

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17628

研究課題名（和文）患者由来ネオアンチゲンを標的とした個別化iPSCs癌ワクチン療法の基礎研究

研究課題名（英文）Basic research on personalized iPSCs cancer vaccine therapy targeting neoantigen from patients

研究代表者

岩本 博光 (Iwamoto, Hiromitsu)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60756592

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）：本研究は申請者が一貫して研究してきたiPSCs癌ワクチン療法の問題点であった、有効な標的の探求の終着点となる。これまでiPSCsにネオアンチゲンを形質導入したという報告はなく、極めて新規性が高い。患者由来のネオアンチゲンを遺伝子導入したiPSCsを用いた癌ワクチン療法は、免疫学的寛容に陥ることなく、これまでのTAAを導入したiPSCs癌ワクチン療法に比べ、より強力な抗腫瘍効果を発揮する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロフェッショナルなAPCsであるDCsを用いたDCs癌ワクチンは以前から有望視されてきたが、いくつかの問題点があった。iPSCs癌ワクチン療法は、これらの問題点を改善し、より強力な治療戦略であると考えられた。しかしそのiPSCs癌ワクチン療法も十分な効果が得られず、より強力な治療標的を探求していた。今日、免疫治療と言えば免疫チェックポイント阻害剤が隆盛を誇っているが、これはあくまでも癌の砦をはがすだけで、癌を撃退するには強力な武器が必要である。そしてその武器は自らには安全であるものが適している。これらの観点からも、本研究は新たな癌免疫療法を開発できる可能性のある非常に重要な研究である。

研究成果の概要（英文）：This study marks the end of the search for effective targets, which has been a problem of iPSCs cancer vaccine therapy that the applicant has consistently studied. To date, there have been no reports of iPSCs being transduced with neoantigens, and this is extremely novel. Cancer vaccine therapy using iPSCs transfected with patient-derived neoantigens does not induce immunological tolerance, and exhibits stronger antitumor effects than conventional iPSCs cancer vaccine therapy transfected with TAAs.

研究分野：消化器外科

キーワード：iPSCs 癌ワクチン テーラーメイド治療 ネオアンチゲン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の着想に至った経緯

申請者は前述の通り、iPSCs から APCs である DCs を分化誘導し、これに TAA を遺伝子導入し、癌ワクチンとして投与する iPSDCs 癌ワクチン療法の基礎研究に従事し、その高い有効性を報告してきた。しかし一方で、未だに癌ワクチン療法は臨床応用には届いておらず、ブレイクスルーには強力な治療効果を引き出す、新たな治療標的が必要であった。そのような状況の中、次世代シーケンサーやバイオインフォーマティクスの技術の進歩により、癌患者個々の全ゲノムの遺伝子変異が同定できるようになったことから、ネオアンチゲンが癌免疫療法の標的として脚光を浴びるようになった。ネオアンチゲンは免疫学的寛容による治療効果の減弱をなくし、患者個々に応じたテーラーメイドの、強力な治療効果を引き出す新たな治療標的となると考え、より強力な iPSDCs 癌ワクチン療法が開発できるのではないかとこの着想に至った。

(2) 関連する国内外の研究動向と位置づけ

唯一のプロフェッショナルな APCs である DCs を用いた DCs 癌ワクチンは以前から有望視されてきたが、いくつかの問題点から置き去りにされてきた。iPSDCs 癌ワクチン療法は、これらの問題点を改善し、より強力な治療戦略であると考えられた。しかしその iPSDCs 癌ワクチン療法も十分な効果が得られず、より強力な治療標的を探求していた。その一方で、次世代シーケンサーを使ってマウスの癌細胞のネオアンチゲンを同定し、それらをマウスにワクチン投与することで抗腫瘍効果を導き出した論文が相次いで報告され、それらのエビデンスに基づき患者個々のネオアンチゲンを標的とした個別化がんワクチン療法の臨床試験が既に始まっている。今日、免疫治療と言えば免疫チェックポイント阻害剤が隆盛を誇っているが、これはあくまでも癌の砦をはがすだけで、癌を撃退するには強力な武器が必要である。そしてその武器は自らには安全(癌特異的で副作用が少ない)であるものが適している。これらの観点からも、本研究は新たな癌免疫療法を開発できる可能性のある非常に重要な研究である。

