

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15935

研究課題名(和文) ヒト単球由来iPS細胞を用いた細胞性免疫とPD-L1阻害剤の癌幹細胞治療法開発

研究課題名(英文) Development of therapy for cancer stem cells by cellular immunity using human monocyte-derived iPS cells and PD-L1 inhibitor

研究代表者

平松 範子 (Hiramatsu, Noriko)

藤田医科大学・治験・臨床研究支援センター・技術員

研究者番号：10802209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト単球由来iPS細胞から誘導した樹状細胞に腫瘍細胞のライセートを添加することで、抗原提示能力の指標の一つであるHLA-DR蛋白質を高発現する細胞が増加した。そこに同一人の末梢血リンパ球を共培養すると培養上清中のIFN- $\gamma$ 量が増加した。一方、臨床の非小細胞肺癌患者の生検および手術組織から樹立したPD-L1蛋白質の発現が低い細胞株に、IFN- $\gamma$ を添加することでPD-L1の発現が増加する傾向が観察された。よって、リンパ球のIFN- $\gamma$ 分泌を促すヒト単球由来iPS細胞から誘導した樹状細胞との共存は、肺癌細胞のPD-L1発現を高め、結果としてPD-L1阻害剤の薬効向上につながる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義として、リンパ球のように分化に伴うゲノム情報の不可逆な修飾を受けていない単球由来iPS細胞を用いて、細胞性免疫の観点から免疫チェックポイント阻害剤の薬効と組み合わせることで、癌細胞に対するより強力な細胞傷害効果を発揮できる可能性がある。また、実際に免疫チェックポイント阻害剤が臨床応用されている肺癌において、PD-L1の発現量と癌幹細胞の誘導性や傷害性について検証したことにより、化学療法や放射線治療に耐性を示し、これまで根絶困難であった癌幹細胞に対する効果も期待され、肺癌に対する新規治療法の確立につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Addition of tumor cell lysates to dendritic cells derived from human monocyte-derived iPS cells increased the number of cells expressing high levels of HLA-DR protein, one of the antigen-presenting abilities. By co-culturing peripheral blood lymphocytes of the same person there, the amount of IFN- $\gamma$  in the culture supernatant increased. On the other hand, it was observed that the expression of PD-L1 tends to increase by adding IFN- $\gamma$  to cell lines with low expression of PD-L1 protein established from biopsy and surgical tissues of clinical non-small cell lung cancer patients. Therefore, it is suggested that coexistence with dendritic cells derived from human monocyte-derived iPS cells, which promote IFN- $\gamma$  secretion by lymphocytes, may increase PD-L1 expression in lung cancer cells and consequently improve the pharmacological response of PD-L1 inhibitors.

研究分野：細胞生物学関連

キーワード：単球 iPS細胞 樹状細胞 マクロファージ リンパ球 肺癌 PD-L1 IFN-

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

進行した肺癌の治療は、薬物療法が中心に実施されるが、近年、細胞傷害性抗癌剤や分子標的薬に加えて、患者自身の体に備わっている免疫機能を高めることで癌細胞を排除する免疫チェックポイント阻害剤に期待が高まっている。この免疫チェックポイント阻害剤の代表例として、細胞傷害性 T 細胞の膜表面に発現する Programmed cell death 1 (PD-1) と癌細胞の膜表面に発現する PD-1 ligand (PD-L1) が結合して、免疫抑制シグナルが発生することで T 細胞の癌細胞傷害機能が低下する免疫逃避機構をブロックするために、抗 PD-1 抗体、または抗 PD-L1 抗体を用いた阻害剤などが挙げられる。PD-1 阻害剤として、すでにニボルマブやペムブロリズマブが保険適応されており、PD-L1 阻害剤としてはアテゾリズマブが 2017 年 2 月より適応申請されている。しかし、免疫チェックポイント阻害剤は薬剤自体が癌細胞を傷害するものではなく、効果は癌細胞の PD-L1 の発現量や患者の免疫機能などに依存することが考えられるため、癌の病期、組織分類や病態によって治療効果に差が出てしまうことがある。

多能性幹細胞は自己複製能と多分化能を併せ持つ未分化な細胞であり、近年、人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem cell : iPS 細胞) を用いた再生医療に関するさまざまな研究が行われている。一方、同じ幹細胞でも癌細胞に含まれる「癌幹細胞」の存在が 1997 年に報告され (Bonnet D, et al, *Nat. Med.*, 1997) 抗癌剤に対する抵抗性、癌治療後の再発や転移に深く関与していると考えられている。例えば胆道癌において、PD-L1 低発現癌細胞が癌幹細胞の特徴を備えており、予後は悪いことが報告されている (Keiichi T, et al, *Cancer Sci.*, 2014)。

