

## iPS細胞由来の樹状細胞と マクロファージを用いた医療技術の開発

*Clinical application of ES and iPS cell-derived dendritic cells and macrophages*

### Keywords

ES細胞  
iPS細胞  
樹状細胞  
免疫療法  
マクロファージ

千住 覚

熊本大学大学院医学系研究部 免疫識別学分野

### Summary

Dendritic cells (DC) are the most potent antigen-presenting cells. Genetically engineered DC expressing antigens and immuno-regulatory molecules are regarded as promising means to manipulate immune responses. We have established methods to generate DC from mouse and human embryonic stem (ES) cells. Genetic modification of ES cell-derived DC (ES-DC) can readily be done by the introduction of expression vectors into undifferentiated ES cells by electroporation and subsequent induction of differentiation of the transfectant ES cell clones to ES-DC. Using mouse models, we have demonstrated the usefulness of genetically modified ES-DC in eliciting anti-cancer immunity and in treating autoimmune disease. Considering future clinical application of this technology, unavailability of human ES cells genetically identical to the patients is a crucial problem. By applying ES-DC technology to iPS cells, we will overcome the issue of histocompatibility and also ethical issues arising from the use of human ES cells. iPS technology made it feasible also to generate large number of macrophages genetically matched to patients. I herein introduce our researches on ES-DC and discuss the possible clinical application of DC and macrophages derived from iPS cells.

### はじめに

樹状細胞は、抗原蛋白質をプロセスしてT細胞に提示する抗原提示機能に特化した免疫細胞であり、免疫応答の制御において中心的な役割を果たしている。我々は、これまでにマウス、サル、およびヒトのES細胞から樹状細胞(ES-DC)を作製する技術、さらにES細胞において遺伝子改変を行い、これをES-DCへ分化誘導することにより遺伝子改変樹状細胞を作製する技術を開発している。そして、マウスモデルにおいて、特定の抗原と各種の免疫制御分子を同時に発現するES-DCを作製し、これを投与することにより個体の免疫応答を抗原特異的に制御するという独自の手法を確立している。今後、これまでのES細胞を使用した研究により得ている成果をiPS細胞へ応用し、医療技術としての実用化へ向けた研究を進めたいと考えている。さ

Senju, Satoru

Department of Immunogenetics, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences  
E-mail : senjusat@gpo.kumamoto-u.ac.jp

らに、ES細胞やiPS細胞からは、マクロファージを作製することも可能であり、iPS細胞に由来するマクロファージを用いる医療技術の開発も行いたいと考えている。

### マウス ES 細胞からの樹状細胞への分化誘導培養

ES細胞の血液細胞への分化を誘導するOP9細胞と共培養することによりES細胞から血液細胞への分化を誘導し、さらに適切なタイミングで樹状細胞への分化を促すサイトカインを加えることにより、樹状細胞への分化誘導ができると考え、研究を行った。そして、マウスES細胞から樹状細胞(ES-DC)を作製する以下のような培養プロトコルを確立した(図1)<sup>1)</sup>。ES-DCは、MHCクラスII分子を介した抗原提示機能と一次MLR刺激活性を有していた。これをさらにTNF- $\alpha$ 、IL-4、および抗CD40刺激抗体の同時添加、あるいはLPSなどで刺激すると、著明な樹状突起を有し、より強力なT細胞刺激活性を有する成熟樹状細胞となる(図2)。

### ヒトES細胞からのES-DCの作製

ES-DCの臨床応用を目指して、ヒトのES細胞からES-DCを作製する分化誘導法の開発も行った<sup>2)</sup>。複数のストローマ細胞株(OP9, ST2, PA6)をフィーダー細胞として用いて比較した結果、ヒトのES細胞の分化誘導においても、OP9を用いることにより最も

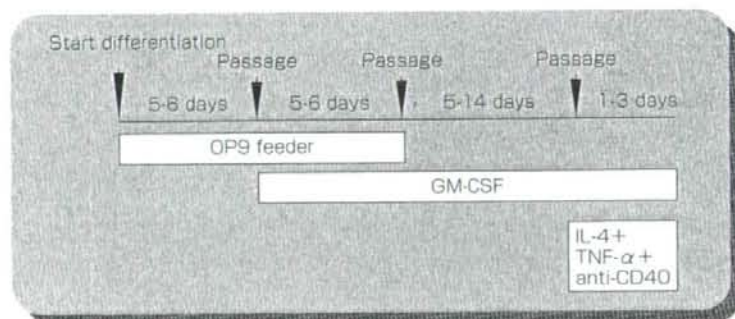
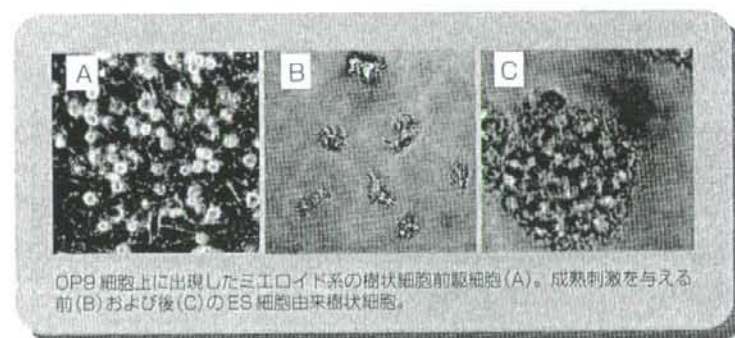


