

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860969

研究課題名(和文)人工多能性幹細胞を用いた悪性黒色腫に対する養子免疫療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of adaptive immunotherapy against malignant melanoma using tumor antigen-specific cytotoxic T cell-derived induced pluripotent stem cells

研究代表者

伊藤 宗成 (Itoh, Munenari)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：20408371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、悪性黒色腫(以下MM)に対する有効な免疫療法を、人工多能性幹細胞(以下iPSC)を用いて確立することを目指した。MM患者から腫瘍抗原特異的細胞傷害性T細胞を分離培養し、そのT細胞からiPSCを樹立することに成功し、その妥当性を検証した。樹立されたiPSCでは、元のT細胞受容体の遺伝子情報が保持されているため、そこから腫瘍傷害性を持ったT細胞を大量に安定供給できる可能性が示された。今後は樹立したiPSCを細胞傷害性T細胞に再度分化誘導させ、実際にその腫瘍傷害性の検討を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Our aim of this project is the establishment of effective adaptive immunotherapy for the treatment of malignant melanoma (MM) using induced pluripotent stem cell (iPSC). We first isolated and expanded tumor antigen-specific cytotoxic T cells from the patients with MM by our original protocol. We next generated iPSC from isolated cytotoxic T cell using sendai virus vector and/or episomal vector. Until now, two iPSC lines were obtained and the authenticity of these iPSCs was confirmed using several ways, indicating the possibility that enough amount of rejuvenated cytotoxic T cells would be provided for adaptive immunotherapy against MM, since the information of re-arranged T cell receptor gene should be kept even after generating iPSC. In the future, we will attempt to re-differentiate iPSCs into cytotoxic T cells, and confirm these cytotoxic functions to reject tumor cells.

研究分野：皮膚科学

キーワード：人工多能性幹細胞 悪性黒色腫 養子免疫療法

### 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫(以下 MM)は色素細胞由来の悪性腫瘍であり、非常に転移しやすく、一度転移を生じると治療抵抗性な悪性度の高い腫瘍である。リンパ節転移を有する病期 III では長期生存率は 40 ~ 50% とかなり低い (Ishihara K *et al. Int J Clin Oncol* 2008)。進行期 MM の治療は化学療法で主流であるが、極めて抵抗性であり、標準的治療とされるダカルバジンでも部分奏功 11.2%、完全奏効 4.1% とされ、化学療法はあくまで症状緩和の手段と考えられており、有効な治療法は確立されていない (Lui P *et al. Cancer Treat Rev* 2007)。

一方で、MM は免疫原性の高い腫瘍として知られ、効率良く抗腫瘍免疫応答を惹起することで腫瘍拒絶を誘導できると考えられている。現在もっとも試みられている免疫療法は強力な抗原提示細胞である樹状細胞を用いて抗腫瘍免疫を誘導する樹状細胞療法である。末梢血単球由来樹状細胞を調整し、*in vitro* で MM 特異抗原やペプチドをパルスして、アジュバントなどとともリンパ節や皮膚に投与することで、腫瘍拒絶に有効な細胞傷害性 T 細胞を体内で誘導する治療法である。しかしその成績は完全・部分奏功を合わせて約 9% と残念ながら高くはない (Engell-Noerregaard L *et al. Cancer Immunol Immunother* 2009)。一方で、腫瘍特異抗原をアジュバントなどと共に直接患者に接種して腫瘍免疫を惹起、腫瘍拒絶を誘導するがんペプチド療法も一定の効果はあげている。進行期 MM 患者に対して、特異抗原である gp100 と IL-2 を投与すると、コントロール群と比較して有意な腫瘍拒絶が起こり、生存期間の延長が見られたとされているが、その効果は極めて限定的であり、有用性は見い出せていない。

最近では養子免疫療法が注目されている。患者から採取した末梢血リンパ球や腫瘍浸潤リンパ球をサイトカイン存在下で培養、あるいは抗原刺激を加えて誘導される活性化リンパ球を患者体内に戻し、腫瘍拒絶を誘導する方法である。米国 NCI において、増殖させた腫瘍浸潤リンパ球を大量の IL-2 とともに患者体内に戻したところ、進行期 MM で完全奏効 9 ~ 16%、部分奏効 40 ~ 55% (計 50 ~ 70%) という比較的高い効果が得られたとしている (Rosenberg SA *et al. Curr Opin Immunol* 2009)。また MM 特異抗原のひとつである NY-ESO-1 を認識する T 細胞受容体を発現するように遺伝的に改変された、患者由来 T 細胞を作製・増殖させ、患者体内に戻したところ、完全奏効率は 45% であったと報告している。この養子免疫療法は進行期 MM の有効な治療方法となり得るが、転移巣切除で得られる腫瘍浸潤リンパ球には限りがあり、増殖させても患者体内に戻せる細胞数、回数には限りがあること、完全奏効の割合はいまだに低く、部分奏功ではその期間に非常

にばらつきがあること、遺伝子改変 T 細胞の場合、その改変にレトロウイルスベクターを用いており、ウイルス由来遺伝子のゲノム遺伝子への挿入があることなど、まだ問題も多い。

我々は、無限の増殖能と多分化能を持つ人工多能性幹細胞 (以下 iPSC) の特性を応用し、この問題が解決したいと考えている。患者の持つ腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞は、抗原認識の要となる T 細胞受容体遺伝子での体細胞遺伝子組み換えがすでに終了しており、そこから iPSC を樹立した場合、起源となる T 細胞での体細胞遺伝子組み換えの情報は保存され、その iPSC から分化誘導された細胞傷害性 T 細胞、同様の腫瘍特異的傷害性を持ち合わせると考えられる。これにより、MM 特異抗原を特異的に認識し、腫瘍拒絶を惹起する細胞傷害性 T 細胞を安定して大量に、必要な時に供給できる体制を整えられると思われる。現在の養子免疫療法の問題点を解決できるのではないかと考えている。本研究計画は、iPSC を用いて有用な MM 免疫治療を樹立していくための基礎研究である。

### 2. 研究の目的

本研究は、MM に対する有効な免疫療法を、iPSC を用いて確立することを目指すものである。患者由来の腫瘍抗原特異的細胞傷害性 T 細胞から、T 細胞受容体の遺伝子情報が保持された iPSC を樹立することで、強力な腫瘍傷害性を持った T 細胞のを安定供給する可能性を探求する。具体的な研究項目は、患者からの腫瘍抗原特異的細胞傷害性 T 細胞の分離、分離した T 細胞からの iPSC の樹立、樹立した iPSC からの細胞傷害性 T 細胞への安定かつ効率良い分化誘導、そして分化誘導した iPSC 由来細胞傷害性 T 細胞の *in vitro* および *in vivo* での腫瘍傷害性の検討の 4 項目である。

### 3. 研究の方法

#### 1. 症例における MM 特異抗原の確認とサンプルの採取 (平成 25 年度)

この項目では、本研究課題に適切な症例の選別とエントリー、およびその症例から腫瘍細胞株の樹立および腫瘍浸潤 T 細胞の分離を目的としている。

実験計画および具体的な工夫：腫瘍切除標本を用いた免疫染色で、どの腫瘍抗原 (NY-ESO-1、MAGE-A1 ~ 4、Melan-A/MART-1、Survivin1 など) が発現しているか、症例ごとに確認を行う。数ある MM 特異的腫瘍抗原の中でも NY-ESO-1 と MAGE-A3 は、抗原性が高く腫瘍免疫を惹起しやすいとされている。そのため本研究でも有力な候補抗原と考えられ、これらの抗原陽性症例を優先的にエントリーする。MM では腫瘍深達度が病期判定、予後判定に重要であるため、腫瘍細胞採取は原発巣ではなく転移巣から行う。また転移巣に浸潤しているリンパ球は腫瘍特異的に反

応している可能性があるため、可能であれば単離して項目3のiPSC樹立に用いる。

## 2. 末梢血からのMM抗原特異的な細胞傷害性T細胞の分離培養

この項目では、対象MM患者から腫瘍抗原特異的な細胞傷害性T細胞を分離することを目的とする。

実験計画：まずマグネットビーズ法を用いて、対象MM患者末梢血から細胞傷害性T細胞をCD8を指標として分離する。1で検出された腫瘍抗原のペプチドプールを用い、分離したCD8陽性細胞傷害性T細胞内のうち、MM腫瘍抗原特異的なT細胞のみを活性化させる。その後、活性化細胞障害性T細胞で発現しているとされるCD137を指標として、活性化されたMM抗原特異的なT細胞のみを分離する。また、若干ではあるが、腫瘍抗原を認識するT細胞受容体の遺伝子情報に関する報告も存在するため、必要であれば発現しているT細胞受容体の型の確認も行う。

## 3. 細胞傷害性T細胞からのiPSCの樹立と、樹立したiPSCの妥当性の検証

この項目ではウイルス由来遺伝子の挿入のない患者由来iPSCの樹立を目指す。

実験計画：センダイウイルスベクターは細胞質型のRNAウイルスであり、ウイルス由来遺伝子が標的細胞内に残存しないのが特徴である。そのセンダイウイルスベクターを用いて、iPSC作成に必要な転写因子(リプログラミング因子)を導入された患者由来T細胞は、iPSC用培地で一定期間培養され、その後、出現してきたiPSC様のコロニーを回収し、細胞株を樹立する。樹立されたiPSCの妥当性は、幹細胞マーカーの発現の有無、主要幹細胞マーカーのプロモーター領域での脱メチル化の有無、核型異常の有無、三胚葉への分化能などを確認し検証する。またネガティブコントロールとして腫瘍抗原を認識しない他のT細胞からもiPSCを樹立する。

## 4. T細胞由来iPSCから細胞傷害性T細胞への再分化

樹立されたiPSCでは、由来となる細胞傷害性T細胞が持っていたT細胞受容体の遺伝子情報が保持されていると想定され、そのiPSCから誘導された細胞傷害性T細胞はすべて同一の腫瘍傷害能を持つと考えられる。この項目では、細胞傷害性T細胞の分化誘導方法を確立する。

実験計画：現時点では過去の報告に基づき、一番分化効率がよく、in vivoでの機能にも優れたT細胞を誘導できる、OP9-DL1細胞とのco-culture systemを用いることを検討している。

## 5. iPSC由来T細胞が持つ腫瘍細胞傷害性の検討

この項目では、iPSC由来細胞傷害性T細胞のin vitroおよびin vivoでの腫瘍傷害能を検討する。

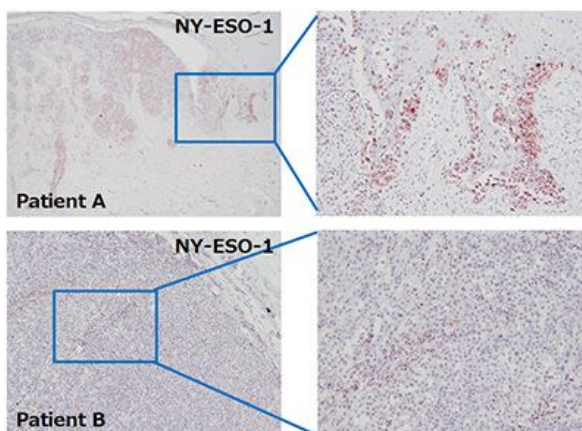
実験計画：樹立した腫瘍細胞株にin vitroにてiPSC由来細胞傷害性T細胞を作用させ、

細胞傷害性の有無をcytotoxicity assayにて検討する。もし細胞傷害作用が証明された場合、必要に応じて生体イメージングが可能のように標識を加えた腫瘍細胞株を、SCIDマウスに接種して腫瘍を形成させたのち、iPSC由来細胞傷害性T細胞を移植して腫瘍拒絶が生じるか観察する。ネガティブコントロールには腫瘍抗原を認識しない他のT細胞から樹立したiPSCから分化誘導した細胞傷害性T細胞を用いる。

