

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 20日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012年

課題番号：23790446

 研究課題名（和文）癌幹細胞を標的とした新規GM-CSF遺伝子導入iPS細胞ワクチン療法の開発
 研究課題名（英文）Development of novel cancer cell vaccine using GM-CSF gene-transduced
 IPS cells targeting cancer stem cells

研究代表者

井上博之（INOUE HIROYUKI）

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：80529967

研究成果の概要（和文）：GM-CSF遺伝子導入iPSワクチン(iPS/GM-CSF)細胞をSeVベクター感染及び放射線照射により作成し、十分量のGM-CSFの産生を確認した。iPS/GM-CSF細胞は、非導入iPS細胞と同様の形態学的所見及び幹細胞関連マーカー発現しており、幹細胞性の維持が示唆された。低免疫原性マウス（LLC）担癌同系マウスモデルにおいてiPS/GM-CSF細胞ワクチン投与群において、対照群と比較し有意な予防的及び治療的抗腫瘍効果が認められた（ $p < 0.05$ ）。同治療経過中、体重減少や肝腎機能障害等の重篤な有害事象を認めなかった。また、免疫担当細胞欠失実験よりCD4陽性T及びCD8陽性T細胞の関与を明らかにした。以上より、同療法の新規癌免疫療法としての有望性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Our results of *in vitro* assays demonstrated that non-transmissible recombinant Sendai virus-mediated mouse GM-CSF gene transfer to iPS (iPS/GM) cells was effective to produce abundant GM-CSF *in vitro* (200～ng/10⁶ cells/24 hrs) and iPS/GM-CSF cells maintained their stemness in terms of morphology and antigenicity as evidenced by the expression levels of SSEA-1, Oct3/4 and alkaline phosphatase similar to those seen in unmodified iPS cells. Our results of *in vivo* studies using immunocompetent mice demonstrated that mice treated with both prophylactic and therapeutic vaccination using irradiated iPS/GM-CSF (ir.iPS/GM-CSF) cells significantly suppressed the tumor growth of subcutaneously transplanted syngeneic LLC mouse poorly immunogenic lung cancer in the left flank. Of note, during these treatments described above, no serious adverse events were observed with lack of liver and kidney dysfunctions as evidenced by biochemical analysis as well as absence of loss of body weight, suggesting its relative tolerability of use of iPS cells as vaccine cells. Furthermore, *in vivo* depletion assays showed that the antitumor effect observed in mice treated with ir.iPS/GM-CSF cells was significantly abrogated by depleting CD4+T or CD8+T cells, demonstrating its partial dependence on T cell-mediated cellular antitumor immunity. In conclusion, this is the first report that demonstrated a therapeutic antitumor efficacy of normal fibroblast-derived iPS cell vaccines including iPS/GM cells, providing possible implications that these novel vaccine strategy using iPS cells could induce CSCs associated antigens-specific antitumor immunity and be a promising prophylactic or therapeutic anticancer modality.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：癌幹細胞、iPS細胞、腫瘍免疫療法、GM-CSF、遺伝子治療、肺癌

1. 研究開始当初の背景

腫瘍発生あるいは再発の原因として考えられる少数の癌幹細胞に対する治療戦略が固形癌治療において極めて重要であると考えられている。胚性幹 (ES) 細胞は、いわゆる癌幹細胞とも共通する幹細胞関連抗原を発現し、癌幹細胞を標的とした有効性が期待できる。しかし ES 細胞を用いた場合、使用による倫理的課題が問題となり得る。近年、ES 細胞に極めて類似した遺伝子発現様式を有する人工多能性幹 (iPS) 細胞が、体細胞に初期化因子遺伝子を導入することにより樹立可能となった。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では癌幹細胞関連腫瘍抗原を標的とした新規 iPS 細胞ワクチン療法の *in vivo* 担癌マウスモデルにおける有効性 (抗腫瘍効果) 及び安全性を検討した。さらに、その抗腫瘍効果誘導メカニズムを明らかにするため免疫担当細胞欠失実験及びの同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞への遺伝子導入後の導入効率の確認、iPS ワクチンの作成