図1 マウスES細胞からの樹状細胞分化誘導培養法の概略



OP9細胞上に出現したミエロイド系の樹状細胞前駆細胞(A)。成熟刺激を与える前(B)および後(C)のES細胞由来樹状細胞。

図2 マウスES細胞に由来する分化細胞の形態

良い結果が得られた。マウスの場合と異なり、分化誘導の過程で一時的にGM-CSFに加えてM-CSFを添加することが有効であり、また、フィーダー細胞なしで培養するステップで、GM-CSFに加えてIL4を添加することが必要であった。ヒトES-DCも、蛋白質抗原をプロセスしてT細胞へ提示する活性やアロMLR刺激活性など、樹状細胞としての機能を備えていた。また、マウスES-DCの場合と同様の手法で、ヒトの遺伝子改変ES-DCを作製することも可能であった。

### 悪性腫瘍に対する抗原特異的免疫療法

癌に対する抗原特異的免疫療法は、適切な癌抗原を標的とすることにより、抗癌剤よりも選択的に癌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りうる可能性を秘めている。今日、数多くの癌抗原が同定されているが、その多くは細胞質あるいは核内蛋白質であり、これを標的とした免疫療法を行うためには抗原に対するT細胞応答を賦活化する必要がある。そこで、効果的な能

動免疫法(ワクチン法)の確立が必要である。

樹状細胞に抗原を体外で負荷して生体に投与することにより、体内の抗原特異的なT細胞を活性化する、いわゆる細胞ワクチンの手法は、新たなワクチン法として期待されている。我々は、これまでの研究において、マウスES-DCに腫瘍抗原などを発現させ、マウスに投与することにより、抗腫瘍免疫を誘導できることを示している<sup>31-61</sup>。ヒトiPS細胞から樹状細胞(iPS-DC)が作製できれば、癌に対する樹状細胞ワクチンとして有用であると考えられる。

### 自己免疫疾患に対する 抗原特異的免疫抑制療法

種々の自己免疫疾患は、さまざまな自己抗原に対する免疫寛容が破綻し、免疫系による攻撃により組織傷害が生ずるものである。免疫抑制剤を用いた治療では、免疫応答能が全般的に低下する結果、感染症に罹患する危険性が高まるという問題がある。そこで、免疫応答能全体を低下させず、標的となっている自己抗原に対する免疫応答のみを特異的に抑制する治療法の開発が切望されている。我々は、これまで、自己免疫疾患の治療法として、自己免疫の標的となっている自己抗原と免疫抑制分子を同時に発現させたES-DCを生体に投与するという手法をマウスモデルを用いて検討している。そして、ES-DCに自己抗原と同時にPD-L1あるいはTRAILを強制発現させたものを投与することにより、自己免疫疾患

(実験的自己免疫性脳脊髄炎:EAE)を治療できることを報告している<sup>71-81</sup>。

### iPS 細胞由来のマクロファージ を用いたアルツハイマー病など の治療法の開発

アルツハイマー病は、異常なプロセシングを受けたアミロイドβ蛋白が脳内に蓄積し、このために神経細胞が機能的抑制を受け、さらには、細胞死に陥ることにより発症する疾患である。若年性にこの疾患を発症する変異型ヒトアミロイド前駆蛋白(APP)のトランスジェニックマウスを用いた研究により、中枢神経組織内のマクロファージであるミクログリアがアミロイドを分解し疾患の進行を遅延させる機能を果たしていることが示されている。

我々は、これまで、ヒトおよびマウスのES細胞からES-DCへの分化誘導培養において、樹状細胞と同時にマクロファージが出現することを観察してきた。また、マウスiPS細胞からマクロファージ(iPS-MP)を大量に作製することが可能であることも見出している。そこで、PS細胞よりアミロイド蛋白の分解能力の強いiPS-MPを作製し投与することにより、アミロイドβ蛋白を分解するという治療が可能かもしれないと考えている。

### ●文 献

- 1) Senju S, Hirata, S, Matsuyoshi H, et al: Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood* 101: 3501-3508, 2003
- 2) Senju S, Suemori H, Zembutsu H, et al: Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Stem Cells* 25: 2720-2729, 2007
- 3) Matsuyoshi H, Senju S, Hirata S, et al: Enhanced priming of antigen-specific CTL *in vivo* by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein; application to anti-tumor vaccination. *J Immunol* 172: 776-786, 2004
- 4) Matsuyoshi H, Hirata S, Yoshitake Y, et al: Therapeutic effect of  $\alpha$ -galactosylceramide-loaded dendritic cells genetically engineered to express SLC/CCL21 along with tumor antigen against peritoneally disseminated tumor cells. *Cancer Science* 96: 889-896, 2005
- 5) Fukuma D, Matsuyoshi H, Hirata S, et al: Anti-cancer immunotherapy with semi-allogeneic embryonic stem cell-derived dendritic cells genetically engineered to express a model tumor antigen. *Biochem Biophys Res Comm* 335: 5-13, 2005
- 6) Motomura Y, Senju S, Nakatsura T, et al: Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing Glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Res* 66: 2414-2422, 2006
- 7) Hirata S, Senju S, Matsuyoshi H, et al: Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing MOG peptide along with TRAIL or PD-L1. *J Immunol* 174: 1888-1897, 2005
- 8) Hirata S, Matsuyoshi H, Fukuma D, et al: Involvement of regulatory T cells in the experimental autoimmune encephalomyelitis-preventive effect of dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein plus TRAIL. *J Immunol* 178: 918-925, 2007

# ES細胞およびiPS細胞を用いた免疫療法

— ES細胞およびiPS細胞由来の樹状細胞およびマクロファージによる新規医療技術

Toward the medical application of ES cell or iPS cell-derived dendritic cells and macrophages



