腫瘍効果を調べた。免疫不全マウスに子宮頸がん細胞株を腹腔内注射し、無治療群、末梢血由来 HPV-CTL 治療群もしくは iPS 細胞由来 HPV-CTL 治療群に分けて治療効果を確認した。3週間後の腫瘍の量の測定結果は、iPS 細胞由来 HPV-CTL 治療群で有意な腫瘍抑制効果を認めた。さらに、マウス生存率の比較においても、iPS 細胞由来 HPV-CTL 治療群は、末梢血由来 HPV-CTL 治療群に比較して、有意な生存期間延長効果を認めた【図1】。以上の結果を、引用論文 (Honda T et al. *Mol Ther.* 2020) に報告した。



【図1】末梢血由来キラーT細胞とiPS細胞由来キラーT細胞との比較

< 引用論文 >

Honda T, Ando M, Ando J, Ishii M, Sakiyama Y, Ohara K, Toyota T, Ohtaka M, Masuda A, Terao Y, Nakanishi M, Nakauchi H, Komatsu N: Sustainable tumor suppressive effect of iPSC-derived rejuvenated T cells targeting cervical cancers. *Mol Ther*, 28(11): 2394-2405, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Yasuda H, Tsutsui M, Ando J, Inano T, Noguchi M, Yahata Y, Tanaka M, Tsukune Y, Masuda A, Shirane S, Misawa K, Gotoh A, Sato E, Aritaka N, Sekiguchi Y, Sugimoto K, Komatsu N	4. 巻 110
2. 論文標題 Vitamin B6 Deficiency Is Prevalent in Primary and Secondary Myelofibrosis Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 543-549
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-019-02717-8.	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 Ando M, Ando J, Yamazaki S, Ishii M, Sakiyama Y, Harada S, Honda T, Yamaguchi T, Nojima M, Ohshima K, Nakauchi H, Komatsu N	4. 巻 105
2. 論文標題 Long-term Eradication of Extranodal Natural killer/T-cell Lymphoma, Nasal Type, by Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Epstein-Barr Virus-Specific Rejuvenated T Cells in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Haematologica.	6. 最初と最後の頁 796-807
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2019.223511.	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 Edahiro Yoko, Ando Jun, Suzuki Toshifumi, Fukumura Yuki, Masuda Azuchi, Sakayori Shiori, Takeda Jun, Maruyama Yojiro, Makino Shintaro, Itakura Atsuo, Komatsu Norio	4. 巻 57
2. 論文標題 Multiple Placental Infarcts in a Pregnant Woman with Essential Thrombocythemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 3647 ~ 3650
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.1311-18	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 青田 泰雄、後藤 明彦、奥田 優子、本田 匡宏、渡辺 直紀、安藤 純、小松 則夫	4. 巻 59
2. 論文標題 繰り返し再燃にpomalidomide, carfilzomibが奏効したアミラーゼ産生型多発性骨髄腫	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 865 ~ 871
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.59.865	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 Honda Tadahiro, Ando Miki, Ando Jun, Ishii Midori, Sakiyama Yumi, Ohara Kazuo, Toyota Tokuko, Ohtaka Manami, Masuda Ayako, Terao Yasuhisa, Nakanishi Mahito, Nakauchi Hiromitsu, Komatsu Norio	4. 巻 28
2. 論文標題 Sustainable Tumor-Suppressive Effect of iPSC-Derived Rejuvenated T Cells Targeting Cervical Cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 2394 ~ 2405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2020.07.004	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 Ando Jun, Ngo Minhtran C., Ando Miki, Leen Ann, Rooney Cliona M.	4. 巻 22
2. 論文標題 Identification of protective T-cell antigens for smallpox vaccines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytotherapy	6. 最初と最後の頁 642 ~ 652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcyt.2020.04.098	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13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 本田匡宏、安藤美樹、安藤純、崎山祐未、中内啓光、小松則夫
