

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461923

研究課題名(和文) 癌幹細胞を標的としたiPS細胞由来細胞傷害性T細胞を用いた新規癌免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of the new cancer immunotherapy using iPS- derived CTLs for cancer stem cells

研究代表者

中村 公紀(Nakamura, Masaki)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80364090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：当教室では、以前より、樹状細胞(dendritic cell ; DC)を用いた細胞傷害性T細胞(CTLs; cytotoxic T lymphocytes)による抗腫瘍効果の有用性を報告してきた。今回、消化器固形癌の癌胎児性抗原(CEA)遺伝子導入マウスiPS細胞由来DCs(miPSDCs-CEA)を作成し、CEA transgenic mouseを用いて、miPSDCs-CEAワクチンによる特異的CTLsの誘導、抗腫瘍効果を検討した。結果、miPSDCs-CEAワクチンによるCEA特異的CTLの誘導、および著明な腫瘍増殖抑制効果を認めた。今後、ヒト消化器癌に対して臨床応用をめざす予定である。

研究成果の概要(英文)：We have reported an effective antitumor immune response of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) by vaccine therapy using dendritic cells (DCs). Moreover, we have used the induced pluripotent stem (iPS) cell-derived DCs (iPSDCs). In the present study, we used carcinoembryonic antigen (CEA) of gastrointestinal cancers, and examined an actual antitumor effect using a CEA transgenic mouse model. We adenovirally transduced the CEA gene into mouse iPSDCs (miPSDCs) and immunized mice once with the genetically modified DCs. The cytotoxic activity of CTLs and the therapeutic efficacy of this vaccination were assayed. Our results showed significantly higher cytotoxicity against MC38-CEA and significantly higher therapeutic efficacy in mice administered with miPSDCs-CEA than in mice immunized with PBS and miPSDCs-LacZ. Therefore, this vaccination strategy using genetically modified iPSDCs expressing CEA may be useful for future clinical application against patients with a gastrointestinal cancer.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：iPS細胞 樹状細胞 癌免疫療法

1. 研究開始当初の背景

我々は、以前より癌特異的免疫療法として、樹状細胞(dendritic cell ; DC)を用いた細胞傷害性 T 細胞 (CTL; cytotoxic T lymphocyte)による抗腫瘍効果の有用性を報告してきた。我々は、マウス大腸癌細胞株 CT26 の腫瘍抗原遺伝子 gp70 を GM-CSF 遺伝子と同時に DC に導入し、この DC をマウスに投与することで CT26 に対する極めて強い CTL の抗腫瘍免疫反応が誘導されることを報告した (Clin Cancer Res 8:2742-2749, 2002, Oncology 68: 163-170, 2005)。さらに改良を加え、IL-12 の遺伝子やユビキチン遺伝子を腫瘍抗原遺伝子導入 DC に同時導入し、強力な CTL の誘導を証明した (Int J Cancer 120:585-593, 2006, Int J Oncol 28: 947-953, 2006, Int J Oncol 31:931-939, 2007, Cancer Sci. 99:407-13, 2008, Cancer Lett. 305:32-9, 2011)。また、さらには DC の安定した増幅を目的とし、iPS(induced pluripotent stem cell)細胞から DC を分化させ、その機能が骨髓細胞由来の DC の機能を担保することも証明した (Int J Cancer. 2014; 134:332-41.)。このように CTL を活性化させる免疫遺伝子治療は特異的に癌細胞を攻撃する最も有効な癌治療法の一つであり、その治療法を癌幹細胞に応用することは極めて有用であると考えられる。

2. 研究の目的

当初、本研究は、iPS 細胞から直接大量に、癌幹細胞特異的抗原を標的とした細胞傷害性 T 細胞を作製し、さらに効率的で強力な癌幹細胞に対する癌免疫療法を構築し、究極の癌免疫治療を確立することを目的に開始した。しかし、消化管癌幹細胞マーカー発現 adenovirus vector の作製および調整、iPS 細胞から CTL への誘導に難渋したため、消化器固形癌の癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 遺伝子導入 iPS-DCs を作成し、CEA transgenic mouse を用いて、CEA 遺伝子導入 iPS-DCs それによる CTL の誘導、増強効果を検討した。

3. 研究の方法

・CEA transgenic mouse の再生

胚細胞の状態である C57BL/6J-TgN(CEA_{Ge}) 18FJP mice (Dr F. James Primus より供与) を本学動物実験施設にて繁殖させる。生まれしてきた Tg mouse は、その tail の genome DNA 中の CEA 遺伝子の存在を PCR にて確認する。以下の実験ではこの Tg mouse を使用する。

・マウス iPS 細胞株の樹状細胞 (DC) への分化誘導

マウス iPS 細胞は、iPS-MEF-Ng-20D-17 を使用 (RIKEN CELL BANK より購入) (Step1) マウス iPS 細胞株をゼラチンコートし非動化した OP9 細胞を seed された 6 well dish に播種し、MEM 下で共培養する。

(Step2) Step1 で回収した細胞を、OP9 細胞を seed された 150 mm dish に播種し、MEM/GM-CSF 下で共培養する。

(Step3) Step2 で回収した細胞を、90 mm dish に播種し、R-10/GM-CSF 下で共培養する。

(Step4) Step3 で回収した細胞を、90 mm dish に播種し、R-10/TNF /GM-CSF 下で共培養する。

・CEA 遺伝子導入マウス iPS-DC の樹立

分化誘導した iPS-DC に、Adenovirus を用いて遠心法にて、CEA 遺伝子を導入する。遺伝子導入後 48 時間後の CEA 発現を intracellular FACS で確認し実験に用いる。また、コントロール遺伝子として LacZ を用いる。

・CEA 遺伝子導入 iPS-DC ワクチンによる特異的細胞障害性 T 細胞 (以下 CTL) の誘導

1. C57BL/6J-TgN(CEA_{Ge})18FJP mice に DC vaccine (1×10^6) を投与する。

各 group n=6

group 1 : PBS

group 2 : miPS-DC-LacZ

group 3 : miPS-DC-CEA

2. Day14 に sacrifice し、脾臓を摘出する。

これを target cell と共に 5 日間培養する。

target cell は MC38-CEA (CEA(+))、

MC38 (CEA(-))、YAC-1 (NK 感受性(+)) を使用。

3. 51Cr を用いて Cr-release assay を行う。

・腫瘍抗原遺伝子導入 iPS-DC ワクチンによる腫瘍増殖抑制効果

1. Day0

C57BL/6J TgN(CEA_{Ge}) 18FJP mice に MC38-CEA を 1×10^6 投与する。

2. Day5

C57BL/6J TgN(CEA_{Ge}) 18FJP mice に DC vaccine (1×10^6) を投与する。

各 group n=7

group 1 : PBS

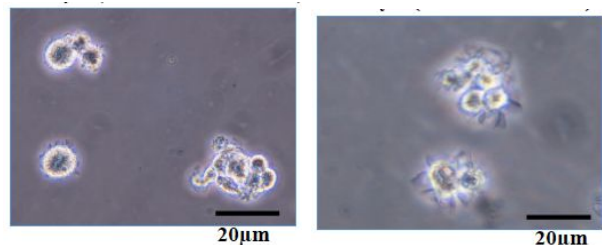
group 2 : miPS-DC-LacZ

group 3 : miPS-DC-CEA

4. 研究成果

(1) マウス iPS 細胞株の樹状細胞 (DC) への分化誘導

形態的にも Monocytes 由来 DCs (MoDCs) と同等



(immature miPSDCs)

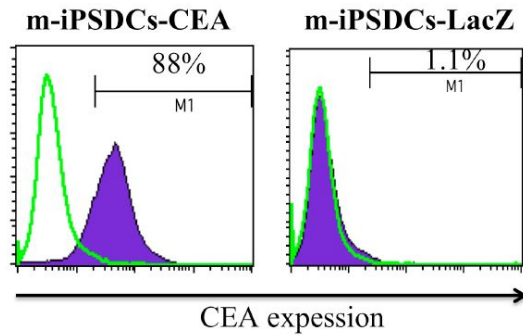
(mature miPSDCs)

(Iwamoto H et al. Int J Cancer. 2014; 134:332-41.)