千住 覚

Satoru SENJU

熊本大学大学院医学薬学研究所免疫識別学分野

◎著者らは数年前より、ES細胞から樹状細胞への分化誘導法の開発、およびES細胞由来の樹状細胞による免疫制御についての基礎研究を行ってきた。最近のiPS細胞作製法という画期的な技術の開発により、任意の個体の体細胞から多能性幹細胞を作製することが可能となった。著者らは、iPS細胞は各種の再生医療のための細胞ソースとしてのみならず、細胞治療に用いるための樹状細胞およびマクロファージを作製するための材料として非常に有用であると考えている。本稿では著者らの、多能性幹細胞由来の樹状細胞およびマクロファージを用いたさまざまな疾患の治療法に関する研究について紹介する。



Key word : ES細胞, iPS細胞, 樹状細胞, マクロファージ, 癌

胚性幹(ES)細胞は、発生初期の胚から樹立され、多様な細胞への分化能力と無限増殖能力を合わせもつ多能性幹細胞である。これまでに、マウスのES細胞を用いた遺伝子ターゲティング技術により数多くの遺伝子破壊マウスが作製され、生命科学の各方面の発展に大きく寄与してきた。1990年代の終りにヒトのES細胞がはじめて樹立され、それ以降、ES細胞は基礎研究のためのツールとしてのみならず、ES細胞由来の分化細胞を用いた薬剤スクリーニング、あるいはヒトES細胞由来の分化細胞を移植する再生医療への応用などの用途への医療応用が考慮されるようになった。

著者らは、細胞ワクチンとして用いる樹状細胞を作製するための材料としてES細胞を用いることを考え、2000年にマウスES細胞から樹状細胞を作製するための*in vitro*分化誘導系の開発に着手した。その後、現在まで、マウスES細胞由来の樹状細胞(ES-DC)を用いた免疫細胞療法の研究を行っている。さらにES-DC技術の医療応用をめざして、カンクイザルおよびヒトのES細胞からの樹状細胞分化誘導法の開発も行っている。

ES細胞由来の分化細胞を用いた医療技術の実用化を考慮した場合、ヒトES細胞の使用に伴う倫理的な問題に加えて、レシピエントとES細胞の間の遺伝的背景の差に起因するHLA型の不一致をはじめとする組織不適合性の問題が非常に大きな障壁となっていた。しかし、これらの問題点は最近のiPS(induced pluripotent stem)細胞作製技術の開発によって解決される見込みとなり、多能性幹細胞からの分化誘導技術を応用した医療技術が実現される可能性が高まった。

著者らは、iPSの作製が報告されるより以前、ES細胞とレシピエントの間のHLA class I対立遺伝子に不一致の問題を解決する手段として、後述するようなHLA class Iの細胞表面発現に関与する分子の遺伝子改変による解決策を検討していた。iPS技術の開発により、この手法の有用性については再考する必要が生じたが、一方で、レシピエントと遺伝的背景が完全に一致している多能性幹細胞の作製が可能になったため、申請者らの研究にあらたな応用の可能性が生じた。

## 樹状細胞療法における細胞ソースとしてのES細胞の有用性

樹状細胞は強力な T 細胞刺激活性を有するプロフェッショナル抗原提示細胞であり、体外で何らかの方法により抗原を負荷した樹状細胞を投与する樹状細胞ワクチンが抗腫瘍免疫療法的手段として期待されている。現在、アフエーシス(成分採血)により分離した末梢血白血球中の単球(モノサイト)を GM-CSF などのサイトカインを加えて培養し分化誘導することにより作製された樹状細胞が治療に用いられている。しかし、末梢血単球は体外で増殖させることができないため、治療に必要な数の樹状細胞を得るためには大量の血液をアフエーシス処理する必要がある。さらに、単球から樹状細胞への分化誘導効率には細胞ドナーにより大きな個人差があり、アフエーシスを行ってもかならずしも十分な数の樹状細胞が得られるとは限らない。このように、末梢血単球由来の樹状細胞を用いる方法はドナーの負担と細胞供給の不安定性という問題があり、その臨床的有効性が確認されたとしても医療技術として広く普及するのは困難であると予想される。また、単球由来樹状細胞を用いた抗腫瘍免疫療法では多くの場合、期待されたほどの効果が得られていないのが現状である。

ES 細胞はさまざまな細胞へ分化する能力を備えている代表的な多能性幹細胞であり、適切な条件の下で培養することにより多能性を保ったまま無限に増殖させることが可能である。著者らは研究をはじめめるにあたって、無限増殖能を有する ES 細胞を材料として樹状細胞を作製することが可能になれば、細胞ドナーへ負担をかけることなく樹状細胞をいくらかでも作製できるようになると考えた。また、ES 細胞は電気穿孔法あるいはリポフェクション法により、ウイルスベクターを使用することなく簡便に遺伝子導入を行うことが可能であり、さらに、遺伝子導入細胞のクローンを作製することも可能である。そこで、ES 細胞の段階で遺伝的改変を行い、適切な遺伝子改変 ES 細胞クローンを選択し、これを樹状細胞に分化誘導すれば、樹状細胞の遺伝的改変を容易に行うことができる。これにより抗原分子あるいは各種の免疫

