

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650232

研究課題名（和文）iPS細胞ワクチンを用いた腫瘍血管標的免疫療法

研究課題名（英文）Immunotherapy targeting tumor vascular cells using iPS cell-derived vaccine

研究代表者

本間 定（HOMMA SADAMU）

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50192323

研究成果の概要（和文）：

iPS細胞は分化誘導により血管前駆細胞（induced Vascular Progenitor cells, iVP細胞）へ分化する。iVP細胞lysateをパルスした樹状細胞でマウスを免疫すると強い抗腫瘍効果が誘導され、組織学的に腫瘍血管の減少と血管内皮細胞に反応する液性抗体の誘導が認められた。以上より、iVP細胞で宿主を免疫すると腫瘍血管の進展を抑制する免疫反応が誘導され、その結果、抗腫瘍効果が得られる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Induced Pluripotent Stem (iPS) cells are able to differentiate into vascular progenitor cells (iVP cells). Immunization of mice with dendritic cells pulsed with iVP cell lysate could induce potent antitumor immunity. Development of tumor vascular system was significantly suppressed and antibody against vascular endothelial cells was induced in the immunized mice. It is suggested that immunization with iVP cells could confer antitumor activity by induction of immune response against tumor vasculature.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：iPS細胞、血管前駆細胞、腫瘍血管、血管新生、樹状細胞、血管内皮細胞、血管周細胞、抗腫瘍効果

1. 研究開始当初の背景

iPS (induced pluripotent stem) 細胞は特定遺伝子の導入により多くの細胞に分化で

きる能力を獲得した細胞であり、再生医療、難病の病因解明などに高い期待がよせられている。一方で近年 iPS細胞の特性を生かして iPS細胞をがん治療に応用する試みが開始

され注目を集めている。

がん免疫療法は多種のがん抗原の同定と抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導・活性化機構の解明により近年著しい進歩を遂げた。がん患者の体内でがん抗原を認識してがん細胞を破壊する CTL を誘導するためのがんワクチンの臨床試験が国内外において精力的に進められてきた。2010 年、前立腺癌に対する樹状細胞ワクチン「プリベンジ」の有効性が科学的に証明され、米国 FDA の承認を得て臨床の現場で実用化されたことは特筆に値する。しかし、現時点では多くのがんワクチンの治療効果は限られており、進行がんの治療に際しては難渋することが少なくない。その原因のひとつとして、がん細胞に発現するがん抗原や CTL の抗原ペプチド認識に必須の分子である MHC class I の発現消失がある。このようながん細胞の免疫逃避機構はがんワクチンなどの免疫療法の有効性を低下させる要因となっており、その対策が急がれる。

一方、腫瘍組織を構成する腫瘍血管は正常組織を構成する血管には見られない特殊性が存在する。活発な増殖能を示す腫瘍血管細胞の一部は骨髄細胞から由来することが知られており、正常血管には見られない分子の発現と抗原性を示す。このことを利用して、腫瘍血管のみに発現する抗原を認識する CTL を人為的に誘導・活性化すれば、免疫的機序により腫瘍血管を傷害して抗腫瘍効果が得られる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は多分可能を有する iPS 細胞から血管前駆細胞を分化誘導し、この細胞の成分を用いて宿主を免疫することにより、腫瘍血管細胞を傷害する免疫反応を活性化して抗腫瘍効果を得るがんワクチンを開発することであり、マウスによる基礎実験系を用いてこの概念の妥当性を検証する。この方法が確立されれば、iPS 細胞を用いた新たながん免疫療法の道が開かれる可能性がある。

3. 研究の方法

iPS 細胞は山中博士らにより樹立された iPS-MEF-Ng-20D-17 細胞の分与を受け、iPS 細胞の血管前駆細胞

(inducedVascularProgenitor 細胞、iVP 細胞)への分化誘導は Narazaki ら (Circulation. 2008; 118: 498) の方法によった。

誘導された iVP 細胞と腫瘍血管内皮細胞の遺伝子発現の共通性を検討するために、iVP 細胞と CMS-4 腫瘍組織から単離した VEGFR2 陽性細胞から total RNA を採取し、microarray 方を用いて両者の遺伝子発現の

