

# 多能性幹細胞由来のDCをベースとした武装化細胞ワクチンの作製と がん免疫療法への応用

愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部  
リサーチレジデント 張 エイ

(共同研究者)

京都大学iPS細胞研究所	准教授 金子 新
熊本大学生命科学研究部	准教授 千住 寛
愛知県がんセンター研究所	連携大学院学生 牧 寛之
愛知県がんセンター研究所	主任研究員 植村 靖史
愛知県がんセンター研究所	部長 葛島 清隆

## はじめに

樹状細胞 (dendritic cell: DC) は、1973年に米国ロックフェラー大学の故ラルフ・シュタインマン博士らにより発見された免疫担当細胞である。この細胞は、その後の研究で、強力なT細胞刺激活性を有し、外来抗原に対する免疫応答を惹起する抗原提示細胞であるだけでなく、免疫応答性制御の中心的な役割を担う重要な細胞であることが分かってきた。このDCに抗原を負荷して生体に投与することにより、体内の抗原特異的T細胞を活性化する、いわゆるDCワクチンの手法は、悪性腫瘍に対する新たなワクチン法として期待されている。

近年、米国で開発されたDCワクチン(プロベンジ)は、米国食品医薬局の認可を得て臨床応用が開始されている。しかしながら、この治療法は、自己血由来のDCを用いる為、①DCの前駆細胞を得るために、免疫不全に陥っているがん患者から大量の採血を必要とする、②治療費が高額(3回投与で9万3,000ドル)である等の理由により広く応用されていないのが現状である。

我々を含むいくつかの研究グループは、胚性幹細胞(ES細胞)あるいは人工多能性幹細胞(iPS細胞)からDCを誘導する技術、また、多能性幹細胞の段階で遺伝子を改変し、機能的修飾を賦与したDCを作製する技術を報告してきた<sup>(1-5)</sup>。iPS細胞は無限の増殖能と分化多能性を有しており無限のDCソースとなるだけでなく、ES細胞が抱える生命倫理の問題やアロ抗原性の問題を克服できる。ところが、iPS細胞からDCを誘導する方法は、約1ヶ月間の日数がかかること、操作性が煩雑でコストパフォーマンスが悪いなどの問題があった。

我々はこれらを克服するために、iPS細胞からDCを誘導する過程で自己増殖因子を導入して、長期間増殖が可能なミエロイド細胞の構築に成功した。この細胞は、1日あたり1.5~3倍の速度で増殖し、GM-CSF依存性に3ヶ月間以上増殖を続けた。また、比較的高濃度の

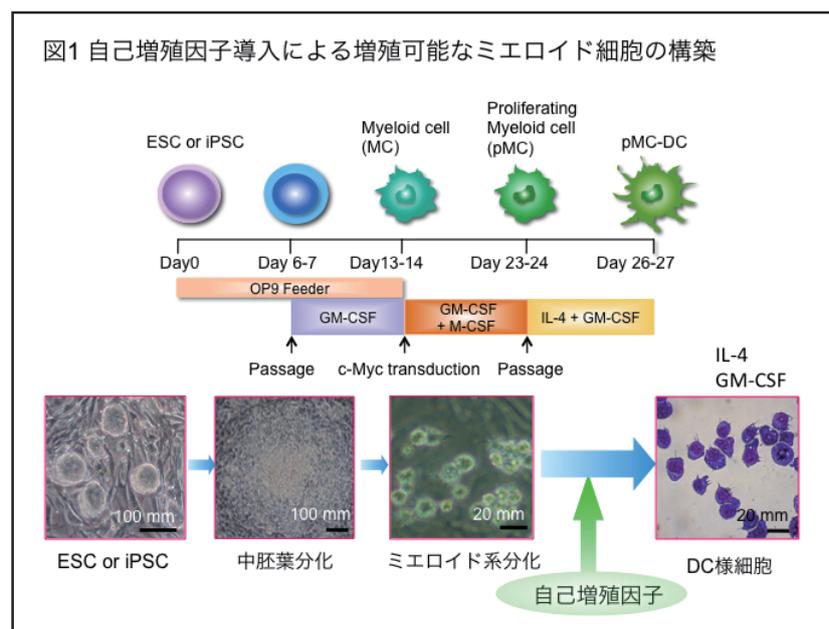
GM-CSFがなければ増殖が誘導されず、生体内に大量投与した場合でも白血病や自己免疫疾患等を発症せず、安全性に優れることが明らかになっている。この細胞は、F4/80, CD11b, CD11c, DEC205を発現し、Gr-1の低発現を示す。これにIL-4とGM-CSFを添加して2日間培養すると容易にDC様の細胞になり、LPSやOK432で成熟刺激を加えるとTNF- $\alpha$ やIL-12p70を産生した。また、MHC-II, CD40, CD86などの発現上昇が誘導され、骨髄由来DCに類似の反応性を示した。さらに、これにモデル抗原(OVA)を負荷して生体内に投与すると、抗原特異的T細胞の活性化が誘導され、抗原を発現するがん細胞の生着を抑制できること、がん移植マウスの生存期間が延長するなどの抗腫瘍効果が認められた(論文投稿中)。iPS細胞由来DCの増殖を誘導する技術は、国内外を通じて他に類がなく、操作性やコストパフォーマンス等の問題点を克服することができる。

## 研究の目的

本研究課題は、このDC様細胞をベースとして、これにがんを直接傷害するエフェクター分子を発現させ、より抗腫瘍効果に優れた細胞ワクチンを作製する。これをがん患者に投与して、患者の生命予後を改善する新たな免疫療法の開発を行うことを目的としている。本研究により開発される、いわゆる「武装化DCワクチン」は、がん細胞を直接傷害した後に、アポトーシスに陥ったがん細胞を取り込み、がん由来する「がん抗原」を提示して、2次的なT細胞応答を惹起することが期待される為、効果の高い治療法になる可能性を秘めている。

## 方法

C57BL/6マウス胎児線維芽細胞に由来するiPS細胞、およびC57BL/6マウスES細胞をOP9フィーダー細胞上で6~7日間培養して中胚葉分化を誘導した。その後、新たなOP9フィーダー細胞に移し、GM-CSF入りの培地で6~8日間培養してミエロイド系細胞への分化を誘導した。この細胞に、レンチウイルスを使用し



てc-Myc遺伝子を導入してサイトカイン依存性に増殖するミエロイド細胞を作製した(図1)。

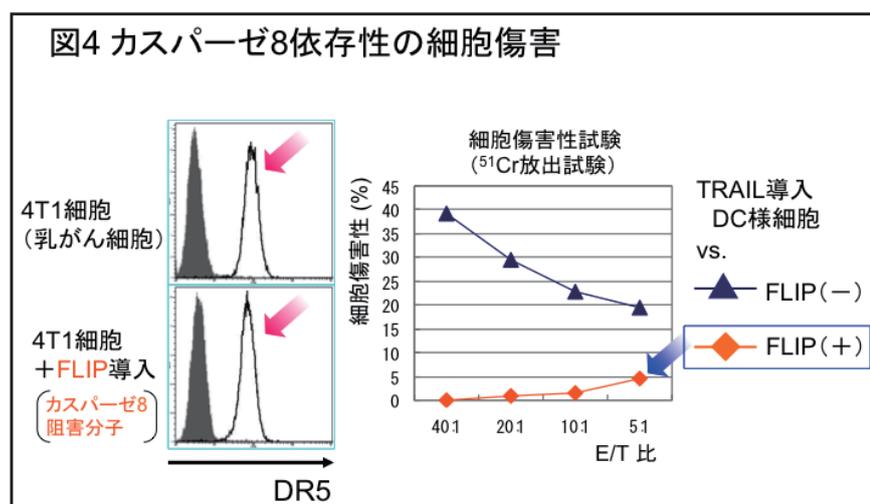
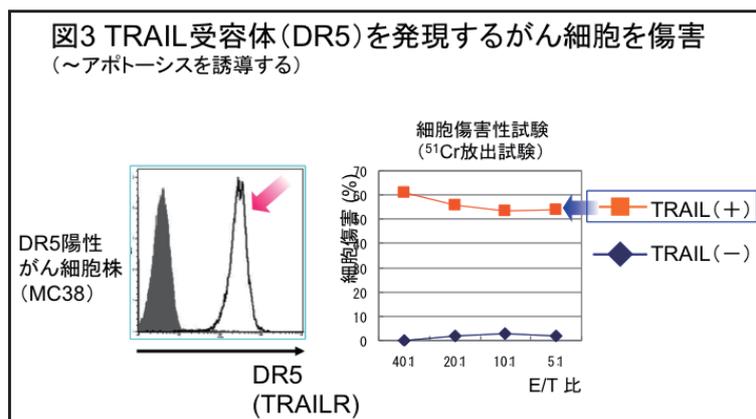
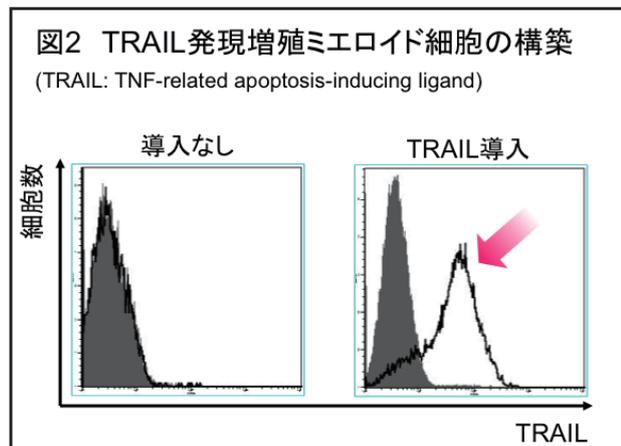
この細胞をベースとして、がん細胞に細胞死を誘導する分子（TRAIL）を発現するES由来あるいはiPS由来の増殖ミエロイド細胞を作製した。これのTRAIL感受性がん細胞株に対する細胞傷害活性を解析した。