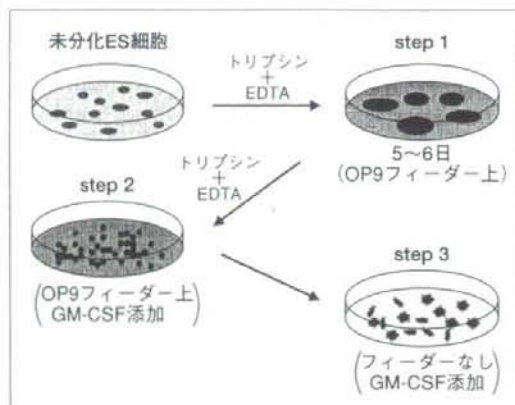


図 1 マウスES細胞からの樹状細胞への分化誘導法の概要

マウス ES 細胞からの樹状細胞分化誘導法は、① step 1: ES 細胞を OP9 フィーダー細胞上で培養することによる中胚葉系への分化誘導、② step 2: 分化細胞を OP9 フィーダー細胞上で GM-CSF 存在下で培養することによるミエロイド系細胞への分化および細胞増殖、③ step 3: フィーダー細胞なしで GM-CSF 存在下で培養することによる樹状細胞(ES-DC)への分化誘導、の3段階に分けられる。ヒト ES-DC の分化誘導法も、基本的には同様の3つの step からなる。培養法の詳細については引用文献を参照のこと。

制御分子を人為的に発現させるなど、機能をさまざまに修飾した樹状細胞を作製することができるという利点もある。

## マウスES細胞からの樹状細胞の作製

著者らはまず、マウスの ES 細胞から樹状細胞を分化誘導する方法の開発に取り組んだ。マウスの ES 細胞から各種の血液細胞への分化を誘導する方法として、OP9 細胞(正常な M-CSF 遺伝子を欠損した op/op マウスに由来する骨髓ストローマ細胞株)をフィーダー細胞として用いる方法が、仲野ら<sup>1)</sup>により報告されていた。著者らはこの方法を参考にして、OP9 細胞などのフィーダー細胞と共培養することにより ES 細胞から血液細胞への分化を誘導し、さらに適切なタイミングで樹状細胞への分化を促すサイトカインを加えることにより樹状細胞への分化誘導ができると考え、研究を開始した。その結果、マウス ES 細胞から樹状細胞を作製する以下のような培養プロトコルを確立した(図 1)<sup>2)</sup>。

まず、維持培養中の ES 細胞をトリプシン/

EDTA を用いて回収し、単層培養している OP9 細胞の上へ播種し、5~6 日間培養する。この結果、ドーム状に盛り上がった形態を示す未分化な ES 細胞のコロニーが、分化した平坦な形態のコロニーへ変化する。つぎに、分化した細胞をトリプシン/EDTA を用いて培養プレートから回収し、あらたに準備した OP9 細胞上で GM-CSF の存在下で 5~6 日間培養する。この結果、OP9 細胞上に浮遊性あるいは弱付着性の ES 細胞の細胞が出現し、GM-CSF に依存して増殖する。この細胞を細菌培養用のペトリディッシュに移し、さらに GM-CSF の存在下で培養を続けると、3~7 日目ごろより不規則な樹状突起を有する浮遊性の細胞が出現する。この細胞はアロ T 細胞を刺激して増殖誘導する活性 (MLR 刺激活性) を有しており、また、細胞表面に CD80, CD86, MHC class II などを発現していた。これをさらに TNF- $\alpha$ , IL-4, 抗 CD40 刺激抗体、あるいは LPS などで刺激すると、著明な樹状突起を有し、より強力な T 細胞刺激活性を有する成熟樹状細胞となる。著者らはこの ES 細胞由来の樹状細胞に ES-DC と名づけた。ES-DC は GM-CSF に依存して分化すること、および表面マーカー (CD11b 陽性) からミエロイド系樹状細胞に相当すると考えている。

### ● 遺伝的改変を行った ES 細胞由来の樹状細胞による抗腫瘍免疫の誘導

細胞ワクチンとして生体に投与するために樹状細胞に腫瘍抗原を負荷する方法として、樹状細胞に腫瘍細胞の分解産物を貪食させる方法、あるいは腫瘍抗原に由来し T 細胞から認識されるエпитープに相当する合成ペプチドをパルスする方法などがある。一方、腫瘍抗原の遺伝子を樹状細胞に導入し、樹状細胞自身に腫瘍抗原を発現させることにより生体投与後も持続的な抗原提示が起り、より効率よく T 細胞刺激を行えると期待される。

著者らはモデル腫瘍抗原として、OVA (卵白アルブミン) 抗原を発現する ES-DC を作製した<sup>2)</sup>。この OVA 発現 ES-DC を ES 細胞と同系のマウス個体に移入することにより、OVA 抗原に特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を感作することができ

た。またこの ES-DC は、*in vitro* でマウスの脾由来の非感作 T 細胞と共培養することによっても、OVA 抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞を活性化することができた。さらに、マウスにこの樹状細胞を投与することにより OVA 抗原に対して感作すると、OVA を発現するマウス腫瘍細胞 (MO4) を移植した場合にこれを拒絶できた<sup>3)</sup>。

腫瘍細胞に自然に発現している腫瘍抗原を標的とした抗腫瘍免疫応答の誘導も可能であるかどうかについても検討した。Glypican3 は、著者らの研究室の中面 (現所属: 国立がんセンター東病院) らがヒトの肝細胞癌およびメラノーマに発現する腫瘍抗原として同定したものである<sup>4)</sup>。Glypican3 はまた、マウスのメラノーマ細胞株 B16-F10 にも発現している。そこで、ES-DC に Glypican3 を強制発現させたものをマウス個体に投与することにより、B16-F10 に対する拒絶効果を誘導できるかどうか検討した。その結果、B16-F10 の皮下移植モデル、および肺転移モデルにおいて腫瘍拒絶効果の誘導が認められた<sup>5)</sup>。

### ● 抗原とケモカインを共発現する ES-DC を用いた抗腫瘍免疫効果の増強

著者らは、細胞ワクチンとして使用する ES-DC に T 細胞の遊走を促すケモカインを発現させることにより ES-DC が抗原特異的な T 細胞を遭遇する効率を改善し、抗原を負荷した樹状細胞による免疫効果を向上させる、という試みも行った。生体移入した ES-DC がリンパ組織へ遊走できなくても、ES-DC に T 細胞の遊走を促すケモカインを強制発現させておけば、ES-DC が存在する場所へ T 細胞が集まり、その場所で抗原特異的な T 細胞を活性化できるのではないかと考えたのである。

