

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名：

革新的がん医療実用化研究事業

Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名：

iPS細胞ストックを基盤とする進行胃がんに対する免疫細胞療法の開発

Immunocytotherapy based on iPS cell stock against advanced gastric cancer

所属 役職 氏名：

国立大学法人熊本大学 大学院生命科学研究部 免疫識別学分野

准教授 千住 覚

Kumamoto University, Graduate School of Medical Sciences, Department of Immunogenetics

Associate Professor Satoru Senju

実施期間：平成28年4月1日～平成29年3月31日

分担研究開発課題名：

HLA欠損iPS-ML/IFN β 細胞の作成

Generation of HLA-deficient iPS-ML/IFN β

研究開発分担者：

国立大学法人熊本大学 大学院生命科学研究部 免疫識別学分野

准教授 千住 覚

Kumamoto University, Graduate School of Medical Sciences, Department of Immunogenetics

Associate Professor Satoru Senju

分担研究開発課題名：

非臨床薬効評価（同種モデルにおける宿主免疫応答評価）

Non-clinical efficacy evaluation (Analysis of host immune response in a syngeneic model)

研究開発分担者：

国立大学法人熊本大学 大学院生命科学研究部 免疫識別学分野

准教授 千住 覚

Kumamoto University, Graduate School of Medical Sciences, Department of Immunogenetics
Associate Professor Satoru Senju

分担研究開発課題名：

非臨床安全性試験（造腫瘍試験、一般毒性試験）

Non-clinical safety evaluation (tumorigenicity test, safety assessment)

研究開発分担者：

国立大学法人熊本大学 大学院生命科学研究部 免疫識別学分野

准教授 千住 覚

Kumamoto University, Graduate School of Medical Sciences, Department of Immunogenetics
Associate Professor Satoru Senju

分担研究開発課題名：

治験製品製造体制確立（設備稼働、製造過程の手順書 SOP の整備）

Establishment of manufacturing system for investigation product (Factory operation, SOP creation)

研究開発分担者：

国立大学法人熊本大学 大学院生命科学研究部 免疫識別学分野

准教授 千住 覚

Kumamoto University, Graduate School of Medical Sciences, Department of Immunogenetics
Associate Professor Satoru Senju

分担研究開発課題名：

治験製品概要書の作成

Creating a clinical trial product overview statement

研究開発分担者：

国立大学法人熊本大学 大学院生命科学研究部 免疫識別学分野

准教授 千住 覚

Kumamoto University, Graduate School of Medical Sciences, Department of Immunogenetics
Associate Professor Satoru Senju

分担研究開発課題名：腫瘍抗原特異的 T 細胞反応誘導の解析

: Analysis of cancer antigen-specific T cell response

研究開発分担者：

国立がん研究センター 先端医療開発センター 免疫療法開発分野

ユニット長 植村 靖史

National Cancer Center, Exploratory Oncology Research & Clinical Trial Center, Division of Cancer Immunotherapy

Unit Leader, Yasushi Uemura

II. 成果の概要 (総括研究報告)

インターフェロン (IFN) β には、直接的な腫瘍抑制効果に加えて、免疫系を活性化し抗腫瘍免疫応答を増強する働き、及び、腫瘍血管の新生を抑制する作用がある。しかしながら、IFN治療の臨床的有用性が認められるがんは、悪性黒色腫、腎細胞癌、脳腫瘍などに限定される。その主な理由として、IFNを静脈内等へ投与した場合に生じる全身性の強い炎症惹起作用により投与許容量に限界があること、また、血液中における半減期が短いことがある。そして、そのために、腫瘍組織に対してIFNを十分な量と時間、作用させることが難しいことが挙げられる。本研究では、マクロファージの腫瘍浸潤性を利用し、抗腫瘍作用を有するIFN β を腫瘍局所において選択的に作用させるためのDDSとして用いる新たながん治療法の開発を行っている。研究代表者らは、ヒトのiPS細胞からミエロイド細胞を作成し、さらに、細胞増殖因子(cMYCおよびBMI1)の遺伝子を導入することにより、増殖能力を有するミエロイド細胞を作成する方法を開発しており、これをiPS-MLと名付けている。iPS-MLは、M-CSFの存在下でのみ長期増殖する能力を有しており、かつ、生体内に存在するマクロファージに類似した機能特性および遺伝子発現のパターンを示す。

各種の固形がんの組織にはマクロファージの浸潤が認められる。iPS-MLをヒトの腫瘍細胞を生着させたSCIDマウスに投与すると、腫瘍局所に集積し組織内へ浸潤する。IFN β の発現ベクターの導入によりIFN β を産生させたiPS-ML (iPS-ML/IFN β)を投与することにより、腫瘍局所に浸潤したiPS-ML/IFN β からIFN β が産生され、腫瘍組織選択的にIFN β を作用させ抗腫瘍効果を得ることができると考え開発を開始した。iPS-ML/IFN β は、胃がんおよび膵臓がんの腹膜播種ゼノグラフトモデルにおいて治療効果を発揮する。そこで、IFN β およびIFN γ を高産生するiPS-MLの進行胃がんの治療を目的とする再生医療等製品としての開発を行っている。

本年度は、iPS-ML/IFNの治験製品としての製造を行うためのGMP培養システムの構築を行った。具体的には、自動培養装置を用いた大量培養および自動プロセッシング装置を用いた濃縮洗浄工程の手順を確定した。このシステムにより、マスターセルバンク (MCB) に由来する細胞から製品製造までの、増殖、洗浄、濃縮、および凍結の工程を、完全閉鎖系かつ生物由来原材料基準に適合して完了できる。

また、腹膜播種がんに加えて転移性肝臓がんおよび原発性肝臓がんに対するiPS-ML/IFN β による治療の効果を検討するために、肝臓がんの同所性ゼノグラフトモデルを樹立した。ヒト胃がん細胞株をSCIDマウスの脾臓に注射することにより作成した転移性肝臓がん、および、ヒト肝細胞がん株を肝臓に直接注射することにより作成した原発性肝臓がんのいずれのモデルにおいて、iPS-ML/IFN β による治療が有効であることを確認することができた。さらに、これらのモデルにおいても、体外から投与したiPS-MLが腫瘍へ直接浸潤することを確認することができた。

ゼノグラフトモデルを用いた検討では、宿主免疫応答を介した治療効果および副作用の検討ができないため、同種モデルを用いた検討も行った。マウスにおけるiPS-MLのモデル細胞(マウスES-ML)を用いて、MHC欠損アロ細胞投与の安全性と治療効果について検討し効果と安全性を実証した。MHCクラスI/クラスIIを欠損しIFN β を発現するマウスES-ML (ES-ML/IFN β)を、大腸がん腹膜播種あるいは肝転移を有する異系統のマウスに投与し、その治療効果を確認した。

Interferon (IFN)- β possesses multiple anti-cancer functions. Direct anti-cancer effects of this cytokine by inducing growth arrest or apoptosis of various cancer cells is well established. Induction of anti-cancer immunity and inhibition of tumor angiogenesis have also been described. Despite the multiple anti-cancer mechanisms, application of IFN- β as anti-cancer agents is so far limited to the therapy of melanoma, renal cancer, and some brain tumors.

The drawback of IFN- β as anti-cancer drug is its short half-life (1-2 hours) in blood and low efficiency of tissue penetration after intravenous administration. On the other hand, high-dose intravenous administration may cause systemic toxicity. Thus, development of delivery system is desirable to make IFN- β act specifically in cancer tissues.

