

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640091

研究課題名(和文)単球増殖誘導技術を用いた樹状細胞の大量生産

研究課題名(英文)Generation of large number of dendritic cells by induction of monocyte amplification

研究代表者

千住 覚 (Senju, Satoru)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：50274709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：樹状細胞を用いたがん治療は、国内外において幅広く実施されている。樹状細胞療法をさらに普及させ、評価を進めるには、樹状細胞の安定大量供給が必須である。樹状細胞は、末梢血単球から作製されているが、従来、単球を増殖させることは不可能であり、必要数の単球を得るためにアフレーシス操作による白血球分離が必要である。本研究では、こヒトの単球を増殖させる手法を開発し、これを臨床的に実用化するための基礎的検討を行った。その成果として、侵襲性を伴うアフレーシスを行うことなく樹状細胞療法を行うことが可能になった。これにより、末梢血単球数の少ない患者でも実施可能になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed a method to expand human monocytes through lentivirus-mediated introduction of cMYC and BMI1, and we named the monocyte-derived proliferating cells, CD14-ML. CD14-ML differentiated into functional DC (CD14-ML-DC) upon addition of IL-4, resulting in the generation of a large number of DC. One drawback of this method was the extensive donor-dependent variation in proliferation efficiency. In the current study, we found that introduction of BCL2 or LYL1 along with cMYC and BMI1 was beneficial. Using the improved method, we obtained CD14-ML from all samples, regardless of whether the donors were healthy individuals or cancer patients. This improved method enables the generation of a sufficient number of DC for vaccination therapy from a small amount of peripheral blood from cancer patients. Information on T cell epitopes is not necessary in vaccination with cancer antigen-expressing CD14-ML-DC.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞 単球 がん治療 ワクチン 細胞治療

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞は、最も強力なTリンパ球刺激能力を有する抗原提示細胞である。動物実験の結果から腫瘍抗原を負荷した樹状細胞を用いる免疫療法には、腫瘍抗原をアジュバンドと混和して投与するワクチン法よりも、より高い抗腫瘍効果が期待される。今日、樹状細胞を用いた癌に対する免疫療法は、世界中で実施されている。最近、米国において、前立腺癌に対する自己樹状細胞を用いた免疫療法の大規模な臨床試験が行われた結果、生存期間を延長するという効果が確認された。

樹状細胞療法のさらなる普及とその効果の検討を進める上では、治療に用いるための樹状細胞の安定供給が大きな課題である。通常実施されているプロトコールで樹状細胞療法を行うためには、1クールあたり2~5x10⁸個の樹状細胞を必要とする。樹状細胞は、末梢血中の単球をサイトカイン存在下で培養することにより得られるが、従来技術では、ヒトの末梢血単球を体外で増殖させることは不可能であり、大量の単球を必要とする。

研究代表者は、長年、多能性幹細胞から樹状細胞を作製し医療応用する研究に取り組んでおり、ヒトiPS細胞から作製したミエロイド系前駆細胞に対して細胞増殖・不死化因子を導入することにより、長期間に渡り増殖し続けるミエロイド系細胞ライン(iPS-ML)を作製する方法を開発した。そして、ヒト末梢血単球でも同様に増殖誘導が可能であるかどうか検討を行った結果、末梢血単球の増殖誘導も可能であることを見いだした。

癌に対する抗原特異的免疫療法には、適切な癌抗原を標的とすることにより、副作用が少なく、かつ効果の高い治療法になる可能性がある。近年、癌抗原ペプチドを用いたワクチン療法の臨床試験が進められて

おり、腫瘍ワクチンとして有用な抗原の同定が進んでいる。

樹状細胞療法は、腫瘍抗原を用いたワクチンの効果を増強する手法として期待されるが、“単球を単純に樹状細胞に分化させて治療に用いる”という既存の方法では、樹状細胞調整の不安定性から医療技術としての確立およびさらなる普及は困難であると考えられる。

ヒトの末梢血単球を、腫瘍化させることなく、また、樹状細胞への分化能力を保持したまま増殖させるという本技術により、樹状細胞療法をより安全、効率的に実施できるようになることが期待された。

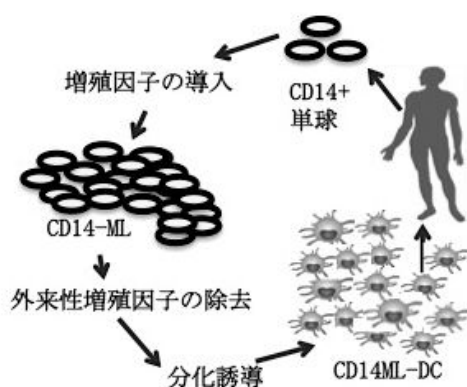
2. 研究の目的

樹状細胞療法をさらに普及させ、評価を進めるには、樹状細胞の安定・大量供給が必須である。樹状細胞は、末梢血単球から作製されているが、従来、単球を増殖させることは不可能であり、大量の単球を分離する必要がある。本研究では、ヒトの単球を増殖させる手法(CD14-ML法)を用いて樹状細胞を大量に作成する技術を臨床的に応用するための基礎的検討を行うことを目的とした。

ヒトの末梢血単球(モノサイト)に増殖性を付与する既存技術は存在しない。そのため、現在、樹状細胞療法を行うためには、成分採血装置(アフエレーシス)を用いて大量の患者血液を処理し白血球の分離が行われている。一般的には、その後、プラスチックディッシュへの付着性、あるいは、CD14の発現を指標として単球の分離が行われ、その後に樹状細胞への分化誘導培養が行われている。

樹状細胞療法時のアフエレーシスでは大量の血液を処理する必要があり、がん患者にとっては侵襲的である。さらに、末梢血単球の数や採取後の生存率には、細胞ドナ

ーにより大きな違いがあるため、アフェレーシスを行っても十分な細胞数を確保できない場合もある。特に、化学療法を受けている癌患者等において末梢血単球数の減少があり、樹状細胞療法の実施が困難な場合もある。



研究代表者は、単球に対してレンチウイルスベクターを用いて cMYC と BMI1 を同時に導入し強制発現させることにより、細胞ドナーによっては 1,000 倍以上に細胞を増幅できることを発見し、この増殖する CD14 陽性細胞を、CD14-ML と命名した。CD14ML は、M-CSF と GM-CSF の両方の存在する場合に増殖する。CD14-ML 法の問題点として、ドナーによっては、CD14-ML の作成が不可能（増殖誘導ができない）であることが重要である。

本研究では、cMYC と BMI1 に加えて新たな因子を導入することにより、単球のドナーが誰であっても CD14-ML を作成できるように方法を改善することを目的とした。さらに、抗原となるタンパクの遺伝子を導入することにより、抗原を自ら発現する樹状細胞を作成する手法を開発することを試みた。

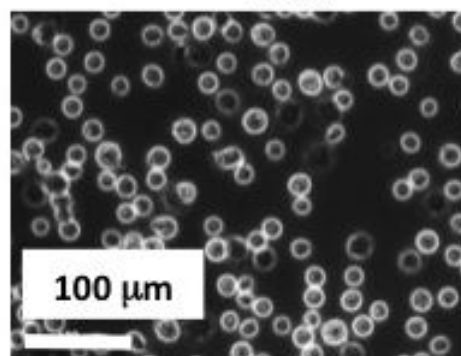
3. 研究の方法

CD14-ML 作成法

CD14-ML を作成するには、まず、末梢血単

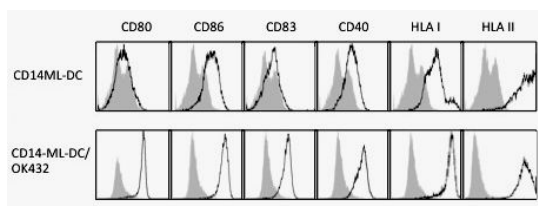
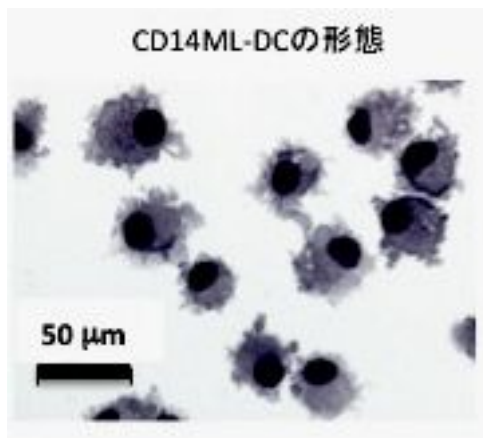
核細胞中から、抗 CD14 抗体磁気ビーズを用いて、CD14 陽性細胞を分離する。これを GM-CSF と M-CSF の存在化において培養しつつ、cMYC と BMI1 を発現するレンチウイルスベクターを感染させる。レンチウイルス感染後、2-3 週間より、細胞増殖が観察される。

CD14-ML の形態



CD14ML の樹状細胞 (CD14ML-DC) への分化誘導法

CD14-ML は、通常の末梢血単球と同様に IL-4 存在下で培養することにより、2-3 日で樹状細胞 (CD14ML-DC) へと分化する。下の図は、CD14ML-DC の形態、および、細胞表面分子の発現 (OK432 による刺激前後) を示す。CD14ML-DC は、典型的な CD14ML-DC は、強力な T 細胞刺激活性を有し、また、OK432 刺激により大量の IL-12 を産生する。さらに、CD14ML-DC を用いて、in vitro で腫瘍抗原特異的な CTL ラインを樹立することも可能である。CD14ML-DC は、T 細胞刺激細胞として、通常の単球由来樹状細胞と同等かあるいはそれ以上の能力を有する。



4. 研究成果

CD14-ML 作製法の改善

本研究以前に、12名の健常人ドナーに由来する単球に cMYC と BMI1 を導入し、増殖誘導を試みていた。そのうち、9名のドナーについては、20-100倍程度への増殖を認めていた。一方、残りの3名については、遺伝子導入を行っていない対照サンプルと比較して、有意な細胞数の増加を認めなかった。

本研究では、そのために cMYC と BMI1 以外に、ドナーが誰であっても CD14-ML を作製できるような、適切な細胞増殖・不死化因子を探索した。

その結果、cMYC と BMI1 に加えて、BCL2 あるいは LYL1 を導入することにより、少なくとも新鮮な（凍結保存していない）ヒトの単球に関しては、全てのドナーから CD14-ML を作成できる（細胞数を 100 倍以上に増幅できる）ことを見いだした。

遺伝子導入による腫瘍抗原発現樹状細胞の作製

一般に、HLA クラス I 結合性を有する合成

ペプチドを負荷した場合、半減期 12~24 時間程度で、細胞表面上の HLA クラス I 上から消失する。一方、遺伝子導入により樹状細胞自身に腫瘍抗原を発現させた場合、持続的な抗原タンパクの産生とエピトープ提示がなされるため、ワクチンとして投与した場合の T 細胞刺激効果が高くなる。また、この方法では、合成ペプチドの場合と異なり、低頻度 HLA クラス I (HLA-A2 や A24 以外) や HLA-B によって提示されるエピトープなど、未同定の腫瘍抗原エピトープも提示される。

本研究では、CD14-ML に腫瘍抗原の遺伝子を導入し、増殖させた後、樹状細胞に分化させることにより、自ら発現する抗原由来のエピトープを HLA クラス I 上に提示する樹状細胞を作成する技術を確立した。この手法により、未同定の腫瘍抗原エピトープも含めて、持続的に腫瘍抗原エピトープを提示する樹状細胞が作成できるようになった。この手法を用いることにより、合成ペプチドを服する場合よりも強い抗腫瘍免疫を誘導できること、さらに、HLA-A2 と A24 のいずれも保持しないがん患者も樹状細胞療法を受けることができると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Haruta M, Tomita Y, Imamura Y, Matsumura K, Ikeda T, Takamatsu K, Nishimura Y, Senju S. Generation of a large number of functional dendritic cells from human monocytes expanded by forced expression of cMYC plus BMI1. *Human Immunol* 74, 1400-1408, 2013(査読有り)
2. Imamura Y, Haruta M, Tomita Y, Matsumura K, Ikeda T, Yuno A, Hirayama M, Nakayama H, Mizuta H, Nishimura Y, Senju S. Generation of Large Numbers

of Antigen-Expressing Human Dendritic Cells Using CD14-ML Technology. *Ploa One* 11 e0152348, 2016(査読有り)

〔学会発表〕(計4件)

1. 今村悠哉、春田美和、富田雄介、松村桂子、池田徳典、高松孝太郎、西村泰治、千住覚：ヒトの末梢血単球の増殖誘導法を用いた樹状細胞の大量産生。第18回日本がん免疫学会総会 松山市 2014年7月30日～8月1日
2. 今村悠哉、春田美和、富田雄介、松村桂子、池田徳典、高松孝太郎、西村泰治、千住覚：HLA 拘束性 T 細胞を誘導可能な末梢血モノサイト由来樹状細胞の大量産生法の開発。第23回日本組織適合性学会大会 長崎市 2014年9月13日～15日
3. Imamura Y, Haruta M, Tomita Y, Matsumura K, Ikeda T, Yuno A, Hirayama M, Nakayama H, Mizuta H, Nishimura Y, Senju S. Cancer antigen-expressing CD14ML-derived DC as a potential means for vaccination therapy 第19回日本がん免疫学会 東京都 2015年7月9日
4. Imamura Y, Haruta M, Tomita Y, Matsumura K, Ikeda T, Yuno A, Hirayama M, Nakayama H, Mizuta H, Nishimura Y, Senju S. ヒト末梢血単球の増殖誘導法、および、これを用いた樹状細胞の大量生産技術の開発 第25回日本樹状細胞研究会 岡山市 2015年7月10日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：血液由来単球の増殖誘導方法

発明者：千住覚 今村悠哉

権利者：熊本大学

種類：特許

番号：2016-12951

出願年月日：2016年1月27日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

千住 覚 (Senju Satoru)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：50274709