

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591874

研究課題名(和文) iPS細胞由来樹状細胞/癌幹細胞融合ワクチンを用いた新規的癌免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of the new cancer immunotherapy using fusion cell-vaccine of iPSDC and cancer stem cell

研究代表者

中村 公紀(Nakamura, Masaki)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80364090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は腫瘍抗原遺伝子(TAA)導入iPS細胞由来DCs(iPSDCs)を分化誘導し、従来の骨髄細胞由来DCs(BMDCs)と比較し、その抗腫瘍効果を検討した。【方法】マウスiPS細胞からTAA遺伝子導入DCsを分化誘導し、抗原提示細胞としての機能を比較検討した。抗腫瘍効果については、51Cr-release assayおよび皮下腫瘍モデルで評価した。【結果】TAA遺伝子導入iPSDCsは、BMDCsと同等の抗原提示細胞としての機能を認め、抗腫瘍効果においても同等であった。【結語】iPSDCsはBMDCsと同等の機能、抗腫瘍効果を認め、今後、臨床応用の可能性が期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：It is generally accepted that the difficulty in obtaining a sufficient number of functional dendritic cells (DCs) is a serious problem in DC-based immunotherapy. We used the induced pluripotent stem (iPS) cell-derived DCs (iPSDCs). In this study, we examined the capacity of iPSDCs compared with that of bone marrow-derived DCs (BMDCs). We adenovirally transduced the hgp100 gene into DCs and immunized mice once with the genetically modified DCs. The cytotoxic activity of CD8 (+) cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and the therapeutic efficacy of the vaccination were assayed. Our results showed that hgp100-specific CTLs exhibited as high a level of cytotoxicity as BMDCs. Moreover, vaccination with the genetically modified iPSDCs achieved as high a level of therapeutic efficacy as vaccination with BMDCs. This study clarified experimentally that iPSDCs have an equal capacity to BMDCs. This vaccination strategy may therefore be useful for future clinical application as a cancer vaccine.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：iPS細胞 樹状細胞 癌免疫療法

1. 研究開始当初の背景

我々は、以前より癌特異的ワクチン療法として、樹状細胞療法の有用性を報告してきた。樹状細胞(dendritic cell ; DC)は強力な抗原提示能を有し、効率的にT細胞を活性化し、微弱な免疫応答を賦活することができる。したがって、DCは癌免疫療法においては極めて重要な tool であり、樹状細胞療法は特異的に癌細胞を攻撃する非常に有用な癌治療法の一つである。しかし、樹状細胞療法の大きな問題点は、細胞量の確保であり、臨床応用した場合、DCは、末梢白血球中の単球(モノサイト)をGM-CSF等のサイトカインを加えて培養し分化誘導することにより作製され、末梢血単球は体外で増殖させることができないため、樹状細胞治療に必要な数を得るためには、大量の血液をアフエーシス(成分採血)処理することにより得られた白血球中から単球を分離する必要がある。つまり、末梢血単球由来のDCを用いる方法は、ドナーの負担と細胞供給の不安定性という問題があり、その臨床的有効性が確認されたとしても、医療技術として広く普及するのは非常に困難であると予想される。そこで無限増殖能を有する人工多能性幹細胞(iPS細胞)を材料としてDCを作製することが可能になれば、細胞ドナーへ負担をかけることなく必要な数のDCを作製できるようになると考えた。

2. 研究の目的

われわれはiPS細胞由来DCs(iPSDCs)が従来の骨髄細胞由来DCs(BMDCs)と、抗原提示細胞(APC)として同等の機能を有し、同等の抗腫瘍効果を示すならば、現在のDCsワクチン療法の問題を解決し、大きく進歩できると考えた。

本研究ではマウスiPS細胞から腫瘍抗原遺伝子(TAA)遺伝子導入DCsを分化誘導し、APCとしての機能を、従来のBMDCsと比較検討した。抗腫瘍効果については、⁵¹Cr-release assayおよび皮下腫瘍モデルで評価した。

3. 研究の方法

(1)マウスiPSDCsの分化誘導

マウスiPS細胞(iPS-MEF-Ng-20D-17)を4ステップでiPSDCsへ分化誘導した。第1はiPS細胞を、MEM培地上で、OP9細胞をfeeder細胞として培養する。第2は、7日目に細胞を回収し、それらの細胞を、2ME、rmGM-CSFを含むMEM培地上で、新たなOP9細胞をfeeder細胞として培養する。第3は、14日目に浮遊細胞を回収し、rmGM-CSF、を含む完全培地上で培養する。第4は、26日目に浮遊細胞を回収し、新たなrmGM-CSF、rmTNF-を含む完全培地上で培養する。28日目に浮遊細胞を回収する。