(2) CEA 遺伝子導入マウス iPSCs の作製
表面マーカー CD11c, CD80, CD86, I-A^b の確認

CEA 遺伝子導入マウス iPSCs の CEA 発現の確認

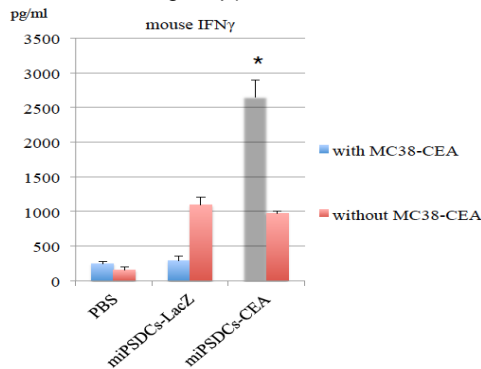
DCs と adenovirus vector (100 MOI) を混合させ、37 °C、2000g、2 時間遠心して感染後、TNF にて 48 時間 maturation させ、CEA の発現を確認。



(3) CEA 遺伝子導入マウス iPSCs ワクチンによる特異的 CTLs の誘導

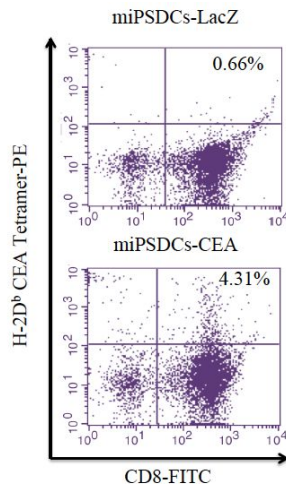
IFN Secretion Assay :

CEA 遺伝子導入マウス iPS-DC を投与したマウスの脾細胞は、CEA 発現 MC38 に対して有意に高い IFN の産生を認めた (* P<0.001; n=6 for each group).

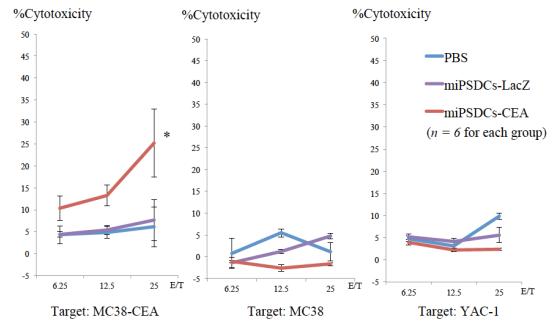


Tetramer assay:

CEA 遺伝子導入 iPS-DC ワクチンによる T 細胞は、CEA 特異的 CD8+T 細胞であった。

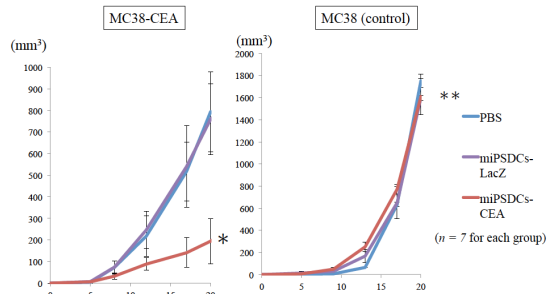


CEA 遺伝子導入マウス iPSCs を投与したマウスの CTL は、PBS、LacZ 遺伝子導入マウス iPSCs を投与したマウスと比較して、有意に CEA 発現 MC38 に対する細胞障害活性を認めた (P<0.01)。



(4) 皮下腫瘍モデルにおける腫瘍増殖抑制効果の検討

CEA 発現 MC38 の皮下腫瘍モデルにおいて、CEA 遺伝子導入マウス iPSCs によるワクチン効果は、コントロール群 (PBS、LacZ 遺伝子導入マウス iPSCs) と比較して、有意に抗腫瘍効果を認めた (* P<0.01)。一方、CEA を発現していない MC38 に対する抗腫瘍効果は認めなかった (** P<0.05)



以上より、1)CEA transgenic mouse において、CEA 遺伝子導入マウス iPSCs ワクチンにより CEA 特異的 CTL の誘導が可能であり、MC38-CEA に対し高い細胞障害活性を示すことを明らかにした。2)皮下腫瘍モデルを用いた検討において、CEA 遺伝子導入マウス iPSCs ワクチンは、MC38-CEA に対する著明な腫瘍増殖抑制効果を認めることを証明した。

本結果から、今後、ヒト消化器癌に対して臨床応用をめざし、さらに強力な CTL の開発を進めていく予定である。

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4件)

1: Kitadani J, Ojima T, Iwamoto H, Tabata H, Nakamori M, Nakamura M, Katsuda M, Miyazawa M, Hayata K, Yamaue H. Cancer Immunotherapy Using Human Induced

Pluripotent Stem Cell-Derived Dendritic Cells (iPSCs) Expressing Carcinoembryonic Antigen. Gan To Kagaku Ryoho. 2016 Sep;43(9):1071-3. 査読有

2: Ojima T, Nakamori M, Nakamura M, Katsuda M, Hayata K, Nakamura Y, Yamaue H.

Expression of BRCA1, a factor closely associated with relapse-free survival, in patients who underwent neoadjuvant chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and fluorouracil for squamous cell carcinoma of the esophagus. Surg Today. 2017 Jan;47(1):65-73. 査読有

3: Iida T, Iwahashi M, Katsuda M, Ishida K, Nakamori M, Nakamura M, Naka T, Ojima T, Ueda K, Hayata K, Yasuoka H, Yamaue H. Prognostic significance of IL-17 mRNA expression in peritoneal lavage in gastric cancer patients who underwent curative resection. Oncol Rep. 2014 Feb;31(2):605-12. 査読有

4: Iwamoto H, Ojima T, Hayata K, Katsuda M, Miyazawa M, Iida T, Nakamura M, Nakamori M, Iwahashi M, Yamaue H. 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 Jan 15;134(2):332-41. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

1: Ojima T, Kitadani J, Iwamoto H, Nakamori M, Nakamura M, Yamaue H; Feasibility of Cancer Vaccine Therapy using Dendritic Cells Generated from Induced Pluripotent Stem Cells Expressing Carcinoembryonic Antigen. 2017 ASCO. 2017.6.Chicago, USA

2: 岩本博光、尾島敏康、北谷純也、田端宏堯、早田啓治、勝田将裕、宮澤基樹、中村公紀、中森幹人、山上裕機: 臨床応用に向けた腫瘍抗原 (TAA) 遺伝子導入 iPSC 細胞由来樹状細胞 (iPSCs) 癌ワクチン療法の改善点. 第 15 回日本再生医療学会総会. 2016.3.大阪

3: Iwamoto H, Ojima T, Kitadani J, Tabata H, Hayata K, Katsuda M, Miyazawa M, Nakamura M, Nakamori M, Yamaue H. The cancer vaccine therapy using DCs derived from iPSC cells (iPSCs) expressing TAA gene. ASCO-Gastrointestinal Cancers Symposium. 2016.1.San Francisco, USA

4: 岩本博光、尾島敏康、北谷純也、田端宏堯、早田啓治、勝田将裕、宮澤基樹、中村公紀、中森幹人、山上裕機: iPSC 細胞由来樹状細胞 (iPSCs) 癌ワクチン療法の基礎研究と臨床応用への道筋: A basic research and the road to a clinical application of the cancer vaccine therapy using iPSCs. 第 53 回日本癌治療学会学術集会. 2015.10.京都

5: 岩本博光、尾島敏康、北谷純也、田端宏堯、早田啓治、勝田将裕、宮澤基樹、中村公紀、中森幹人、山上裕機: iPSC 細胞由来樹状細胞 (iPSCs) 癌ワクチン療法のこれまでの基礎研究の成果と臨床応用に向けての課題. 第 70 回日本消化器外科学会総会. 2015.7.浜松

6: 尾島敏康、岩本博光、中森幹人、中村公紀、北谷純也、勝田将裕、早田啓治、松村修一、加藤智也、田端宏堯、竹内昭博、岩橋誠、山上裕機: iPSC 細胞由来樹状細胞を用いた消化器固形癌テラーメイド治療の可能性. 第 115 回日本外科学会学術集会. 2015.4.名古屋

〔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:
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

中村 公紀 (Nakamura Masaki)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 80364090

(2) 研究分担者

山上 裕機 (Yamaue Hiroki)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20191190

中森 幹人 (Nakamori Mikihiro)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10322372

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