

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462078

研究課題名(和文) iNKT細胞のリプログラミングと膵臓癌免疫療法への応用

研究課題名(英文) Reprogramming and re-differentiation of invariant NKT cells for pancreatic cancer immunotherapy

研究代表者

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

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)：多くのがん患者では、iNKT細胞数の減少や機能低下が観察されており、これを回復する方法の開発に期待が寄せられている。私達はiNKT細胞を人工多能性幹細胞(iPSC)まで初期化した後に、IL-2/IL-15を用いて再分化を誘導する方法を開発した。再生iNKT細胞は、 $\alpha$ -ガラクトシルセラミドを認識して増殖応答とIFN- $\gamma$ 産生を示し、樹状細胞の活性化を介して細胞傷害性T細胞の増殖を誘導した。一方、再生iNKT細胞は、がん細胞に対してNKG2DとDNAM-1依存性の直接傷害活性を示した。以上より、再生iNKT細胞は、膵臓癌に対して効果的な免疫療法を提供するプラットフォームとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：V $\alpha$ 24 invariant natural killer T (iNKT) cells are a subset of T lymphocytes implicated in the regulation of broad immune responses. Reduced iNKT cell numbers and function have been observed in many patients with cancer. To recover these numbers, we reprogrammed human iNKT cells to pluripotency and then re-differentiated them into regenerated iNKT cells in vitro through an IL-2/IL-15-based optimized cytokine combination. The re-differentiated iNKT cells showed proliferation and IFN- $\gamma$  production in response to  $\alpha$ -galactosylceramide, induced dendritic cell maturation and downstream activation of cytotoxic T lymphocytes, and exhibited NKG2D- and DNAM-1-mediated NK cell-like cytotoxicity against cancer cell lines. The immunological features of re-differentiated iNKT cells and their unlimited availability from induced pluripotent stem cells offer a potentially effective immunotherapy against pancreatic cancer.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：外科 膵臓 がん 免疫

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は、極めて予後の悪い消化器癌の1つであり、有効な治療がなく、膵臓癌と診断された患者の生存期間は、昔とほとんど変わっていない。また、分子標的薬の恩恵を受けている他の癌に比較して、膵臓癌患者の治療選択肢は極めて限られている為、より効果的な治療法の開発が切望されている。

インバリアントナチュラルキラーT (iNKT) 細胞は、T細胞とナチュラルキラー(NK)細胞の両方の特徴を有し、多型をもたないCD1d分子に提示された糖脂質抗原(α-GalCer)を認識する特殊なT細胞サブセットである。この細胞は、樹状細胞(DC)との相互作用により、細胞傷害性T細胞(CTL)やナチュラルキラー(NK)細胞を活性化することにより、抗腫瘍効果を発揮することが知られている。近年、千葉大で実施されたiNKT細胞療法の臨床試験は、α-GalCer負荷DCを投与して生体内のiNKT細胞を活性化させるものであるが、初回治療だけでもかかわらず平均生存期間が数倍延長することが示されている。その一方で、治療対象の2/3のがん患者では、iNKT細胞数が少ない為、治療を受けることができないのが現状である。従って、iNKT細胞の若さと数を回復できれば広く応用が可能となる。私達は、疲弊T細胞クローンから人工多能性幹細胞(iPSC)を作製(初期化・リプログラミング)し、これから再度分化誘導して得られたT細胞は、疲弊マーカーを消失して、テロメア長の伸長を示すなどの若返りが得られ、T細胞機能が回復することを明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究課題は、iNKT細胞を多能性幹細胞のレベルまでリプログラミングした後に、iNKT細胞(iPSC-iNKT細胞)への分化を誘導して若返りによる機能改善を図る。これを膵臓癌患者に投与して、免疫抑制性の癌微小環境を改善するとともに、持続的で強力な膵臓癌の排除を誘導する新たな免疫療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒトiNKT細胞にリプログラミングファクターを導入してiPSCを作製する。

iNKT-iPSCから造血系分化を經由してT細胞への分化誘導を行い、ヒトiNKT細胞分化に重要な因子を同定する。

分化誘導したiNKT細胞のTCR遺伝子再構成、抗原特異性などを解析して、機能的なiNKT細胞であることを確認する。

DCに賦与する機能的修飾(アジュバント効果)を明らかにする。

4. 研究成果

1. iNKT細胞に由来するiPSQ(iNKT-iPSC)の作製

ヒトiNKT細胞株にリプログラミングファクター(Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc)を導入してiPS細胞を樹立した(図1)。樹立された細胞は3胚葉への分化能を有していた。

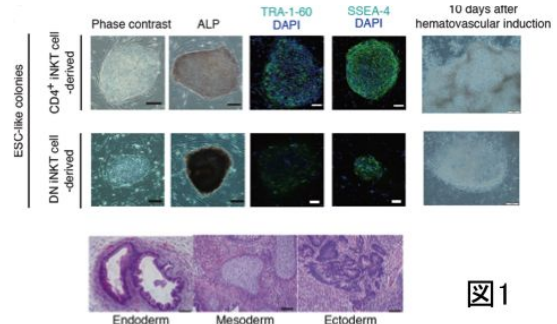


図1

2. iNKT-iPSCからT細胞への再分化誘導  
iNKT-iPSCから造血分化、T細胞分化の各過程を経てiPS-iNKT細胞を誘導した(図2)。

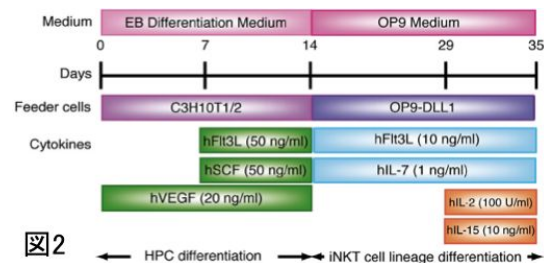
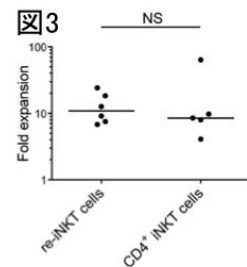


図2

以前構築した方法で樹立したiPSC-iNKT細胞は、α-GalCerに対する反応性が低かったが、分化の最終段階でIL-2とIL-15を入れることで改善が認められた。この細胞は、マイトジェンで複数回刺激しても増殖能が衰えなかった(図3)。

一方、抗原刺激あり・なしの両方において、元のiNKT細胞と類似した遺伝子発現パターンを示したが、ナイーブ・メモリーT細胞

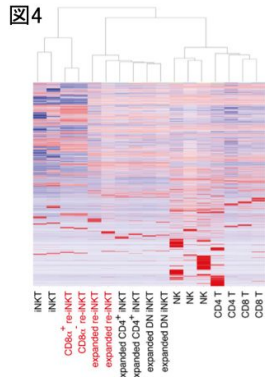


関連遺伝子の発現が低下しており、NK細胞に類似する遺伝子発現パターンもいくつか観察された(図4, 5)。

3. サイトカイン産生性と抗原特異性

分化誘導したiPSC-iNKT細胞は、α-GalCer/CD1dテトラマーで染色することができたが、元のiNKT細胞に発現するCD4分子を発現しなかった(図6)。α-GalCer負荷DCを用いて

刺激すると IFN- $\gamma$  を産生した(図7)。



一方、IL-4 の産生はほとんど観察されず Th1 傾向のサイトカイン産生性を示した (data not shown)。これに抗 CD1d 抗体を添加した場合には IFN- $\gamma$  産生が低下すること、さらに CD1d 導入 C1R 細胞株に対して  $\alpha$ -GalCer 特異的 IFN- $\gamma$  産生を示すことから、CD1d 拘束性に  $\alpha$ -GalCer を認識することを確認した。

T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子配列は、iNKT-iPSC 及び iPSC-iNKT で全く同じ遺伝子配列を有し、抗原特異性が維持されていると考えられた (data not shown)。

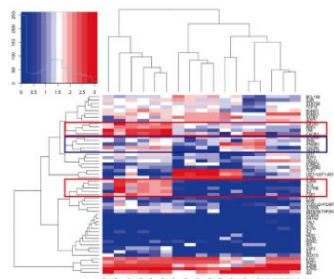


図5

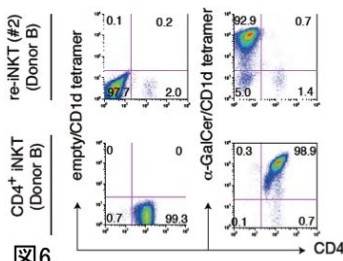


図6

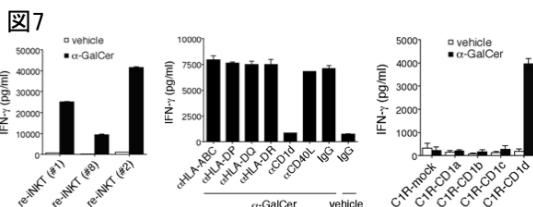
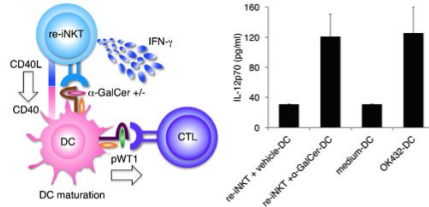


図7

図8



#### 4. 樹状細胞との相互作用による免疫賦活効果

iPSC-iNKT 細胞と  $\alpha$ -GalCer 負荷 DC を共培養すると、DC における成熟マーカー (CD86 分子) の発現上昇 及び IL-12p70 産生が上昇して、DC の活性化が誘導された (data not shown, 図8)。この DC に、がん抗原ペプチドを負荷して、自己の CD8 $^+$  T 細胞を共培養したところ、抗原特異的 T 細胞の増殖が誘導された (図9)。この T 細胞は、がん抗原ペプチドを負荷した細胞株に強力な細胞傷害活性を發揮した。

図9

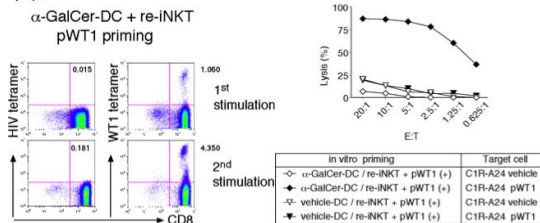
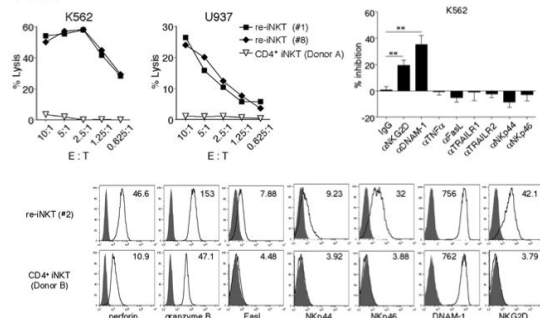


図10



#### 5. NK 細胞様の細胞傷害活性

iPSC-iNKT 細胞は、がん細胞株に抗原非特異的な細胞傷害活性を示した (図10)。阻害試験の結果より、傷害活性は NKG2D と DNAM1 に依存することが明らかとなった。細胞傷害に關与する分子群の発現をフローサイトメトリーで評価したところ、iPSC-iNKT 細胞は、元の iNKT 細胞と比較して、perforin, granzyme B, Fas L, NKp44, NKp46, NKG2D の発現が高く、DNAM1 の発現に大きな違いがなかった。

## 6. まとめ

iPSC-iNKT 細胞は、抗原特異性が明らかであり、多型のない CD1d 分子で提示された特定の糖脂質抗原を認識する。機能的には、元の iNKT 細胞に類似する部分と異なる部分が観察されたが、元の iNKT 細胞と比較して、がん免疫療法に有利な機能を兼ね備えていると考えられる。近年、TCR 遺伝子改変 T 細胞療法やキメラ抗原受容体導入 T 細胞療法が開発されている。iPSC-iNKT 細胞は、遺伝子改変 T 細胞のプラットフォームとなる可能性を秘めている。iPSC の段階で遺伝子改変操作が容易であり、効果と安全性を高めることができる。また、無限の提供を可能にする為、広く応用可能な細胞製剤としてのポテンシャルを有していると考えられる。

## 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 10 件)

1. Fujinami N, Yoshikawa T, Sawada Y, Shimomura M, Iwama T, Sugai S, Kitano S, Uemura Y, Nakatsura N.  
Enhancement of antitumor effect by peptide vaccine therapy in combination with anti-CD4 antibody: Study in a murine mode.  
*Biochemistry and Biophysics Reports* 5: 482-491, 2016
2. Miyasaka T, Watanabe Y, Akahoria Y, Miyamura N, Ishiia K, Kinjo Y, Miyazaki Y, Liu T-Y, Uemura Y, and Kawakami K.  
Human CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> invariant natural killer T cells promote IgG secretion from B cells stimulated by cross-linking of their antigen receptors.  
*World Journal of Vaccines* 6: 34-41, 2016
3. \* Ueda N, \*Zhang R, Tatsumi M, Liu T-Y, Kitayama S, Yasui Y, Sugai S, Iwama T, Senju S, Okada S, Nakatsura T, Kuzushima K, Kiyoi H, Naoe T, Kaneko S and Uemura Y.  
BCR-ABL-specific CD4<sup>+</sup> T helper cells promote the priming of antigen-specific cytotoxic T cells via dendritic cells.  
*Cell. Mol. Immunol.*, (16 May 2016) doi: 10.1038/cmi.2016.7 \*equal contribution.
4. \*Kitayama S, \*Zhang R, Liu T-Y, Ueda N, Iriguchi S, Yasui Y, Kawai Y, Tatsumi M, Hirai N, Mizoro Y, Iwama T, Watanabe A, Nakanishi M, Kuzushima K, Uemura Y, Kaneko S.  
Cellular adjuvant properties and direct cytotoxicity of redifferentiated Va24 invariant NKT-like cells from human induced pluripotent stem cells  
*Stem Cell Reports* 6: 213-227, 2016. \*equal contribution.
5. Nakatsuka R, Iwaki R, Matsuoka Y, Sumide K, Kawamura H, Fujioka T, Sasaki Y, Uemura Y, Asano H, Kwon A-H, Sonoda Y.  
Identification and characterization of Lineage<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> VSEL phenotypic residing in adult mouse bone tissue.  
*Stem Cells and Development*. 25: 27-42, 2016.
6. Iwama T, Uchida T, Sawada Y, Tsuchiya N, Sugai S, Fujinami N, Shimomura M, Yoshikawa T, Zhang R, Uemura Y, Nakatsura T.  
Vaccination with liposome-coupled glypican-3-derived epitope peptide stimulates cytotoxic T lymphocytes and inhibits GPC3-expressing tumor growth in mice.  
*Biochem Biophys Res Commun*. 469: 138-143, 2016.
7. Sugai S, Yoshikawa T, Iwama T, Tsuchiya N, Ueda N, Fujinami N, Shimomura M, Zhang R, Kaneko S, Uemura Y, Nakatsura T.  
Hepatocellular carcinoma cell sensitivity to V<sub>9V2</sub> T lymphocyte-mediated killing is increased by zoledronate.  
*Int J Oncol.*, 48 (5): 1794-1804, 2016
8. Nakatsuka R, Matsuoka Y, Uemura Y, Sumide K, Iwaki R, Takahashi M, Fujioka T, Sasaki Y, Sonoda Y.  
Mouse dental pulp stem cells support human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells in vitro.  
*Cell Transplantation*. 24: 97-113, 2015
9. Matsuoka Y, Nakatsuka R, Sumide K, Kawamura H, Takahashi M, Fujioka T, Uemura Y, Asano H, Sasaki Y, Inoue M, Ogawa H, Takahashi T, Hino M, Sonoda Y.  
Prospectively isolated human bone marrow-derived MSCs support primitive human CD34-negative hematopoietic stem cells.  
*Stem Cells*. 33 (5): 1554-1565, 2015
10. Zhang R, Liu T, Senju S, Haruta M, Hirotsawa 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. and 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 (6): 668-677 2015