平松は、研究協力者である藤田医科大学の磯谷・山本とともに、独自で作出した単球由来 iPS 細胞を用いて制御性 T 細胞 (regulatory T Cell : Treg) を分化誘導し、抗原特異的に喘息の病態を制御できるような新規免疫細胞療法の確立を目指した基礎研究を実施してきた。一方で、Treg は抗原特異性を有しないまま過剰反応すると、癌免疫機構など不可欠な免疫応答まで抑制する。実際に、癌細胞の免疫逃避機構として、T 細胞に発現する PD-1 と癌細胞に発現する PD-L1 の結合が Treg の過剰反応を引き起こすことで病態の予後不良につながるため、この機構を防ぐために開発されたのが免疫チェックポイント阻害剤である。そこで、本研究では、免疫感作を受けおらずリンパ球のように分化に伴うゲノム情報の不可逆な修飾を受けていない単球由来 iPS 細胞を用いて、細胞性免疫の観点から免疫チェックポイント阻害剤の薬効と組み合わせることで、癌細胞に対するより強力な細胞傷害効果を発揮できるのではないかという着想を得た。また、実際に免疫チェックポイント阻害剤が臨床応用されている肺癌において、PD-L1 の発現量と癌幹細胞の誘導性や傷害性について検証することにより、化学療法や放射線治療に耐性を示す肺癌に対する新規治療法の確立につながる可能性も考え、本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、肺癌細胞に対して、免疫チェックポイント阻害剤 (PD-L1 阻害剤) と独自で作出したヒト単球由来 iPS 細胞から分化誘導した免疫細胞を用いて、PD-L1 阻害剤をランダムクとして、細胞傷害効果を増強し、抗癌剤の効果が低いとされる「癌幹細胞」に対する新規治療法を探索することである。

### 3. 研究の方法

先述の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究では、当研究室で考案した方法にて作製したヒト単球由来 iPS 細胞を基点細胞とし、樹状細胞 (dendritic cell : DC) など抗原提示細胞に分化誘導を行い、リンパ球との共培養実験や PD-L1 阻害剤 (抗 PD-L1 抗体) や癌幹細胞マーカーを発現する PD-L1 の低発現の臨床分離肺癌細胞を用いた基礎検討をとおして、抗癌剤治療が困難とされる癌幹細胞に対する新規治療法の探索を行った。研究期間において、具体的に以下の項目について検討した。

(1) ヒト単球由来 iPS 細胞から DC など抗原提示細胞への分化誘導法の検証と末梢血リンパ球を用いた共培養実験

研究室で考案した方法にて、末梢血ヒト単球をシャーレの中で活性を維持したまま前培養し、市販のエピゾーマルベクターを導入して、複数人のヒト末梢血単球由来 iPS 細胞を作製した。次に、安定した培養法を確立しているヒト単球由来 iPS 細胞を用いて、BMP4、SCF、Flt-3、GM-CSF、M-CSF、IL-4、TNF- $\alpha$ 、LPS などの添加因子を用いた既報論文 (Masakatsu D, et al, *Plos One.*, 2013) を改良した 5 段階の分化誘導プロトコルにて、単球および DC への分化誘導を実施した。分化誘導した DC に対して、抗原として 100 ng/mL のダニ虫体抽出物および腫瘍細胞のライセートを添加する実験を行い、フローサイトメトリーを用いた発現解析を実施した。なお、追加実験として、単球由来 iPS 細胞から別の抗原提示細胞としてマクロファージを誘導するプロトコルも検証した。

さらに、抗原を添加した iPS 細胞由来 DC およびマクロファージと同一人の末梢血リンパ球を共培養して、ELISA 法にて培養上清中の IFN- $\gamma$  量を測定し、リンパ球の活性を検証した。

(2) *in vitro* における PD-L1 発現/低発現の肺癌細胞をターゲットとした「癌幹細胞」に対する新規治療法探索に向けた基礎検討

市販されている複数の肺癌細胞株の中から PD-L1 蛋白質を安定的に発現している A549 細胞

株を選出し、PD-L1 に対する siRNA の導入を行い、PD-L1 および癌幹細胞マーカーについてフローサイトメトリーを用いた発現解析を実施した。

さらに、実際に複数の非小細胞肺癌患者から採取した臨床の生検組織および手術臓器を初代培養して肺癌細胞株の確立と解析を実施した（本学倫理審査委員会承認済み）。具体的には、フローサイトメトリーや免疫染色による蛋白解析を実施し、PD-L1 および癌幹細胞マーカーの発現を確認した。特に増殖能が高く、PD-L1 の発現が低く癌幹細胞マーカーを発現する細胞株を選出して、培養液中に IFN- $\gamma$  を添加し、細胞免疫染色にて PD-L1 の発現を確認した。