特性を比較検討した。

iVP 細胞によるマウス免疫は iVP 細胞が有する 2 種類の haplotype に対する allo 免疫反応を利用して iVP 細胞をそのままマウス皮下に接種する方法と、マウス骨髄細胞から GM-CSF, IL-4 を用いて誘導した樹状細胞 (dendritic cell, DC) に iVP 細胞の lysate をパルスして皮下投与する方法の 2 種類で行った。いずれの方法も 1 週間間隔で iVP 細胞、または DC を 10^6 /mouse で皮下投与した。

皮下移植に用いたマウス腫瘍細胞は腫瘍血管誘導の強い CMS-4 線維肉腫細胞、中等度の腫瘍血管誘導を示す BNL 肝癌細胞、腫瘍血管誘導の乏しい C26 大腸癌細胞の 3 種類を使用し、ワクチン効果の比較検討を行った。抗腫瘍効果の判定は上記免疫マウスの背部皮下に 10^6 個の腫瘍細胞を移植し、1 週ごとに腫瘍径を計測すると同時に、全生存期間の比較を行った。

ワクチン効果を担う effector 細胞の同定のために抗 CD4、CD8 mAb、asialoGM1 抗体を免疫マウスに投与し、CD4+細胞、CD8+T 細胞、NK 細胞を deplete した条件下での抗腫瘍効果を検討した。

腫瘍細胞、または血管内皮細胞に対する CTL の誘導の検討は免疫マウスの脾細胞から magnetic sorting により CD8+T 細胞を得て effector 細胞とし、腫瘍細胞は CMS-4、血管内皮細胞は bENDO3 細胞を標的細胞として用いて ^{51}Cr release 法を用いて行った。腫瘍細胞、血管内皮細胞に対する液性抗体の誘導の検討は、上記細胞に反応するマウス血清中の免疫グロブリン (Ig) の存在を anti-mouse Ig 抗体を用いた FACS 法により行った。

4. 研究成果

iPS 細胞は feeder layer, LIF free で collagen Type IV coated dish に培養を移すと 3-4 日で小型で敷石状の血管前駆細胞 (induced Vascular progenitor cells, iVP 細胞) へ分化した。この細胞と CMS-4 腫瘍組織内の血管細胞 (VEGFR2+) の遺伝子発現をマイクロアレイで比較すると、両者間には多くの血管関連遺伝子の共通発現が認められた。

この iVP 細胞で免疫した BALB/c マウスに CMS-4 線維肉腫細胞を移植すると、腫瘍の増殖抑制と生存期間の延長が認められた。この抗腫瘍効果は未分化な iPS 細胞で免疫した場合より、iVP 細胞で免疫した方が強力であった。iVP 免疫マウスに形成された腫瘍は組織学上腫瘍血管の減少が認められたため、iVP 細胞で誘導された免疫反応が腫瘍血管の形成を抑制した可能性が示された。

iVP 細胞の cell lysate をパルスした樹状細胞で BALB/c マウスを免疫すると、免疫マウスは CMS-4 に対し強い予防的抗腫瘍効果を

示した。免疫マウスに形成された腫瘍は腫瘍血管の形成が不良で、CD31+血管内皮細胞とASMA+血管周細胞の減少と配列不整が観察され、Tomato lectin perfusion による検討では腫瘍血管の明らかな減少が認められた。

CMS-4 腫瘍は血管に富み iVP ワクチンで強い抗腫瘍効果が得られる。一方、腫瘍血管の発達が中等度の BNL 肝癌細胞、腫瘍血管の乏しい C26 大腸癌細胞を用いて同様の実験を行うと、BNL では中等度の抗腫瘍効果、C26 では殆ど抗腫瘍効果は見られなかった。このことより、iVP ワクチンにより誘導される抗腫瘍効果は腫瘍血管の豊富な腫瘍ほど強力である可能性が考えられた。

免疫マウスに mAb 投与し CD4+、CD8+細胞を deplete させると、抗腫瘍効果の抑制は抗 CD4 抗体を投与した時の方が強かった。NK 細胞を depletion させても影響はなかった。免疫マウスから脾臓中の CD8+T 細胞を分離し、これを effector 細胞として CMS-4 腫瘍細胞、bENDO3 血管内皮細胞に対する細胞傷害活性を測定すると、bENDO3 細胞に対して強い細胞傷害活性が認められた。また、免疫マウス血清中には bENDO3 細胞に反応する抗体が誘導されていたが、CMS-4 細胞に対する抗体価は低かった。

