

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791492

研究課題名(和文)CEA遺伝子導入ES細胞由来樹状細胞を用いた癌ワクチン療法

研究課題名(英文)Cancer vaccine therapy using genetically modified induced pluripotent stem cell-derived dendritic cells expressing the TAA gene.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：私達はiPS細胞由来樹状細胞(DC)を作成し、腫瘍抗原遺伝子であるhgp100遺伝子を導入し、これを用いた癌ワクチン療法の可能性をマウスを用いて検討した。結果、iPSDCはnaiveDCと比較して成熟能、遊走能は同等であることを示し、さらにhgp100遺伝子発現iPSDCワクチンによってhgp100特異的な細胞障害性Tリンパ球(CTL)が誘導されること、またこのCTLはhgp100発現細胞株であるB16に対して強力な抗腫瘍効果を発揮することを立証した。また実際の治療モデルでnaiveDCとiPSDCは同等のワクチン効果を発揮することを立証した。今後の臨床応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We developed the induced pluripotent stem cell-derived dendritic cells DCs (iPSDCs) from iPS cells and examined the capacity for maturation of iPSDCs compared to that of bone marrow-derived DCs (BMDCs) in addition to the capacity for migration of iPSDCs to lymph nodes. We adenovirally transduced the hgp100 gene, natural tumor antigens, into DCs and immunized mice once with the genetically modified DCs. Our results showed that iPSDCs have an equal capacity to BMDCs in terms of maturation and migration. Furthermore, hgp100-specific CTLs were generated in mice immunized with genetically modified iPSDCs. These CTLs exhibited as high a level of cytotoxicity against B16 cells as BMDCs. Moreover, vaccination with the genetically modified iPSDCs achieved as high a level of therapeutic efficacy as vaccination with BMDCs. Our study clarified that genetically modified iPSDCs have an equal capacity to BMDCs in terms of tumor-associated antigen specific therapeutic antitumor immunity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：樹状細胞 iPS細胞 癌ワクチン

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞 (DCs) は、抗原提示細胞 (APC) として、抗腫瘍免疫反応において非常に重要な役割を果たしている。これまで当教室では、DCs ワクチン療法の基礎研究及び臨床研究を行ってきた。臨床において、DCs ワクチン療法は多量の DCs が必要であるが、担癌患者から誘導した DCs はその数、ワクチン効果が一定ではなく、安定した DCs の供給が課題である。そのような中、2006 年に多様な細胞分化能力と無限増殖能力を併せ持つ iPS 細胞の樹立が報告され、2009 年には iPS 細胞由来 DCs (iPSDCs) の分化誘導が報告された。そこで私達は、もしこの iPSDCs が従来の naive な DCs と、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、その臨床応用に向けて大きく前進できると考えた。

2. 研究の目的

本研究ではマウス iPS 細胞から TAA 遺伝子導入 iPSDCs を分化誘導し、APC としての機能及び抗腫瘍効果を BMDCs と比較検討した。抗腫瘍効果については、⁵¹Cr-release assay およびマウス皮下腫瘍モデルで比較検討した。

今回の私達の研究により、iPSDCs が、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立証された場合、iPSDCs が naive DCs の代わりとなり得ると考える。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 癌ワクチン療法の研究を大きく前進させることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験 I. 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、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- α を含む培地上で培養する。そして 28 日目に浮遊細胞を回収する。

(2) 実験 II. 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- γ) 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) 実験 III. 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 tetramer assay で解析した。さらに残りの脾細胞を 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 を抽出した。これを B16 細胞, MC38 細胞, YAC-1 細胞で, ^{51}Cr -release assay にて TAA 特異的細胞障害活性を解析した。

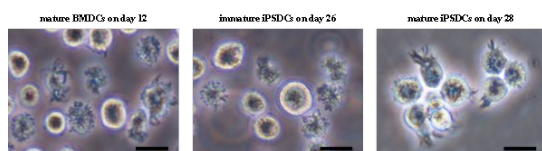
In vivo による比較検討

それぞれの 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, 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, 1 回皮下投与し, 皮下腫瘍の大きさを定期的測定し解析した。

4. 研究成果

(1) 実験 I. マウス iPSDCs の分化誘導

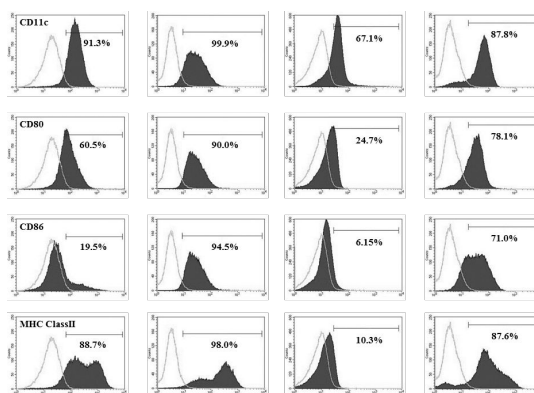
接着細胞である iPS 細胞をプロトコールで培養すると, 第 2 ステップの終わりの 14 日目には, 明るく, 小さい, 類縁形の浮遊細胞が得られた。さらに第 3 ステップの終わりの 26 日目には, 一部に突起の様な不整な部位を有する未成熟 iPSDCs が得られた。そして第 4 ステップの終わりの 28 日目には, 従来の BMDCs と同様に, 著明な樹状突起を有する成熟 iPSDCs が得られた。



(2) 実験 II. iPSDCs と BMDCs の APC としての機能の評価

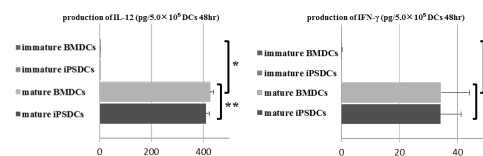
成熟能の比較検討

DCs の表面マーカーである CD11c は, iPSDCs では BMDCs と同等の発現率を認めた。また co-stimulatory molecule である CD80, CD86 は, TNF- α により成熟化することで, iPSDCs は BMDCs と同等の発現率の上昇を認めた。MHC class- も同様に, 同等の発現率の上昇を認めた。



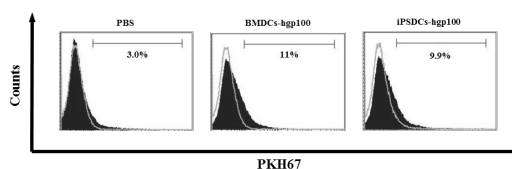
サイトカイン分泌能の比較検討

IL-12, IFN- γ 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

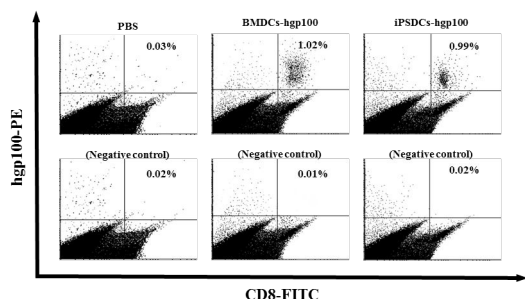
回収した所属リンパ節を凍結標本にして, 薄切したものと, それをさらに HE 染色したものを, 蛍光顕微鏡で観察すると, gp100 遺伝子を導入したそれぞれの DCs どちらでも, 遊走してきた, 蛍光標識された DCs を T-cell rich zone に認めた。また回収した所属リンパ節をホモジナイズし, PBS で懸濁したものを flow cytometry で解析すると, コントロールとして用いた, 治療していないマウスのリンパ節と比較して, PKH67 陽性細胞の比率は, PBS 群 3.0% であるのに対し, BMDCs-gp100 群 11%, iPSDCs-gp100 群 9.9% と, 同等の発現率の上昇を認めた。



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

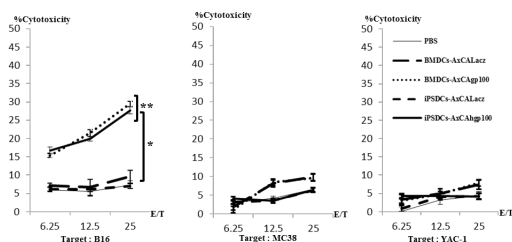
In vitro による比較検討

tetramer assay では、iPSDCs 群と BMDCs 群では同等の tetramer 陽性リンパ球を認めたが、Negative コントロール群である PBS 群では認めなかった。



gp100 遺伝子を発現している B16 細胞を標的細胞にした場合では、iPSDCs-gp100 群と BMDCs-gp100 群において、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 2 群の間には有意差は認めなかった ($p > 0.05$).

gp100 陰性の MC38 細胞ではどの群においても有意な細胞傷害活性は、認めなかった。さらに YAC-1 細胞でもどの群においても有意差は認めず、NK 活性は認めなかった。



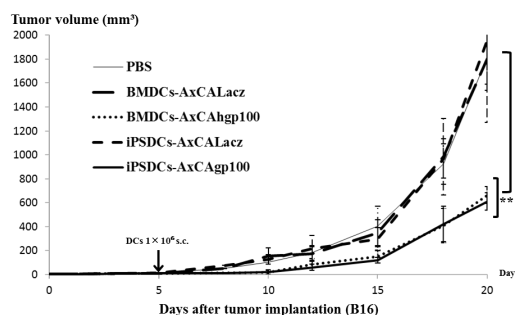
In vivo による比較検討

B16 細胞の TAA 遺伝子である gp100 遺伝子を導入した iPSDCs-gp100 群と BMDCs-gp100 群では、他の 3 群と比べ、有意に高い腫瘍増殖抑制効果を認めたが ($p < 0.001$), これら 2 群の間には有意差は認めず ($p > 0.05$) 全く同等であった。

今回の私達の研究により、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がほぼ同

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 の代わりとなり得ると考える。

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 癌ワクチン療法の研究を大きく前進させることができる。そして未来のテーラーメイド治療として TAA 遺伝子導入 iPSDCs 癌ワクチン療法の実現を目指す。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。そして遺伝子導入された iPS 細胞を iPSDCs に分化誘導し、この iPSDCs をワクチンとして投与するという戦略である。そのため今後は、まず transgenic mouse を用いた preclinical study に取り組み、その後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 22 件)全査読有

1. Nakamura M, Nakamori M, Ojima T, et al.: Reconstruction after proximal gastrectomy for early gastric cancer in the upper third of the stomach: An analysis of our 13-year experience. *Surgery*. 2014; 28 pii: S0039-6060(14)00065-8. doi:10.1016/j.surg.2014.02.015.
2. Ojima T, Takifuji K, Nakamura M, et al.: Endoscopic submucosal dissection for gastric tumors in various types of remnant stomach. *Endoscopy*. 2014; 28. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24777426
3. Ojima T, Takifuji K, Nakamura M, et al.: Complications of Endoscopic Submucosal

- Dissection for Gastric Noninvasive Neoplasia: An Analysis of 647 Lesions. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2014; 4. URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24710239>
4. **Ojima T**, Iwahashi M, Nakamori M, et al.: Is Preoperative Colonoscopy Necessary for Patients Undergoing Gastric Cancer Surgery? *Ann Surg Oncol.* 2014 Feb 22. URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24562939>
 5. **Ojima T**, Nakamori M, Nakamura M, et al.: Successful treatment of esophageal fistulas with endoscopic injection of alpha-cyanoacrylate monomer. *Endoscopy.* 2014;46 Suppl 1 UCTN:E62-3. doi: 10.1055/s-0033-1359159.
 6. Iwamoto H, **Ojima T**, Nakamori M, et al.: Cancer vaccine therapy using genetically modified induced pluripotent stem cell-derived dendritic cells expressing the TAA gene. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2013;40:1575-7. URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24393853>
 7. Iida T, Iwahashi M, Katsuda M, Ishida K, Nakamori M, Nakamura M, Naka T, **Ojima T**, et al.: Prognostic significance of IL-17 mRNA expression in peritoneal lavage in gastric cancer patients who underwent curative resection. *Oncol Rep.* 2014;31:605-12. doi: 10.3892/or.2013.2911.
 8. Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, **Ojima T**, et al.: Clinical benefits of thoracoscopic esophagectomy in the prone position for esophageal cancer. *Surg Today.* 2013;20. URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24254061>
 9. Iwamoto H, **Ojima T**, Hayata K, et al.: 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.* 2014;134:332-41. doi: 10.1002/ijc.28367.
 10. Nakamura M, Iwahashi M, Nakamori M, **Ojima T**, et al.: A new prognostic score for the survival of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Surg Today.* 2014;44:875-83. doi:10.1007/s00595-013-0628-z.
 11. **Ojima T**, Iwahashi M, Nakamori M, et al.: Atrial fibrillation after esophageal cancer surgery: an analysis of 207 consecutive patients. *Surg Today.* 2014;44:839-47. doi: 10.1007/s00595-013-0616-3.
 12. Kishi K, Iida T, **Ojima T**, et al.: Esophageal gel-shifting technique facilitating eradication boost or reirradiation to upper mediastinal targets of recurrent nerve lymph node without damaging esophagus. *J Radiat Res.* 2013;54:748-54. doi: 10.1093/jrr/rrs137.
 13. Hayata K, Iwahashi M, **Ojima T**, et al.: Inhibition of IL-17A in tumor microenvironment augments cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes in tumor-bearing mice. *PLoS One.* 2013;8: e53131. doi:10.1371/journal.pone.0053131.
 14. Tsuji T, Nakamori M, Iwahashi M, Nakamura M, **Ojima T**, et al.: An armed oncolytic herpes simplex virus expressing thrombospondin-1 has an enhanced in vivo antitumor effect against human gastric cancer. *Int J Cancer.* 2013;132:485-94. doi: 10.1002/ijc.27681.
 15. Nakamura M, Iwahashi M, Nakamori M, Naka T, **Ojima T**, et al.: Lower mediastinal lymph node metastasis is an independent survival factor of Siewert type II and III adenocarcinomas in the gastroesophageal junction. *Am Surg.* 2012;78:567-73. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546130>
 16. Naka T, Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, **Ojima T**, et al.: The evaluation of surgical treatment for gastric cancer patients with noncurative resection. *Langenbecks Arch Surg.* 2012;1 URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22294323>
 17. Katsuda M, Iwahashi M, Matsuda K, Miyazawa M, Nakamori M, Nakamura M, Naka T, **Ojima T**, et al.: Peptide vaccine therapy with TLR-9 agonist for patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2011;38:1942-4 URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22202246>
 18. **Ojima T**, Iwahashi M, Nakamori M, et al.: The impact of abdominal shape index of patients on laparoscopy-assisted distal gastrectomy for early gastric cancer. *Langenbecks Arch Surg.* 2012;397:437-45. doi: 10.1007/s00423-011-0883-7.
 19. Katsuda M, Iwahashi M, Matsuda K, Miyazawa M, Nakamori M, Nakamura M,

- Ojima T**, et al.: Comparison of different classes of CpG-ODN in augmenting the generation of human epitope peptide-specific CTLs. *Int J Oncol.* 2011;39:1295-302. doi: 10.3892/ijo.2011.1146.
20. Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, **Ojima T**, et al.: Optimal period for the prophylactic administration of neutrophil elastase inhibitor for patients with esophageal cancer undergoing esophagectomy. *World J Surg.* 2011;35:1573-9. doi: 10.1007/s00268-011-1095-6.
21. Miyazawa M, Iwahashi M, **Ojima T**, et al.: Dendritic cells adenovirally-transduced with full-length mesothelin cDNA elicit mesothelin-specific cytotoxicity against pancreatic cancer cell lines in vitro. *Cancer Lett.* 2011;305:32-9. doi: 10.1016/j.canlet.2011.02.013.
22. Iida T, Iwahashi M, Katsuda M, Ishida K, Nakamori M, Nakamura M, Naka T, **Ojima T**, et al.: Tumor-infiltrating CD4+ Th17 cells produce IL-17 in tumor microenvironment and promote tumor progression in human gastric cancer. *Oncol Rep.* 2011;25:1271-7. doi: 10.3892/or.2011.1201.
- 〔学会発表〕(計 8 件)
1. **尾島敏康**: ワークショップ iPS 細胞由来樹状細胞を用いた消化器固形癌テーラーメイド治療の可能性. 第 26 回日本バイオセラピー学会学術集会総会, 2013.12. 盛岡
2. **尾島敏康**: iPS 細胞由来樹状細胞を用いた癌ワクチン療法. 第 51 回日本癌治療学会学術集会, 2013. 10. 京都
3. **尾島敏康**: Having multiple gastric cancers is risk factors for influencing comorbidity of colorectal cancer in patients with gastric cancer. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013.10. 横浜
4. **Toshiyasu Ojima**: The impact of abdominal shape index of patients on laparoscopy-assisted distal gastrectomy for early gastric cancer. Korean Gastric Cancer Association 2013, 2013.4.Korea Daegu
5. **尾島敏康**: iPS 細胞由来樹状細胞の分化誘導とその抗腫瘍効果の評価. 第 50 回日本癌治療学会学術集会, 2012. 10. 大阪
6. **Toshiyasu Ojima**: Influence of Overweight on Gastric Cancer Patients after Curative Gastrectomy The 9th International Gastric Cancer Congress, 2011. 4, Soul
7. **Toshiyasu Ojima**: The impact of abdominal shape index of patients on laparoscopy-assisted distal gastrectomy for early gastric cancer. International Surgical Week ISW2011, 2011. 8, Tokyo
8. **Toshiyasu Ojima**: Clinicopathological characteristics of remnant gastric cancer after a distal gastrectomy. The 21st World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists (IASGO), 2011. 11, Tokyo
6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 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
- (2) 研究分担者
 なし ()
 研究者番号 :
- (3) 連携研究者
 なし ()
 研究者番号 :