2. 研究の目的

本研究は申請者が一貫して研究してきた iPSDCs 癌ワクチン療法の問題点であった、有効な標的の探求の終着点となる。これまで iPSDCs にネオアンチゲンを形質導入したという報告はなく、極めて新規性が高く、申請者の業績からその可能性も高いと考えられる。これによりネオアンチゲンというより有効な標的を決定し、患者個々に対応した個別化治療の扉をあけ、臨床応用で十分な効果が挙げられず、停滞している癌ワクチン療法の研究のブレイクスルーとなり、難治性消化器固形癌の新規の癌免疫療法の開発となる、極めて意義深く世界にインパクトを与える研究であると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 患者由来のネオアンチゲンの解析

患者より癌組織を摘出し、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム解析を行い、エクソンにおける遺伝子変異ならびに遺伝子発現量を決定する。そしてそれら遺伝子変異は、同時並行して全ゲノム解析した患者由来の末梢血単核球(PBMCs)の結果と比較し、さらには COSMIC で検索を行い、遺伝子由来ペプチドの MHC への結合予測は Net MHC Ver4.0 で行う。これらに基づき、そのタンデムミニ遺伝子を合成し、pCDNA ベクターにクローニングする。これを electroporation により iPS バンクより入手した iPSCs より分化誘導した iPSDCs に上記ベクターにより、電気穿孔法(electroporation)にて遺伝子導入を行い、その患者独自のネオアンチゲンを発現する iPSDCs (iPSDCs-neoantigen)を得る。

(2) 患者由来の癌細胞株の樹立(CTOS法: Proc Natl Acad Sci USA 2011;108(15):6235-6240) 摘出した患者の癌組織を約 2mm 角に細切し、DMEM/F12 (Thermo Fisher) 10mL に Liberase DH (Roche Diagnostics) 100 µL (0.26 U/ mL)を添加した酵素液中で、37 °C で 2 時間インキュベートする。これらのポアサイズ 500 µm および 250 µm の金属メッシュを通過した分画を回収。これを 100 µm のナイロンメッシュ、40 µm のナイロンメッシュの順に通して、各フィルター上に残った小腫瘍片を 8ng/mL bFGF を添加した StemPro® hESC 培地(ともに ThermoFisher)中で翌日まで培養し、CTOS を形成させる。そして麻酔下で NOD/SCID マウスの皮下に CTOS を接種して移植する。

継代及び実験に使用する場合は腫瘍塊の直径が約 10mm になったところでマウスを頸椎脱臼し腫瘍塊を取り出す。組織像については腫瘍塊のパラフィン切片を H&E 染色で確認する。

(3) Winn assay による in vivo での抗腫瘍効果の比較検討

iPSDCs-neoantigen、iPSDCs-GFP (コントロール) を stimulator、患者由来 PBMCs を responder

として供培養を行い、in vitro 刺激を 3 回繰り返すことにより bulk CTLs を得る。次に MACS Pro を用いて CD8+CTLs をソートし、癌細胞株 1 に対し CD8+CTLs が 10 の割合で混ぜ合わせ、100 μ L につき標的癌細胞株 1×10^5 cells と CD8+CTLs が 1×10^6 cells になるように PBS にて調整する。CTOS NOD/SCID mice の背中に皮下投与する。そして腫瘍のサイズを (short diameter)² \times long diameter \times 0.52 を指標とし経時的に評価し、その値が 2000 を超えた場合はマウスの苦痛を考慮し安楽処置とする。すべてのマウスを解剖し腹膜播種、肝転移、脾臓転移などの転移の有無を確認し、ある場合はその数、大きさを記録する。

4. 研究成果

当初患者由来の組織を順次得る予定であったが、コロナ下により、治療以外の外来受診をいただくことが困難となり、研究の一部が遅延してしまった。

(1) 患者由来のネオアンチゲンの解析：患者より癌組織を摘出し、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム解析を行い、エクソンにおける遺伝子変異ならびに遺伝子発現量を決定した。そしてそれら遺伝子変異は、同時並行して全ゲノム解析した患者由来の末梢血単核球 (PBMCs) の結果と比較し、さらには遺伝子由来ペプチドの MHC への結合予測を行った。これらに基づきタンデムミニ遺伝子を合成し、pCDNA ベクターにクローニングした。これを電気穿孔法にて遺伝子導入を行い、その患者独自のネオアンチゲンを発現する iPSCs (iPSCs-neoantigen) を得た。

(2) 患者由来の癌細胞株の樹立 (CTOS 法)：摘出した患者の癌組織を約 2mm 角に細切し、37 で 2 時間インキュベートした。これらを各種メッシュを通過した、各フィルター上に残った小腫瘍片をメEDIUM 中で翌日まで培養し、CTOS を形成させた。そして麻酔下で NOD/SCID マウスの皮下に CTOS を接種して移植した。継代及び実験に使用する場合は腫瘍塊の直径が約 10mm になったところでマウスを頸椎脱臼し腫瘍塊を取り出した。

(3) Winn assay による in vivo での抗腫瘍効果の比較検討：iPSCs-neoantigen、iPSCs-GFP (コントロール) を stimulator、患者由来 PBMCs を responder として供培養を行い、in vitro 刺激を 3 回繰り返すことにより bulk CTLs を得た。次に MACS Pro を用いて CD8+CTLs をソートし、癌細胞株 1 に対し CD8+CTLs が 10 の割合で混ぜ合わせ、CTOS NOD/SCID mice の背中に皮下投与し、その抗腫瘍効果を判定する予定であったが、先述の通り、コロナ下にて患者由来の組織を得ることが困難であったため、本実験は結果を得ることができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimpei Maruoka, Toshiyasu Ojima, Hiromitsu Iwamoto, Junya Kitadani, Hirotaka Tabata, Shinta Tominaga, Masahiro Katsuda, Keiji Hayata, Akihiro Takeuchi, Hiroki Yamaue	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Tumor RNA transfected DCs derived from iPS cells elicit cytotoxicity against cancer cells induced from colorectal cancer patients in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-07305-1.	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 北谷純也, 尾島敏康, 岩本博光, 山上裕tw *	4. 巻 72(3)
2. 論文標題 消化器固形癌を標的としたips細胞由来樹状細胞療法の研究 基礎的研	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 和歌山医学	6. 最初と最後の頁 150-153
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 -

〔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 富永 信太, 尾島 敏康, 宮澤 基樹, 岩本 博光, 北谷 純也, 丸岡 慎平, 山上 裕機
2. 発表標題 ユビキチンプロテアソーム系を応用した新規iPS細胞由来樹状細胞ワクチン療法の研究
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸岡 慎平, 尾島 敏康, 岩本 博光, 北谷 純也, 田端 宏堯, 出口 真彰, 中森 幹人, 中村 公紀, 勝田 将裕, 山上 裕機
2. 発表標題 iPS細胞由来樹状細胞(iPSDCs)を用いた新規免疫療法の確立
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

1. 発表者名 尾島 敏康, 北谷 純也, 岩本 博光, 丸岡 慎平, 田端 宏堯, 中村 公紀, 中森 幹人, 勝田 将裕, 早田 啓治, 福田 直城, 富永 信太, 竹内 昭博, 本林 秀規, 山上 裕機
2. 発表標題 再生医療の実現-外科医に期待される役割- iPS細胞由来樹状細胞を用いた癌ワクチン療法
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
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

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