#### 4. 研究成果

当研究室で考案した方法にてヒト単球由来 iPS 細胞を作製して、単球および DC を分化誘導できる最適なプロトコルを検討し、複数人の血液検体から単球を分離し、安定的に iPS 細胞へのリプログラミング、単球、DC への分化誘導に成功した (Isogai S, et al, *Cell Reprogram.*, 2018) (図 1)。分化誘導した DC は樹状突起を伸ばし (図 2) CD209、CD83、抗原提示能力の重要な指標の 1 つである MHC クラス II 分子である HLA-DR 蛋白質を発現し、抗原として複数のアレルゲンや腫瘍細胞のライセートの添加により HLA-DR を高発現する細胞が増加した (Hiramatsu N, et al, *Med Mol Morphol.*, 2020) (図 3)。分化誘導実験については、培養液や成長因子、阻害剤などの添加量を調整することで、より効率的に誘導できるプロトコルを検証した。樹状細胞への分化誘導については、成長因子の濃度や培地交換日を調整することで、抗原提示能力の指標の 1 つである HLA-DR 蛋白質を発現する細胞を安定的に誘導することができた。

なお、分化誘導実験を実施する過程で、ディフ・クイック染色標本を観察したところ、突起を伸ばす樹状様細胞に加えて細胞質内に多数の空胞を有するマクロファージ様の細胞が多くみられた。そこで、リンパ球へ腫瘍抗原情報を伝達する手段として、樹状細胞に加えてマクロファージを用いる方法も考慮し、iPS 細胞からマクロファージを誘導するプロトコルを検証し、CD11c、CD169 (Siglec1) 蛋白質を発現するマクロファージ様細胞を分化誘導することに成功した。

図1 培養ヒト単球 (左) およびヒト単球由来iPS細胞 (右)

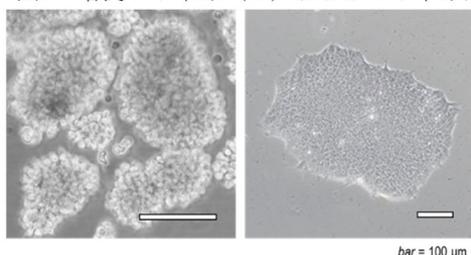


図2 ヒト単球由来iPS細胞から分化誘導した単球 (左) およびDC (右)

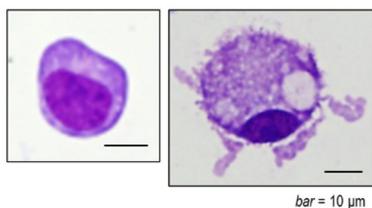
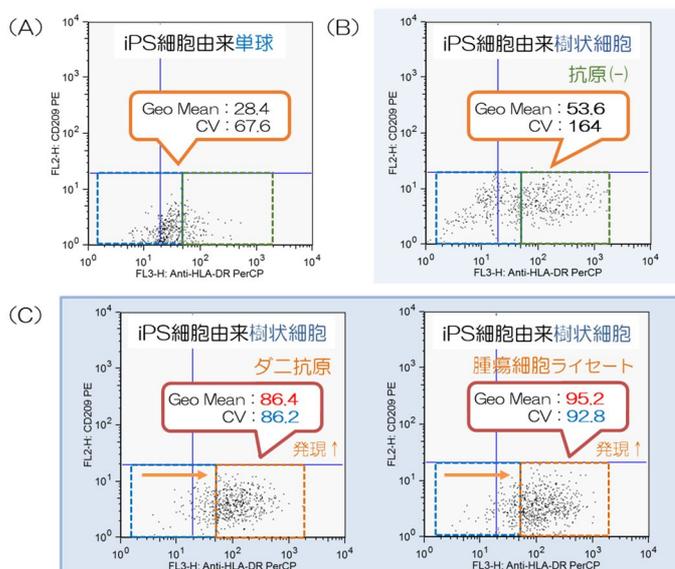


図3 ヒト単球由来iPS細胞から分化誘導した単球およびDCのHLA-DR蛋白質発現解析



(A) iPS細胞から分化誘導した単球

(B) iPS細胞から分化誘導したDC

(C) iPS細胞から分化誘導したDCにダニ抗原 (左) および腫瘍細胞ライセート (右) を添加した

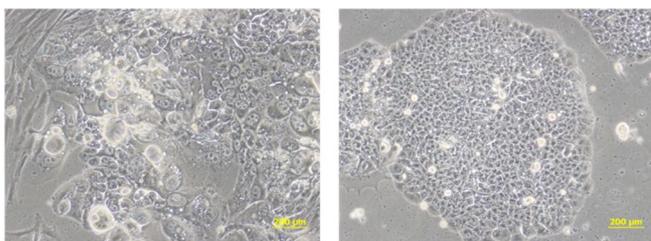
また、単球由来 iPS 細胞からリンパ球への分化誘導については、フィーダーフリーでの誘導方法を検証し、CD45、CD4 蛋白質を発現する細胞を誘導することができたが、細胞傷害性 T 細胞

胞への誘導方法は今後さらなる検討が必要であったため、本研究では末梢血リンパ球を実験に使用した。抗原を添加した iPS 細胞由来 DC およびマクロファージと同一人の末梢血リンパ球を共培養したところ、培養上清中の IFN- $\gamma$  量が増加したことから、抗原提示細胞である iPS 由来 DC の存在によりリンパ球を活性化させることができた。

一方、市販されている複数の肺癌細胞株の中から PD-L1 蛋白質を安定的に発現している A549 細胞株を選出し、PD-L1 に対する siRNA の導入を行い、PD-L1 の発現低下と癌幹細胞マーカーである CD133 や CD44 の発現変動を確認した。なお、A549 細胞株を抗 PD-L1 抗体を添加した培地で培養し、洗浄後に別の動物種の抗体にて PD-L1 の発現を確認したところ、発現が低下していた。

さらに、複数の臨床肺癌細胞株を用いて、iPS 細胞由来免疫細胞を用いた細胞傷害効果と PD-L1 や CD44、CD133 など癌幹細胞マーカー蛋白質発現との関係性を検証するために、2019 年度より、実際に非小細胞肺癌患者から採取した生検組織および手術臓器を初代培養して肺癌細胞株の確立と解析を実施している（本学倫理審査委員会承認済み）（図 4）。20 例以上の肺癌細胞株を樹立し、PD-L1 蛋白質の発現などに個人差があることを確認した。

図4 臨床の非小細胞肺癌組織から樹立した細胞株



特に増殖能が高い細胞株については、フローサイトメトリーや免疫染色による蛋白解析を実施し、EpCAM、TROP2 や癌幹細胞マーカーの1つである CD44 の高発現を確認した（図 5）。これらの肺癌細胞において PD-L1 蛋白質の発現は低かったが、IFN- $\gamma$  を添加することにより PD-L1 の発現が増加する傾向が確認された（図 6）。

図5 臨床分離肺癌細胞株のフローサイトメトリー解析結果

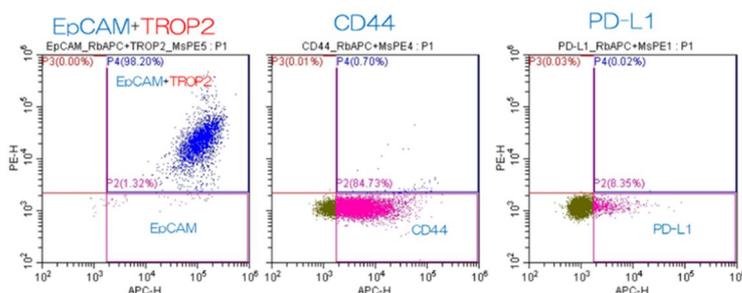
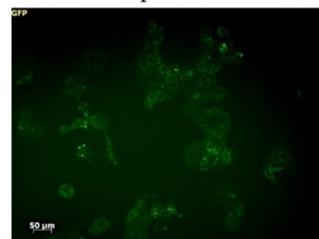


図6 IFN- $\gamma$ 添加後の臨床分離肺癌細胞



以上の研究成果から、リンパ球の IFN- $\gamma$  分泌を促すことが確認されたヒト単球由来 iPS 細胞から誘導した抗原提示細胞（2018 年度報告）との共存や、サイトカイン療法との併用は、肺癌細胞における PD-L1 の発現を高めることも想定され、免疫チェックポイント阻害剤の1つである PD-L1 阻害剤の薬効向上につながる可能性が示唆された。現在、本研究成果を含む内容の特許出願の準備を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Hiramatsu N, Yamamoto N, Isogai S, Onouchi T, Hirayama M, Maeda S, Ina T, Kondo M, Imaizumi K.  | 4. 巻<br>53(2)       |
| 2. 論文標題<br>An analysis of monocytes and dendritic cells differentiated from human peripheral blood monocyte-derived induced pluripotent stem cells. | 5. 発行年<br>2020年     |
| 3. 雑誌名<br>Medical Molecular Morphology  | 6. 最初と最後の頁<br>63-72 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s00795-019-00231-8   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>山本直樹, 磯谷澄都, 平松範子, 井上敬浩, 近藤征史, 今泉和良 | 4. 巻<br>39          |
| 2. 論文標題<br>末梢血単球由来iPS細胞の作出と難治性喘息への臨床応用にむけて   | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>アレルギーの臨床                           | 6. 最初と最後の頁<br>47-48 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし                | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Isogai S, Yamamoto N, Hiramatsu N, Goto Y, Hayashi M, Kondo M, Imaizumi K.             | 4. 巻<br>20            |
| 2. 論文標題<br>Preparation of induced pluripotent stem cells using human peripheral blood monocytes. | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Cellular Reprogramming   | 6. 最初と最後の頁<br>347-355 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1089/cell.2018.0024  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>平松 範子, 山本 直樹, 磯谷 澄都, 近藤 征史, 今泉 和良                         | 4. 巻<br>42          |
| 2. 論文標題<br>ヒト末梢血由来単球を用いた新規iPS細胞の作出 -免疫制御系細胞を用いたトランスレーショナルリサーチをめざして- | 5. 発行年<br>2018年     |
| 3. 雑誌名<br>藤田学園医学会誌  | 6. 最初と最後の頁<br>25-30 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし                                       | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>平松範子                                     |
| 2. 発表標題<br>iPS細胞を用いたDiscovery                       |
| 3. 学会等名<br>第60回日本白内障学会総会・第47回水晶体研究会合同学会（招待講演）（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2021年                                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>平松範子                               |
| 2. 発表標題<br>バイオリソース・臨床情報の利活用促進を目指したプラットフォームの構築 |
| 3. 学会等名<br>第7回学内研究シーズ・ニーズ発表交流会（藤田医科大学）        |
| 4. 発表年<br>2021年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>磯谷 澄都, 山本 直樹, 平松 範子, 井上 敬浩, 丹羽 義和, 後藤 康洋, 林 正道, 近藤 征史, 今泉 和良 |
| 2. 発表標題<br>ヒト末梢血単球由来iPS細胞の分化誘導に関する検討                                    |
| 3. 学会等名<br>第59回日本呼吸器学会学術講演会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>磯谷澄都, 山本直樹, 平松範子, 森川紗也子, 峯澤智之, 榊原洋介, 岡村拓哉, 魚津桜子, 三重野ゆうき, 後藤康洋, 林正道, 近藤征史, 今泉和良 |
| 2. 発表標題<br>ヒト末梢血単球由来iPS細胞の分化誘導に関する検討  |
| 3. 学会等名<br>第50回藤田学園医学会  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>平松範子, 山本直樹, 磯谷澄都, 近藤征史, 今泉和良    |
| 2. 発表標題<br>ヒト末梢血単球由来iPS細胞から分化誘導した樹状細胞の機能解析 |
| 3. 学会等名<br>第50回日本臨床分子形態学会総会・学術集会           |
| 4. 発表年<br>2018年                            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>平松範子, 山本直樹, 磯谷澄都, 近藤征史, 今泉和良                |
| 2. 発表標題<br>アレルギー研究領域における新しいツールとしてのヒト末梢血単球由来iPS細胞株作製の試み |
| 3. 学会等名<br>日本組織培養学会第91回大会                              |
| 4. 発表年<br>2018年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|  |
|--|
| <p>藤田医科大学バイオリソース室<br/> <a href="https://www.fujita-hu.ac.jp/~biobank/Fujita_Biobank_HP/index.html">https://www.fujita-hu.ac.jp/~biobank/Fujita_Biobank_HP/index.html</a><br/>         現在、本研究成果を含む内容の特許出願の準備を行っている。</p> |
|--|

| 6. 研究組織 |                               |                       |    |
|---------|-------------------------------|-----------------------|----|
|         | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
| 研究協力者   | 山本 直樹<br><br>(Yamamoto Naoki) | 藤田医科大学                |    |

6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|-----------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 磯谷 澄都<br><br>(Isogai Sumito)      | 藤田医科大学                |    |
| 研究協力者 | 近藤 征史<br><br>(Kondo Masashi)      | 藤田医科大学                |    |
| 研究協力者 | 今泉 和良<br><br>(Imaizumi Kazuyoshi) | 藤田医科大学                |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |