

### III. 平成25年度研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名                  | 書籍全体の編集者名 | 書 籍 名         | 出版社名      | 出版地 | 出版年   | ページ    |
|------|--------------------------|-----------|---------------|-----------|-----|-------|--------|
| 千住 覚 | iPS細胞由来のミエロイド細胞のがん治療への応用 | 河上 裕      | 別冊<br>・医学のあゆみ | 医歯薬出版株式会社 | 東京  | 2014年 | 98-104 |

雑誌

| 発表者氏名  | 論文タイトル名   | 発表誌名                                | 巻号      | ページ       | 出版年  |
|--|---|-------------------------------------|---------|-----------|------|
| Senju S, Koba C, Haruta M, Matsunaga Y, Matsumura K, Haga E, Sasaki Y, Ikeda T, Takamatsu, K, and Nishimura Y.   | Application of iPS cell-derived macrophages to cancer therapy.  | OncoImmunology                      | 14      | e27927    | 2014 |
| Yatsuda J, Irie A, Harada K, Michibata Y, Hirotake T, Senju S, Tomita Y, Yuno A, Hirayama M, Samor-associated antigens.  | Establishment of <i>HLA-DR4</i> transgenic mice for the identification of CD4 <sup>+</sup> T cell epitopes of tumor-associated antigens.                                      | PLoS One                            | 8 (12): | e84908    | 2013 |
| Tomita Y, Yuno A, Tsukamoto H, Senju S, Yoshimura S, Osawa R, Kuroda Y, Hirayama M, Irie A, Hamada A, Jono H, Yoshida K, Tsunoda T, Kohrogi H, Yoshitake Y, Nakamura Y, Shinohara M and Nishimura, Y | Identification of CDCA1 long peptides bearing both CD4 <sup>+</sup> and CD8 <sup>+</sup> T-cell epitopes: CDCA1-specific CD4 <sup>+</sup> T-cell immunity in cancer patients. | Int. J. Cancer                      | 134     | 352-366   | 2014 |
| 千住 覚   | ヒトiPS細胞からの樹状細胞作製法の進歩  | 実験医学                                | 31 (12) | 1994-1997 | 2013 |
| Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Sawada Y, Sakai M, Shirakawa H, Nobuoka D, Nakatsura T.  | Analysis of cytotoxic T lymphocytes from a patient with hepatocellular carcinoma who showed a clinical response to vaccination with a glypican-3-derived peptide.             | Int. J. Oncol.                      | 43(4)   | 1019-1026 | 2013 |
| Sawada Y, Komori H, Tsunoda Y, Shimomura M, Takahashi M, Baba H, Ito M, Saito N, Kuwano H, Endo I, Nishimura Y, Nakatsura T.   | Identification of HLA-A2 or HLA-A24-restricted CTL epitopes for potential HSP105-targeted immunotherapy in colorectal cancer.   | Oncol. Rep.                         | 31(3)   | 1051-1058 | 2014 |
| Suzuki S, Shibata K, Kikkawa F, Nakatsura T.   | Significant clinical response of progressive recurrent ovarian clear cell carcinoma to glypican-3-derived peptide vaccine therapy: Two case reports.                          | Human Vaccines & Immunotherapeutics | 10(2)   | 1-8       | 2014 |



## IV. 研究成果の刊行物・別刷

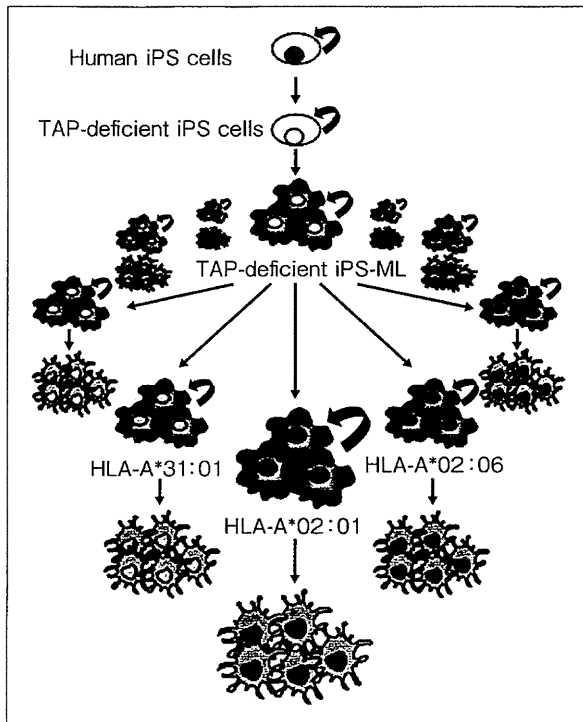


図 3 TAP欠損iPS細胞を用いた多様なHLA型に対応できる樹状細胞供給システム

### IPS-MLおよびML-DC投与後の腫瘍化リスク

iPS-MLの増殖にはヒトの血清中の濃度より高濃度のM-CSFの存在が必要であるため、人体への投与後に増殖して腫瘍化する危険性は非常に低いと考えている。さらに、以下に説明する理由により、TAPを欠損したアロの細胞が投与した後に腫瘍化(白血病化)することはないと考えられる。

TAP欠損細胞ML-DCにおいて細胞表面上のHLA class Iの発現は著しく低下しているものの、完全に欠如しているわけではない。TAP欠損細胞においても膜蛋白や分泌蛋白の膜移行シグナル配列に由来するペプチド断片がTAP非依存性に小胞体内へ輸送され、HLA class Iに結合し、細胞表面に発現される。このため、正常の細胞と比べるとHLAの発現量は低く、かつHLAに結合しているペプチドの多様性(diversity)は小さくなるため、TAP欠損細胞を認識するアロ反応性CD8陽性T細胞の数(頻度)は著しく少なくなる。とはいえ、CD8陽性T細胞による攻撃が完全に欠如しているわけではないので、いずれはかならず拒絶される。さらに、TAP欠損ML-DCでも、

HLA class II分子は発現しているので、アロ反応性CD4陽性T細胞による攻撃も受ける。したがって、TAP欠損iPS-MLに由来する細胞といえどもアロのレシピエント体内で生存しつづけ、そのなかから白血病が発症する可能性はないといえる。実際に、これまでマウスのシステムを用いて、TAPを欠損したES細胞由来の増殖性ミエロイド細胞をアロ個体に投与する実験を行っているが、投与細胞が腫瘍化したことはない。

すなわち、がん抗原ペプチドなどをパルスしたTAP欠損細胞ML-DCをアロのレシピエントに投与した場合、このML-DCは一定期間はレシピエント体内で生存し、ペプチド抗原特異的T細胞を刺激することができる。しかし、いずれはレシピエントの免疫細胞による攻撃を受け破壊されるので、投与されたML-DCがアロ個体の体内で腫瘍化する危険性はない。

### おわりに

前述したように著者は、TAP欠損を欠失していてもアロのiPS-MLが、投与後にレシピエント体内で増殖し腫瘍化することはない、と考えている。しかし腫瘍化の問題は、安全性という観点からはもっとも懸念されるところである。そこで、より慎重を期すため、臨床試験を開始する前に霊長類を用いた長期間にわたる安全性確認実験を行う必要があると考えている。著者らは以前の研究において非ヒト霊長類のES細胞からミエロイド系細胞を作製する方法をすでに確立している<sup>5)</sup>。そこで、TAP欠損ヒトiPS細胞を作製した手法と同様の手法を用いて、コモンマーモセットなどのiPS細胞においてTAP遺伝子を破壊した後、iPS-MLを作製し、MHCが一致しない個体へ移入した後、白血病の発症がないかどうか検討する、という実験が有用であろう。

ES細胞およびiPS細胞から樹状細胞を作成し、がんや感染症に対するワクチン治療に用いようとする研究は、著者らのほかに、Slukvin(Wisconsin)やFairchild(Oxford)らのグループによっても行われている<sup>13-18)</sup>が、本稿では割愛させていただいた。

胞における遺伝子改変というアプローチを試みている。前述したように、アロ細胞移植における急性拒絶反応における主要な標的はドナータイプの HLA class I である。HLA class I は抗原ペプチドとの複合体として細胞表面に発現するが、HLA class I / 抗原ペプチド複合体の形成においてはペプチドトランスポーターである TAP (transporter associated with antigen presentation) が必須の役割を担っている(「サイドメモ 2」参照)。TAP を欠損した細胞では HLA class I / 抗原ペプチド複合体の形成が妨げられ、HLA class I が細胞表面で安定して発現することができない。したがって、TAP を欠損した細胞では細胞表面の HLA class I の発現が抑制されるため、アロの個体に移入後の急性拒絶を回避できると考えられる。

著者らはこのことを実証するために、TAP1 遺伝子を欠損させたマウスの ES 細胞に由来する樹状細胞(ES-DC)を作成し、以下のような実験を行った<sup>12)</sup>。E14 株は 129 系統のマウスに由来する ES 細胞であり、H-2b ハプロタイプの MHC を有する。ジーンターゲットングにより TAP1 遺伝子を欠損させ、さらに、h-2<sup>d</sup> ハプロタイプの MHC class I である K<sup>d</sup> を導入し、その後この ES 細胞から樹状細胞を作製した。この TAP1 欠損/K<sup>d</sup> 導入 ES-DC を h-2<sup>d</sup> ハプロタイプの BALB/c マウスに移入したところ、TAP1 を欠損していない親株由来の ES-DC に比べて移入後の生存効率が改善し、急性拒絶反応を軽減できたと考えられた。また、TAP を欠損させた場合も細胞外から添加した抗原ペプチドの提示には支障がない(実際には提示効率が増強する)ので、この ES-DC に人為的に発現させたレシピエントタイプの MHC class I (H-2K<sup>d</sup>) に結合性の合成ペプチドを添加して投与し、ペプチド特異的免疫応答を誘導することを試みた。この結果、BALB/c マウスにおいてペプチド特異的な T 細胞応答を誘導し、さらに抗原特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導することができた。以上の結果は、TAP を欠損させただけでレシピエントに適合する任意の MHC class I 分子を発現させることにより、レシピエント体内で T 細胞免疫応答を誘導できることを示すものである。

この動物実験の結果に基づき、ヒト iPS 細胞に

においても TAP を欠失させることによりアロ反応性 CD 陽性 T 細胞による認識を回避できるかどうか検討した<sup>11)</sup>。まず、HLA-A\*24:02/11:01 のヒト iPS 細胞において TAP2 遺伝子の標的破壊を行い、つぎにこの iPS 細胞から iPS-ML を作製した。この TAP2 欠損 iPS-ML に対して、HLA-A\*02:01 の発現ベクターを導入し、その後この iPS-ML から ML-DC を作製した。この ML-DC に悪性黒色腫関連抗原である MART1 に由来する HLA-A\*02:01 結合性ペプチドを負荷し、これを HLA-A\*02:01 を有するアロのドナーの末梢血に由来する CD8 陽性 T 細胞と共培養した。通常、末梢血 T 細胞を HLA 不適合のあるアロの樹状細胞と共培養すると、ミスマッチ HLA に対する強力な T 細胞反応が起こるため、このような樹状細胞を刺激細胞として特定の抗原ペプチドに特異的な T 細胞を刺激し反応を検出することは困難である。しかし、この TAP 欠損 ML-DC を刺激細胞とした実験では、HLA-A\*02:01/MART1 ペプチドに特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導することができた。この結果は、ヒトの場合も TAP 欠損 ML-DC を用いることによりミスマッチ HLA class I に対するアロ反応を回避することができることを意味する。

以上の結果から、著者は TAP 欠損 iPS-ML に各種の HLA class I を導入することにより、さまざまな HLA 型の患者に対して使用することが可能な樹状細胞を作製することが可能であると考えている。図 3 に概念図を示すように、このシステムでは TAP2 欠損 iPS 細胞から iPS-ML を作製し、これに各種の HLA class I 遺伝子を導入した後に大量に増殖させて凍結保存しておく。がん患者に対する樹状細胞ワクチンとして使用する場合は、適切な HLA class I 遺伝子が導入された iPS-ML を解凍、IL-4 を添加して 3 日ほど培養し樹状細胞(ML-DC)へ分化させ、治療に用いる。iPS-ML を大量に生産し、クオリティーチェックを行った後に凍結保存することにより、製造コストを大幅に削減することが可能となる。また、細胞の解凍以降のステップは短期間の簡単な培養操作を行うのみで実施することが可能である。

ら、iPS-MLは生理的なマクロファージと同様に腫瘍組織へ移行する性質を有していることが示された。著者は、iPS-MLに抗腫瘍活性を有する分子を強制発現させ、担がん個体へ投与すれば治療効果が得られるのではないかと考えている。現在、インターフェロン、TNF- $\alpha$ 、FASリガンド、TRAILなどを発現させたiPS-MLを作成し、胃癌および膵癌の腹膜播種ゼノグラフトモデルを用いて効果を検討している。

### 3 TAP分子欠損組織不適合性の回避およびHLAタイプ別細胞供給システム

iPS-ML作成技術によりヒトのマクロファージおよび樹状細胞(ML-DC)の大量生産が可能となった。しかし、患者ごとに個別にML-DCを作成するまでには、iPS細胞の作成、ミエロイド系細胞への分化誘導、さらにiPS-MLの作成という手順を踏む必要がある。これには最短でも2カ月以上の期間を必要とする。これでは治療のタイミングを逃してしまうおそれ大きい。またこの期間、患者個別に細胞培養操作を行うとなると相当の労力と費用がかかることにもなる。

一方、当然のことながら既存の、特定の細胞ドナーに由来するiPS細胞から作成したML-DCを遺伝的背景の異なる患者の治療に使用することはできない。これは組織不適合性、すなわちアロ個

体間で細胞移入を行った場合、移入されたドナー由来細胞がレシピエントの免疫系により認識され、速やかに破壊されてしまうためである。とくに細胞移入後数日で発生する急性拒絶反応においては、不適合HLA class Iを認識するCTL(細胞傷害性T細胞)が主要なエフェクター細胞となる。

このような問題の解決法として、HLAハプロタイプ(「サイドメモ1」参照)についてホモ接合となっているドナーからiPS細胞を作成し、さまざまなHLA型を網羅した“iPS細胞バンク(ストック)”を作成する構想が提唱されており、著者らはこの構想の実現におおいに期待している。しかし現時点では、たとえば日本人集団のうちどの程度がこのバンクでカバーされるようになるか不確定であり、頻度の低いHLAハプロタイプについてはホモ接合の細胞ドナーが見つからない可能性が大きい。

著者らはこの“バンク構想”に期待を寄せつつ、組織不適合性の問題の解決策として、ヒトiPS細胞

#### サイドメモ1

### HLAハプロタイプ

同一染色体上に存在する複数の遺伝子座における対立遺伝子(アレル)の組合せをハプロタイプという。ヒトのMHC(主要組織適合抗原複合体)であるHLA(ヒト白血球型抗原)をコードする遺伝子群は、6番染色体短腕上のHLA class Iとclass II遺伝子領域にまたがって存在する。HLAの各遺伝子座の間には連鎖不平衡があり、民族集団ごとに比較的頻度の高いHLAハプロタイプが存在する。たとえば、集団中において、あるHLAハプロタイプの頻度(ハプロタイプ頻度)が10%であるとすると、その集団中の1%の個体はそのHLAハプロタイプのホモ接合であることが期待される。

#### サイドメモ2

### TAP

MHC class Iに結合する抗原ペプチドを供給するためのペプチドトランスポーターであり、細胞質内のプロテアソームによる蛋白質分解の結果として産生されたペプチド断片を、ATP分解に伴うエネルギーに依存して小胞体内腔へ輸送する。TAPはTAP1とTAP2の2つのサブユニットからなる二量体として機能し、これらの分子の遺伝子はいずれもMHC class II遺伝子領域内(ヒトにおいてはHLA-DQとDP遺伝子座の間)に存在する。MHC class Iは重鎖( $\alpha$ 鎖)、 $\beta$ 2ミクログロブリン、および抗原ペプチドからなる三量体の形成により安定した構造をとり、細胞表面上へ輸送される。TAP1とTAP2のいずれかの遺伝子を欠失した細胞では小胞体内腔へ抗原ペプチドが供給されず、この三量体形成がなされないため、細胞表面上におけるMHC class I分子の発現レベルが著しく低下する。ただし、膜蛋白や分泌蛋白の膜移行シグナル配列に由来するペプチド断片はTAP非依存性に小胞体内腔へ移行しMHC class Iに結合するため、TAP欠損細胞であっても細胞表面上のMHC class Iが完全に消失するわけではない。

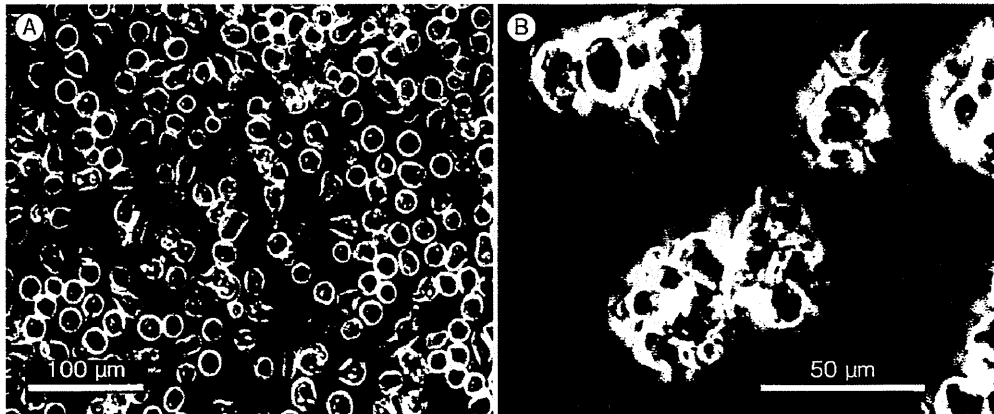


図2 iPS-MLおよびそれに由来する樹状細胞様細胞(ML-DC)の形態  
A: iPS-MLの形態, B: ML-DCの形態.

細胞を疾患治療に用いることを想定して研究を進めてきた<sup>9,10)</sup>.

図1に示す方法により, ヒトのES細胞あるいはiPS細胞からマクロファージおよび樹状細胞を作製することが可能である<sup>5,10)</sup>. しかし, この方法では分化誘導に1カ月以上の期間を必要とし, かつ, 分化誘導の結果として最終的に得られる細胞数が用いたiPS細胞の10~20倍程度でしかない. このために, 大量の分化細胞を得るためには大規模なスケールの分化誘導培養を行うことが必要となり, 臨床応用となれば多額の費用が必要となることが予想された. そこで, 製造コストを実用化できるレベルへ抑えるためには細胞産生効率を大幅に改善する必要があると考え, 数年にわたり試行錯誤を行った. その結果, ヒトiPS細胞に由来するミエロイド系血液細胞(CD11陽性細胞)に, レンチウイルスベクターを用いてcMYC+BM11, cMYC+EZH2, あるいはcMYC+BM11+MDM2などを導入することにより増殖性を有するミエロイド系細胞(iPS-ML)を作製できることを見出し(図2), iPS-ML(iPS cell-derived myeloid cell line)と名づけた<sup>11)</sup>.

iPS-MLはM-CSFに依存して倍加時間1~2日程度で長期間(4カ月以上)増殖するので, 一度作成すれば得られる細胞数は無限である. 浮遊状態で増殖し, 培養液を加えつつ培養を継続するだけで増殖するので, 簡単に大量培養が可能である. 重要な点として, iPS-MLは樹状細胞へ分化する能力を保持したまま増殖するという特性を有して

いる. iPS-MLを増殖させるときはM-CSFとGM-CSFの存在下で維持培養を行う. これに, IL-4を添加することにより数日で樹状細胞様の形態を有する細胞へ分化する(図2). 著者らはこの細胞をML-DCと名づけている. ML-DCは今日, 臨床的に使用されている単球由来の樹状細胞以上に強力なT細胞刺激活性とCTL誘導能力を有しており, 細胞ワクチンとして有用であると考えられる.

がん治療に用いるための樹状細胞の製造法として, 著者らはiPS-MLを大量に製造してストックしておき, 必要に応じてこれを解凍しIL-4を添加して2~3日培養してML-DCへ分化させるというシステムを検討している. このシステムを実用化することができれば, 細胞ワクチンとして使用可能な樹状細胞を簡便に低コストで供給することが可能となると考えられる.

また, iPS-MLを抗腫瘍エフェクター細胞としてがん治療に使用する研究も行っている. がん組織にはしばしばマクロファージの浸潤が観察されることから, マクロファージは腫瘍組織への移行性を有しているものと考えられる. iPS-MLを投与した場合にがん組織に浸潤するかどうか検討するため, ヒト胃癌細胞(NUGC-4)をscidマウスの腹腔へ投与し, ゼノグラフトによる胃癌腹膜播種のモデルを作成した. このマウスへ蛍光色素を用いて染色したiPS-MLを投与し観察したところ, マウス腹腔内の大網を中心とする腫瘍組織へのiPS-MLの集積と浸潤が認められた. この結果か



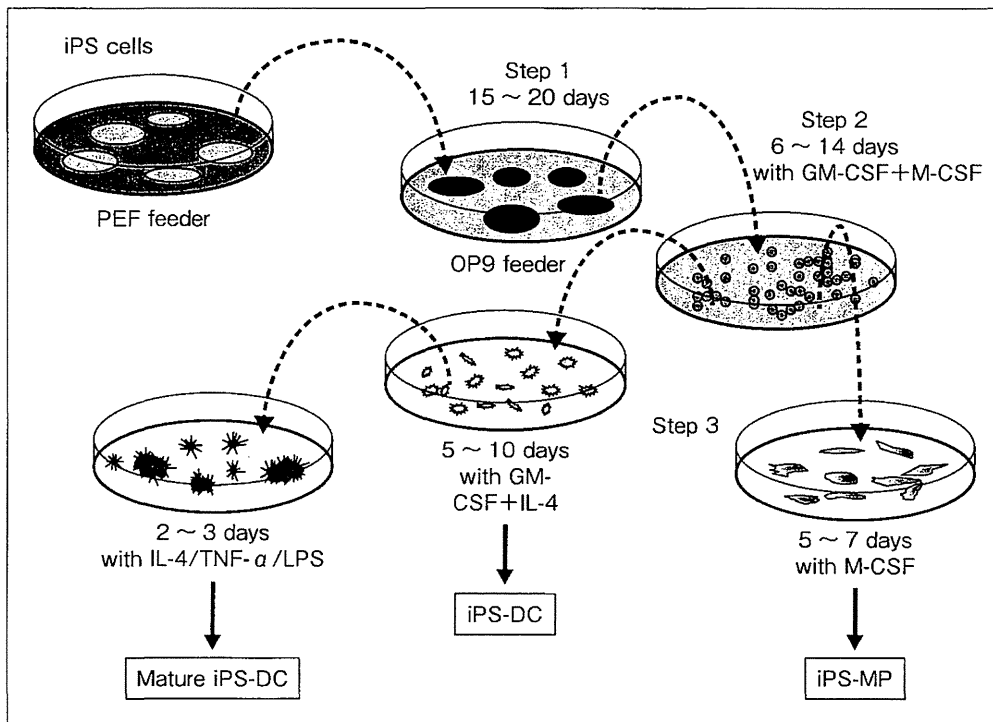


図 1 ヒトiPS細胞から樹状細胞およびマクロファージへの分化誘導法の概要

古くからの研究で明らかにされているように、マクロファージが直接的な抗腫瘍活性を有していることは事実である。多くの悪性腫瘍の組織内にはマクロファージの浸潤が認められる。しかし、近年の多くの研究報告においては、マクロファージによる組織破壊が悪性腫瘍の局所浸潤や転移巣形成を助長する、あるいはマクロファージが腫瘍血管の形成を促進することが示されている。がん発症初期の段階ではマクロファージによるがん細胞排除機構が働くが、がんの進行に伴う局所および体内環境の変化により、マクロファージが抗腫瘍活性を失ってしまうものと考えられる。

海外においてはがんに対する活性化マクロファージ療法の臨床試験も実施されている<sup>2,3)</sup>。多くの場合、樹状細胞療法の場合と同様に患者自身の末梢血白血球を、アフレーシスを用いて分離し、そのなかの単球をインターフェロン $\gamma$ などで刺激したものを投与するという方法である。しかし、これまでの臨床試験で明白な治療効果が示された例はない。マクロファージ療法が有効性を示していない理由としては、投与されたマクロファージの数が $10^9$ 前後と不十分であり、また、がん患者から採取されたマクロファージは担がん

状態という体内環境にさらされていたためがん細胞に対する攻撃能力を失っていたことも考えられる。すなわち、患者自身の末梢血を細胞ソースとするマクロファージ療法では量的にも質的にも限界があり、有効な治療法とはなりえないと考えられる。

以上をまとめると、悪性腫瘍に対する樹状細胞療法ならびにマクロファージ療法を有効な治療法として確立し普及させるには、十分な量と質の治療用細胞を実用的なコストで供給できる技術の開発が必要であると考えられる。

### iPS-ML

著者らは樹状細胞療法における細胞ソースの問題を解決すべく、10年ほど前からES細胞に由来する樹状細胞を用いたがん治療の研究を行ってきた。その過程においてマウスおよびヒトのES細胞から機能的な樹状細胞を作成するための分化誘導技術を開発した<sup>4,5)</sup>。さらにマウスモデルを用いて、ES細胞由来の樹状細胞(ES-DC)による抗腫瘍免疫療法の有効性を検討した<sup>6-8)</sup>。また、2007年にヒトiPS細胞の作製が発表された後は、iPS細胞から分化誘導したマクロファージあるいは樹状

## iPS細胞由来のミエロイド細胞のがん治療への応用

—TAP欠損iPS細胞に由来する増殖性を有するミエロイド細胞

Application of iPS cell-derived myeloid cells to cancer therapy



千住 覚

Satoru SENJU

熊本大学大学院生命科学研究部免疫識別学分野

○がんに対する免疫療法として樹状細胞を用いたワクチン療法が国内外で実施されているが、多くの場合、患者自身の末梢血単球から作成された樹状細胞が用いられている。末梢血単球は増殖能力がほとんどないため、必要量の樹状細胞を作成するためにアフレーション装置を用いた白血球分離が行われている。また、単球の樹状細胞への分化能力には細胞ドナーによる個体差が大きいという問題もある。一方、海外ではマクロファージの直接的な抗腫瘍効果を期待し、自己の単球由来マクロファージによるがん治療の臨床試験が実施されている。しかし、がん患者由来の単球は担がん状態という体内環境に曝露されていたためか、マクロファージ療法が明らかな有効性を示した報告はない。樹状細胞療法にせよマクロファージ療法にせよ、より有効な治療法として確立し普及させるには、抗腫瘍活性を有する細胞を十分量提供できる技術の開発が必須であろう。著者らは、ヒトのiPS細胞から長期間にわたり増殖し、かつ樹状細胞へ分化可能なミエロイド系細胞ライン(iPS-ML)を作製する方法を開発している。さらに、iPS細胞における遺伝子標的破壊により組織適合性の問題を解決することを試みている。将来的にはこれらの技術を基盤として、がん治療に用いるための樹状細胞とマクロファージを作成し実用化することをめざしている。本稿ではこの研究の現状について紹介したい。

**Key word** : iPS細胞, 樹状細胞, マクロファージ, がん治療, HLA

### 樹状細胞療法とマクロファージ療法の現状

がんに対する抗原特異的免疫療法は、適切ながん抗原を標的とすることにより、抗がん剤よりも選択的にがん組織を攻撃できる可能性があり、副作用が少なく、かつ効果の高い治療法になる可能性を秘めている。がんに対する能動免疫法のひとつとして樹状細胞療法が行われている。樹状細胞によるT細胞への腫瘍抗原の提示は抗腫瘍免疫応答の起点であり、マウスを用いた動物実験では腫瘍抗原ペプチドをそのままワクチンとして投与するよりも、体外で腫瘍抗原を負荷、あるいは遺伝子導入により腫瘍抗原を発現させた樹状細胞を投与する方法のほうが有効であることが示されている。最近では前立腺がんに対する自己樹状細胞を用いたワクチン療法の有効性を示す大規模な臨床試験の結果が報告されている<sup>1)</sup>。

樹状細胞療法に用いられる樹状細胞は通常、患者末梢血中の単球(モノサイト)から分化させることにより作製されている。しかし、単球は体外ではほとんど増殖させることができないため、治療を行うのに十分な数の樹状細胞を調整するためには大量の単球を必要とする。現在、悪性腫瘍に対する細胞ワクチンとして用いるために、末梢血白血球を成分採血装置を用いて採取し、そのなかから分離した単球を培養して樹状細胞に分化させるという方法が実施されている。末梢血中の単球数やその樹状細胞への分化能力には細胞ドナーにより大きな個体差があり、がん患者の場合、十分な数の樹状細胞が調整できないという場合もある。さらに患者個別のアフレーションと培養の操作が必要であるために、費用が高額であることも問題である。

## 文献

- 1) Kantoff, P. W. et al.: *N. Engl. J. Med.*, **363** : 411-422, 2010.
- 2) Andreesen, R. et al.: *J. Leukoc. Biol.*, **64** : 419-426, 1998.
- 3) Monnet, I. et al.: *Chest*, **121** : 1921-1927, 2002.
- 4) Senju, S. et al.: *Blood*, **101** : 3501-3508, 2003.
- 5) Senju, S. et al.: *Stem Cells*, **25** : 2720-2729, 2007.
- 6) Matsuyoshi, H. et al.: *J. Immunol.*, **172** : 776-786, 2004.
- 7) Motomura, Y. et al.: *Cancer Res.*, **66** : 2414-2422, 2006.
- 8) Fukushima, S. et al.: *J. Immunother.*, **32** : 219-231, 2009.
- 9) Senju, S. et al.: *Stem Cells*, **27** : 1021-1031, 2009.
- 10) Senju, S. et al.: *Gene Ther.*, **18** : 874-883, 2011.
- 11) Haruta, M. et al.: TAP-deficient human iPS cell-derived myeloid cell lines as unlimited cell source for dendritic cell-like antigen presenting cells. *Gene Ther.*, 2012, Aug. 9. (Epub ahead of print)
- 12) Matsunaga, Y. et al.: *J. Immunol.*, **181** : 6635-6643, 2008.
- 13) Fairchild, P. J. et al.: *Curr. Biol.*, **10** : 1515-1518, 2000.
- 14) Zhan, X. et al.: *Lancet*, **364** : 163-171, 2004.
- 15) Slukvin, I. I. et al.: *J. Immunol.*, **176** : 2924-2932, 2006.
- 16) Choi, K-D. et al.: *J. Clin. Invest.*, **119** : 2818-2829, 2009.
- 17) Lin, J. et al.: *Stem Cell Rev. Rep.*, **7** : 736-747, 2011.
- 18) Silk, K. M. et al.: *Gene Therapy*, **19** : 1035-1040, 2012.

\* \* \*

## Application of iPS cell-derived macrophages to cancer therapy

Satoru Senju<sup>1,2</sup>, Chihiro Koba<sup>1,2</sup>, Miwa Haruta<sup>1,2</sup>, Yusuke Matsunaga<sup>1,2</sup>, Keiko Matsumura<sup>1,2</sup>, Eriko Haga<sup>1,2</sup>,  
Yuko Sasaki<sup>1,2</sup>, Tokunori Ikeda<sup>1,2</sup>, Koutaro Takamatsu<sup>1,2</sup>, and Yasuharu Nishimura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunogenetics; Graduate School of Medical Sciences; Kumamoto University;

Kumamoto, Japan

<sup>2</sup>CREST; Japan Science and Technology Agency; Kawaguchi, Japan

**Keywords:** gastric cancer, interferon  $\beta$ , iPS cells, macrophages, pancreatic cancer, peritoneal dissemination

**Correspondence to:** Satoru Senju; Email: senjusat@gpo.kumamoto-u.ac.jp

Citation: Senju S, Koba C, Haruta M, Matsunaga Y, Matsumura K, Haga E, Sasaki Y, Ikeda T, Takamatsu K, Nishimura Y. Application of iPS cell-derived macrophages to cancer therapy.

OncoImmunology 2014; 3:e27927; <http://dx.doi.org/10.4161/onci.27927>

We established a method to produce a large quantity of myeloid cells from human inducible pluripotent stem cells (iPSCs). When injected intraperitoneally into mice carrying established peritoneal tumors, iPSC-derived myeloid cells (iPS-MCs) efficiently accumulated within neoplastic lesions. The intraperitoneal injection of iPS-MCs expressing interferon  $\beta$  significantly inhibited the growth of human gastric and pancreatic cancers implanted in the peritoneal cavity of immunocompromised mice.

## Introduction

Macrophage infiltration is frequently observed in solid tumors.<sup>1</sup> Recent studies indicate that tumor-associated macrophages (TAMs) are significantly involved in tumor progression, accelerating the local invasion and metastatic dissemination of malignant cells.<sup>2</sup> Other studies have highlighted the possibility that macrophages may also mediate a tumoricidal effect, leading to the development of macrophage-based anticancer therapies. As a standalone example, the transfer of autologous monocyte-derived macrophages activated with interferon (IFN) $\gamma$  ex vivo has been tested as a potential intervention for patients with solid tumors.<sup>3</sup> However, no clear therapeutic benefit has thus far associated with macrophage-based anticancer therapies. To optimize the efficacy of such an approach, improvements of the method for supplying macrophages are necessary. Indeed, if sufficient amounts of macrophages exerting potent anticancer effects could be repeatedly administered, patients may achieve robust clinical benefit from this cell-based immunotherapeutic regimen,

### iPSC-Derived Proliferating Myeloid Cells

Several groups, including ours, have thus far established methods to generate macrophages from mouse or human inducible pluripotent stem cells (iPSCs).<sup>4,5</sup> However, the number of macrophages generated from human iPSCs is 100 times lower than the number of undifferentiated



iPSCs used as starting material. In addition, the generation of macrophages from iPSCs is time-consuming, laborious, and too expensive to be applied to the clinical practice.

Recently, we established a method to induce proliferation of the iPSC-derived myeloid cells (iPS-MCs) upon the lentivirus-mediated transduction of genes that promote cell proliferation or inhibit cell senescence, *i.e.*, *v-myc* avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (*MYC*) plus *BM11*, to generate an iPSC-derived myeloid/macrophage cell line (iPS-ML). Such an iPS-ML can proliferate in a colony stimulating factor 1 (CSF1)-dependent manner for at least several months while retaining the potential to differentiate into dendritic cells (iPS-ML-DCs) with a potent T cell-stimulating capacity.<sup>6</sup>

### **Accumulation and Infiltration of Intraperitoneally Injected iPS-MCs in Tumor Tissues**

We examined whether or not iPS-MCs administered intraperitoneally would infiltrate tumor lesions pre-established in the peritoneal cavity of mice.<sup>7</sup> To this end, green fluorescent protein (GFP)-expressing NUGC-4 human gastric cancer cells, which have been established from a peritoneal metastatic lesion removed from an individual with diffuse gastric cancer, were intraperitoneally injected into SCID mice. After 15 d, iPS-MCs labeled with the red fluorescent dye PKH26 were administered via the same route. Macroscopic fluorescence analysis on the next day revealed that both NUGC-4-derived tumors and iPS-MCs localize for the most part to the greater

omentum, demonstrating that iPS-MCs efficiently accumulate into neoplastic lesions. Of note, such a preferential accumulation of iPS-MCs into the greater omentum was not observed when iPS-MCs were inoculated into tumor-free mice. Next, we isolated and microscopically examined neoplastic lesions. PKH26-labeled iPS-MCs infiltrated nests of GFP-expressing NUGC-4 cells. Higher magnification analysis of tumor sections clearly demonstrated the infiltration of iPS-MCs into the neoplastic tissue. These results indicate that iPS-MCs efficiently infiltrate malignant tissues when intraperitoneally injected into mice carrying cancers established in the peritoneal cavity.

## **Therapeutic Effects of IFN $\beta$ -Secreting iPS-MCs on Peritoneally Disseminated**

### **NUGC-4 Gastric Cancer Cells in Xenograft Models**

IFN $\beta$  exerts anti-proliferative and/or pro-apoptotic effects on various types of cancer cells. We examined the effects of iPS-MCs genetically modified to secrete IFN $\beta$  (iPS-ML/IFN $\beta$ ) on against NUGC-4 cells *in vivo*.<sup>7</sup> We generated NUGC-4 cells expressing the firefly luciferase, NUGC4/Luc cells, which can be easily monitored *in vivo* by bioluminescence analysis. SCID mice were then inoculated with NUGC-4/Luc cells (day 0), and 4 d later they were divided into a treated and a control group. Mice belonging to the treated group were injected *i.p.* with iPS-ML/IFN $\beta$  from day 4 ( $2 \times 10^7$  cells/injection/mouse, 3 injections per week). Tumor growth was significantly inhibited by the inoculation of iPS-ML/IFN $\beta$  cells. Of note, the administration of iPS-ML/IFN $\beta$  also inhibited the

growth of MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells in a similar xenograft model. In summary, iPS-MCs expressing IFN $\beta$  potentially inhibit the growth of human gastric and pancreatic cancers growing in immunocompromised SCID mice.

### **Toward Clinical Applications**

Gastric cancer is one of most frequent malignancies worldwide and the second most frequent cause of cancer-related mortality. Peritoneal dissemination is the most difficult type of metastasis to treat of those associated with gastric cancer. Pancreatic cancer has a poor prognosis, with overall 5-y survival rate being < 10%. Thus, efficient therapies for these intractable cancers are urgently needed. The present study suggests that iPS-MCs secreting antineoplastic factors may be used to treat cancers for which no standard therapy has been established yet.

For macrophage-based immunotherapeutic regimens to achieve robust clinical effects, cancer patients may need to receive repetitive administrations of large numbers of cells. Since our iPS-ML proliferates for at least several months, sufficient amounts of iPS-MCs may be readily available by this approach. However, the proliferative capacity of our iPS-ML may constitute a concern, as this line could drive leukemogenesis, at least theoretically, in a completely autologous setting.

To circumvent such risk, we plan to use allogeneic iPS-MCs lacking transporter associated with antigen presentation (TAP) for future clinical applications. TAP plays a key role in

antigen-presentation by MHC class I molecules. In TAP-deficient cells, the expression levels of MHC class I molecules on the cell surface are very low. More importantly, the lack of TAP greatly reduces the complexity of peptides presented on MHC class I molecules. In line with these notions, we previously demonstrated that TAP-deficient cells evade recognition by most alloreactive CD8<sup>+</sup> T cells (the major immune effector cells mediating acute rejection) upon transfer into allogeneic recipients.<sup>8</sup> Nevertheless, alloreactive CD8<sup>+</sup> T cells recognizing MHC class I-bound peptides presented via the TAP-independent pathway (mainly derived from signal peptides) may eventually eliminate the allogeneic TAP-deficient iPS-MCs. Based on these premises, we predict that TAP-deficient iPS-MCs would survive in the recipient for several days, allowing them to exert anticancer effects, but would then be eliminated by the recipient's immune system. Thus, the administration of allogeneic, TAP-deficient iPS-MCs to cancer patients should be effective and safe.

(Fig. 1)

#### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

#### References

1. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 2006; 66:605-12; PMID:16423985; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4005>



- <jrn>2. Mantovani A, Schioppa T, Porta C, Allavena P, Sica A. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25:315-22; PMID:16967326; <http://dx.doi.org/10.1007/s10555-006-9001-7></jrn>
- <jrn>3. Andreesen R, Hennemann B, Krause SW. Adoptive immunotherapy of cancer using monocyte-derived macrophages: rationale, current status, and perspectives. *J Leukoc Biol* 1998; 64:419-26; PMID:9766621</jrn>
- <jrn>4. Choi KD, Vodyanik MA, Slukvin II. Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34+CD43+CD45+ progenitors. *J Clin Invest* 2009; 119:2818-29; PMID:19726877; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI38591></jrn>
- <jrn>5. Senju S, Haruta M, Matsumura K, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takamatsu K, Irie A, Nishimura Y. Generation of dendritic cells and macrophages from human induced pluripotent stem cells aiming at cell therapy. *Gene Ther* 2011; 18:874-83; PMID:21430784; <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2011.22></jrn>
- <jrn>6. Haruta M, Tomita Y, Yuno A, Matsumura K, Ikeda T, Takamatsu K, Haga E, Koba C, Nishimura Y, Senju S. TAP-deficient human iPS cell-derived myeloid cell lines as unlimited cell source for dendritic cell-like antigen-presenting cells. *Gene Ther* 2013; 20:504-13; PMID:22875043; <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2012.59></jrn>
- <jrn>7. Koba C, Haruta M, Matsunaga Y, Matsumura K, Haga E, Sasaki Y, Ikeda T, Takamatsu K, Nishimura Y, Senju S. Therapeutic effect of human iPS-cell-derived myeloid cells expressing IFN- $\beta$  against peritoneally disseminated cancer in xenograft models. *PLoS One* 2013; 8:e67567; PMID:23826321; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0067567></jrn>
- <jrn>8. Matsunaga Y, Fukuma D, Hirata S, Fukushima S, Haruta M, Ikeda T, Negishi I, Nishimura Y, Senju S. Activation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by beta 2-microglobulin or TAP1 gene disruption and the introduction of recipient-matched MHC class I gene in allogeneic embryonic stem cell-derived dendritic cells. *J Immunol* 2008; 181:6635-43; PMID:18941254</jrn>



**Figure 1.** Anticancer therapy with iPSC-derived macrophages producing interferon  $\beta$ . Inducible pluripotent stem cell (iPSC)-derived myeloid cells (iPS-MCs) infiltrate tumor tissues upon injection into cancer-bearing recipients. Interferon  $\beta$  (IFN $\beta$ )-expressing iPS-MCs secrete IFN $\beta$  within neoplastic lesions, hence causing disease regression.

# Establishment of HLA-DR4 Transgenic Mice for the Identification of CD4<sup>+</sup> T Cell Epitopes of Tumor-Associated Antigens

Junji Yatsuda<sup>1,2</sup>\*, Atsushi Irie<sup>1</sup>\*, Kumiko Harada<sup>1</sup>, Yayoi Michibata<sup>1</sup>, Hirotake Tsukamoto<sup>1</sup>, Satoru Senju<sup>1</sup>, Yusuke Tomita<sup>1</sup>, Akira Yuno<sup>1</sup>, Masatoshi Hirayama<sup>1</sup>, Mohammad Abu Sayem<sup>1,3</sup>, Naoki Takeda<sup>4</sup>, Isao Shibuya<sup>5</sup>, Shinji Sogo<sup>5</sup>, Fumihiko Fujiki<sup>6</sup>, Haruo Sugiyama<sup>7</sup>, Masatoshi Eto<sup>2</sup>, Yasuharu Nishimura<sup>1\*</sup>

**1** Department of Immunogenetics, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan, **2** Department of Urology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan, **3** Department of Biotechnology and Genetic Engineering, Mawlana Bhashani Science and Technology University, Tangail, Bangladesh, **4** Division of Transgenic Technology, Institute of Resource Development and Analysis, Kumamoto University, Kumamoto, Japan, **5** Microbiological Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd, Tokushima, Japan, **6** Department of Cancer Immunology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan, **7** Department of Functional Diagnostic Science, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

## Abstract

Reports have shown that activation of tumor-specific CD4<sup>+</sup> helper T (Th) cells is crucial for effective anti-tumor immunity and identification of Th-cell epitopes is critical for peptide vaccine-based cancer immunotherapy. Although computer algorithms are available to predict peptides with high binding affinity to a specific HLA class II molecule, the ability of those peptides to induce Th-cell responses must be evaluated. We have established HLA-DR4 (HLA-DRA\*01:01/HLA-DRB1\*04:05) transgenic mice (Tgm), since this HLA-DR allele is most frequent (13.6%) in Japanese population, to evaluate HLA-DR4-restricted Th-cell responses to tumor-associated antigen (TAA)-derived peptides predicted to bind to HLA-DR4. To avoid weak binding between mouse CD4 and HLA-DR4, Tgm were designed to express chimeric HLA-DR4/I-E<sup>d</sup>, where I-E<sup>d</sup> α1 and β1 domains were replaced with those from HLA-DR4. Th cells isolated from Tgm immunized with adjuvant and HLA-DR4-binding cytomegalovirus-derived peptide proliferated when stimulated with peptide-pulsed HLA-DR4-transduced mouse L cells, indicating chimeric HLA-DR4/I-E<sup>d</sup> has equivalent antigen presenting capacity to HLA-DR4. Immunization with CDCA1<sub>55-78</sub> peptide, a computer algorithm-predicted HLA-DR4-binding peptide derived from TAA CDCA1, successfully induced Th-cell responses in Tgm, while immunization of HLA-DR4-binding Wilms' tumor 1 antigen-derived peptide with identical amino acid sequence to mouse ortholog failed. This was overcome by using peptide-pulsed syngeneic bone marrow-derived dendritic cells (BM-DC) followed by immunization with peptide/CFA booster. BM-DC-based immunization of KIF20A<sub>494-517</sub> peptide from another TAA KIF20A, with an almost identical HLA-binding core amino acid sequence to mouse ortholog, successfully induced Th-cell responses in Tgm. Notably, both CDCA1<sub>55-78</sub> and KIF20A<sub>494-517</sub> peptides induced human Th-cell responses in PBMCs from HLA-DR4-positive donors. Finally, an HLA-DR4 binding DEPDC1<sub>191-213</sub> peptide from a new TAA DEPDC1 overexpressed in bladder cancer induced strong Th-cell responses both in Tgm and in PBMCs from an HLA-DR4-positive donor. Thus, the HLA-DR4 Tgm combined with computer algorithm was useful for preliminary screening of candidate peptides for vaccination.

**Citation:** Yatsuda J, Irie A, Harada K, Michibata Y, Tsukamoto H, et al. (2013) Establishment of HLA-DR4 Transgenic Mice for the Identification of CD4<sup>+</sup> T Cell Epitopes of Tumor-Associated Antigens. PLoS ONE 8(12): e84908. doi:10.1371/journal.pone.0084908

**Editor:** Hiroshi Shiku, Mie University Graduate School of Medicine, Japan

**Received:** September 2, 2013; **Accepted:** November 28, 2013; **Published:** December 30, 2013

**Copyright:** © 2013 Yatsuda et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported in part by Grants-in-aid Nos. 22133005 and 24300334 to YN from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan (<http://www.mext.go.jp/>) and a collaborative research funding from Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. (<http://www.otsuka.co.jp/>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** IS and S. Sogo are current employees of Microbiological Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. and that YN is supported by a funding from Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

\* E-mail: mxnishim@gpo.kumamoto-u.ac.jp

☉ These authors contributed equally to this work.