## 結果

TRAILを導入したES由来増殖ミエロイド細胞（TRAIL-ES-pMC）（図2）は、TRAILを発現しないES-pMCと同等の増殖を示した。この観察はiPS-pMCを用いた場合でも同様の結果であった。

この細胞は、TRAILの受容体であるDR5を発現する大腸がん細胞株(MC38)（図3）、およびDR5を発現する乳がん細胞株4T1（図4）を傷害した。

この傷害メカニズムを調べる為に、カスパーゼ8依存性のシグナルを阻害するcFLIP遺伝子導入4T1細胞を用いたところ傷害活性が消失した。このことから、カスパーゼ8依存性の細胞傷害であることが明らかになった。



## 考察

TRAILを発現する増殖ミエロイド細胞は、このレセプターであるDR5を発現するがん細胞を傷害できることが分かった。しかしながらDR5陽性がんにおいても内因性のシグナル異常に起因してアポトーシスが誘導されないものやDR5の発現が低下しているものが存在する。これらに対しては、何らかの薬剤の併用が必要と考えられる。今回、我々が

解析に用いたTRAIL発現ES由来およびiPS由来pMCは、DCへの誘導をしていないものである。これをDCに分化誘導することにより、アポトーシスに陥ったがん細胞を取り込み、がん細胞に由来するがん抗原を抗原提示して、がん抗原特異的T細胞の活性化を誘導することが可能と考えられる。これにより、T細胞による2次的で持続的ながんの排除が誘導されると考えている。今後も引き続きこれの有用性を明らかにしていきたいと考えている。

## 要 約

最近、我々はES細胞やiPS細胞から樹状細胞 (dendritic cell: DC) を誘導する過程で自己増殖因子を導入して、長期間増殖が可能なミエロイド細胞の構築に成功した。本研究課題では、これをベースとして、DR5陽性がん細胞に対してアポトーシスを誘導する分子 (TRAIL) を発現させた抗腫瘍エフェクター細胞を構築した。この細胞は、DR5陽性がん細胞に対して強力な細胞傷害活性を示した。この増殖ミエロイド細胞からDCを誘導することが技術的に可能であり、本研究で作製されたTRAIL陽性ミエロイド細胞から誘導されるDCは、①DR5陽性がんのアポトーシスを誘導し、②アポトーシスに陥ったがん細胞に由来する「がん抗原」を取り込み、③がん抗原特異的T細胞の活性化を誘導し、④持続的で強力ながん排除を誘導する。本研究課題で構築したミエロイド細胞は、このプラットフォームとなる可能性を秘めている。

## 文 献

1. Senju S, Hirata S, Matsuyoshi H, Masuda M, Uemura Y, Araki K, et al. Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood* 101:3501-8,2003.
2. Zhan X, Dravid G, Ye Z, Hammond H, Shablott M, Gearhart J, et al. Functional antigen-presenting leucocytes derived from human embryonic stem cells in vitro. *Lancet* 364:163-71,2004.
3. Matsuyoshi H, Senju S, Hirata S, Yoshitake Y, Uemura Y, Nishimura Y. Enhanced priming of antigen-specific CTLs in vivo by embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein: application to antitumor vaccination. *J Immunol* 172:776-86,2004.
4. Senju S, Suemori H, Zembutsu H, Uemura Y, Hirata S, Fukuma D, et al. Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Stem Cells* 25:2720-9,2007.
5. Senju S, Haruta M, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takahashi K, et al. Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27:1021-31,2009.