In many tissue samples of solid cancers, myeloid lineage cells including macrophages exist as components of tumor stroma along with other immune cells. Macrophages express receptors for many kinds of leukocyte-attracting factors, such as chemokines, activated complements, and DAMPs (damage-associated molecular pattern molecules). Multi-step attraction by these factors induces the efficient infiltration of macrophages into cancer tissues. Macrophages producing high dose of IFN- β may be useful as cellular DDS for anti-cancer therapy. However, it is impossible to amplify human peripheral blood monocytes and quantity of macrophages obtained from donated blood is insufficient. We have previously established a method to generate human iPS-cell-derived myeloid cells with proliferation capacity.

iPS-ML intensively infiltrated into the tumor tissues. Expression of various chemokine receptors, complement receptors, TLRs, and also MMPs by iPS-ML, similar to natural macrophages, accounts for the efficient cancer tissue infiltration. In the current study, iPS-ML introduced with an expression vector for IFN- β (iPS-ML/IFN- β) exhibited profound therapeutic effect against primary and metastatic liver cancers in human-mouse xenograft models.

We cannot evaluate immune system-mediated anti-cancer effect of IFN in xenograft models using immune-deficient recipient mice. Thus, we established syngeneic models of peritoneal metastasis cancer and liver metastasis, by implantation of mouse cancer cells (melanoma and colon cancer) into syngeneic mice. By using such cancer models, we analyzed the therapeutic effect of mouse ES cell-derived myeloid cells producing IFNs (mouse ES-ML/IFN, a equivalent of human iPS-ML/IFN). ES-ML/IFN exhibited significant therapeutic effect in these experiments, consolidating proof-of-concept of anti-cancer therapy with iPS-ML/IFN.

We are developing a manufacturing system to generate iPS-ML as cellular therapeutics. We have established a procedure for a large scale cell culture using a automatic system (WAVE-25 Bioreactor, GE Healthcare), which allows closed culture of 10^8 - 10^{10} floating cells. After the expansion culture, iPS-ML are subjected to processing step including cell collection, washing, re-suspension in freeze media by using Clinimacs Prodigy (Miltenyi Biotec), an automatic cell processing system.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 2件、国際誌 8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- β . *J 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. Suenaga G, Ikeda T, Komohara Y, Takamatsu K, Kakuma T, Tasaki M, Misumi Y, Ueda M, Ito T, Senju S, Ando Y. Involvement of Macrophages in the Pathogenesis of Familial Amyloid Polyneuropathy and Efficacy of Human iPS Cell-Derived Macrophages in Its Treatment. *PLoS one* 11(10) e0163944 2016
4. Hosoi A, Su Y, Torikai M, Jono H, Ishikawa D, Soejima K, Higuchi H, Guo J, Ueda M, Suenaga G, Motokawa H, Ikeda T, Senju S, Nakashima T, Ando Y. Novel Antibody for the Treatment of Transthyretin Amyloidosis. *J. Bio. Chem.* 291, 25096-25105, 2016
5. Imamura Y, Haruta M, Tomita Y, Matsumura K, Ikeda T, Hirayama M, Nakayama H, Mizuta H, Nishimura Y, Senju S. Generation of large numbers of antigen-expressing human dendritic cells using CD14-ML technology. *PLoS One*;11(4):e0152384. doi: 10.1371/journal.pone.0152384, 2016.
6. 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, Uemura Y. BCR-ABL-specific CD4⁺ T helper cells promote the priming of antigen-specific cytotoxic T cells via dendritic cells. *Cell. Mol. Immunol.* doi:10.1038/cmi.2016.
7. 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 V α 24 invariant NK-like cells from human induced pluripotent stem cells *Stem Cell Reports*. 6: 213-227, 2016
8. 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 γ 9V δ 2 T lymphocyte-mediated killing is increased by zoledronate. *Int J Oncol*. 48 (5): 1794-1804, 2016
9. 千住 覚 iPS 細胞由来マクロファージ細胞の疾患治療への応用 *医学のあゆみ* 257(3)226-232, 2016.

10. 千住 覚 iPS 細胞由来の樹状細胞およびマクロファージのがん治療への応用臨床血液 57(8)1074-1079, 2016.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Cancer therapy with iPS cell-derived myeloid cells 口頭 Senju Satoru、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)、2016年6月5日、国内
2. iPS 細胞由来のマクロファージを用いたがん治療 口頭 千住 覚、日本樹状細胞研究会 (熊本市) 2016年9月2日 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし