

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09186

研究課題名(和文) III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) Therapy for lung cancer using the genetically engineered myeloid cells producing type III IFN

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス人工多能性幹細胞(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-pMC)を構築した。これを基盤としてIFN- γ あるいはFLT3Lを発現するpMC細胞株を樹立した。これらを担がんマウスに投与したところ、単独投与で、投与部位のみならず遠隔部位のがんの成長を抑制し、免疫系の活性化による抗腫瘍効果を発揮することが明らかになった。また、2つの細胞に加えてIFN γ 産生pMCを投与した場合には、単独投与よりも優れた効果が観察され、臨床応用への期待が持てる結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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1位を占めている。近年、有効性が明らかにされた免疫チェックポイント阻害剤(ICB)は、遺伝子変異が多いものやPD-L1陽性のものであっても奏効する患者は限定的で、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。ICB抵抗性の「肺がん」を制御する為には、免疫抑制機構を回避するとともに、がん反応性T細胞浸潤を誘導する方法の開発が必要不可欠である。本研究の成果は、免疫チェックポイント阻害剤抵抗性を示す肺がん患者の生命予後を改善する新たな細胞医療の開発に資する。

研究成果の概要(英文)：Cytokine-dependent proliferation of myeloid cells (iPSC-pMC) was established from mouse induced pluripotent stem cells (iPSC). On this basis, we established pMC cell lines expressing IFN- γ or FLT3L. When these cell lines were administered to carcinoma-bearing mice, it was found that they inhibited the growth of cancer not only at the site of administration but also at distant sites, and exerted anti-tumor effects by activating the immune system. In addition, when IFN- γ -producing pMC were administered in addition to the two cell lines, a better effect was observed than when they were administered alone, showing promise for clinical application.

研究分野：がん免疫療法

キーワード：がん 免疫 細胞療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

型 IFN は、種々のウイルス感染に対して細胞性免疫応答を惹起する重要なサイトカインであり (Front. Immunol. 8: 1707, 2017) その機能の多くは 型 IFN (IFN- /) とオーバーラップするが、免疫抑制性の炎症反応を惹起しないという利点を有する為、型 IFN よりも優れた抗腫瘍効果を発揮する可能性を秘めている (Front. Immunol. 8: 1668, 2017, Nat. Immunol. 8: 1035-1045, 2019)。

抗腫瘍活性を示す分子をがん組織にデリバリーする手段の 1 つとして、抗腫瘍分子を結合したがん特異的抗体 (抗 EGFR 抗体など) を全身投与する方法がある (Cancer Cell 29: 285-296, 2016) 。しかし、がん特異的表面分子が未知の「がん」に対しては適用が困難である。一方、間葉系幹細胞 (MSC) などの細胞製剤を用いたデリバリー法は、がん特異的表面分子の有無に依存せずに、投与局所で持続的に抗腫瘍分子を作用させることが可能である (Nat Commun. 7: 10593, 2016) 。

人工多能性幹細胞 (iPSC) から分化誘導した細胞は、MSC よりも広く応用可能な細胞製剤プラットフォーム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) を作製する技術を開発してきた (Cancer Immunol. Res. 3: 668-677, 2015) 。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 あるいは 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。

型 IFN は、CD103+樹状細胞 (DC) の活性化を介してウイルス反応性 CD8+ T 細胞応答を惹起して、優れた抗ウイルス効果を発揮する (Nat. Immunol. 20: 1035-1045, 2019) 。しかしながら、細胞製剤を用いた 型 IFN デリバリーシステムの抗腫瘍活性は明らかになっていない。一方、FLT3L は、ミエロイド系前駆細胞からクロスプレゼンテーションに優れた CD103+ DC へと分化するために必須のサイトカインである。このサイトカインをがん局所にデリバリーすることで、CD103+ DC への分化を誘導して、がん反応性 T 細胞の初期活性化を促進して優れた抗腫瘍効果を発揮することが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、iPSC-pMC を基盤として、III 型 IFN 産生能を賦与した新規抗腫瘍細胞製剤を開発する。これをがん治療に応用することを予見して、抗腫瘍活性を示す I 型 IFN、あるいは、FLT3L デリバリーシステムとの併用などによる抗腫瘍効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) iPSC-pMC (pMC-IFN- および pMC-FLT3L) の作製

OP9 (op/op マウス由来の骨髄間質細胞株理研バイオリソース研究センター) から分譲された。C57BL/6 マウスの iPSC-pMC は、以前に報告した方法で構築した (Cancer Immunol Res. 2015 Jun;3(6):668-77. Doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0117) 。iPSC を OP9 フィーダー細胞上で 20 % FBS 含有 -MEM で 6~7 日間培養した。その後、中胚葉に分化した細胞を採取し、新しい OP9 細胞に再播種し、20 % FBS、20 ng/ml GM-CSF、55 mM 2-メルカプトエタノール (2-ME) (Gibco) 含有 -MEM で培養した。13-14 日目、浮遊細胞をピペッティングにより回収した。iPSC 由来骨髄細胞 (iPS-MC) は、10 µg/mL 硫酸プロタミン (Sigma-Aldrich) 存在下、c-MYC を発現するレンチウイルスベクターを導入し、20%FBS、30 ng/ml rmGM-CSF、50 ng/ml rhM-CSF 添加 MEM で培養した。5-6 日後、増殖した骨髄系細胞が出現した (iPSC 由来増殖骨髄系細胞、iPS-pMC) 。IFN- 産生 iPSC-pMC (pMC-IFN-) FLT3L 産生 iPSC-pMC (pMC-FLT3L) は、IFN- あるいは FLT3L と Venus を共発現するレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入して作製し、20 %FBS、30 ng/mL rmGM-CSF および 50 ng/mL rhM-CSF 含有 -MEM で培養した。遺伝子導入細胞は、Venus の発現を指標にセルソーターで分離した。

(2) 遺伝子発現コンストラクト

マウス IFN- あるいは FLT3L 発現コンストラクトを作製するために、マウス IFN- あるいはマウス FLT3L の合成 cDNA を作成した (GenScript) 。これらの cDNA 断片をプラスミド DNA、CSII-EF-MCS-IRES-Venus (理研バイオリソースセンター) のマルチクローニングサイト (MCS) に挿入して発現コンストラクトを作製した。

(3) 組換えレンチウイルスの作製

293T 細胞を、Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、パッケージングプラスミド (pCAG-HIVgp) Envelope/Rev プラスミド (pCMV-VSV-G-RSV-Rev) および発現プラスミドをトランスフェクトした。37 °C で 12~16 時間インキュベートした後、培地を 10 mM Forskolin (Sigma-Aldrich) を含む完全 DMEM 培地に交換した。48 時間後、水疱性口内炎ウイルス G 糖タンパク質 (VSV-G) で偽型化した HIV-1 ベースのレンチウイルスベクターを含む上清を採取し、0.45 µm フィルターでろ過した後、Lenti-X Concentrator (Clontech)

を用いて濃縮した。

(4) サイトカイン依存性細胞増殖能の評価

96 ウェル培養プレートに各種遺伝子改変を行った pMC (2×10^3 /well) を播種し、これに、培地のみ (コントロール) GM-CSF (30 ng/mL)、M-CSF (50 ng/mL)、あるいは、GM-CSF と M-CSF の両者を加えた条件で培養を開始した。MTT (3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド; Sigma-Aldrich) を 0, 1, 2, 3, 4 日目に MTT を加えて、4 時間後、プレートを遠心して細胞を沈降させ、上清をタッピングにより除去した。その後、各ウェルに 200 μ L の DMSO を添加して 5 分後、570 nm の吸光度を測定した。

(5) フローサイトメトリー

セルソーターで分離した pMC-IFN- α あるいは pMC-FLT3L は Venus の発現を指標に純度をフローサイトメトリーで確認した。遺伝子導入前後の細胞表面マーカーの発現は以下の蛍光標識抗体 (BioLegend) を用いて評価した。Anti-mouse H-2Kb/Db Ab, anti-mouse I-A/E Ab, anti-mouse CD40 Ab, anti-mouse CD80 Ab, anti-mouse CD86 Ab, anti-mouse CD11b Ab, anti-mouse CD11c Ab, anti-mouse CD33 Ab, anti-mouse F4/80 Ab, anti-mouse CD205 Ab

(6) サイトカイン ELISA

pMC-IFN- α (2.5×10^3 /well) を 96 well plate に播種して 24 時間後、培養上清中の IFN- α を DuoSet ELISA Mouse IFN- α (R&D) で測定した。

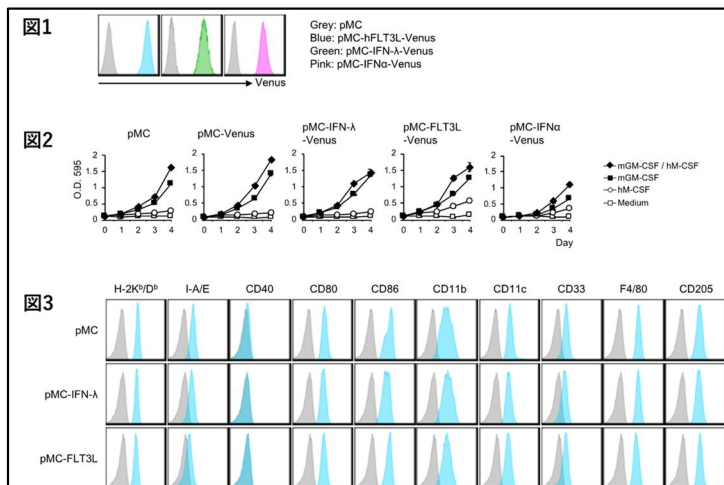
(7) 抗腫瘍効果の判定

OVA 発現 B16-F10 メラノーマ細胞株 (MO4 : 1×10^5) を C57BL/6 マウスの両脚に移植した。移植後、4 日後に、pMC-IFN- α 、pMC-FLT3L、あるいは、我々が以前に報告した pMC-IFN- α (1×10^6 /マウス) を、または、これらの組み合わせを右脚のがん局所に投与した。経時的に投与局所 (右脚) と遠隔部位 (左脚) の腫瘍径を測定した。腫瘍の長径が 15mm に達した時点でマウスを安楽死させた。抗腫瘍効果は、腫瘍径とマウス生存により評価した。

4. 研究成果

(1) pMC-IFN- α および pMC-FLT3L の構築

樹立した pMC-IFN- α と pMC-FLT3L は、III 型インターフェロン (type III IFN) 遺伝子、あるいは、FLT3L 遺伝子と蛍光タンパク (Venus) 遺伝子を共発現する。両者ともに Venus 共発現して目的のサイトカインを発現することが示唆された (図 1)。



(2) サイトカイン依存性増殖能

pMC-IFN- α および pMC-FLT3L は、MTT 法による評価

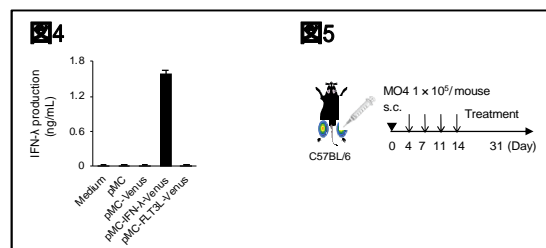
で GM-CSF 依存性に増殖することが分かった。また、この増殖は、M-CSF を添加することで更に促進することが明らかになった。培地に GM-CSF と M-CSF を添加して培養すると 3 ヶ月以上増殖を続け、大量生産が可能であることが明らかになった (図 2)。

(3) 表面マーカー発現解析

pMC-IFN- α および pMC-FLT3L は、ともに H-2Kb/Db 陽性、I-A/E 陽性、CD40 陰性、CD80 陽性、CD86 陽性、CD11b 陽性、CD11c 陽性、CD33 陽性、F4/80 陽性、CD205 陽性であり、ミエロイド系マクロファージ・DC 様の表面マーカー発現パターンを示した。これらの発現は、III 型インターフェロン (type III IFN) 遺伝子、あるいは、FLT3L 遺伝子の導入によって変化せず、導入前の pMC と同様であった (図 3)。抗原提示分子 (MHC-I, MHC-II) 及び共刺激分子 (CD80, CD86) を発現し、抗原提示細胞様のフェノタイプを示し、壊死したがん細胞を取り込み、がん抗原をプロセス・抗原提示して二次的な免疫応答を惹起する可能性が示唆された。

(4) サイトカイン産生能

pMC-IFN- α は、GM-CSF の添加がない培地の中でも III 型 IFN を産生し、生体内に投与しても III 型 IFN を継続的に産生して、効果を発揮する可能性が示唆された (図 4)。



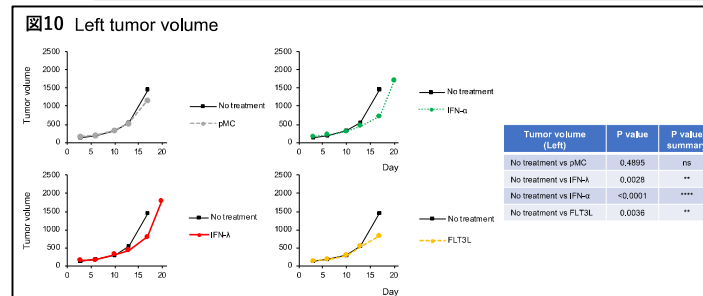
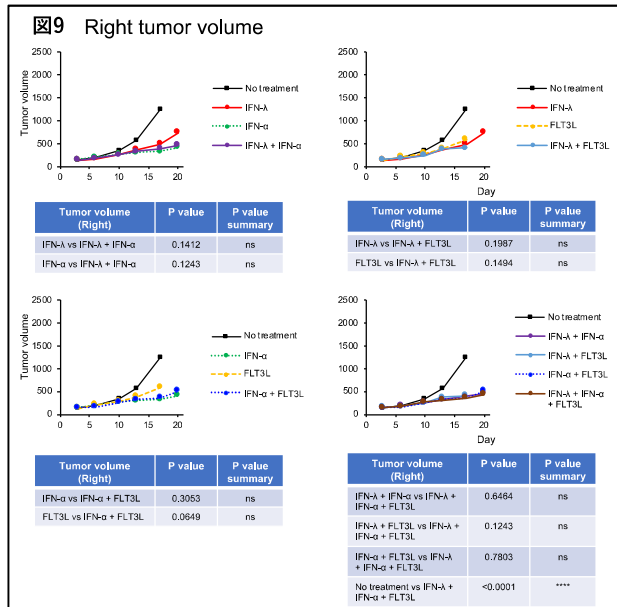
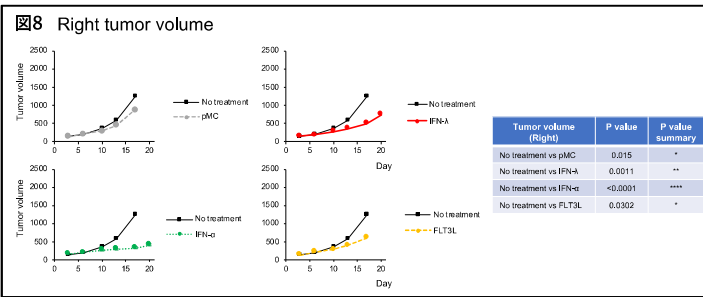
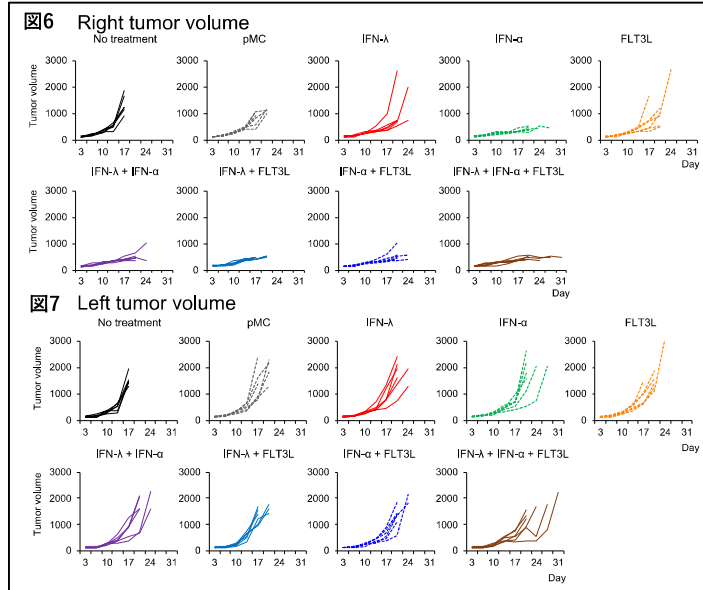
(5) In vivo 有効性評価

C57BL/6 マウスの両脚に OVA 発現メラノーマ細胞株 (M04) を移植した。移植 4 日後、type I IFN 産生 iPSC-pMC、type III IFN 産生 iPSC-pMC、および、FLT3L 産生 iPSC-pMC を単独、あるいは、これらを組み合わせて右脚腫瘍局所に投与して、投与部位および遠隔部位のがんの腫瘍径を経時的に測定した (図 5, 6, 7)。投与局所におけるがん抑制効果は、単独で type I IFN 産生 iPSC-pMC が最も強く、FLT3L 産生 iPSC-pMC が最も弱かった (図 8)。2 つ以上の組み合わせでは効果が向上した (図 9)。一方、遠隔部位におけるがん抑制効果は、単独では、type I IFN 産生 iPSC-pMC が最も強く、次いで type III IFN 産生 iPSC-pMC と FLT3L 産生 iPSC-pMC が同等であった (図 10)。2 つの組み合わせでは大きな差を認めなかったが、3 つの組み合わせにより効果が向上した (図 11)。type III IFN 産生 iPSC-pMC は、type I IFN 産生 iPSC-pMC と FLT3L 産生 iPSC-pMC と併用投与することにより、投与部位のみならず遠隔部位のがんを制御することが明らかとなった。一方、type I IFN 産生 iPSC-pMC、あるいは、type III IFN 産生 iPSC-pMC の単独投与の場合、あるいは、type I IFN 産生 iPSC-pMC、type III IFN 産生 iPSC-pMC、FLT3L 産生 iPSC-pMC の 3 者を混合投与した場合には、未治療群と比較して著しく生存が延長した (図 12)。

考察

本研究により、type I IFN 産生 iPSC-pMC、type III IFN 産生 iPSC-pMC、FLT3L 産生 iPSC-pMC の 3 者を混合投与した場合には、投与部位のみならず遠隔部位のがんの制御が可能であることが示唆された。私達は以前、type I IFN 産生 iPSC-pMC (1×10^6 個) をがんの局所に週 3 回投与することで、投与部位のみならず遠隔部位のがんを制御できることを報告した (Cell Rep. 2019 Oct 1;29(1):162-175.e9.)。type I IFN は、CD103+DC に作用してがん反応性 T 細胞の初期活性化を促進するが、同時に免疫抑制機構を作動させ、がんの治療抵抗性を誘発する。

本研究では、type I IFN 産生細胞の投与数を 1/3 まで減らし、type III IFN 産生 iPSC-pMC、FLT3L 産生 iPSC-pMC との 3 者の併用で、週 2 回投与においても、投与部位のみならず遠隔部位のがんを制御できることを明らかにした。つまり、type I IFN のネガティブフィードバックを最小限に抑えつつ、CD103+DC 応答を介したがん反応性



T細胞の活性化を誘導できたのではないかと考える。本システムによる CD103+DC の分化促進、がん反応性 T細胞応答の促進、ネガティブフィードバックの低下の証明は今後の課題である。今後はこれに加えて、免疫チェックポイント阻害剤との併用効果を明らかにし、臨床開発への可能性を検証したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Mashima H, Zhang R, Kobayashi T, Tsukamoto H, Liu T, Iwama T, Hagiya Y, Yamamoto M, Fukushima S, Okada S, Idiris A, Kaneko S, Nakatsura T, Ohdan H, Uemura Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 Improved safety of induced pluripotent stem cell-derived antigen-presenting cell-based cancer immunotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Ther Methods Clin Dev.	6. 最初と最後の頁 171-179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtm.2021.03.002.	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 Mizuhashi S, Kubo Y, Fukushima S, Kanemaru H, Nakahara S, Miyasita A, Ishibashi T, Kuriyama H, Kimura T, Masuguchi S, Zhang R, Iwama T, Nakatsura T, Uemura Y, Senju S, Ihn H.	4. 巻 102
2. 論文標題 Immune cell therapy against disseminated melanoma by utilizing induced pluripotent stem cell-derived myeloid cell lines producing interferon-beta or interleukin-15/interleukin-15 receptor alpha	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci.	6. 最初と最後の頁 133-136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2021.03.005.	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 Kudo-Saito C, Ogiwara Y, Imazeki H, Boku N, Uemura Y, Zhang R, Kawano-Nagatsuma A, Kojima M, Ochiai A.	4. 巻 11
2. 論文標題 CD11b + DIP2A + LAG3 + cells facilitate immune dysfunction in colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 5428-5439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Shen S, Wu Q, Liu J, Wu L, Zhang R, Uemura Y, Yu X, Chen L, Liu T.	4. 巻 35
2. 論文標題 Analysis of human glioma-associated co-inhibitory immune checkpoints in glioma microenvironment and peripheral blood	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Immunopathol Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/20587384211056505.	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 Kuriyama H, Fukushima S, Kimura T, Kanemaru H, Miyashita A, Okada E, Kubo Y, Nakahara S, Tokuzumi A, Nishimura Y, Kajihara I, Makino K, Aoi J, Masuguchi S, Tsukamoto H, Inozume T, Zhang R, Nakatsura T, Uemura Y, Senju S, Ihn H.	4. 巻 22(4)
2. 論文標題 Immunotherapy with 4-1BBL-Expressing iPS Cell-Derived Myeloid Lines Amplifies Antigen-Specific T Cell Infiltration in Advanced Melanoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci .	6. 最初と最後の頁 1958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22041958.	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 Mashima H, Zhang R, Kobayashi T, Hagiya Y, Tsukamoto H, Liu T, Iwama T, Yamamoto M, Lin C, Nakatsuka R, Mishima Y, Watanabe N, Yamada T, Senju S, Kaneko S, Idiris A, Nakatsura T, Ohdan H, Uemura Y.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Generation of GM-CSF-producing antigen-presenting cells that induce a cytotoxic T cell-mediated antitumor response.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncoimmunology	6. 最初と最後の頁 1814620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2162402X.2020.1814620.	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 Shen S, Chen L, Liu J, Yang L, Zhang M, Wang L, Zhang R, Uemura Y, Wu Q, Yu X, Liu T.	4. 巻 17(3)
2. 論文標題 Current state and future of co-inhibitory immune checkpoints for the treatment of glioblastoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Bio Med.	6. 最初と最後の頁 555-568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0027.	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 該当する

1. 著者名 Kimura T, Fukushima S, Okada E, Kuriyama H, Kanemaru H, Kadohisa-Tsuruta M, Kubo Y, Nakahara S, Tokuzumi A, Kajihara I, Makino K, Miyashita A, Aoi J, Makino T, Tsukamoto H, Nishimura Y, Inozume T, Zhang R, Uemura Y, Senju S, Ihn H.	4. 巻 33(5)
2. 論文標題 Induced pluripotent stem cell derived myeloid cells expressing OX40 ligand amplify antigen specific T cells in advanced melanoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pigment Cell Melanoma Res.	6. 最初と最後の頁 744-755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcmr.12887.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 植村靖史、福田恭子
2. 発表標題 iPS細胞由来IFN産生ミエロイド細胞を用いたがん免疫療法 Cancer immunotherapy using iPS cell-derived IFN-producing myeloid cells
3. 学会等名 日本再生医療学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 福田 恭子, 植村 靖史	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 7
3. 書名 実験医学 増刊	

〔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	植村 靖史 (Uemura Yasushi) (40364781)	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・ユニット長 (82606)	

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