前述した OVA 遺伝子を導入したマウス ES 細胞に、さらに、T 細胞に対する遊走活性を有するケモカインの遺伝子を導入し、この ES 細胞から OVA とケモカインを同時に発現する ES-DC を作製した<sup>3)</sup>。T 細胞に対する遊走活性を有するケモカインとして生理的に存在する樹状細胞からは産生されない、SLC (CCL21), Mig (CXCL9), および Lymphotactin (XCL1) の 3 種類を選択した。前述の

OVA 遺伝子を導入した ES 細胞に、さらにこれらのケモカインの遺伝子をそれぞれ導入した。そして、OVA とそれぞれのケモカインを同時に発現する ES-DC を作製し、これらの ES-DC をマウスに投与したときの免疫効果を比較した。その結果、この 3 種類のケモカインのいずれについても、OVA を単独で発現する ES-DC よりも、OVA とケモカインを同時に発現する ES-DC のほうがより効果的に CTL を活性化できることがわかった。さらに、SLC あるいは Mig を OVA と同時に発現する ES-DC は、OVA 単独発現の ES-DC よりも抗腫瘍効果の誘導においても優れていた。とくに SLC の共発現により、もっとも強い抗腫瘍免疫の増強効果が得られた<sup>3,6)</sup>。

### 遺伝子改変 ES-DC を用いた免疫応答の抑制的制御

ES-DC 技術の応用として、自己免疫疾患の標的となる自己抗原と免疫抑制分子とを同時に発現させた ES-DC による自己免疫疾患の治療について検討を行った<sup>7,8)</sup>。EAE(実験的自己免疫性脳脊髄炎)は、ミエリン鞘抗原である MOG(myelin oligodendrocyte glycoprotein)などをアジュバントと混合して動物に投与することにより、中枢神経系への炎症細胞浸潤と下肢を中心とする運動麻痺が惹起される自己免疫疾患のモデルである。

MOG に由来するペプチドと T 細胞応答を抑制する機能を有する TRAIL あるいは PD-L1 を共発現する ES-DC をマウス個体に投与することにより、EAE の発症を抑制できるかどうかを検討した。TRAIL と MOG あるいは PD-L1 と MOG を発現した ES-DC を投与したマウスにおいて、MOG ペプチドで誘導される EAE の抑制が観察された。一方で、無関係な抗原である OVA と TRAIL あるいは PD-L1 を発現した ES-DC を投与したマウスでは MOG ペプチドによる EAE 発症の抑制は認められなかった。

### ヒト ES 細胞からの樹状細胞の作製

以上のように、マウスモデルにおいて遺伝子導入により機能を修飾した ES-DC を用いることにより、抗腫瘍免疫の誘導に加えて免疫応答の抑制

的制御も可能であることも確認できた。そこで、ES-DC の臨床応用をめざしてヒトの ES 細胞から ES-DC を作製する分化誘導法の開発に取り組んだ<sup>9)</sup>。

マウスの ES 細胞に比べてヒト ES 細胞では血液細胞への分化誘導により長い期間を必要としたが、OP9 を用いることにより樹状細胞への分化誘導が可能であった。マウスの場合と異なり、分化誘導の過程で一時的に GM-CSF に加えて M-CSF を添加することが有効であり、また、フィーダー細胞なしで培養するステップで、GM-CSF に加えて IL-4 を添加することが必要であった。この方法により作製したヒト ES-DC は、蛋白質抗原をプロセスして T 細胞へ提示する活性やアロ MLR 刺激活性など、樹状細胞としての機能を備えていた。また、マウス ES-DC の場合と同様の手法で、ヒトの遺伝子改変 ES-DC を作製することも可能であった。

### HLA class I 関連遺伝子の改変による ES 細胞に伴う組織適合性解決の試み

ES 細胞由来の分化細胞を用いて治療を行う際

サイト  
メモ

#### TAP と $\beta_2$ ミクログロブリン

MHC(ヒトでは HLA) class I 分子は、哺乳動物においてすべての有核細胞と血小板の細胞膜表面に発現している。生合成された MHC class I 分子の  $\alpha$  鎖(重鎖)が細胞膜表面に輸送され発現するためには、小胞体(endoplasmic reticulum: ER)内で  $\beta_2$  ミクログロブリン( $\beta_2$ M)と会合し、さらに、MHC class I 分子のペプチド収容溝の構造に適合した結合モチーフを有するペプチドを結合して三量体を形成する必要がある。MHC class I 分子に結合するペプチドの多くは、細胞質内に存在する蛋白質が蛋白質分解装置であるプロテアソーム(proteasome)の作用により分解されることにより生じたペプチドである。このようなペプチドは、TAP(transporter associated with antigen processing)とよばれる ER 膜に存在するペプチドトランスポーターにより ATP 分解に伴うエネルギー依存性に ER 内へ輸送される。以上のことより、MHC class I 分子の細胞表面への発現には  $\beta_2$ M と TAP が必要である。

にはレシピエントと ES 細胞の間の遺伝的背景の差異に起因する組織不適合性が問題となる。とくに、ES 細胞とレシピエントの間の HLA class I 対立遺伝子に不一致がある場合、アロ HLA class I を認識するレシピエント体内の細胞障害性 T 細胞により移植した細胞が排除されてしまうと予想される。

この問題を解決するために、レシピエントの免疫系からアロとして認識される内因性の MHC class I 分子を発現せず、レシピエントと共有した MHC class I 分子のみを発現する ES-DC を作製するという方法を考えた。具体的には、MHC class I 分子の細胞表面への発現に必須の働きをする TAP (transporter associated with antigen presentation) 1 および  $\beta_2$  ミクログロブリン ( $\beta_2$ -microglobulin:  $\beta_2m$ ) の遺伝子 (「サイドメモ」参照) を標的破壊するという方法を、マウス ES-DC を用いて検討した。マウスの MHC である H-2 遺伝子座において b ハプロタイプを有する ES 細胞において、gene targeting によりこれらの遺伝子のいずれかを欠損させた。さらに、H-2<sup>d</sup> ハプロタイプの MHC class I 分子 (H-2K<sup>d</sup>) の遺伝子 ( $\beta_2m$  欠損 ES 細胞には  $\beta_2m$  を結合させた H-2kDa の遺伝子) を導入した。これらの遺伝子改変 ES 細胞から分化誘導することにより、内因性の H-2<sup>b</sup> ハプロタイプに由来する MHC class I 分子を発現せず、H-2K<sup>d</sup> を発現する ES-DC を作製することができた。現在、これらの遺伝子改変 ES-DC を H-2<sup>d</sup> ハプロタイプのマウスへ投与した場合の細胞ワクチン効果を検討中である。

### iPS細胞を用いる利点と問題点

最近、ES 細胞で高発現している数種類の遺伝子をマウスあるいはヒトの体細胞に導入し強制的に発現させることにより細胞のリプログラミングを誘導し、ES 細胞と同等の多分化能を有する iPS 細胞を作製できるという驚くべき発見がなされた<sup>10-12)</sup>。ヒト ES 細胞はヒト胚に由来する細胞であり、その医療応用の是非についてはさまざまな議論があり、治療法としての有効性が認められたとしても社会的コンセンサスを得るうえでかなりの困難が予想される。体細胞から作製できる iPS

細胞の場合は、ES 細胞に比べると倫理的問題という障壁がはるかに低い。さらに、iPS 細胞は治療の対象となる患者自身から作製することが可能である。このため、前述したような ES 細胞とレシピエントの間の組織不適合性の問題も、ES 細胞の代わりに iPS 細胞を使用することにより解決される見込みとなった。しかし、現在の iPS 細胞作製技術では、1 人のドナーからの iPS 細胞の樹立に相当な費用と労力を必要とするため、治療対象者すべてについての個別の iPS 細胞の作製は医療経済的に成立しない可能性がある。この点ではさまざまな HLA タイプを有するドナーから iPS 細胞を作製し “iPS 細胞バンク” を作製する、あるいは前述した TAP あるいは  $\beta_2m$  の遺伝的改変などの手法によりさまざまな HLA をカバーする “iPS 細胞ライブラリー” を作製する、という方法が現実的かもしれない。

### iPS細胞由来のマクロファージを用いる医療技術の可能性

著者らは、これまでの ES 細胞から樹状細胞への分化誘導実験において同時にマクロファージも容易に分化することを観察している。マクロファージは感染防御において重要な免疫細胞であると同時に、生体内で日々大量に発生する死細胞など体内の不要物を貪食し処理するという重要な働きを有している。著者は iPS 細胞からマクロファージを大量に作製し、これを生体にすることにより蛋白質蓄積病である Alzheimer 病、アミロイドーシス、プリオン病をはじめとして、さまざまな疾患の治療が可能になるのではないかと考えている。

### おわりに

マウスの ES 細胞から樹状細胞への分化を誘導する方法としては、著者らのほかに、Fairchild らにより胚様体 (embryoid body) 形成を経由する方法が報告されている<sup>13)</sup>。また、ヒト ES 細胞から抗原提示細胞、あるいは樹状細胞の作製についても、Zhan ら、および Slukvin らの報告がある<sup>14,15)</sup>。

多能性幹細胞由来の免疫細胞作製技術の医療応用には、ヒト化マウスなどのモデルを用いてその



有効性をさらに検証するとともに、分化誘導培養において動物血清および動物由来のフィーダー細胞を用いない方法を開発する必要がある。このように、解決すべき課題は多いが、医療に対してこれまでにはなかったツールを提供するものであり、どのような方面で有用性があるかをよく検討しつつ研究を進めていきたいと考えている。

### 文献

- 1) Nakano, T. et al. : *Science*, **265** : 1098-1101, 1994.
- 2) Senju, S. et al. : *Blood*, **101** : 3501-3508, 2003.
- 3) Matsuyoshi, H. et al. : *J. Immunol.*, **172** : 776-786, 2004.
- 4) Nakatsura, T. et al. : *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun.*, **306** : 16-25, 2003.
- 5) Motomura, Y. et al. : *Cancer Res.*, **66** : 2414-2422, 2006.
- 6) Matsuyoshi, H. et al. : *Cancer Sci.*, **96** : 889-896, 2005.
- 7) Hirata, S. et al. : *J. Immunol.*, **174** : 1888-1897, 2005.
- 8) Hirata, S. et al. : *J. Immunol.*, **178** : 918-925, 2007.
- 9) Senju, S. et al. : *Stem. Cells*, **25** : 2720-2729, 2007.
- 10) Takahashi, K. and Yamanaka, S. : *Cell*, **126** : 663-676, 2006.
- 11) Takahashi, K. et al. : *Cell*, **131** : 861-872, 2007.
- 12) Yu, J. et al. : *Science*, **318** : 1917-1920, 2007.
- 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.

\*\*\*次号の特集予告(227巻6号)\*\*\*\*\*

## ◆維持透析療法——治療・管理の進歩

(企画：秋澤忠男／昭和大学医学部内科学講座腎臓内科学部門)

\*\*\*\*\*

日本の透析患者の死亡リスクは、年齢や糖尿病などの原疾患や併存症などの背景因子で補正しても、アメリカの26%、ヨーロッパの40%ときわめて低い。しかし、腎機能を喪失して長期間人工腎下で生活する透析患者には数多くの問題点が存在する。世界でもっとも良好な生命予後を誇るわが国の透析患者ですら、その平均余命を一般人口と比較すると50%に満たず、長期透析患者には多くの特有の合併症が発症し、患者の health-related quality of life (HRQOL) は健常人に比べ大きく阻害されている。こうした現状を打破するため、世界的に数多くの対策がとられている。治療ガイドラインの策定による適切な医療の供給、新しい治療技術の開発と普及、より早期からの合併症予防のための管理、などである。本特集では、各専門分野を代表する臨床医の先生方より、維持透析患者の生命予後とQOL改善をめざした取組みと、その成果をもたらす意義を執筆いただく。

### 3. 免疫療法への応用を目指した ES細胞からの樹状細胞の作製

千住 覚

腫瘍抗原を負荷した樹状細胞、あるいは、遺伝的改変により機能を修飾した樹状細胞を生体に移入する細胞治療が、新たな医療技術として期待されている。樹状細胞療法の実現には、治療に用いるのに必要な樹状細胞の安定供給を可能にする技術の開発が不可欠であろう。われわれは、旺盛な増殖能力と多様な細胞への分化能力を合わせもつ胚性幹（ES）細胞を樹状細胞の材料として用いることを考え、ES細胞からの樹状細胞分化誘導法の開発とこれを用いた免疫療法の研究を行っている。本稿では、この研究の現状と課題について概説する。

#### はじめに

悪性腫瘍に対して有効な免疫療法を行うためには、腫瘍細胞に特異的に発現する抗原に対しての免疫応答を強力に賦活する方法の開発が不可欠である。生体外で培養した樹状細胞に何らかの方法で腫瘍抗原を負荷し生体に移入する細胞ワクチンが、抗腫瘍免疫応答を効果的に誘導する手段として期待されている。樹状細胞

療法を医療として確立するためには、治療に用いるのに必要な樹状細胞の安定供給を可能にする技術の開発が不可欠である。われわれは、細胞ワクチンとして用いる樹状細胞を作製するための材料として胚性幹（ES）細胞に着目し、ES細胞由来の樹状細胞を用いた免疫療法の研究を行っている。

#### 1 ES細胞からの樹状細胞の作製

##### 1) 樹状細胞を作製するための材料としての ES細胞の有用性

現在、臨床的に施行されている樹状細胞療法として、腫瘍抗原を負荷し生体に移入する細胞ワクチン法がある。この抗腫瘍免疫療法に用いられる樹状細胞は、アフエーシス（成分採血）<sup>\*1</sup>により分離した末梢白血球中の単球（モノサイト）を、GM-CSFなどのサイトカインを加えて培養し分化誘導することにより作製されている。しかしながら、末梢白血球は、体外で増殖させることができないため、治療に必要な数の樹状細胞を得るためには、大量の血液をアフエーシス処理する必要がある。さらに、単球から樹状細胞へ

#### 【キーワード&略語】

ES細胞, 樹状細胞, 免疫療法, T細胞, iPS細胞

$\alpha$ -GalCer :  $\alpha$ -galactosylceramide  
( $\alpha$ -ガラクトシルセラミド)

CTL : cytotoxic T lymphocyte  
(細胞傷害性T細胞)

EAE : experimental autoimmune  
encephalomyelitis (実験的自己免疫性脳脊髄炎)

ES cell : embryonic stem cell (胚性幹細胞)

iPS cell : induced pluripotent stem cell  
(誘導多能性幹細胞)

MOG : myelin oligodendrocyte glycoprotein

OVA : ovalbumin (卵白アルブミン)

Generation of dendritic cells from ES cells aiming at immunotherapy

Satoru Senju : Department of Immunogenetics, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences (熊本大学大学院医学薬学研究部・免疫識別学分野)



図1 マウスES細胞から樹状細胞への分化誘導培養

最初のステップでは、OP9細胞をフィーダー細胞として培養することにより、ES細胞の中胚葉系への分化を誘導する。次のステップでは、OP9細胞上でGM-CSFを添加して培養することにより、ミエロイド系の浮遊細胞への分化を誘導する。さらに、この浮遊細胞を、フィーダー細胞なしで細菌培養用のディッシュで培養することにより、樹状細胞への分化を促す。また、TNF- $\alpha$ 、IL-4、および抗CD40抗体を同時に加えることにより、樹状細胞の完全成熟を誘導することが可能である。

の分化誘導効率には細胞ドナーにより大きな個人差があり、アフエーシスを行っても必ずしも十分な数の樹状細胞が得られるとは限らない。

このように、末梢血単球由来の樹状細胞を用いる方法は、ドナーの負担と細胞供給の不安定性という問題があり、その臨床的有効性が確認されたとしても、医療技術として広く普及するのは困難であると予想される。

ES細胞は、さまざまな細胞へ分化する能力を備えている代表的な多能性幹細胞である。ES細胞は、また、旺盛な増殖能力を有しており、適切な条件の下で培養することにより、多能性を保ったまま無限に増殖させることが可能である。われわれは、無限増殖能を有するES細胞を材料として樹状細胞を作製することが可能になれば、細胞ドナーへ負担をかけることなく必要な数の樹状細胞を得られるようになると考えた。

また、ES細胞は、電気穿孔法あるいはリポフェクション法により、ウイルスベクターを使用することなく、簡便に遺伝子導入を行うことが可能であり、さらに、遺伝子導入細胞のクローンを作製することも可能

