

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08965

研究課題名(和文) 腸内細菌叢を制御した新規iPS細胞由来樹状細胞ワクチン療法の開発

研究課題名(英文) Development of new iPS cell-derived dendritic cell vaccine therapy that regulates gut microbiota

研究代表者

中村 公紀(Nakamura, Masaki)

和歌山県立医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80364090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌叢は、癌免疫療法に対する奏効と耐性のメカニズムの調節において重要な役割を果たしている。腸内細菌叢と宿主反応の関連を検討した結果、大腸癌に関連する腸内細菌として、Fusobacteria phylum, Firmicutes phylumの存在が示唆された。さらに、本研究において担癌患者iPS細胞から樹状細胞(DCs)の分化誘導を行い、このiPS細胞由来DCs(iPSDCs)に同患者の腫瘍由来RNAを導入しin vitroにおいてその抗腫瘍効果を検討した。結果、腫瘍由来RNAを導入したiPSDCsにより誘導された細胞傷害性T細胞は、高い腫瘍特異的細胞傷害活性を誘導することを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌免疫療法において、細胞傷害性T細胞活性の誘導を飛躍的に高める必要がある。そのためには、我々が行ってきたiPS細胞由来樹状細胞ワクチン療法にさらなる工夫が必要であった。本研究により、iPS由来樹状細胞の特性を活かした、より強力で臨床的な癌免疫ワクチン療法の進歩を促進できると考える。本法を新しい癌免疫療法の臨床研究として立ち上げることに極めて重要な根拠となり、将来の胃癌・大腸癌などの固形癌を標的にした臨床研究へのステップとして、極めて意義深いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To enhance immunogenicity in the dendritic cell (DC) vaccine, we transfected patient-derived iPSDCs with in vitro transcriptional RNA (ivtRNA), which was obtained from tumors of three patients with colorectal cancer. We investigated iPSDCs-ivtRNA which were induced by transfecting ivtRNA obtained from tumors of three colorectal cancer patients, and examined its antitumor effect. Moreover, we analyzed neoantigens expressed in colorectal cancer cells and examined whether iPSDCs-ivtRNA induced cytotoxic T lymphocytes (CTLs) against the predicted neoantigens. CTLs activated by iPSDCs-ivtRNA exhibited cytotoxic activity against the tumor spheroids in all three patients with colorectal cancer. IFN- γ ELISPOT assay revealed that the CTLs induced by iPSDCs-ivtRNA responded to one of the candidate neoantigens. In vitro CTLs obtained by transfecting tumor-derived RNA into iPSDCs derived from three patients with colorectal cancer showed potent tumor-specific killing effect.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：樹状細胞 iPS細胞 癌免疫療法 腸内細菌叢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢は、癌免疫療法に対する奏効と耐性のメカニズムの調節において重要な役割を果たしており、腸内細菌叢に起因する免疫系の変化を活用し、癌に対する免疫応答を増強させる可能性がある。また、腸内細菌叢による免疫チェックポイント阻害による抗腫瘍効果が高まることが報告されている。我々は、以前より癌に対する免疫ワクチン療法として、樹状細胞(dendritic cells; DCs)から誘導した細胞傷害性 T 細胞(cytotoxic T lymphocytes; CTLs)による抗腫瘍効果の有用性を報告し、さらに iPS (induced pluripotent stem cell)細胞から大量の DCs を誘導することにも成功した。しかし、このような癌免疫療法でも、癌を消滅させる程の強力な免疫誘導は困難であり、さらなる効果的な癌免疫治療の開発が必要である。そこで、本研究は、腸内細菌叢を調整し抗腫瘍免疫能を増強し、効率的で強力な iPS 細胞由来 DCs (iPSDCs)を用いた癌免疫療法を構築し、より臨床的な癌免疫ワクチン療法を確立することを目的にした。

2. 研究の目的

当初、抗腫瘍免疫を増強させるために腸内細菌叢の調整を試みたが、その作製、調整に難渋したため、研究計画を一部変更し、まず、腸内細菌叢と宿主反応の関連を検討した。次世代シーケンサーを用いて、網羅的に解析することにより、大腸癌(colorectal cancer; CRC)および炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease; IBD)の臨床病理学的因子との関連について明らかにすることにした。また、iPSDCs ワクチンの抗腫瘍効果をより強力なものとするべく、担癌患者 iPS 細胞から iPSDCs の分化誘導を行い、これに同患者の腫瘍由来 RNA を導入し、*in vitro*においてその抗腫瘍効果を検討した。また、この腫瘍由来 RNA を導入した iPSDCs により誘導された CTLs が、neoantigen に対し免疫応答可能かどうかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 腸内細菌叢研究

実験 1. 検体採取

- ①手術症例の場合は、病変を含む腸管を摘出後、摘出標本の腸管洗浄液を採取
内視鏡検査症例の場合は、病変部(癌部/炎症部)の腸管洗浄液を採取
遠心し、沈渣を採取後、直ちに-80 に凍結
AllPrep Power Fecal DNA/RNA Kit にて凍結沈査より DNA/RNA を採取

実験 2. 解析

- ①16S rRNA 遺伝子(V3-V4)配列の解析を実施
腸内細菌叢の群像構造プロファイルの取得
PICRUSt を用いた予測メタゲノム解析

(2) iPS 細胞由来樹状細胞研究

実験 1. 担癌患者 iPSDCs の分化誘導

3 名の大腸癌患者ドナーの末梢血単核細胞 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)へ、センダイウイルスベクター (ID Pharma)にて山中 4 因子を遺伝子導入し、iPS 細胞の樹立を行った。得られた iPS 細胞を Matrigel コートした dish でフィーダーレス培養を行い、その後 5 ステップ法で iPSDCs へ分化誘導を行った。第 1 に bone morphogenetic protein (BMP)4 を添加し 4 日間培養した。第 2 に vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (b-FGF), stem cell factor (SCF) を添加した StemPro-34 (Thermo Fisher Scientific)に置き換え 2 日間培養した。第 3 に SCF, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), thrombopoietin (TPO), Fms-related tyrosine kinase (Flt) -3 ligand, interleukin (IL) -3 を添加した StemPro-34 に変更し、7 日間培養した。第 4 に M-CSF, Flt-3 ligand, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) を添加した StemPro-34 に変更し、3 日間培養した。浮遊してくる細胞を CD14 抗体で標識し、auto MACS Pro (Miltenyi)にて分離した。第 5 に回収した細胞を GM-CSF, IL-4 を加え 5 日間培養し、その後 maturation cocktail として prostaglandin E2 (PGE2), IL-1, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- を添加し 2 日間培養後に浮遊細胞を回収した。

実験 2. 担癌患者由来癌スフェロイド Cancer tissue-originated spheroids (CTOS)の樹立

3 名の大腸癌患者ドナーより CTOS 法にて、癌スフェロイドを樹立した。ドナーより摘出した癌組織を細断したのちに、Liberase DH solution (Roche Diagnostics)を加え 2 時間溶解分離した。この溶解過程で single cell とならず細胞間接着を維持したままの細胞塊を 100 μm および 40 μm の cell strainer を用いて回収し、培養することで癌スフェロイドの樹立を行った。

実験 3. 腫瘍 RNA の *in vitro*における増幅と評価

3 名の大腸癌患者ドナーから樹立した CTOS より RNeasy plus micro kit (Qiagen)を用いて、total RNA を抽出した。oligo-dT primer [5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30)VN-3'] および T7 strand switch primer [5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCGGG-3']を加え、SuperScript II reverse

transcriptase (Thermo Fisher Scientific)を用いた逆転写反応にて cDNA を作成した。この cDNA を PCR で増幅した。増幅した cDNA を T7 mMESSAGE mMACHINE Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いることで、in vitro 転写し、in vitro transcriptional RNA (ivtRNA)を作成した。ivtRNA は変性アガロースゲル電気泳動と、2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)を用いて品質の確認を行った。

実験 4. エレクトロポレーション法を用いた iPSCs への ivtRNA 導入効率の検討

導入効率の検討に先立ち、green fluorescent protein (GFP)の ivtRNA を作成した。エレクトロポレーションは Gene Pulser Xcell (Bio-Rad)を用いて、square-wave pulse, 500 V, 0.5 ms の条件にて実施した。GFP ivtRNA を 20 µg/mL から 160 µg/mL までの各濃度で iPSCs へエレクトロポレーションした際の GFP タンパクの発現率を flow cytometry にて検討した。

実験 5. 腫瘍 RNA 導入 iPSCs による in vitro における細胞障害活性誘導能の検討

回収した成熟 iPSCs へ腫瘍由来 ivtRNA をエレクトロポレーションし iPSCs-CTOS ivtRNA を得た。Responder をドナー患者の PBMCs, stimulator を腫瘍由来 ivtRNA 導入 iPSCs とし、20:1 の割合で 1 週毎に 3 回刺激した。得られた細胞から auto MACS Pro にて CD8(+) CTLs を抽出した。ターゲット細胞として、CTOS を用い、⁵¹Cr-release assay にて特異的細胞傷害活性を解析した。また、3 名の大腸癌患者ドナーのうち 1 名から樹立した CTOS には高い CEA 発現を認めため、CTOS ivtRNA を導入した iPSCs (multiple antigen をターゲットとするワクチン)と CEA のみ発現する CEA ivtRNA を導入した iPSCs (single antigen をターゲットとするワクチン)を作成し、どちらが高い細胞障害活性が誘導されるかを検討した。

実験 6. 腫瘍 RNA 導入 iPSCs による in vitro における neoantigen をターゲットとした CTLs 誘導能の検討

腫瘍 (CTOS) および正常組織 (PBMCs) を次世代シーケンサーにより whole exome 解析し、腫瘍特異的な遺伝子変異を同定した。遺伝子変異により発生しうる変異ペプチドを *in silico* にて予測した。これらの予測された変異ペプチドの中から、HLA 分子との親和性が高く、RNA シーケンスにより発現量が多いと予測されたペプチドを選出し合成を行った。選出した変異ペプチドに対して、ELISpot assay を用いたバリデーションスタディを実施した。ELISpot assay では腫瘍由来の RNA を導入した iPSCs (iPSCs-CTOS ivtRNA) により誘導された CTLs が、変異ペプチドに対して免疫応答するかを検証した。また、選出した変異ペプチドを iPSCs に直接パルスすることで iPSCs-neoantigen peptide を作成し、これにより誘導した CTLs が変異ペプチドに対し免疫応答するかについても検討した。

4. 研究成果

(1) 腸内細菌叢研究

16S rRNA 解析による腸内細菌叢解析を実施した結果、大腸癌(n=110)に関連する腸内細菌として、Fusobacteria phylum、Firmicutes phylum、IBD(n=7)に関連する腸内細菌として、Proteobacteria phylum の存在が示唆された(図1)。

(2) iPS 細胞由来樹状細胞研究

実験 1. 担癌患者 iPSCs の分化誘導

3 名の大腸癌ドナーの PBMCs からいずれも iPS 細胞の樹立が可能であり、分化開始後 23 日目まで成熟した iPSCs が分化誘導された。第 1 ステップでは、平坦で粗なコロニーとなり、第 2 ステップでは血管内皮様の紡錘形の細胞集塊を形成した。第 3 ステップの後半になると、ドーム状の CD45 陽性細胞からなる細胞集塊を認め、第 4 ステップでは単球様の小円形の浮遊細胞を多数認めた。これらのほとんどは CD14 陽性細胞であった。第 5 ステップでは、樹状突起を持つ淡明な細胞が現れ、成熟化によりその数も多くなった。形態を BMDCs と比較すると樹状突起の数や長さ、細胞サイズは類似するものであった(図 2)。

実験 2. 患者由来癌スフェロイド Cancer tissue-originated spheroids (CTOS) の樹立

3 名の大腸癌ドナーの癌組織からいずれも CTOS の樹立が可能であった。腫瘍細胞マーカーである EpCAM の高い発現を確認した。また CD45 の発現は認めなかった。3 名のドナーのうち 1 名において CEA の高い発現を認めた(図 3)。

実験 3. 腫瘍 RNA の in vitro における増幅と評価

腫瘍(CTOS)より RNA を抽出し、増幅することにより、iPSCs へ導入するための十分な量の ivtRNA が得られた。ivtRNA は変性アガロースゲル電気泳動にてスミア状に分布した。また 2100 Bioanalyzer による検討では、正規分布の形を示した(図 4)。

実験 4. エレクトロポレーション法を用いた iPSCs への ivtRNA 導入効率の検討

GFP タンパクをコードした ivtRNA を iPSCs へエレクトロポレーションし flow cytometry にて発現率を検討し、GFP の発現率は、エレクトロポレーション時に加えた GFP ivtRNA の容量依存的に増加し、80 µg/mL 以上での発現率は 90%程度で一定となった。この結果より以降の ivtRNA の投与量を 80 µg/mL とした(図 5)。

実験 5. 腫瘍 RNA 導入 iPSCs による in vitro における細胞傷害活性誘導能の検討

3名の担癌患者ドナーから腫瘍 RNA 導入 iPSCs (iPSCs-CTOS ivtRNA) を作成した。いずれのドナーにおいても iPSCs-CTOS ivtRNA での刺激により誘導された CTLs は自己仮想ターゲットである CTOS に対し、細胞傷害活性をみとめたが、コントロールである iPSCs-GFP ivtRNA により誘導された CTLs は細胞傷害活性を認めなかった。CTOS に CEA の発現を認めた Case 1 においては、single antigen (この場合 CEA) をターゲットとした iPSCs-CEA ivtRNA により誘導された CTLs にも細胞傷害活性を認めた。しかし、multiple antigen をターゲットとした iPSCs-CTOS ivtRNA による細胞傷害活性よりも低かった(図 6)。

実験 6. 腫瘍 RNA 導入 iPSCs による in vitro における neoantigen をターゲットとした CTLs 誘導能の検討

In vitro による neoantigen 解析を実施し 12 個の候補変異タンパクを選出した。ELISpot assay において、腫瘍由来 ivtRNA を導入した iPSCs-CTOS ivtRNA は、遺伝子変異の結果生じると予測された変異ペプチドの1つである No.9 neoantigen (STTA p.Arg300Gln QQFEVLFQSV) に対し免疫応答を示した(図 7)。予測ペプチドを iPSCs にパルスすることで作成した iPSCs- neoantigen peptide により誘導した CTLs では、2つの予測ペプチドに対して免疫応答し、うち1つは上記 No.9 neoantigen と同じペプチドであった(図 7)。

< 総括 >

今回のわれわれの研究により、腫瘍由来 RNA を導入した iPSCs により誘導された CTLs は、高い腫瘍特異的細胞傷害活性を誘導することが証明された。さらに、腫瘍由来 RNA を導入した iPSCs により誘導された CTLs は、neoantigen に対する免疫応答が可能であることが示唆された。

iPS 細胞は、癌免疫治療の分野において有用な tool であると考ええる。iPSCs ががんワクチン療法の臨床応用を目指し、さらに強力で効果的な癌免疫療法の開発を進めていく予定である。

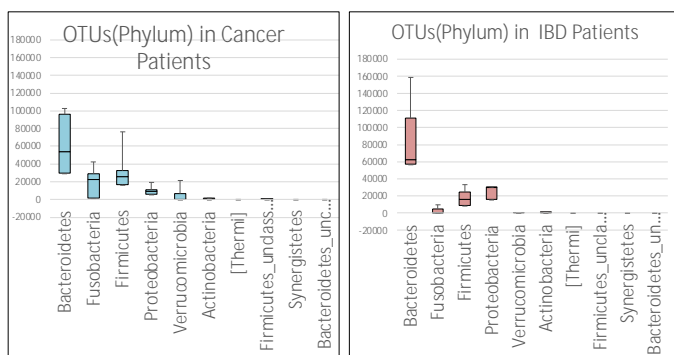


図 1. Proteobacteria phylum CRC < IBD、Fusobacteria phylum/Firmicutes phylum CRC > IBD

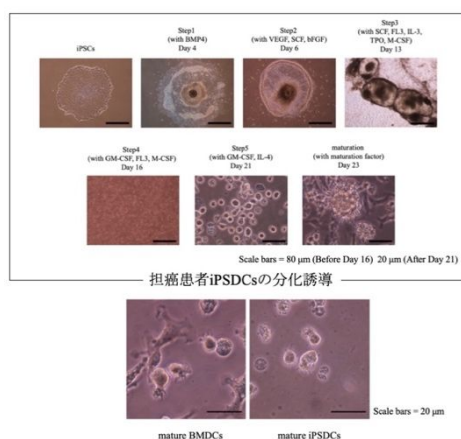


図 2.

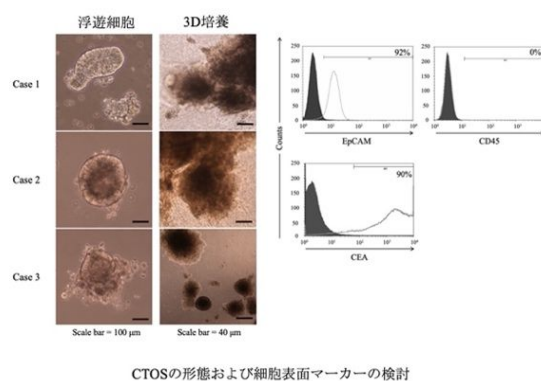


図 3.

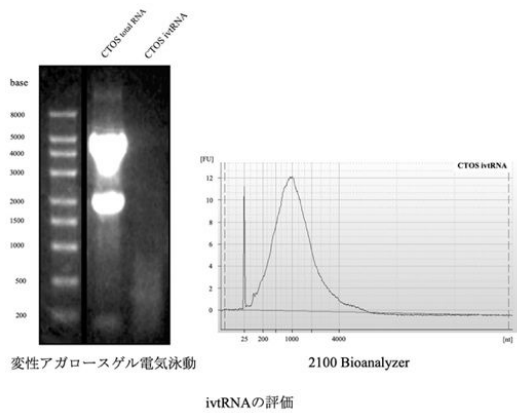


図 4.

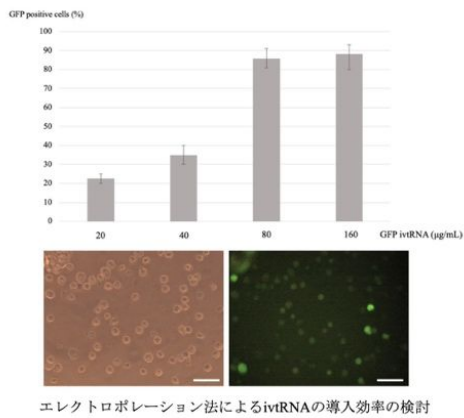


図 5.

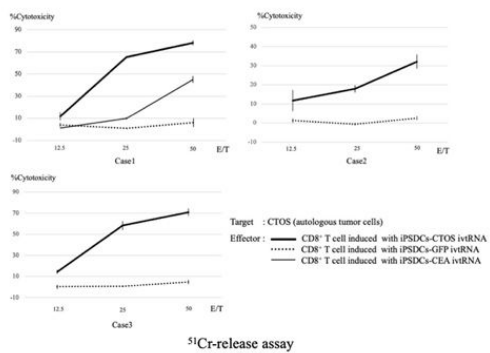


図 6.

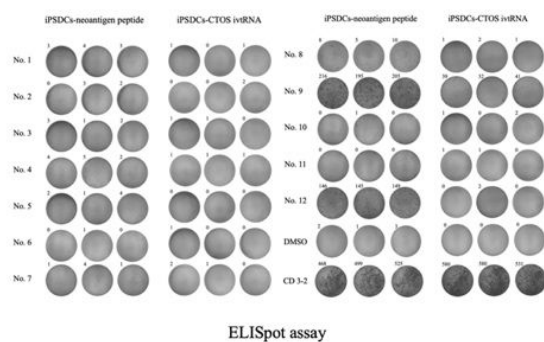


図 7.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北谷純也、尾島敏康、岩本博光、丸岡慎平、富永信太、中村公紀、勝田将裕、宮澤基樹、山上裕機
2. 発表標題 消化器癌を標的としたiPS細胞由来樹状細胞療法の基礎研究
3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北谷純也、尾島敏康、岩本博光、丸岡慎平、富永信太、宮澤基樹、勝田将裕、中村公紀、山上裕機
2. 発表標題 消化器固形癌を対象としたiPS細胞由来樹状細胞療法の基礎研究
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 勝田将裕、宮澤基樹、中村公紀、川井学、尾島敏康、岡田健一、廣野誠子、早田啓治、北畑裕司、山上裕機
2. 発表標題 当科における膵癌に対するがんワクチン療法の開発
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
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	山上 裕機 (Yamaue Hiroki) (20191190)	和歌山県立医科大学・医学部・学長特命教員（特別顧問） (24701)	

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	北谷 純也 (Kitadani Junya) (30596979)	和歌山県立医科大学・医学部・助教 (24701)	
研究分担者	尾島 敏康 (Ojima Toshiyasu) (60448785)	和歌山県立医科大学・医学部・講師 (24701)	

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
---------	---------