〔学会発表〕(計 15 件)

1. ZHANG Rong, KITAYAMA Syuichi, LIU Tianyi, UEDA Norihiro, IWAMA Tatsuaki, NAKATSURA Tetsuya, KUZUSHIMA Kiyotaka, KANEKO Shin, UEMURA Yasushi  
Cellular adjuvant properties and direct cytotoxicity in rejuvenated V $\alpha$ 24 invariant NKT cells from human induced pluripotent stem cells  
第 45 回日本免疫学会学術総会 (沖縄コンベンションセンター・宜野湾市) 2016 年 12 月 5 日~7 日
2. 張 エイ, 上田 格弘, 喜多山 秀一, 安井 裕, 土屋 伸広, 劉 天懿, 岩間 達章, 葛島 清隆, 中面 哲也, 清井 仁, 金子新, 植村 靖史  
Therapeutic potential of dasatinib for acute graft versus leukemia disease  
第 75 回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜・横浜市) 2016 年 10 月 6 日~8 日
3. Manami Shimomura, Shigehisa Kitano, Kayoko Syoda, Chizuru Iwakami, Yuki Saito, Kazuto Nosaka, Syouichi Mizuno, Toshiaki Yoshikawa, Shoji Yokochi, Satoru Ito, Kouji Matsushima, Yasushi Uemura, Tetsuya Nakatsura  
Investigation of peripheral blood CD4<sup>+</sup> cells depletion using humanized anti-human CD4 antibody in vitro.  
第 75 回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜・横浜市) 2016 年 10 月 6 日~8 日
4. 上田格弘, 植村 靖史, 張 エイ, 喜多山 秀一, 安井 裕, 巽 美奈子, 劉 天懿, 葛島 清隆, 清井 仁, 金子新  
CD4-modification of re-differentiated BCR-ABL-specific T cells promote the priming of leukemia antigen-specific CTLs via DCs  
第 75 回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜・横浜市) 2016 年 10 月 6 日~8 日
5. TSUCHIYA Nobuhiro, UEMURA Yasushi, IWAMA Tatsuaki, ZHANG Rong, SUZUKI Toshihiro, YOSHIKAWA Toshiaki, SAWADA Yu, TAKUBO Keiyo, SAKAGAMI-SAWANO Asako, MIYAWAKI Atsushi, ENDO Itaru, NAKATSURA Tetsuya  
iPSC-pMCs genetically engineered to express IFN $\alpha$  as a potential cell medicine for cancer  
第 75 回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜・横浜市) 2016 年 10 月 6 日~8 日
6. 土屋 伸広, 植村 靖史, 岩間 達章, 張 エイ, 得光 友美, 鈴木 利宙, 吉川 聡明, 澤田 雄, 田久保 圭誉, 阪上-沢野 朝子, 宮脇 敦史, 遠藤 格, 中面 哲也  
インターフェロン $\alpha$ を産生する iPS 細胞由来増殖性ミエロイド細胞を用いたがん免疫療法  
第 20 回日本がん免疫学会総会 (大阪カンファレンスセンター&ホテル・大阪市) 2016 年 7 月 27 日~29 日
7. 下村 真菜美, 吉川 聡明, 正田 香世子, 岩上 千鶴, 齋藤 友貴, 野坂 和外, 水野 正一, 北野 滋久, 横地 祥司, 伊藤 哲, 松島 綱治, 植村 靖史, 中面 哲也  
ヒト血液検体を用いたヒト化抗 CD4 抗体による In Vitro での CD4 陽性細胞除去効果の検討  
第 20 回日本がん免疫学会総会 (大阪カンファレンスセンター&ホテル・大阪市) 2016 年 7 月 27 日~29 日
8. 藤浪 紀洋, 吉川 聡明, 澤田 雄, 下村 真菜美, 水野 正一, 北野 滋久, 植村 靖史, 中面 哲也  
抗 CD4 抗体併用によるがんペプチドワクチン療法の効果増強に関する前臨床的検討  
第 20 回日本がん免疫学会総会 (大阪カンファレンスセンター&ホテル・大阪市) 2016 年 7 月 27 日~29 日
9. Norihiro Ueda, Yasushi Uemura, Zhang Rong, Shuichi Kitayama, Yutaka Yasui, Minako Tatsumi, Tian-Yi Liu, Kiyotaka Kuzushima, Hitoshi Kiyoi, Tomoki Naoe, Shin Kaneko  
Generation of BCR-ABL Reactive CD4<sup>+</sup> T Helper Cells By Reprograming and Redifferentiation  
*57th ASH Annual Meeting and Exposition, December 5-8, 2015, Orlando, FL*
10. Norihiro Ueda, Yasushi Uemura, Rong Zhang, Shuichi Kitayama, Yutaka Yasui,

Hitoshi Kiyoi, Shin Kaneko  
Generation of BCR-ABL reactive CD4 T lymphocytes by reprogramming and redifferentiation  
第 44 回日本免疫学会学術総会(札幌コンベンションセンター・札幌市)2015 年 11 月 18 日~20 日

11. 上田 格弘, 植村 靖史, 張 エイ, 喜多山 秀一, 安井 裕, 平井 範仁, 巽 美奈子, 劉 天懿, 葛島 清隆, 清井 仁, 金子新

BCR-ABL 特異的ヘルパーT 細胞のリプログラミングと CML 治療への応用  
第 77 回日本血液学会学術集会(石川県立音楽堂, 金沢市)2015 年 10 月 16 日~10 月 18 日

12. Rong Zhang, Yasushi Uemura, Tianyi Liu, Sachiko Okamoto, Hiroaki Ikeda, Minako Tatsumi, Mitsuhiro Takenoyama, Yoshiki Akatsuka, Seiji Okada, Junichi Mineno, Hiroshi Shiku, Kiyotaka Kuzushima

Interaction of Vα24 iNKT cells with dendritic cells increases the therapeutic efficacy of TCR-gene modified T cells  
第 74 回日本癌学会学術総会(名古屋国際会議場・名古屋市)2015 年 10 月 8 日~10 日

13. Norihiro Ueda, Yasushi Uemura, Rong Zhang, Shuichi Kitayama, Yutaka Yasui, Minako Tatsumi, Tian-Yi Liu, Shiori Sugai, Kiyotaka Kuzushima, Hitoshi Kiyoi, Shin Kaneko

Generation of BCR-ABL reactive CD4 T lymphocytes by reprogramming and redifferentiation  
第 74 回日本癌学会学術総会(名古屋国際会議場・名古屋市)2015 年 10 月 8 日~10 日

14. Tatsuaki Iwama, Motoharu Suzuki, Tianyi Liu, Rong Zhang, Toshiaki Yoshikawa, Manami Shimomura, Tetsuya Nakatsura, Kiyotaka Kuzushima and Yasushi Uemura.

Regulation of IL-12 family cytokine/Osteopontin balance in DCs by ligand activation of iNKT cells.  
第 74 回日本癌学会学術総会(名古屋国際会議場・名古屋市)2015 年 10 月 8 日~10 日

15. TSUCHIYA Nobuhiro, IWAMA Tatsuaki, UCHIDA Tetsuya, SHIMOMURA Manami, YOSHIKAWA Toshiaki, FUJINAMI Norihiro, SAITO Yuki, UEMURA Yasushi, NAKATSURA Tetsuya.

Vaccination of GPC3-derived peptide-coupled liposome inhibits GPC3

expressing tumor growth.

第 74 回日本癌学会学術総会(名古屋国際会議場・名古屋市)2015 年 10 月 8 日~10 日

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: CD4 陽性細胞の製造方法(特願 2015-203482)

発明者: 金子新, 上田 格弘, 植村 靖史

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2015-203482

出願年月日: 平成 27 年 11 月 13 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

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

植村 靖史 (UEMURA Yasushi)

研究者番号: 40364781

##### (2) 研究分担者

国立がん研究センター

先端医療開発センター・研究員

張 エイ (ZHANG Rong)

研究者番号: 00643719