以上より、iPS 細胞から血管前駆細胞へ分化した iVP 細胞の成分で宿主を免疫すると、腫瘍血管に反応する液性抗体が誘導され、その効果により腫瘍血管の発達が抑制され抗腫瘍効果が得られる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- 1) Kimura Y, Tsukada J, Tomoda T, Takahashi H, Imai K, Shimamura K, Sunamura M, Yonemitsu Y, Shimodaira S, Koido S, Homma S, Okamoto M. Clinical and immunologic evaluation of dendritic cell-based immunotherapy in combination with gemcitabine and/or S-1 in patients with advanced pancreatic carcinoma. *Pancreas*. 査読有 41; 2012: 195-205
- 2) Koido S, Homma S, Takahara A, Namiki Y, Tsukinaga S, Mitobe J, Odahara S, Yukawa T, Matsudaira H, Nagatsuma K, Uchiyama K, Satoh K, Ito M, Komita H, Arakawa H, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. Current immunotherapeutic approaches in pancreatic cancer. *Clin Dev Immunol*. 2011; 査読有 2011: 267539.
- 3) Takahara A, Koido S, Ito M, Nagasaki E, Sagawa Y, Iwamoto T, Komita H, Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M, Mineno J, Shiku H, Nishida S, Sugiyama H, Tajiri H, Homma S. Gemcitabine enhances Wilms' tumor gene WT1 expression and sensitizes human pancreatic cancer cells with WT1-specific T-cell-mediated antitumor immune response. *Cancer Immunol Immunother*. 査読有 60(9): 2011: 1289-1297.
- 4) Koido S, Homma S, Takahara A, Namiki Y, Komita H, Nagasaki E, Ito M, Nagatsuma K, Uchiyama K, Satoh K, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. Immunologic monitoring of cellular responses by dendritic/tumor cell fusion vaccines. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 査読有 2011: 910836
- 5) 小井戸薫雄、本間 定、高原映崇、込田英夫、大草敏史、田尻久雄. 進行膵癌に対するGemcitabine併用WT1 標的免疫療法の意義. *胆と膵査読有* 32; 2011: 887-891.
- 6) Ito M, Suzuki H, Sagawa Y, Homma S. The identification of a novel Paneth cell-associated antigen in a familial adenomatous polyposis mouse model. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 400: 2010: 548-553.
- 7) Koido S, Homma S, Hara E, Namiki Y, Takahara A, Komita H, Nagasaki E, Ito M, Ohkusa T, Gong J, and Tajiri H. Regulation of Tumor Immunity by Tumor/Dendritic Cell Fusions, *Clin Dev Immunol*. Volume 2010, 査読有 2010; Article ID 516768, 14 pages
- 8) Koido S, Hara E, Homma S, Namiki Y, Komita H, Takahara A, Nagasaki E, Ito M, Sagawa Y, Mitsunaga M, Uchiyama K, Satoh K, Arihiro S, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. Dendritic/pancreatic carcinoma fusions for clinical use: comparative functional analysis of healthy- versus patient-derived fusions. *Clin Immunol*. 査読有 135: 2010: 384-400.
- 9) Koido S, Homma S, Hara E, Namiki Y, Okusa T, Gong J, Tajiri H. Antigen-specific polyclonal cytotoxic T lymphocytes induced by fusions of dendritic cells and tumor cells. *J Biomed Biotech*. Volume 2010, 査読有

2010; Article ID 752381, 12 pages
doi:10.1155/2010/752381

- 10) Saeki C, Nakano M, Takahashi H, Saito S, Homma S, Tajiri H, Zeniya M. Accumulation of functional regulatory T cells in a actively inflamed liver in mouse dendritic cell-based autoimmune hepatic inflammation. Clin Immunol. 査読有 135:2010: 156-166.
- 11) Nagasaki E, Takahara A, Koido S, Sagawa Y, Aiba K, Tajiri H, Yagita H, Homma S. Combined treatment with dendritic cells and 5-fluorouracil elicits augmented NK-cell -mediated antitumor activity via tumor necrosis factor-alpha pathway. J Immunother. 査読有 33: 2010: 467-474.

〔学会発表〕 (計 12 件)

- 1) Nakano M, Nakagawa R, Saeki C, Oikawa T, Takahashi H, Homma S, Zeniya M. Activated NKT cells producing interferon-gamma potentiate cytotoxic T cell-mediated autoimmune hepatic inflammation. 59th American Association of Liver disease Liver Meeting, Nov 7th, 2011, San Francisco
- 2) 西田純幸、小井戸薫雄、原 一馬、森本創世子、坪井昭博、本間 定、武田裕、込田英夫、永野浩昭、岡 芳弘、大草敏史、田尻久雄、杉山治夫. 膵癌に対するゲムシタピン併用WT1 ペプチドワクチン療法の臨床効果と免疫誘導. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2012 年 10 月 5 日、名古屋
- 3) カン シン、木村幸乃、塚田 旬、吉崎慎二、石田尾武文、岡本正人、本間 定、小井戸薫雄、恒富亮一、吉村 清、裕 彰一、岡 正朗. 化学療法剤による癌細胞の免疫感受性の増強. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2012 年 10 月 4 日、名古屋
- 4) 本間 定、佐川由紀子、伊藤正紀、永崎栄次郎、高原映崇、込田英夫、小井戸薫雄. iPS細胞から腫瘍血管を標的とした癌ワクチンの開発. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2012 年 10 月 3 日、名古屋
- 5) 本間 定、佐川由紀子、伊藤正紀、永崎栄次郎、高原映崇、込田英夫、小井戸薫雄. iPS細胞から腫瘍血管を標的とした癌ワクチンの作製. 第 15 回日本がん免疫学会総会. 2011 年 7 月 1 日.大阪
- 6) 中野真範、中川 良、佐伯千里、及川恒一、高橋宏樹、本間 定、田尻久雄、銭谷幹男. 自己免疫性肝障害を惹起す

る自己反応性CD8+T細胞の活性化と肝内誘導には肝内活性化NKT細胞が関与する. 第 4 7 回日本肝臓学会総会. 2011 年 6 月 3 日、東京

- 7) 本間 定、小井戸薫雄、込田英夫、高原映崇、大草敏史、西田純幸、武田 裕、岡 芳弘、伊藤壽記、坪井昭博、杉山治夫. 膵癌に対するWT1 ペプチド免疫療法. 第 48 回日本癌治療学会学術集会、パネルディスカッション「WT1 ペプチドがん免疫療法の現状と将来」2010 年 10 月 29 日、京都
- 8) 西田純幸、武田 裕、小井戸薫雄、岡 芳弘、込田英夫、本間 定、大草敏史、森正樹、土岐祐一郎、川瀬一郎、田尻久雄、杉山治夫. 切除不能・再発進行膵臓癌に対するゲムシタピン併用WT1 ペプチドワクチン療法 第 1 相臨床試験. 第 6 9 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 24 日、大阪
- 9) 小井戸薫雄、本間 定、込田英夫、高原映崇、大草敏史、田尻久雄. 臨床応用に向けた樹状細胞と膵癌細胞との融合膵癌ワクチン. 第 6 9 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 24 日、大阪
- 10) 本間 定、佐川由紀子、高原映崇、永崎栄次郎、込田英夫、伊藤正紀、小井戸薫雄. 抗腫瘍免疫反応により産生されるインターフェロンガンマはゲムシタピン活性化酵素の発現を上昇させる. 第 6 9 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 24 日、大阪
- 11) 本間 定、高原映崇、小井戸薫雄. 進行膵癌に対するWT1 ペプチドワクチンと塩酸ゲムシタピンの併用効果のメカニズム. 第 19 回日本癌病態治療研究会、シンポジウム「癌免疫療法の最前線」2010 年 7 月 1 日、東京
- 12) 本間 定、高原映崇、小井戸薫雄. 進行膵癌に対するWT1 ペプチドワクチンと塩酸ゲムシタピンの併用効果のメカニズム. 日本消第 96 回化器病学会総会、ワークショップ「消化器がんにおけるがんワクチン療法に臨床的エビデンスはあるのか」2010 年 4 月 22 日、新潟

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 定 (HOMMA SADAMU)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50192323

(2) 研究分担者

小井戸 薫雄 (KOIDO SHIGEO)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70266617

伊藤 正紀 (ITO MASAKI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：80297366