(2)iPSDCsとBMDCsのAPCとしての機能の評価

成熟能の比較検討

iPSDCsとBMDCsの成熟能を比較検討するた

めに、それぞれの未成熟、成熟DCsにて表面マーカーの発現(CD11c、CD80、CD86、MHC class)をflow cytometryにて比較検討した。

サイトカイン分泌能の比較検討

iPSDCsとBMDCsのサイトカイン分泌能を比較検討するために、それぞれの未成熟、成熟DCsにてサイトカインの分泌(IL-12、IFN-)をELISA法にて比較検討した。

遊走能の比較検討

iPSDCsとBMDCsの遊走能を比較検討するために、adenovirus vectorでgp100遺伝子導入したそれぞれのDCsにPKH67で蛍光標識して、マウス(C57BL/6(H-2b))の右下腹部に皮下投与し、3日後に所属リンパ節(鼠径リンパ節)を回収した。回収したリンパ節は凍結切片を作成し、HE染色したものと比較して、蛍光顕微鏡にて観察した。さらにホモジナイズしたものをflow cytometryにて比較検討した。

(3)TAA遺伝子導入iPSDCsとBMDCsの抗腫瘍効果の評価

In vitroによる比較検討

それぞれDCsをワクチン投与した際のgp100特異的細胞障害性T細胞(CTLs)の誘導能を比較検討するために、gp100遺伝子導入したそれぞれのDCsをマウスに皮下投与し、14日後に脾臓を回収した。そして抽出した脾細胞をB16細胞(gp100(+))と、5日間共培養した。これにより得られた細胞をMACSにてCD8(+)CTLsを注出した。これをB16細胞、MC38細胞、YAC-1細胞で、⁵¹Cr-release assayにて特異的細胞障害活性を解析した。

In vivoによる比較検討

それぞれDCsをワクチン投与した際の腫瘍増殖抑制効果を比較検討するために、gp100遺伝子導入したそれぞれのDCsを、B16皮下腫瘍モデルマウスに皮下投与し、皮下腫瘍の大きさを継時的に測定し解析した。

4. 研究成果

(結果)

(1)マウスiPSDCsの分化誘導(Fig1A)

接着細胞であるiPS細胞をプロトコールで培養すると、第2ステップの終わりの14日目には、明るく、小さい、類縁形の浮遊細胞が得られた。さらに第3ステップの終わりの26日目には、一部に突起の様な不整な部位を有する未成熟iPSDCsが得られた。そして第4ステップの終わりの28日目には、従来のBMDCsと同様に、強力な樹状突起を有する成熟iPSDCsが得られた。

(2)iPSDCsとBMDCsのAPCとしての機能の評価

成熟能の比較検討(Fig1B)

iPSDCsはBMDCsと同様に、TNF-で成熟し、CD80、CD86、MHC classの発現の同程度の上昇を認めた。

サイトカイン分泌能の比較検討(Fig1C)

IL-12、IFN-共に、iPSDCs、BMDCs両方で、成熟化により、有意なサイトカインの分泌の

上昇を認めた ($p < 0.001$)。またそれぞれの成熟 DCs のサイトカイン分泌能に有意な差は認められなかった ($p > 0.05$)。

遊走能の比較検討 (Fig2A, B)

回収した所属リンパ節を凍結標本にして、薄切したものと、それをさらに HE 染色したものを、蛍光顕微鏡で観察すると、gp100 遺伝子を導入したそれぞれの DCs どちらでも、遊走してきた、蛍光標識された DCs を皮質周囲などで認めた。また回収した所属リンパ節をホモジナイズし、PBS で再懸濁したものをフローサイトメトリーで解析すると、コントロールとして用いた、治療していないマウスのリンパ節と比較して、PHK67 陽性細胞の比率は、PBS 群が 3.0% であるのに対し、BMDCs-gp100 群が 11%、iPSDCs-gp100 群が 9.9% であった。

(3) TAA 遺伝子導入 iPSDCs と BMDCs の抗腫瘍効果の評価

In vitro による比較検討 (Fig3A)

B16 細胞 (gp100(+)) では、gp100 遺伝子を導入したそれぞれの DCs 群では他の 3 群に比べ有意に高い細胞障害活性を認めたが ($p < 0.001$)、これらの DCs 群の間には有意差は認めなかった。一方 MC38 細胞や YAC-1 細胞では、5 群間に有意な差は認めなかった ($p > 0.05$)。

In vivo による比較検討 (Fig3B)

gp100 遺伝子を導入したそれぞれの DCs 群では他の 3 群に比べ有意に高い腫瘍増殖抑制効果を認めたが ($p < 0.001$)、これらの DCs 群の間には有意差は認めなかった ($p > 0.05$)。

Fig1.