2. 発表標題 子宮頸がんに対するiPS細胞由来CTL療法の開発
3. 学会等名 第11回血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田早希子、安藤美樹、山口智之、安藤純、中沢洋三、中内啓光、小松則夫
2. 発表標題 難治性EBウイルス関連リンパ腫に対するiPS細胞由来LMP1-CART療法の開発
3. 学会等名 第11回血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井翠、安藤美樹、原田早希子、本田匡宏、末原義之、安藤純、小松則夫、中内啓光
2. 発表標題 Ewing肉腫のネオアンチゲンを標的とするiPS細胞由来細胞傷害性T細胞療法の開発
3. 学会等名 第11回血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadahiro Honda, Miki Ando, Yumi Sakiyama, Midori Ishii, Sakiko Harada, Kazuo Ohara, Jun Ando, Hiromitsu Nakauchi, Norio Komatsu
2. 発表標題 iPSC-derived CTL therapy for cervical cancer by targeting human papillomavirus (HPV)
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Midori Ishii, Miki Ando, Yumi Sakiyama, Sakiko Harada, Tadahiro Honda, Jun Ando, Norio Komatsu, Hiromitsu Nakauchi
2. 発表標題 The neoantigen-specific iPSC-derived rejuvenated CTL therapy for Ewing sarcoma
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakiko Harada, Miki Ando, Jun Ando, Satoshi Yamasaki, Midori Ishii, Tadahiro Honda, Kazuo Ohara, Yumi Sakiyama, Yozo Nakazawa, Malcolm K. Brenner, Hiromitsu Nakauchi, Norio Komatsu
2. 発表標題 Development of iPS cell derived LMP1-CART therapy for refractory EB virus associated lymphomas
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miki Ando, Jun Ando, Midori Ishii, Yumi Sakiyama, Sakiko Harada, Tadahiro Honda, Masako Fujita, Norio Komatsu, and Hiromitsu Nakauchi
2. 発表標題 The Preclinical Study of iPSC-derived CTL Therapy for EBV-associated Lymphoma
3. 学会等名 ISSCR 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田早希子、安藤美樹、山口智之、安藤純、中沢洋三、中内啓光、小松則夫
2. 発表標題 難治性EBウイルス関連リンパ腫に対するiPS細胞由来LMP1-CART療法の開発
3. 学会等名 第10回血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安藤美樹、安藤純、石井翠、原田早希子、本田匡宏、藤田雅子、中内啓光、小松則夫
2. 発表標題 EBウイルス関連リンパ腫に対するiPS細胞由来若返りCTL療法の前臨床試験
3. 学会等名 第10回血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本田匡宏、安藤美樹、崎山祐未、村越勇人、安藤純、滝口雅文、中内啓光、小松則夫
2. 発表標題 The role of CD8 <sup>+</sup> -chain in iPSC-derived rejuvenated CTL therapy
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井翠、安藤美樹、原田早希子、本田匡宏、末原義之、安藤純、小松則夫、中内啓光
2. 発表標題 Ewing 肉腫のネオアンチゲンを標的とする iPS 細胞由来細胞傷害性 T 細胞療法の開発
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishii M, Ando M, Harada S, Ando J, Toyota T, Komatsu N, Nakauchi H
2. 発表標題 Dual-antigen targeted iPSC-derived chimeric antigen receptor-T cell therapy for refractory lymphomas
3. 学会等名 ISSCR 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ando M, Ando J, Ishii M, Ohara K, Toyota T, Matsuoka R, Kitade M, Terao Y, Komatsu N, Nakauchi H
2. 発表標題 Development of iPSC-derived extended CTL therapy for cervical cancer
3. 学会等名 ISSCR 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020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	寺尾 泰久  (TERAO YASUHISA)  (00348997)	順天堂大学・医学部・教授    (32620)	



6. 研究組織（つづき）

	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	安藤 美樹  (ANDO MIKI)  (10424251)	順天堂大学・医学部・准教授    (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関