遺伝子導入ベクターとして、DनावEC 社 (Tsukuba, Japan) より購入した F 因子欠損非伝播型組換えセンダイウイルスベクター (SeV/ΔF/GFP、力価 : 1.2×10^{10} CIU/ml, SeV/ΔF/GM-CSF、力価 : 1.6×10^{10} CIU/ml) を使用した。これらのウイルスベクターは Sendai virus を基本骨格とし、F 因子を欠失し NP 遺伝子上流に GFP あるいはマウス GM-CSF cDNA を挿入した遺伝子組換えセンダイウイルスである。iPS 細胞は 12~18 回程度継代を繰り返し、MEF 上でおよそ直径 100 μm のコロニーを形成した状態のものを使用した。培養プラスチック底面を PBS で洗浄し、0.5g/L-Trypsin で 5 分間処理後、10%FBS/DMEM に希釈し、コロニーを単細胞状に分離した細胞浮遊液を調製した。浮遊液は、0.1%ゼラチンコート上に播種後、15% FBS/LIF/DMEM を用いて 37°C、5.0% CO₂ 条件下にて 30 分間培養し、異なる細胞接着性を利用して MEF と iPS 細胞を分離した。30 分後 iPS 細胞が浮遊する上清を回収し遠心 (1000 rpm, 5 min., 4°C) した。回収した iPS 細胞を 1000 units/mL LIF を加えたマウス ES 細胞用無血清培地 STEM Medium にて各感染力価 (MOI : Multiplicity of Infection) に調整した SeV/ΔF/GFP ウイルス希釈液 (MOI=1, 3, 10, 30 及び 100) 100 μl に懸濁し、90 分間培養した。0.1%ゼラチンコート上もしくは MEF 上に播種した。上記方法による遺伝子導入より

24 及び 48 時間後、iPS/GFP 細胞を回収し、FACS Buffer (1%FBS in PBS) で 1 回洗浄後、フローサイトメトリー法により解析した。これらの結果は FlowJo Software Version 7.6 を用いて解析した。また、GFP 遺伝子導入 iPS 細胞を蛍光顕微鏡によって観察、撮影した。同様に、iPS 細胞への GM-CSF 遺伝子導入時は、センダイウイルスベクター (SeV/ΔF/GM-CSF) を用いて上記と同様に、MOI=0, 1, 10 及び 100 の感染条件で行った。iPS 細胞ワクチン作製の際、各非伝播型センダイウイルスベクター感染による遺伝子導入より 24 時間後、20 Gy の γ 線照射を行い、細胞増殖を抑制した。照射には生体防御医学研究所所有ガンマセル装置を使用した。ELISA 法 : SeV/ΔF/GM-CSF 感染より 24 時間後の iPS/GM-CSF 細胞を γ 線照射し、γ 線照射細胞、γ 線非照射細胞のそれぞれ 24 時間後、48 時間後の上清 1 ml を回収し、上清中 GM-CSF 産生量を比較解析した。尚、放射線照射細胞においては 4 日後、6 日後における上清も回収した。マウス GM-CSF 産生量は、Mouse GM-CSF ELISA Ready SET Go!® を使用し添付プロトコールに従って定量測定を行った。

(2) GM-CSF 遺伝子導入 iPS (iPS/GM-CSF) 細胞の幹細胞維持の確認

フローサイトメトリー法: iPS 細胞及び iPS/GM-CSF 細胞における SSEA-1 発現定量には 1000 倍希釈 SSEA-1-mouse IgM を一次抗体、anti-mouse IgM-APC を二次抗体とし、抗体反応を行った。Sca-1 発現定量には 2000 倍希釈 anti-mouse Ly-6A/E (sca-1)-FITC を用い、氷中で 20 分抗体反応後、2%FBS/PBS にて 2 回洗浄した。細胞内在性 Oct-3/4 抗原定量には 1000 倍希釈 Oct-3/4 (C-10) - mouse IgG を一次抗体、1000 倍希釈 anti-mouse IgG-APC を二次抗体とした。また、抗体反応前に 4% PFA (Paraformaldehyde) 1 mL を iPS 細胞に添加し氷中で 20 分間反応させ固定後、PBS で 2 回洗浄し、0.3% Triton X-100 含有 PBS を加え室温で 20 分反応させ膜透過処理を行った。死細胞除去には 1000 倍希釈 PI (Propidium iodide) を使用し、上記抗体反応後、細胞サンプルをフローサイトメトリー法により解析した。FlowJo Software Version 7.6 もしくは Version 10.0 を用いて解析した。アルカリフォスファターゼ染色: 非遺伝子導入 iPS 細胞、遺伝子導入 iPS/GFP 及び iPS/GM-CSF 細胞 (MOI=1 及び 3) を 4 日間培養しコロニー形成確認後、Alkaline Phosphatase Kit (Sigma Aldrich Inc.) を用いてアルカリフォスファターゼ酵素活性を比較検討した。すなわち各種培養細胞を PBS で 2 回洗浄し、キット付属固定液を添加し 30 秒反応後、PBS で洗浄し、

Fast Violet B 及び Naphthol AS-MIX Phosphate を含む染色液を加え室温で1時間遮光条件にて静置し、PBS 洗浄後、光学顕微鏡にて観察し撮影した。

(3) in vivo 担癌マウスモデルにおけるγ線照射 iPS/GM-CSF ワクチンの予防的あるいは治療的抗腫瘍効果及び安全性の確認

予防ワクチン系：各種ウイルスベクターによる遺伝子導入(MOI=3)より24時間後に放射線照射した iPS 細胞、iPS/GFP 細胞あるいは iPS/GM-CSF 細胞を PBS にて 1×10^7 個/ml に調整し、1 ml シリンジを用いて 100 μ l ずつ C57 BL/6 系統マウス(メス)左側腹部に皮下接種した (1.0×10^6 個/マウス) (n=5-6/group)。ワクチン細胞は7日ごとに3回投与し、最後のワクチン接種より7日後に予め1週間培養後3代継代した LLC 細胞を回収し、 2×10^6 個/ml に調整し、100 μ l ずつマウス右側腹部(ワクチン細胞接種部位対側)に皮下接種した (2.0×10^5 個/マウス)。上記予防治療経過中の LLC 細胞接種より1-2日目に各マウス群の血清を回収し、Creatinine Kinase 及び ALT 値を血清生化学検査により測定した。
治療ワクチン系： 2.0×10^6 個/ml に調整した LLC 細胞を同系 C57 BL/6 マウス (メス) 右側腹部に 100 μ l (2.0×10^5 個/マウス) 皮下接種した。腫瘍接種から2日後と9日後、各種ウイルスベクター感染より24時間後に放射線照射 (20 Gy) した iPS 細胞 (ir.iPS)、iPS/GFP 細胞 (ir.iPS/GFP) あるいは iPS/GM-CSF 細胞 (ir.iPS/GM-CSF) を PBS にて 1.0×10^7 個/ml に調整し、上記と同様に 100 μ l ずつマウス左側腹部 (対側) に皮下接種した (1.0×10^6 個/マウス) (n=6 or 7/group)。同様の実験を3回施行した。治療経過中、形成された腫瘍は、測径器を用いて長径及び短径を実験終了まで1週間に3回の頻度で計測した。腫瘍体積は、長径×短径×短径×0.4 と定義し算出し、腫瘍の長径が 1.5 cm を超えた時点でマウスは安楽死させた。また、経過中の体重測定を行った。

(4) 治療ワクチン系抗腫瘍誘導効果に関わる免疫担当細胞同定実験

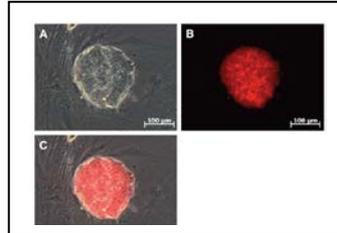
各免疫担当細胞除去実験：上記治療ワクチン系において LLC 細胞皮下接種前より各治療マウス群 (n=6/group) にマウス CD4 あるいは CD8 細胞の中和抗体を3日おきに継続的に腹腔内投与し腫瘍容積を測定し抗腫瘍効果に関与する免疫細胞を同定した。

4. 研究成果

(1) iPS 細胞への遺伝子導入後の導入効率の確認、iPS ワクチンの作成

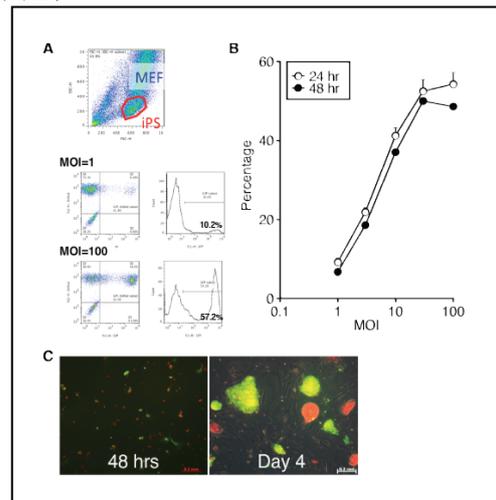
マウス iPS 細胞は単細胞状に分離継代後、マウス MEF 細胞との共培養後約3-4日目に3次元コロニーを形成し、赤色蛍光色素である DsRed の恒常的発現を確認した (図1)。

(図1)



iPS 細胞における SeV/ Δ F/GFP 感染による遺伝子導入効率を確認するため、SeV/ Δ F/GFP 感染より24時間後と48時間後、フローサイトメトリー法により DsRed 陽性 iPS 細胞中の GFP 陽性細胞の割合を算出した。その結果、SSC, FSC で2次元展開した際、iPS 細胞は FSC^{int} SSC^{low} 分画に最も多く存在した (図2A)。iPS 細胞分画に含まれない細胞集団はフィーダー細胞 MEF であると考えられた。iPS 細胞分画をさらに展開し、DsRed 陽性細胞中の GFP 陽性細胞の割合は、MOI=1 で約9%、MOI=30 で約50%以上と十分高い遺伝子導入効率を呈し、MOI=30 以上の遺伝子導入効率はプラトーに達した (図2B)。遺伝子導入より48時間後と4日後、蛍光顕微鏡観察においては DsRed/GFP 両陽性(黄色に染色)の iPS 細胞コロニーが確認できた (図2C)。

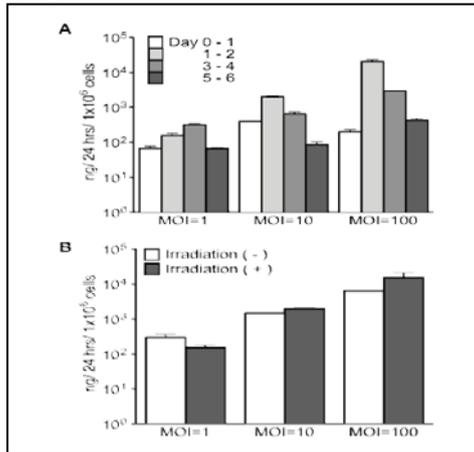
(図2)



次に、iPS 細胞への SeV/ Δ F/GM-CSF 感染による GM-CSF 遺伝子導入 (MOI=1, 10, 100) より24時間後にγ線照射した iPS/GM-CSF ワクチン細胞からの GM-CSF タンパク質産生量を ELISA 法により経時的 (24時間後、48時

間後、4 日後、6 日後) に定量解析した。その結果、iPS/GM-CSF ワクチン細胞は遺伝子導入 (MOI=1) より 24 時間後、69.1 ng/24 hrs/ 1×10^6 個、48 時間後、153.2 ng/24 hrs/ 1×10^6 個、4 日後、319.7 ng/24 hrs/ 1×10^6 個、6 日後、68.3 ng/24 hrs/ 1×10^6 個と十分量の GM-CSF 発現を認め、感染後 2 - 4 日目を最大とし、以降減少するものの発現が長期的に維持されることが明らかになった(図 3 A)。また、MOI 容量依存性に GM-CSF 発現量が増加する傾向を認めた。一方、20 Gy の γ 線照射による GM-CSF 産生量への影響を検討した結果、培養 2 日目における γ 線非照射 iPS/GM-CSF 細胞の 303.7 ng/24 hrs/ 1×10^6 個 (MOI=1) と比較し、 γ 線照射時産生量は 153.2 ng/24 hrs/ 1×10^6 個と軽度の低下を認めた(図 3 B)。先行論文より GM-CSF 遺伝子導入腫瘍ワクチン療法の抗腫瘍効果誘導に必要な至適 GM-CSF 産生量は 40~1500 ng/24 hrs/ 1×10^6 個とされており、MOI=1 以上で十分な GM-CSF 産生量と考えられた。

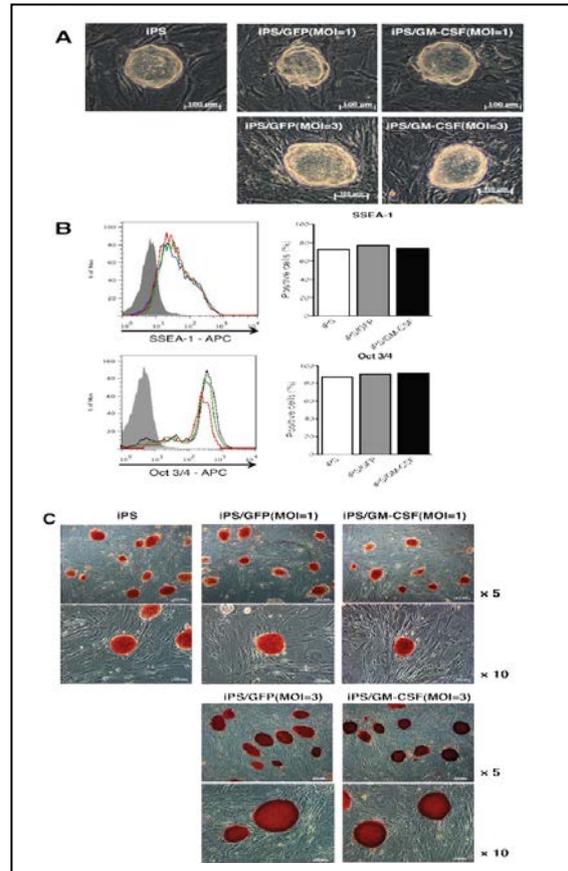
(図 3)



(2) iPS ワクチン細胞における幹細胞性維持の確認

GFP 及びマウス GM-CSF 遺伝子導入後の iPS 細胞の形態学的観察の結果、非伝播型センドライウイルス未感染 iPS 細胞コロニーと比較し明らかな形態学的変化を認めなかった(図 4 A)。また、各 iPS 細胞間における幹細胞抗原 SSEA-1, Oct-3/4 発現 (MOI=1) 及びアルカリフォスファターゼ陽性率 (MOI=1 及び 3) に大きな差異を認めなかったことから、非伝播型センドライウイルスによる各遺伝子導入後も iPS 細胞の未分化性 (幹細胞性) が維持されていることが示唆された(図 4 B, C)。

(図 4)

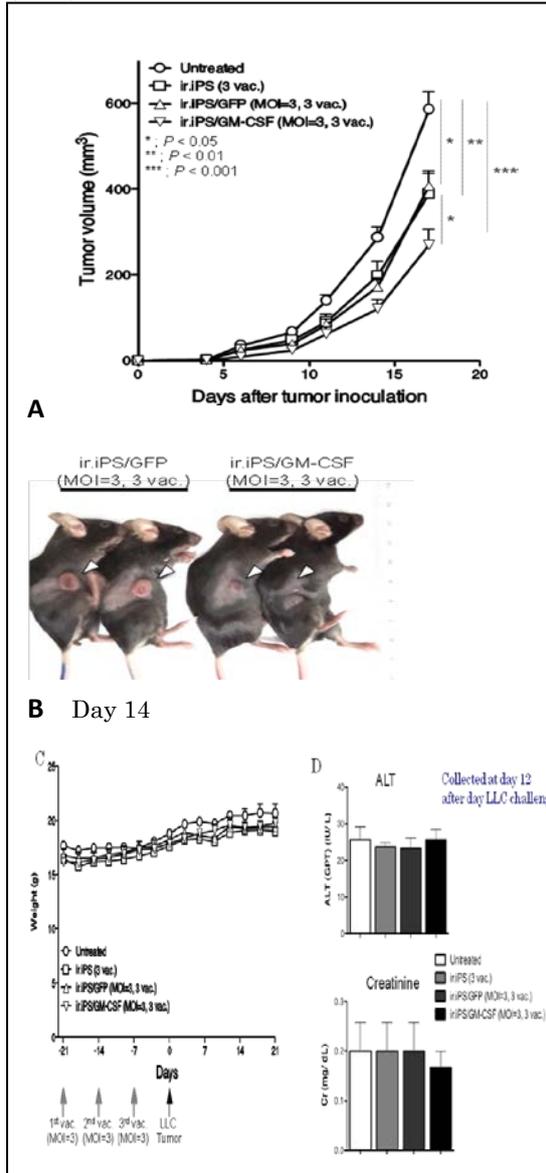


(3) in vivo 担癌マウスモデルにおける γ 線照射 iPS/GM-CSF ワクチンの予防的あるいは治療的抗腫瘍効果及び安全性の確認

次に、SeV (MOI=3) 感染による遺伝子導入により作製した GM-CSF 遺伝子導入 iPS 細胞ワクチン療法の *in vivo* 抗腫瘍効果を皮下結節 LLC 担癌マウス予防モデルにおいて検討した。すなわち、前述の方法により作製した各 γ 線照射ワクチン細胞 ir.iPS 群、ir.iPS/GFP 群、ir.iPS/GM-CSF 群 (1×10^6 個/マウス) あるいは PBS (未治療群) を週に 1 度、3 回 BL/6 マウスの左側腹部に皮下接種した。続いて、最後のワクチン接種より 1 週間後に LLC 同系マウス非小細胞肺癌細胞 (2×10^5 個/mouse) を対側の右側腹部に皮下接種した。その結果、ワクチン未治療群と比較し、ir.iPS/GFP 群、ir.iPS/GM-CSF 群、ir.iPS 群の順に LLC 腫瘍形成が有意に抑制された。これらの結果より、ウイルス感染時 MOI=3、ワクチン細胞を 3 回投与した予防系モデルにおける腫瘍形成抑制効果を検討した結果、未治療群と比較し ir.iPS/GM-CSF 群、ir.iPS 群=ir.iPS/GFP 群の順に有意な腫瘍形成抑制効果が得られた(図 5 A)。また、ir.iPS/GM-CSF 群において ir.iPS/GM-CSF 群と比較し有意な抗腫瘍効果を認めた(図 5 A, B) ことから GM-CSF 遺伝

子導入による増強効果が確認された。さらに、ir.iPS 群あるいは ir.iPS/GFP 群細胞ワクチン治療も未治療群に対し有意な抗腫瘍効果を認めたことから、iPS 細胞ワクチン自体の抗腫瘍免疫誘導性が示された(図 5 A)。さらに、同治療経過中、全治療マウス群において有意な体重減少を認めなかった(図 5 C)。また、day 14 における血清生化学検査の結果、CK 及び ALT 値の異常を認めなかったこと(図 5 D)より重篤な有害事象を引き起こさないこと(安全性)が示唆された。

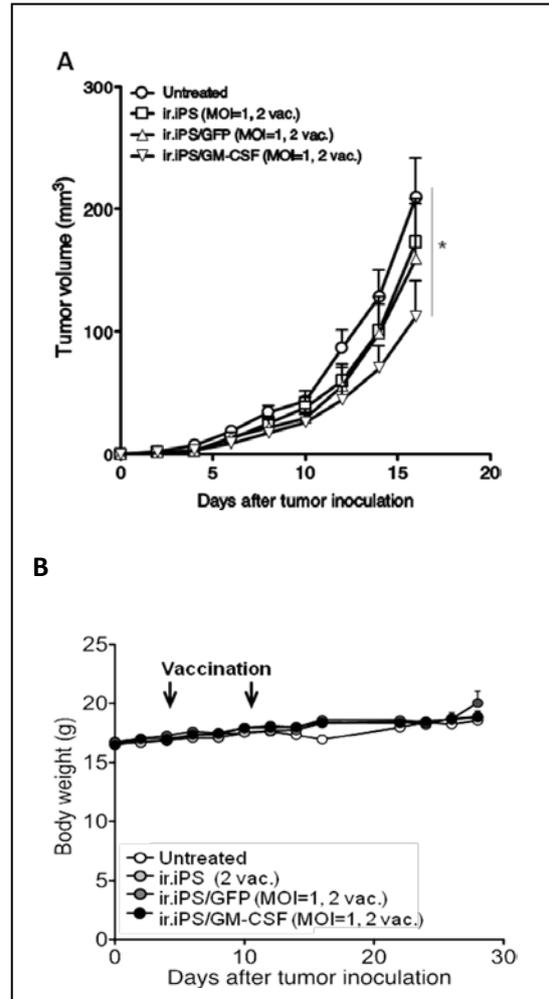
(図 5)



次に、非伝播型センダイウイルスベクター (MOI=1)感染による遺伝子導入により作製した GM-CSF 遺伝子導入 iPS 細胞ワクチン療法の治療的抗腫瘍効果を皮下結節 LLC 担癌マウス治療モデルにおいて検討した。各治療マウス群 (iPS 細胞ワクチン接種群: ir.iPS 群、iPS/GFP 細胞ワクチン接種群: ir.iPS/GFP 群、

iPS/GM-CSF 細胞ワクチン接種群: ir.iPS/GM-CSF 群, 1×10^6 個/マウス)。その結果、未治療群と比較し、ir.iPS/GM-CSF 群において有意な抗腫瘍効果を認めた ($p < 0.05$) (図 6 A)。また、有意ではないものの ir.iPS/GFP 群及び ir.iPS 群においても軽度の LLC 腫瘍形成の抑制を認めた (図 6 A)。また、同治療経過中体重減少や脱毛、衰弱等明らかな有害事象は認められなかった(図 6 B) ことから、同治療の安全性が示唆された。

(図 6)

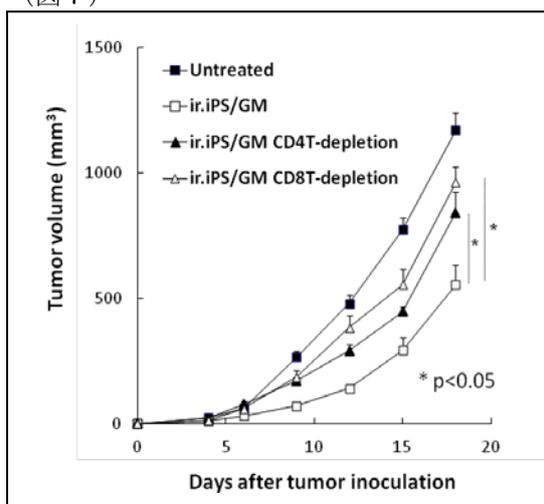


(4) 治療ワクチン系抗腫瘍誘導効果に関する免疫担当細胞同定実験

上記治療ワクチン系において ir.iPS/GM-CSF 治療マウス群 ($n=6/\text{group}$) にマウス CD4 あるいは CD8 細胞の中和抗体を腹腔内投与し腫瘍容積を測定した。その結果、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞除去マウス群において、ir.iPS/GM-CSF 治療マウス群で認められた抗腫瘍効果が、有意に減弱された ($p < 0.05$)。 (図 7)。したがって、同治療による抗腫瘍効果は、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を中心とした細胞性免疫が関与していることが証明された。このことから iPS 細胞抗原及び LLC 癌幹細胞抗原に共通する抗原特

異的 T 細胞応答が誘導されていることが示唆された。

(図 7)



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 0 件)
英字論文作成中

[学会発表] (計 2 件)

Novel cancer immunotherapy using induced pluripotent stem cells genetically engineered to produce GM-CSF.

Ayumi Wanatabe, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Keisuke Okita, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Shinya Yamanaka, and Kenzaburo Tani.

第 71 回日本癌学会学術総会 (ロイトン札幌)
2012 年 09 月 19 日 ~ 21 日

A novel cancer cell vaccine using induced pluripotent stem cells genetically engineered to produce GM-CSF elicits substantial antitumor immunity in a syngeneic mouse model.

Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani.

第 16 回米国遺伝子治療学会総会 (ソルトレークシティ、米国) 2013 年 05 月 14 日 ~ 17 日

[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]

ホームページ等
該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上博之 (INOUE HIROYUKI)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：80529967