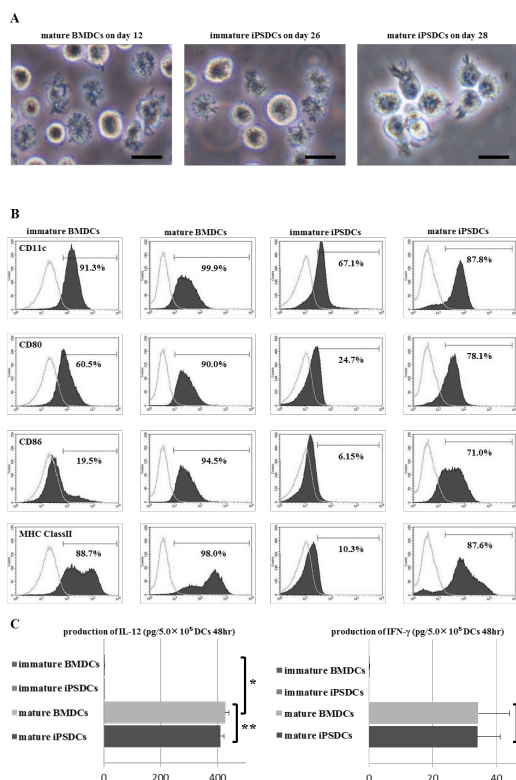


Fig2.

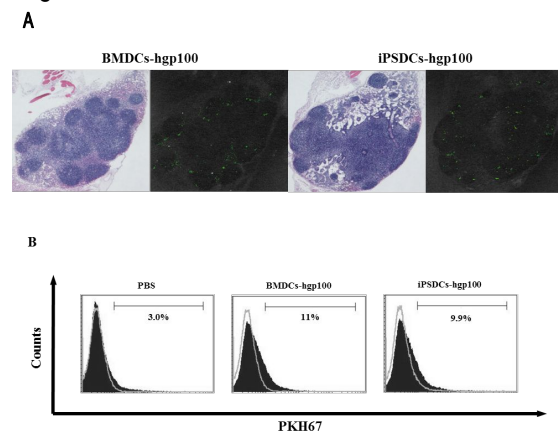
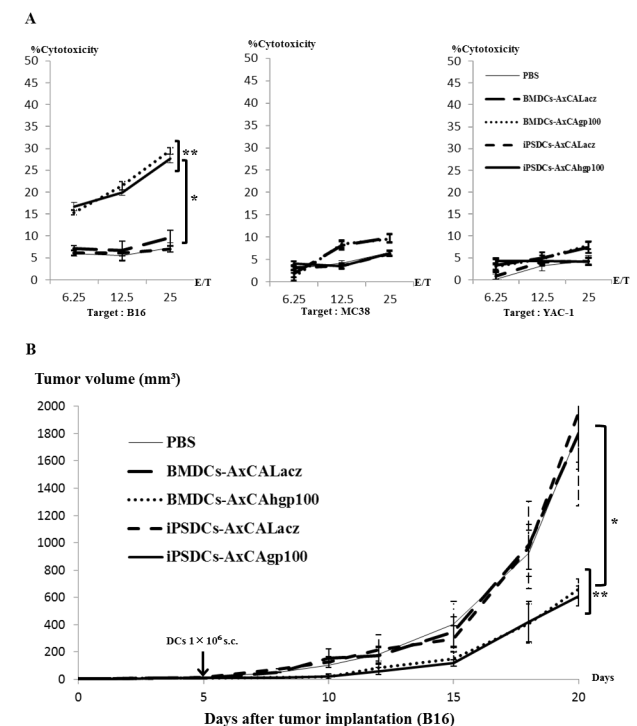


Fig3.



(得られた成果と今後の展望)

今回のわれわれの研究により、iPSDCs は、従来の BMDCs と、APC として同等の機能を有し、同等の抗腫瘍効果を有することが分かった。千住らは、DNA microarrays で iPSDCs と BMDCs の遺伝子発現プロファイルはほぼ同じであると報告している。今回の結果により、遺伝子のみならず、機能も同等であることが証明され、iPSDCs が naive DCs の代わりとなることを確定させたと考える。これにより iPSDCs という、十分な量の、機能的な DCs を得ることができ、DCs ワクチン療法の研究を大きく前進させることができる。そしてその先に臨床応用を目指し、究極のテーラーメイド治療である、TAA 遺伝子導入 iPSDCs ワクチン療法を目指す。具体的には、患者の体細胞から iPS 細胞を作成し、次に TAA 遺伝子を、iPS 細胞に導入する。そしてその遺伝子導入された、iPS 細胞を iPSDCs に分化誘導し、最

最終的には、この iPSDCs をワクチン投与する。そのため今後は、まずトランスジェニックマウスを用いたプレクリニカルスタディーに取り組み、次に人への応用へと研究を進めて行く予定である。

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2件)

1: Iwamoto H, Ojima T, Hayata K, Katsuda M, Miyazawa M, Iida T, Nakamura M, Nakamori M, Iwahashi M, Yamaue H. Antitumor immune response of dendritic cells(DCs) expressing tumor-associated antigens derived from induced pluripotent stem cells: in comparison to bone marrow-derived DCs. Int J Cancer. 査読有 2014; 134(2):332-41. doi: 10.1002/ijc.28367.

2: Iwamoto H, Ojima T, Nakamori M, Nakamura M, Hayata K, Katsuda M, Iida T, Miyazawa M, Iwahashi M, Yamaue H. Cancer vaccine therapy using genetically modified induced pluripotent stem cell-derived dendritic cells expressing the TAA gene. Gan To Kagaku Ryoho. 査読有 2013; 40(12):1575-7.

[学会発表](計6件)

1. 岩本博光、尾島敏康、早田啓治、勝田将裕、宮澤基樹、飯田 武、中村公紀、中森幹人、北谷純也、山上裕機；腫瘍抗原(TAA)遺伝子導入 iPS 細胞由来樹状細胞(iPSDC)癌ワクチン療法。第 114 回日本外科学会。2014 年 4 月 4 日、京都

2. 岩本博光、尾島敏康、中森幹人、中村公紀、早田啓治、勝田将裕、飯田 武、宮澤基樹、岩橋 誠、山上裕機；腫瘍抗原(TAA)遺伝子導入 iPS 細胞由来樹状細胞(iPSDC)を用いた癌ワクチン療法。第 68 回日本消化器外科学会。2013 年 7 月 18 日、宮崎

3. 岩本博光、尾島敏康、中森幹人、中村公紀、早田啓治、勝田将裕、飯田 武、宮澤基樹、岩橋 誠、山上裕機；腫瘍抗原(TAA)遺伝子導入 iPS 細胞由来樹状細胞(iPSDC)を用いた癌ワクチン療法。第 34 回癌免疫外科研究会。2013 年 5 月 16 日、岡山

4. 岩本博光、尾島敏康、岩橋 誠、中森幹人、中村公紀、早田啓治、勝田将裕、飯田 武、宮澤基樹、山上裕機；腫瘍抗原(TAA)遺伝子導入 iPS 細胞由来樹状細胞(iPSDC)癌ワクチン療法の可能性の探究。第 113 回日本外科学会。2013 年 4 月 13 日、福岡

5. 岩本博光、尾島敏康、中森幹人、中村公紀、早田啓治、勝田将裕、飯田 武、宮澤基樹、山上裕機；iPS 細胞由来樹状細胞(iPSDCs)～その実力はいかに～。第 25 回日本バイオセラピー学会。2012 年 12 月 13 日、倉敷

6. Iwamoto H, Ojima T, Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Hayata K, Katsuda M, Iida T, Miyazawa M, Yamaue H; Cancer vaccine therapy using genetically modified DCs derived from iPS cells expressing tumor-associated antigens. 第 71 回日本癌学会。2012 年 9 月 19 日、札幌

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 公紀 (Nakamura Masaki)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：80364090

(2) 研究分担者

山上 裕機 (Yamaue Hiroki)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：20191190

岩橋 誠 (Iwahashi Makoto)
和歌山県立医科大学・医学部・研究員
研究者番号：70244738

中森 幹人 (Nakamori Mikihiro)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：10322372

尾島 敏康 (Ojima Toshiyasu)

和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：60448785

(3)連携研究者
()

研究者番号：