

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501291

研究課題名(和文)再生医学的手法を取り入れた新しいがん免疫細胞療法の開発

研究課題名(英文)A new strategy for tumor immunotherapy using cell reprogramming technology

研究代表者

和田 はるか(Wada, Haruka)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師

研究者番号：70392181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：集学的治療法の進歩によりがんの治療成績は向上しているが、新たな視点からのがん治療法の開発が待ち望まれている。申請者は、近年開発された細胞リプログラミング技術を従来の腫瘍免疫療法に取り入れ、魅力的な新規腫瘍免疫療法を開発できないかと考えた。本研究では、白血病等に対する造血幹細胞移植後の再発例に対し、がん免疫細胞療法の一つであるドナーリンパ球輸注(DLI)療法をモデルとし、細胞リプログラミング技術を応用した新規DLI療法をマウスに施行したところ、治療回数に応じて生存期間が延長し、本コンセプトの有効性が確認できた。一方で奏効機序については、その一端が明らかになったのみであり、更なる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Outcomes of tumor treatment have been improved by development of multidisciplinary treatment. But, innovative tumor treatment strategy is eagerly anticipated. We proposed new strategy for tumor immunotherapy using cell reprogramming technology. In this study, we combined donor lymphocyte infusion (DLI) therapy and cell reprogramming technology. To do new DLI therapy, iPS cells are established from bone marrow donor cells. Usually, DLI treatment need donor lymphocyte on every treatment course, but this novel strategy make possible to do a continuous DLI treatment independent of lymphocyte donor. Then, it make possible to obtain T cell for DLI therapy every time you need. To test this concept, we established mice therapeutic model for leukemia relapse after bone marrow transplantation, and then we applied this new DLI treatment for this mice model. The mice survival were prolonged significantly depending on treatment frequency. It need more analysis to understand the response mechanisms.

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍免疫学

キーワード：T細胞 iPS細胞 再生医学的手法 分化誘導 細胞リプログラミング 腫瘍免疫療法

1. 研究開始当初の背景

iPS細胞作製技術の開発(Takahashi K. et al., Cell. 2006他)により、再生医療の現実化がより身近なものとして感じられるようになり、国内外を問わず世界中でiPS細胞を用いた新しい医療の創造が期待されている。私も、自身のこれまでの研究背景をふまえ更に細胞リプログラミング技術/iPS細胞を取り入れて新たな研究を展開できないかと考え研究活動に取り組んできた。近年、がんの治療法として免疫細胞療法が注目されているが、本研究では、再生医学的手段を取り入れた多面的アプローチにより、奏功力のある新規がん免疫細胞療法の可能性をマウスモデルで示し、次世代腫瘍免疫療法の開発に繋がりたいと考えた。

2. 研究の目的

集学的治療法の進歩により、がんの治療成績は確実に向上している。しかしながら、さまざまな手を尽くしても治療が困難となってしまうがん難民もいまだ数多く存在し、新たな視点からの画期的ながん治療法の開発が待ち望まれている。

申請者は、近年開発された細胞リプログラミング技術という再生医学的手法を従来の腫瘍免疫療法に取り入れることで、新しく魅力的な新規腫瘍免疫療法を開発できると考えた。本研究ではその有効性をマウスモデルで検証し、次世代腫瘍免疫療法の開発に繋げる。

本研究の特色は、従来のがん免疫療法の概念に加え近年開発された細胞リプログラミング技術を組み合わせ、新しいがん免疫療法の可能性を提示することにある。

造血幹細胞/T細胞を枯渇することなく半永久的に維持できる技術は現在のところ存在しない。その点、iPS細胞は半永久的に維持・保存可能であり、持続可能ながん免疫療法を提供することのできる魅力的な細胞資源である。抗原特異的な末梢T細胞を増やす方法として、IL-2等のサイトカインで増幅する方法がとられているが、T細胞が疲弊状態となり本来の機能を十分に発揮できていないのではないかという危惧もある。iPS細胞からT細胞を分化誘導する場合、(IL-2を使用しなくとも)高い増殖能力をもつT前駆細胞という段階を経て成熟T細胞へと分化する(Wada H et al., Int Immunol. 2011)ことから、フレッシュな、いわゆる疲弊状態にはないT細胞を効率よく生産することが可能であるなどの利点があり、より一層の抗腫瘍効果も期待される。

