

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290057

研究課題名(和文) 臨床試験実施へ向けたiPS-MLを用いたがん治療法の検討

研究課題名(英文) Evaluation of cancer therapy with iPS-ML aiming at clinical development

研究代表者

千住 覚 (SENJU, Satoru)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：50274709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：インターフェロン(IFN)- および は、多くの腫瘍細胞に対して増殖抑制効果を有し、また、免疫細胞を活性化する作用を有している。さらにIFNが腫瘍血管の新生を抑制する作用により腫瘍増殖を抑制することが知られている。しかしながら、IFNの臨床的有効性は、一部の腫瘍に限定される。その主な理由として、IFNを静脈内投与した場合に生じるIFNの全身性の作用により、抗腫瘍効果を発揮できる十分な量を投与できないことが挙げられる。本研究は、IFNを発現するiPS-ML(iPS細胞に由来するミエロイド系免疫細胞)によるがんの治療法の効果をマウスモデルを用いて検討した。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that macrophages producing IFN-beta may be useful for anti-cancer therapy. However, it is impossible to amplify human peripheral blood monocytes and thus the quantity of macrophages generated by donated blood may be insufficient for clinical use. We established a method to induce proliferation of human iPS-cell derived myeloid cells (iPS-MC) by introduction of genes promoting cell proliferation to generate iPS-cell derived myeloid/macrophage cell line (iPS-ML).

When iPS-ML were injected into the mice with pre-established peritoneal tumors (xenograft model of peritoneally disseminated cancer), iPS-ML infiltrated into the tumor tissues. In xenograft models, iPS-ML introduced with an expression vector for IFN-beta (iPS-ML/IFN-beta) profoundly inhibited the growth of peritoneally disseminated human gastric and pancreatic cancer. In addition, therapy with iPS-ML/IFN-beta was effective in xenograft models of primary and metastatic liver cancer.

研究分野：免疫学

キーワード：がん治療 免疫療法 細胞治療 iPS細胞 肝臓がん インターフェロン

## 1. 研究開始当初の背景

がん組織中には、しばしば、マクロファージや樹状細胞の浸潤が認められる。マクロファージの抗腫瘍効果に関しては古くから報告がある一方、近年は、腫瘍局所のマクロファージが癌の局所浸潤や転移を助長することを示す報告が相次いでいる。マクロファージは、元来、癌細胞に対する攻撃能力を有しており、生体内で高頻度に出現している腫瘍細胞を発生初期の段階で死滅させるという役割を担っているものと考えられる。しかしながら、がんが増殖し臨床的に診断可能なサイズまで進展している場合は、全身及び局所のサイトカイン環境の変化等により、マクロファージが抗腫瘍効果を失い、逆に、マクロファージによる組織リモデリング活性や血管新生誘導活性等が腫瘍の浸潤や転移を促進するものと考えられる。

マクロファージの抗腫瘍活性に着目した臨床試験が、海外においては複数実施されている。これらの臨床試験においては、アフエレーシス操作を用いて患者血液を大量に処理して末梢血単球を分離し、これを数日間培養して作製したマクロファージを患者体内に戻す、という治療が試みられている。しかしながら、これまでに報告されているいずれの臨床試験においても、明らかな治療効果は認められていない。その理由としては、投与されたマクロファージの数が治療効果を発揮するには不十分であり、また、がん患者の単球由来のマクロファージは本来の抗腫瘍効果を失っているものと考えられる。

樹状細胞は、よく知られているように、非常に強力なT細胞刺激活性を有する抗原提示細胞であり、がんに対する樹状細胞を用いたワクチン療法は、国内外において幅広く実施されている。最近では、米国における大規模な臨床試験において、前立腺癌に対する自己単球由来樹状細胞を用いた免疫療法の臨床的効果が確認されている。がん免疫療法に用いられる樹状細胞は、末梢血単球から作製されているが、化学療法を受けた患者等では十分な数の樹状細胞を調整できない場合がある。樹状細胞療法をさらに普及させ、有効性の評価を進めるには、樹状細胞の安定・大量供給システムの開発が必須である。

以上のように、マクロファージ療法と樹状細胞療法のいずれにおいても、治療効果の改

善には、細胞ソースの問題を改善する必要がある。すなわち、効果の高い治療用細胞を、必要な数だけ、かつできるだけ低コストで供給する方法を開発しなければならない。

ES細胞等の多能性幹細胞は、様々な細胞に分化する能力を保持したまま、ほぼ無限に増殖することが可能である。申請者は、樹状細胞療法における細胞ソースの問題を解決するため、10年程前から、ES細胞に由来する樹状細胞による免疫療法の研究を行ってきた。2007年にヒトiPS細胞の作製が発表された後は、iPS細胞を用いて研究を行ってきた。その結果、iPS細胞からマクロファージと樹状細胞を作製する方法を開発している。その後、治療細胞の製造コストを実用化できるレベルへ抑えるために、細胞産生効率を改善する必要があると考え、数年間にわたり様々な試行錯誤を行った。その結果、ヒトのiPS細胞に由来するミエロイド(CD11b<sup>+</sup>)細胞を増殖させることにより、大量の分化細胞(樹状細胞およびマクロファージ)を安定して得る方法の開発に成功した。

この方法では、ヒトiPS細胞由来のミエロイド系細胞にcMYC+BM11等の増殖・不死化因子を導入することにより、増殖性を有するミエロイド系細胞(マクロファージおよび樹状細胞の前駆細胞)を作製する。我々は、これを、iPS-ML(iPS cell-derived myeloid cell line)と名付けている。iPS-MLは、以下のような特性を有している。

1) M-CSFの存在化で長期に亘って増殖することが可能であり、大量のマクロファージ前駆細胞を単純な浮遊細胞培養操作により作製できる。また、遺伝的改変を施すことによってその機能を人為的に修飾することが可能である。

2) ヒトの腫瘍細胞を生着させたscidマウスにiPS-MLを投与すると、腫瘍局所に集積し腫瘍組織内部へ浸潤する。

3) IL-4を添加して培養すると、2-4日で強力なT細胞刺激活性を有する樹状細胞(ML-DC)へ分化する。

## 2. 研究の目的

本研究は、iPS-MLの特性を生かし、iPS-MLを用いた癌治療法の開発を行うものである。特に、iPS-MLおよびML-DCを用いた腹膜播種胃癌および膵臓癌に対する治療法の有効性

を検証し、さらに、より効果の高い治療法を探索する。具体的には、scid マウス腹腔内へヒトの癌細胞株を移植して作製したゼノグラフトモデルを用いて、iPS-ML の直接的抗腫瘍効果を検討することを目的とした。

### 3 . 研究の方法

#### iPS-ML の作製

未分化なヒト iPS 細胞をフィブロネクチンをコートした培養容器において、BMP-4 を添加した無血清培養液を用いて培養した。あるいは、マウス骨髄ストローマ細胞株 OP9 をマイトマイシン C 処理後ゼラチンコートした培養容器に播種し、分化誘導のためのフィーダー細胞として用いた。

16 から 26 日後、分化細胞を細胞分離液(コラゲナーゼ + トリプシン + KSR)を用いて回収し、非付着性の細胞を分離(培養ディッシュ中で一晩培養し、付着しなかった細胞を非付着性細胞として回収)した。この細胞を GM-CSF と M-CSF の存在下でさらに 5-7 日間培養すると、CD11b 等のミエロイド/単球系のマーカーを発現する浮遊細胞(iPS-MC)が出現する。

次に、iPS-MC へ、レンチウイルスを用いて cMYC+BMI1 あるいは cMYC+EZH2 を導入することにより、iPS-ML (増殖性を有するミエロイド細胞, 右下図)を得ることができる。iPS-ML は、M-CSF 依存性に増殖する。

iPS-ML に インタフェロン ベータ (IFN-beta) の発現ベクターを導入し、IFN-beta を 産 生 する iPS-ML (iPS-ML/IFN-beta)を作成した。

#### ゼノグラフト腫瘍モデルの作成及び治療効果の評価

scid マウス腹腔内へヒトの胃癌および膵臓癌細胞株を移植した腹膜播種癌モデルを用いて、ヒト iPS-ML による抗腫瘍効果を検討した。また、原発性肝臓がんのモデルを作成するために、マウスの肝臓へヒトの肝細胞癌細胞株を移植した。あるいは、マウスの脾臓へヒトの胃癌細胞株を移植した。

iPS-ML の腫瘍組織への集積と浸潤は、腫瘍が生着したマウスの腹腔内へ蛍光色素標識した iPS-ML/IFN を投与し蛍光観察により評価した。

ヒト iPS-ML/IFN による抗腫瘍効果を検討

するために、マウスの腹腔内にルシフェラーゼを発現する腫瘍細胞を移植する。発光イメージングにより、腫瘍増殖の経過を観察し、iPS-ML/IFN による治療効果を検討した。

#### GFP 発現腫瘍細胞株を用いた iPS-ML の腫瘍組織への浸潤の解析

担癌マウスに蛍光標識した iPS-ML を投与し、がん組織への浸潤を検討した。GFP を発現させた癌細胞を scid マウスの腹腔へ投与し 2 週間経過した後、蛍光色素 PKH-26 を用いて染色した iPS-ML を投与した。その翌日、マウスを解剖し腹腔内を露出させた状態で蛍光撮影を行った。形成されている腫瘍は、GFP 検出条件 (Ex/Em:475/520 nm)、投与した iPS-ML は、PKH-26 検出条件 (Ex/Em:550/600 nm) にて撮影、検出した。さらに、腫瘍組織を摘出、固定し、凍結切片を作製して、蛍光顕微鏡による観察を行った。

### 4 . 研究成果

胃癌腹膜播種モデル、膵臓癌腹膜播種モデル、原発性肝臓がんモデル、及び転移性肝臓がんモデルにおいて、iPS-ML/IFN-beta による治療効果検討した。

これらのがん細胞株を注射後、陽性と診断されたマウスを試験群と対照群に分け、試験群のマウスの腹部に iPS-ML/IFN-beta 細胞を週に 2 ~ 3 回、2-3 週間注射した。

いずれのがんモデルにおいても、iPS-ML/IFN-beta の治療により、腫瘍増殖を抑制する効果が認められた。

肝臓がんモデルにおいては、腫瘍を有する肝臓では、IFN-beta の濃度が腫瘍のない肝臓よりも高いことが判明した。これは、iPS-ML/IFN-beta 細胞が腹腔と肝実質を隔てる被膜(漿膜)を通過し、肝臓内のがん病巣に向かって移動するためと考えた。実際に、肝臓内の腫瘍病変に iPS-ML/IFN-beta が直接浸潤していることを示す画像データが得られた。一方で腫瘍のない肝臓には iPS-ML/IFN-beta 細胞は浸透せず、組織表面にとどまった。

また、iPS-ML/IFN-beta 注射後 24 時間から 72 時間までの IFN-beta 濃度は、腫瘍細胞の増殖を阻害、または腫瘍細胞死を引き起こすのに十分な濃度であった。

## 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 4 件)

1. Sakisaka M, Haruta M, Komohara Y, Umemoto S, Matsumura K, Ikeda T, Takeya M, Inomata Y, Nishimura Y, Senju S. Therapy of primary and metastatic liver cancer by human iPS cell-derived myeloid cells producing interferon- . **Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences**. doi: 10.1002/jhbp.422, 2017
2. Miyashita A, Fukushima S, Nakahara S, Kubo Y, Tokuzumi A, Yamashita J, Aoi J, Haruta M, Senju S, Nishimura Y, Jinnin M, Ihn H. Immunotherapy against Metastatic Melanoma with Human iPS Cell-Derived Myeloid Cell Lines Producing Type I Interferons. **Cancer Immunol Res**. 3: 248-258, 2016.
3. Zhang R, Liu TY, Senju S Haruta M, Hirose N, Suzuki M, Tatsumi M, Ueda N, Maki H, Nakatsuka R, Matsuoka Y, Sasaki Y, Tsuzuki S, Nakanishi H, Araki R, Abe M, Akatsuka Y, Sakamoto Y, Sonoda Y, Nishimura Y, Kuzushima K, Uemura Y. Generation of mouse pluripotent stem cell-derived proliferating myeloid cells as an unlimited source of functional antigen-presenting cells. **Cancer Immunol Res**. 3:668-677 2015
4. Haga E, Endo Y, Haruta M, Koba C, Matsumura K, Takamatsu K, Ikeda T, Nishimura Y, Senju S. Therapy of peritoneally disseminated colon cancer by TAP-deficient embryonic stem cell-derived macrophages in allogeneic recipients. **J Immunol**.193: 2024-2033, 2014

[学会発表](計 11 件)

1. iPS 細胞を用いたがん免疫療法の開発, 植村靖史, 柏の葉カンファレンスセンター(千葉県柏市), 2016年1月29
2. 千住覚: iPS 細胞由来のミエロイド細胞(iPS-ML)によるがん治療 第62回日本輸血・細胞治療学会総会、奈良県文化会館、奈良県新公会堂 東大寺総合文化

センター(奈良市)2014年5月16日(5/16 シンポジウム7講演)

3. 千住覚: iPS 細胞を用いた癌に対する免疫細胞療法。遺伝子・デリバリー研究会第14回夏期セミナー 阿蘇いこいの村(阿蘇市)2014年8月20日~21日(8/20 特別講演2)
4. 千住覚: 細胞治療に向けた樹状細胞の可能性。第42回日本臨床免疫学会総会 京王プラザホテル(東京都)2014年9月25日~27日
5. 千住覚、匂坂正孝、春田美和、羽賀栄理子、松村桂子、今村悠哉、池田徳典、西村泰治: ゼノグラフトモデルにおける胃癌肝転移に対する iPS-ML による治療の効果。第73回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(横浜市)2014年9月25~27日(9/26 胃癌・抗腫瘍効果(2) 口頭発表)
6. Haga, E., Endo, Y., Haruta, M., Koba, C., Matsumura, K., Takamatsu, K., Ikeda, T., Nishimura, Y., Senju, S. Therapy of peritoneally disseminated colon cancer by TAP-deficient ES cell-derived macrophages in allogeneic recipients in a mouse model. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 京都国際会議場(京都市)2014年12月10日~12日(ワークショップ 19 Tumor-induced immunosuppression and immunotherapy against cancer)
7. S Senju, M Haruta, A Mimori, K Matsumura, K Kanagawa, E Haga, Y Imamura, M Sakisaka, T Ikeda, Y Nishimura Cancer therapy with ES cell-derived macrophages producing interferon in a mouse mode 日本がん免疫学会 伊藤国際学術研究センター(東京都)2015年7月9日
8. Senju S: Cancer therapy with iPS cell-derived myeloid cells 日本血液学会 石川県立音楽堂(金沢市)シンポジウム10 2015年10月18日
9. 千住覚: iPS 細胞由来のミエロイド細胞による胃癌腹膜播種治療法の開発 千

里ライフサイエンスセミナー千里ライ  
フサイエンスセンター（大阪市）2015  
年 11 月 25 日

10. 千住覚：iPS 細胞を用いたがんに対する  
免疫細胞治療 日本再生医療学会 大阪  
国際会議場（大阪市）日本免疫治療学研  
究会ジョイントシンポジウム 2016 年 3  
月 18 日
11. Senju S: Cancer therapy with iPS  
cell-derived myeloid cells マクロフ  
ァージ分子生物学国際シンポジウム  
(MMCB2016)ソラシティ カンファレンス  
センター(東京都) 2016 年 6 月 5 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 <http://www.immgenet.jp>

## 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

### (2)研究分担者

植村靖史 (UEMURA, Yasushi)  
国立研究開発法人 国立がん研究センター  
先端医療開発センター  
ユニット長  
研究者番号：40364781