## 4. 研究成果

### 1. 症例におけるMM特異抗原の確認とサンプルの採取

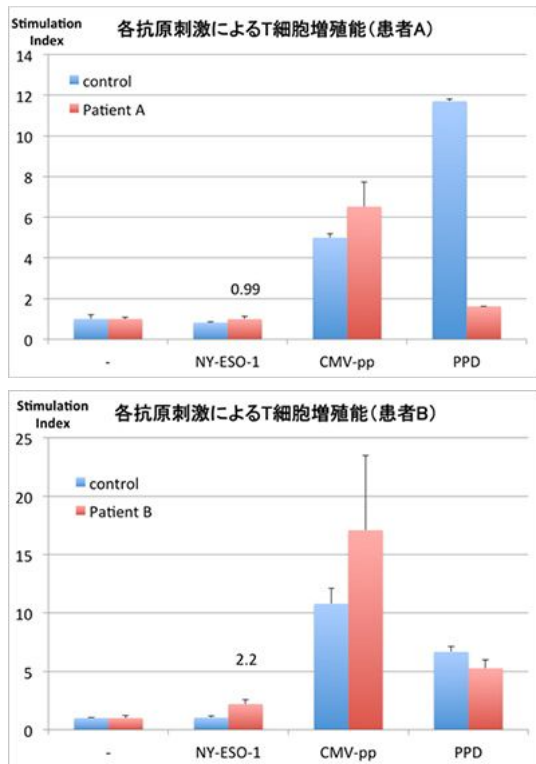
まずヒト精巣サンプルを用いて、腫瘍抗原の免疫染色の条件を最適化、その上で患者サンプルの免疫染色を行った。その結果、免疫原性の強い腫瘍抗原であるNY-ESO-1が陽性のMM患者2名をエントリーすることができた(図1)。



【図1】MM患者におけるNY-ESO-1の発現

しかし、腫瘍細胞に腫瘍抗原が出現していても、患者が腫瘍抗原特異的なCTLを持ち合わせていない可能性も否定できないため、前実験として、患者が腫瘍抗原に反応するT細胞を持っているかどうか確認を行った。具体的方法としては、患者単核球を分離採取し、NY-ESO-1のペプチドプール(100アミノ酸からなる蛋白断端のプール)もしくはpositive controlとなるCMV抗原およびPPDで刺激し、細胞増殖能を<sup>3</sup>H-Thymidineの取り込みを指標に測定した。その結果、患者Aでは、NY-ESO-1ペプチドプールで刺激しても細胞増殖が乏しく(stimulation index 0.99)、腫瘍抗原特異的なCTLの存在が十分確認できなかったのに対して、患者Bでは、CMV抗原やPPDと比較すればわずかではあるが、有意な細胞増殖が認められ(stimulation index 2.2)、腫瘍抗原特異的なCTLが存在している可能性が示唆された(図2)。そのため以降の研究は患者Bの協力のもとで行うこととした。

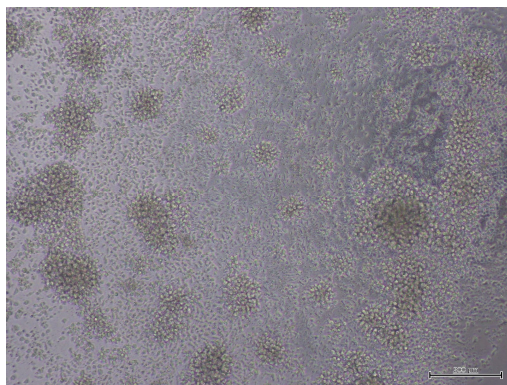
なお現時点ではまだ患者Bから転移巣の採取はできていない。



【図2】抗原刺激による T 細胞増殖能の差異

## 2. 末梢血からの MM 抗原特異的な CTL の分離培養

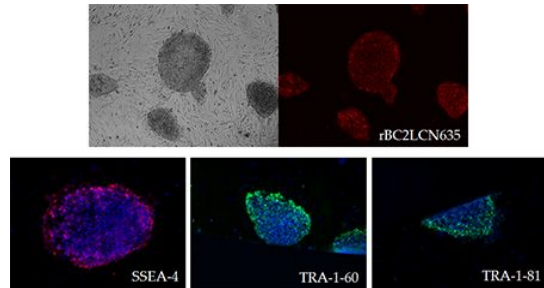
前述のとおり、当初は CD8 および CD137 を指標として、マグネットビーズ法もしくは Cell sorting にて腫瘍抗原特異的 CTL を分離する予定であった。しかし該当する細胞数があまりに少ないため、マグネットビーズ法では目的の細胞以外の混入が大きな割合を占めてしまい、のちの研究に影響を与える可能性があることが大きな問題となった。また、Cell sorting では細胞へのダメージが大きく、細胞生存率が著しく低下し、のちの培養過程でほとんど細胞が増やせず、次のステップへ進むことが困難であった。



【図3】培養された腫瘍抗原特異的 CTL

そのため我々は、長期間にわたって試行錯誤を繰り返し、腫瘍抗原特異的 CTL を分離し、培養する独自の方法を考案した。詳細は論文未発表のため割愛するが、その結果、他の細胞の混入リスクをほぼゼロにし、腫瘍抗原特

異的 CTL をひとつひとつクローン別に回収することに成功した。またそうして回収したひとつの腫瘍抗原特異的 CTL を培養し、iPSC が樹立可能な  $10^6$  にまで増やすことが可能となった(図3)。



【図4】腫瘍抗原特異的 CTL 由来 iPSC

## 3. CTL からの iPSC の樹立と、樹立した iPSC の妥当性の検証

増殖させた腫瘍抗原特異的 CTL に、センダイウイルスベクターを用いてリプログラミング因子を強制発現させて、iPSC の樹立を行った。また、エレクトロポレーション法によるエピソーマルベクターの導入による iPSC の樹立も同時に試みた。

その結果、現在までに 2 つの細胞株の樹立に成功し(図4)、現在、iPSC の妥当性について検証を進めている。

## 4. T 細胞由来 iPSC から CTL への再分化

## 5. iPSC 由来 T 細胞が持つ腫瘍細胞傷害性の検討

残念ながらまだ着手するに至っていない。

現在までの進捗状況により、MM 患者において、MM 腫瘍抗原に反応しうる特異的 CTL を持ち合わせていることを改めて確認できたことは大きな収穫である。またひとつひとつの腫瘍抗原特異的 CTL のクローンを回収し、培養できる手法を確立できたことも様々な研究につながる成果として評価ができるのではないかと考えている。また、培養・増殖させた腫瘍抗原特異的 CTL から iPSC を樹立することにも成功しており、今後さらに研究計画を遂行するよう努めていきたいと考えている。昨年未より、日本では抗 PD1 抗体であるニボルマブが転移性悪性黒色腫の治療薬として承認され、世界で先行承認・使用されている抗 CTLA4 抗体であるイビリムマブと合わせて、immune checkpoint blockade と呼ばれる薬剤として注目を集めている。これらの薬剤は既存の抗癌剤と異なり、癌細胞の持つ免疫抑制機構を解除し、患者の持つ腫瘍免疫を後押しするタイプの薬剤であり、非常に大きな成果をあげている。癌に対する免疫療法は効果が弱く、今まであまり着目はされていなかったが、この breakthrough により、正しく腫瘍免疫を惹起し、サポートすることこそが大切であることが示されたと考える。

本研究は、さらに腫瘍免疫を別の側面からサ

ポートすることで、より強い腫瘍拒絶を誘導しうるものであり、将来的にはこれら immune checkpoint blockade との併用なども検討しうると考えている。今後も本研究の発展、悪性黒色腫の克服のために努めていきたいと考えている。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：

出願年月日：

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

伊藤 宗成 ( ITOH, Munenari )

東京慈恵会医科大学・皮膚科学講座・講師

研究者番号：20408371

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：