(1) 再生医学的手段を取り入れた新規DLI療法の開発

白血病等に対する造血幹細胞移植後の再発予防や再発例に対し、がん免疫細胞療法の一つであるドナーリンパ球輸注(DLI)療法が行われている。DLI療法は、患者に対しアロであるドナーリンパ球のGVL(Graft versus Leukemia)効果を期待する治療法であり、再発予防や再発に対する治療法として大きく期待されている。しかし、大量の採血が必要である等ドナーに対して大きな負担がかかることや、ドナーから採血できなくなった場合には実施不可能となるなどの問題点もある。ドナー血液に依存せずにDLI療法を実施可能にする方法として、ドナー細胞をiPS細胞化して保存し、適宜T細胞へと分化誘導してDLI療法に使用するという方法を考えた。本研究では、DLI療法において再生医学的手段を取り入れることで「持続可能な新規がん免疫細胞療法」の開発が可能になると考え、その可能性について検証する。

(2) 抗原特異的T細胞受容体を導入したiPS細胞から作製したT細胞によるがん免疫細胞療法の開発

近年、腫瘍細胞に特異的な抗原が複数明らかにされてきており、その腫瘍抗原特異的なT細胞は強力な抗腫瘍活性を発揮しうるとして期待されている。しかしながら、通常腫瘍抗原特異的T細胞は生体内にごく僅かしか存在せず、採取・増幅は困難な場合が多いという問題点もかかえている。そこで申請者は、抗原特異的T細胞受容体を導入したiPS細胞を作製することにより、半永久的に抗原特異的なT細胞を供給し、治療へ向けた継続的な治療を行うことができると考えた。本研究では、抗原特異的T細胞受容体を導入したiPS細胞を作製し、そのiPS細胞から誘導したT系列細胞による抗腫瘍効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 当研究のコンセプト(図1)の有効性を示す目的で、骨髄移植後白血病再発マウスモデル系を構築する。このマウスモデルにおけるDLI療法の評価により、iPS細胞より誘導したT系列細胞によるDLI療法の効果の検討および改良を図る。iPS細胞より誘導したT細胞の詳細な解析により、より効率的な抗腫瘍効果の発揮につなげる。

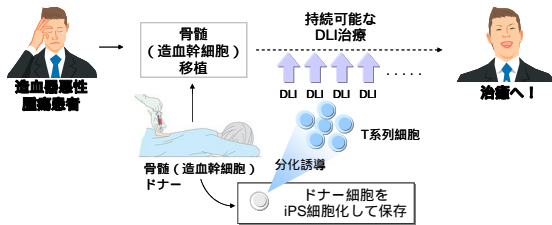


図1 再生医学的手法を取り入れた新しい腫瘍免疫療法の一例

(2) 抗原特異的 T 細胞受容体遺伝子を導入した iPS 細胞を作製し、その iPS 細胞を分化誘導することで抗原特異的 T 系列細胞を誘導する。また、その特異抗原を発現する腫瘍細胞株に対する抗腫瘍活性を測定する。

4. 研究成果

(1) 再生医学的手段を取り入れた新規 DLI 療法の開発

iPS 細胞由来 T 細胞の抗腫瘍効果の検討 (DLI マウスモデルの検討)
線維芽細胞由来 iPS 細胞を T 細胞へ分化誘導し、生成した T 細胞を骨髄移植後白血病再発マウスモデルに DLI 治療細胞として 1 回、あるいは 2 回移入(治療)した。無治療群では、全てのマウスが 30 日以内に死亡するのに対し、治療群では、治療回数依存的に有意に延命効果が認められることがわかった。

DLI 療法の奏効機序に関する検討
- アロ反応性に関する検討 -

DLI 療法が奏効する機序としては、移入した細胞によるアロ反応性によるものが考えられている。そこで、白血病マウスモデルにおいて DLI 療法に用いた細胞、つまり iPS 細胞から誘導した T 細胞のアロ反応性についてリンパ球混合試験にて検討した。iPS 細胞由来 T 細胞は、予想通り同種同系細胞には増殖反応を示さなかった。一方で、同種異系細胞に対しても反応性を示さなかった。よって、本研究でマウスモデルに適用した DLI 療法の奏効機序は、移入細胞のアロ反応性によるものではない可能性が示唆された。

DLI 療法の奏効機序に関する検討
- 免疫細胞組成に与える影響の検討 -

DLI 療法の奏効メカニズムに関して、何らかの機序により免疫細胞組成が変化し、奏効に寄与している可能性を考えた。DLI 施行後、レシピエント CD8+ 細胞傷害性 T 細胞が有意に増加していることを確認した。NK 細胞比率も増加傾向にあり、DLI 療法の奏効性に寄与している可能性が考えられた。しかしながら、DLI 施行後 13 日目の解析で、マウス体内に存在する T 細胞は脾臓細胞中の 1% 未満であり、

奏効機序については更に精査する必要があると考えている。

(2) 抗原特異的 T 細胞受容体を導入した iPS 細胞から作製した T 細胞によるがん免疫細胞療法の開発

OT-1 / 遺伝子導入 iPS 細胞の作製
レンチウイルスにより OT-1 / 遺伝子導入 iPS 細胞の作製を実施した。OT-1 / 遺伝子が iPS 細胞に導入されていることは、ゲノム PCR により確認した。

OT-1 / 遺伝子導入 iPS 細胞からの T 細胞分化誘導と OT-1 / の発現解析
OT-1 / 遺伝子導入 iPS 細胞を in vitro で T 細胞へと分化誘導すると、T 細胞は生成したものの、生成した細胞において OT-1 / の発現はみられなかった。ES 細胞や iPS 細胞では、外来遺伝子がサイレンシングされる現象が知られている。本研究では CMV プロモーター駆動性に OT-1 / を発現させるレンチウイルスベクターを使用した。iPS 細胞内で CMV プロモーターが半不可逆的にサイレンシングされた可能性があり、本研究のように iPS 細胞等において人為的な遺伝子発現誘導を期待する際にはプロモーター選択を精査する必要がある。

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3件)

1. Mouse models of human INAD by Pl1a2g6 deficiency.

Wada H, Kojo S and Seino K.

Histol Histopathol. 28(8):965-9. 2013 査読有

2. Side population is increased in paclitaxel-resistant ovarian cancer cell lines regardless of resistance to cisplatin.

Kobayashi Y, Seino KI, Hosonuma S, Ohara T, Itamochi H, Isonishi S, Kita T, Wada H, Kojo S, Kiguchi K.

Gynecol Oncol. 121(2):390-4. 2011 査読有

他1件

〔学会発表〕(計21件)

1. A novel methodology of immune regulation using pluripotent stem cells
Kudo Hiroya, Sasaki Hajime, Wada Haruka,
Kojo Satoshi, Chikaraishi Tatsuya and
Seino Ken-ichiro

15th International congress of immunology,
Milan, Aug. 22-27. 2013

2. 多能性幹細胞を用いた免疫制御研究
工藤浩也、和田はるか、香城 諭、力石辰也、
清野研一郎

第12回日本再生医療学会、横浜、2013年3月21-23日

3. 多能性幹細胞を用いた新しい免疫制御研究

KUDO Hiroya, WADA Haruka, KOJO Satoshi,
Tatsuya Chikaraishi, SEINO Ken-ichiro
第41回日本免疫学会、神戸、2012年12月5-7日

4. iPS細胞テクノロジーを利用した新規免疫細胞療法開発の取り組み

New approach in tumor immunotherapy using
iPS cell technology

WADA Haruka, KOJO Satoshi, HOSOI Akihiro,
KAKIMI Kazuhiro, SEINO Ken-ichiro

第40回日本免疫学会、幕張、2011年11月27-29日

5. iPSテクノロジーを導入した新しいがん免疫細胞療法の確立に向けた取り組みと現状

和田はるか、細井亮宏、垣見和宏、清野研一郎

第15回がん免疫学会、大阪、2011年6月30日-7月1日

他16件

〔図書〕(計4件)

1. 再生医療事業の課題解決のための手引書
情報技術協会刊

iPS細胞からの免疫細胞分化誘導
和田はるか、工藤浩也、清野研一郎 216-218
2013年

2. 再生医療普及のための基盤技術：再生医療における免疫制御

佐々木元、和田はるか、清野研一郎
最新医学社 187-192 2013年

3. 移植と免疫

工藤浩也、和田はるか、清野研一郎
Medicina 50巻3号 416-418 2013年

4. 細胞治療による免疫寛容の誘導

工藤浩也、和田はるか、清野研一郎
今日の移植 25(4):293-300 2012年

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

(1) ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/Immunobiology-Web/Home.html>

(2) アウトリーチ活動

2012年北海道大学遺伝子病制御
研究所一般公開参加
2013年北海道大学遺伝子病制御
研究所一般公開参加

6. 研究組織

(1) 研究代表者 和田 はるか

(Wada Haruka)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師
研究者番号：70392181

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者 清野 研一郎

(Seino Ken-ichiro)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授
研究者番号：20390117