

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 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：26461991

研究課題名(和文) ヒト腫瘍抗原遺伝子導入iPS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 iPS-derived dendritic cells expressing TAA

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はiPS細胞をDCに分化誘導することで、安定した機能と数のDCを供給可能と考え、iPS細胞由来DC(iPSDC)を使用したワクチン療法の確立を進めている。本研究では、健康人ヒト線維芽細胞からセンダイウイルスベクターを用いてiPS細胞を樹立し、xenofree培養下にiPSDCの分化誘導に成功した。このヒトiPSDCは、末梢血単核球由来のDCと同様の成熟能を認め、また自己仮想targetである、LCL-CEAに対しCEA特異的な細胞障害性を示し、さらにCEA発現細胞株に対しても同様に細胞障害活性を呈することを確認した。臨床応用を視野に入れて、消化器固形癌の担癌患者における検討を開始している。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether genetically modified human induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived dendritic cells (hiPSDCs) expressing carcinoembryonic antigen (CEA) could induce CEA-specific cytotoxic T cells in a human model, and whether genetically modified mouse iPSDCs (miPSDCs) expressing CEA would show an actual antitumor effect using a CEA transgenic mouse model. We differentiated hiPSDCs from iPSCs of three healthy donors and transduced the CEA cDNA into hiPSDCs. The cytotoxic T cells induced by hiPSDCs-CEA exhibited CEA-specific cytotoxic activity against the target cells expressing CEA. Furthermore, in the CEA transgenic mouse model, the cytotoxic T cells generated in mice immunized with miPSDCs-CEA showed CEA-specific cytotoxic activity against MC38-CEA. Genetically modified iPSDCs expressing CEA is a promising tool for clinical application on vaccine therapy against gastrointestinal cancer patients.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：iPS細胞 樹状細胞 腫瘍抗原 ウイルスベクター がんワクチン

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞 dendritic cells (DCs) は、T 細胞への最も効果的な抗原提示能力をもった免疫細胞である。これまでわれわれの教室では、多くの DCs ワクチン療法に関する研究を行ってきた。しかしながら、臨床的に用いる場合、担癌患者から誘導した DCs は成熟能が低く、さらに抗原提示能が低いとされる。われわれは、iPS 細胞 induced pluripotent stem cells (iPSCs) が細胞療法に用いる DCs を作製する材料として有用ではないかと考えた。Iwamoto らは、マウス iPSDCs は、bone marrow-derived DCs (BMDCs) と同等の樹状細胞としての機能及び抗原提示能を有していることを報告した。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト iPS 細胞からヒト iPSDCs の分化誘導を行い、機能に関して Monocyte-derived DCs (MoDCs) と比較検討した。さらに消化器固形癌を対象として、carcinoembryonic antigen (CEA) 遺伝子導入 iPSDCs を作成し、*in vitro* の cytotoxic T lymphocyte (CTL) 誘導能を検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPSDCs の分化誘導

健常人ドナー (HLA-A24/02) の皮膚組織からヒト皮膚線維芽細胞の初代培養を行い、センダイウイルスベクター (Dनावec Corporation) にて山中 4 因子を遺伝子導入し、iPS 細胞の樹立を行った。得られた iPS 細胞を Matrigel コートした dish でフィーダーレス培養を行い、その後 5 ステップで分化誘導を行った。第 1 に bone morphogenetic protein (BMP) 4 を添加し 4 日間培養した。第 2 に vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (b-FGF), stem cell factor (SCF) を添加した StemPro[®]-34 (Thermo Fisher Scientific) に置き換え 2 日間培養した。第 3 に SCF, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), thrombopoietin (TPO), Fms-related tyrosine kinase (Flt)-3 ligand, interleukin (IL) -3 を添加した StemPro[®]-34 に変更し、7 日間培養した。第 4 に M-CSF, Flt-3 ligand, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) を添加した StemPro[®]-34 に変更し 3 日間培養した。浮遊してくる細胞を CD14 抗体で標識し、auto MACS Pro (Miltenyi Biotec) にて分離した。第 5 に回収した細胞を GM-CSF, IL-4 を加え 5 日間培養し、その後 2 日間 maturation cocktail として prostaglandin E2 (PGE2), IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF) - α を添加し浮遊細胞を回収した。

(2) ヒト iPSDCs の機能評価

成熟能の比較

ヒト iPSDCs と MoDCs の表面マーカーの発現 (CD11c, CD80, CD83, CD86, CD40, HLA-ABC, HLA-DR) に関して、未成熟、成熟 DCs についてフローサイトメトリーにて

比較検討した。

サイトカイン産生能の比較

ヒト iPSDCs と MoDCs のサイトカイン産生能の比較のため、それぞれの未成熟、成熟 DCs にてサイトカインの分泌 (IFN- γ , IL-12p70) を ELISA 法にて比較検討した。

遊走能の比較

まず、8.0 μ m pore transwell plate (Corning) の lower chamber に 100ng/ml macrophage inflammatory protein (MIP)-3 β を添加した AIM-V medium を 1 ml 加えた。未成熟、成熟ヒト iPSDCs または MoDCs を 1.5 \times 10⁶ cells/ml の細胞濃度で AIM-V medium に suspend し、0.1ml を upper chamber に添加した。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ で 2 時間インキュベートし、lower chamber 内に遊走してきた DCs をセルカウントし、それぞれ比較検討した。

(3) 腫瘍抗原遺伝子導入 iPSDCs による *in vitro* における細胞障害活性誘導能の検討

回収した未成熟 DCs と CEA 発現 adenovirus vector を 100MOI で混合させ、37 $^{\circ}$ C, 2000g にて 2 時間遠心して感染後、maturation cocktail にて 48 時間 maturation した responder を自己の PBMCs, stimulator を CEA 遺伝子導入 iPSDCs とし、20:1 の割合で 1 週毎に 3 回刺激した。得られた細胞から auto MACS Pro にて CD8(+) CTLs を抽出した。ターゲット細胞として、自己リンパ球から誘導した lymphoblastoid cell lines (LCL) に CEA を発現させた LCL-CEA, HLA-A24 拘束性 peptide である CEA652 peptide をパルスした LCL-CEA652 peptide, そして Lac Z 遺伝子を導入した LCL-LacZ を用い ⁵¹Cr-release assay にて特異的細胞障害活性を解析した。また、CEA を発現する胃癌細胞株である MKN45, 大腸癌細胞株である HT29, また CEA を発現していない胃癌細胞株である MKN1 についても特異的細胞障害活性を示すかどうかも検討した。

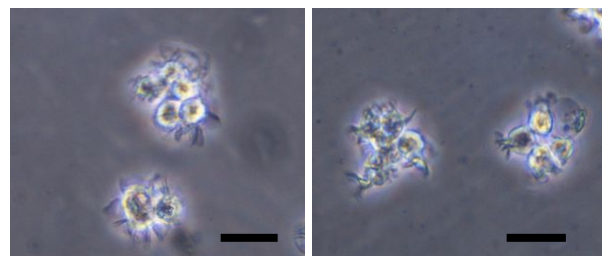
4. 研究成果

(1) ヒト iPSDCs の分化誘導

第 3 ステップの後半になると、ドーム状の胚様体を形成し、第 4 ステップでは小円形の浮遊細胞を多数認められた。第 5 ステップでは、樹状突起を持つ淡明な細胞が現れ、maturation によりその数も多くなった。形態的にも MoDCs と同様であった。

図 1 ヒト iPSDCs の分化誘導

mature hMoDCs mature hiPSDCs



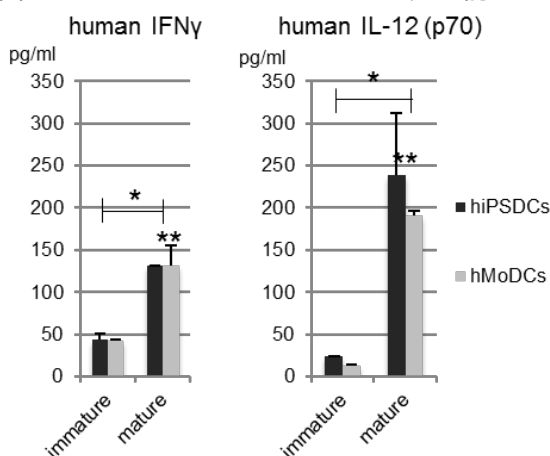
(2) ヒト iPSDCs の機能評価
成熟能の比較

ヒト iPSDCs は MoDCs と同様に maturation cocktail にて成熟し, 表面マーカーである CD80, CD83, CD86, CD40, HLA-ABC, HLA-DR の同程度の発現を認めた.

サイトカイン産生能の比較

ヒト iPSDCs, MoDCs いずれも, 未成熟な DCs では, ほとんど IFN- γ や IL-12p70 の産生を認めなかったが, 成熟した DCs では, IFN- γ , IL-12p70 共に高い産生を認めた(IFN- γ において iPSDCs: MoDCs=131pg/mL:132pg/mL, IL-12p70 において iPSDCs: MoDCs=239pg/mL:191pg/mL).

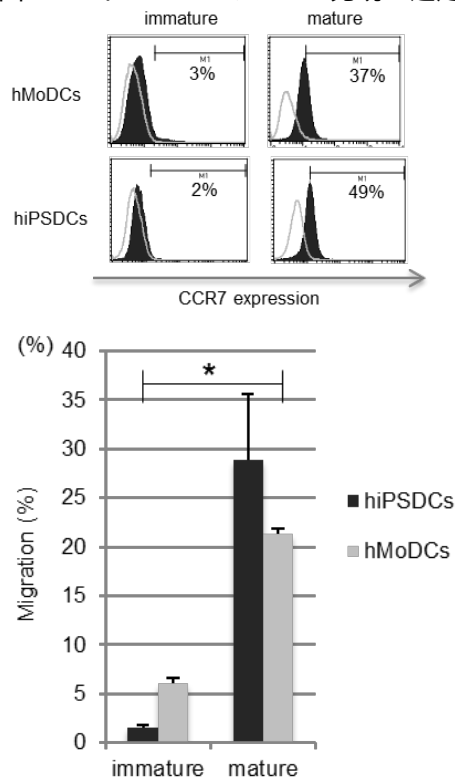
図2 ヒト iPSDCs のサイトカイン産生能



遊走能の比較

ヒト iPSDCs, MoDCs いずれも, 未成熟な DCs では, ほとんど遊走を認めなかったが, 成熟した DCs では, 同等な遊走能を認めた.

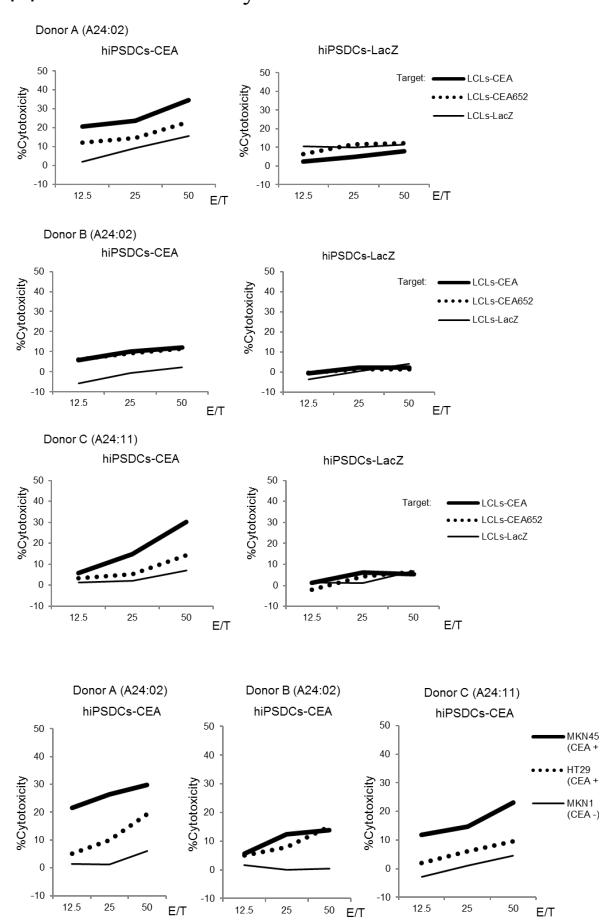
図3 ヒト iPSDCs の CCR7 発現 遊走能



(3) 腫瘍抗原遺伝子導入 iPSDCs による *in vitro* における細胞障害活性の検討

CEA 遺伝子導入 iPSDCs での刺激により誘導された CTLs は自己仮想ターゲットである, LCL-CEA, LCL-CEA652 peptide に対し, 高い細胞障害活性を認めたが LCL-LacZ では認めなかった (E/T 比 50 にて 34.7% vs 22.9% vs 15.5%). また, CEA を発現している cell line である MKN45, HT29 に対しても同様に細胞障害活性を認めたが, CEA を発現していない MKN1 に対しては認めなかった (E/T 比 50 にて 29.7% vs 19.2% vs 6.1%). 以上より, CEA 遺伝子導入 iPSDCs は CEA 特異的に細胞障害活性誘導能を認めることを証明した.

図4 Cr-release assay



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 23 件)

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 (iPSDCs) Expressing Carcinoembryonic Antigen. Gan To Kagaku Ryoho. 2016 Sep;43(9):1071-3. 査読有 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
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. DOI: 10.3892/or.2013.2911. 査読有
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. doi: 10.1002/ijc.28367. 査読有

〔学会発表〕(計 55 件)

Ojima T, Kitadani J, Iwamoto H, Nakamori M, Nakamura M, and Yamaue H: Feasibility of Cancer Vaccine Therapy using Dendritic Cells Generated from Induced Pluripotent Stem Cells Expressing Carcinoembryonic Antigen. 2017 ASCO. 2017. 6.2 Chicago USA

尾島敏康, 岩本博光, 北谷純也, 田端宏堯, 中森幹人, 中村公紀, 勝田将裕, 早田啓治, 竹内昭博, 山上裕機: Cancer Vaccine Therapy using iPS-derived Dendritic Cells. 第 25 回日本癌病態治療研究会, 2016.6.8 三井ガーデンホテル 千葉

尾島敏康 岩本博光 北谷純也 田端宏堯 中森幹人 中村公紀 勝田将裕 早田啓治 加藤智也 竹内昭博 山上裕機: iPS 細胞由来樹状細胞を用いた癌ワクチン療法. 第 54 回日本癌治療学会 学術集会, 2016. 10.20 パシフィコ横浜 横浜

Ojima T, Nakamori M, Nakamura M, Katsuda M, Hayata K, Matsumura S, Kato T, Yamaue H: Expression of ERCC1, TUBB3, BRCA1, and TS as predictive markers of neoadjuvant chemotherapy for squamous cell carcinoma of the esophagus. 2016 ASCO-Gastrointestinal Cancers Symposium. 2016. 1.16 San Francisco USA

Ojima T, Nakamori M, Nakamura M, Iwahashi M, Katsuda M, Hayata K,

Matsumura S, Yamaue H: A phase I/II study of divided-dose docetaxel, cisplatin and fluorouracil (DCF) for patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the esophagus. 2015 ASCO-Gastrointestinal Cancers Symposium. 2015. 1.15 San Francisco USA

尾島敏康, 岩本博光, 北谷純也, 山上裕機: CEA 遺伝子導入 iPS 細胞由来樹状細胞を用いた癌ワクチン療法の可能性. 第 14 回日本再生医療学会総会, 2015.3.23 パシフィコ横浜 横浜

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: iPS 細胞由来樹状細胞を用いた消化器固形癌テラームイド治療の可能性. 第 115 回日本外科学会学術集会, 2015. 4.16 名古屋国際会議場 名古屋

〔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〕

ホームページ等

https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr_view.cgi?recptno=R000024348

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

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

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

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