である。そこで、ES細胞の段階で遺伝的改変を行い、適切な遺伝子改変ES細胞クローンを選択し、これを樹状細胞に分化誘導すれば、樹状細胞の遺伝的改変を容易に行うことができる。これにより、抗原タンパク質あるいは各種の免疫制御分子を人為的に発現させるなど、機能をさまざまに修飾した樹状細胞を作製することができるという利点もある。

## 2) マウスES細胞からの樹状細胞の作製

われわれは、まず、マウスのES細胞から樹状細胞を分化誘導する方法の開発に取り組んだ。マウスのES細胞から各種の血液細胞への分化を誘導する方法として、OP9細胞（正常なM-CSF遺伝子を欠損したop/opマウスに由来する骨髓ストローマ細胞株）をフィーダー細胞として用いる方法が、仲野ら<sup>1)</sup>により報告されている。

そこで、OP9細胞などのフィーダー細胞と共培養することによりES細胞から血液細胞への分化を誘導し、さらに適切なタイミングで樹状細胞への分化を促すサイトカインを加えることにより、樹状細胞への分化誘導ができると考え、研究を開始した。フィーダー細胞としては、OP9細胞を含め骨髓ストローマ細胞株とされる数種類の細胞株を比較検討した。また、サイトカインとしては、GM-CSF、IL-3、Flt3L、SCF、M-CSFなどをさまざまなコンビネーションで添加し、その効果を検討した。その結果、マウスES細胞から樹状細胞を作製する以下のような培養プロトコルを確立した(図1)<sup>2)</sup>。

### ※1 アフエーシス

体外循環装置を用いて、体外に一度取り出した血液から、特定の血球あるいは血漿成分のみを採取（あるいは除去）し、残りの血液成分を生体に戻す手技の総称である。血球成分の採取（あるいは除去）は、特に、サイトフェレーシスと称される。がんに対する治療の目的で、この操作により患者本人の血液から大量の単核球を採取し、さらに分離・培養の操作を加えることにより、活性化T細胞、NK細胞、あるいは樹状細胞を調製し患者に戻す、という免疫細胞療法が試みられている。

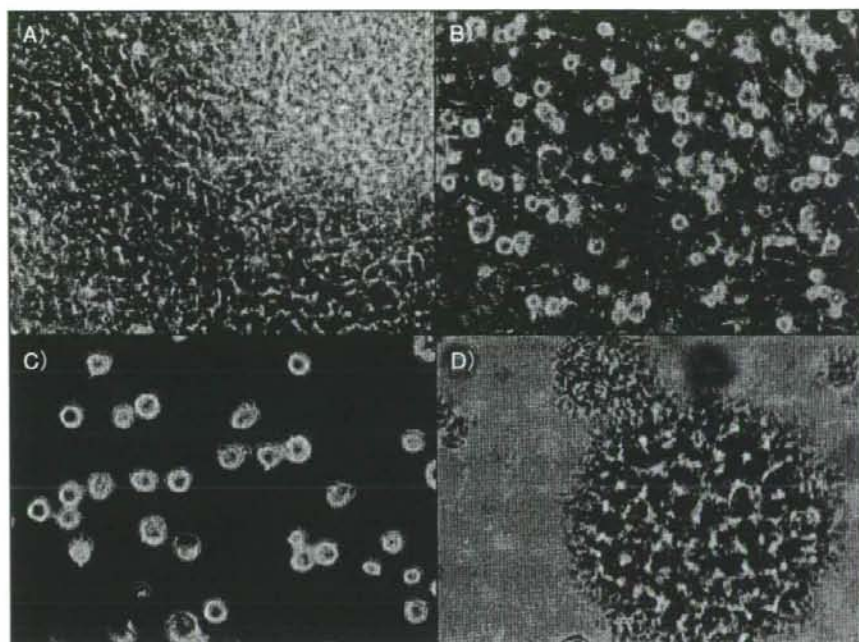


図2 ES-DC分化過程における形態の変化

上段には、OP9細胞上の中胚葉系細胞(A)およびミエロイド系浮遊細胞(B)を示す。下段には、細菌培養用ディッシュに移した後のミエロイド系浮遊細胞(C)および成熟樹状細胞(D: ES-DC)を示す(文献2より転載)

まず、維持培養中のES細胞を回収し、単層培養しているOP9細胞の上へ播種し、5~6日間培養する。この結果、ドーム状に盛り上がった形態を示す未分化なES細胞のコロニーが、平坦な形態の分化コロニーへ変化する(図2A)。

次に、分化した細胞をトリプシン/EDTAを用いて培養プレートから回収し、新たに準備したOP9フィーダー上でGM-CSFの存在下で5~6日間培養する。この結果、OP9細胞上に浮遊性あるいは弱付着性のES細胞の細胞群が出現し、GM-CSFに反応して増殖する(図2B)。

この細胞を細菌培養用のペトリディッシュに移し(図2C)、さらにGM-CSFの存在下で培養を続けると、7~10日目頃より不規則な突起を有する浮遊性あるいは弱付着性の細胞が出現する。この細胞は、MHCクラスII分子を介した抗原提示機能と一次MLR刺激活性を有していた。

これをさらにTNF- $\alpha$ 、IL-4、および抗CD40刺激抗体の同時添加、あるいはLPSなどで刺激すると、著

明な樹状突起を有し、より強力なT細胞刺激活性を有する成熟樹状細胞となる(図2D)、われわれは、このES細胞由来の樹状細胞を、ES-DCと名付けた。ES-DCは、GM-CSFに反応して分化・増殖することとその細胞表面マーカーから、ミエロイド系樹状細胞に相当すると考えられる。この分化誘導プロトコールにより、マウスES細胞のほとんどの株(TT2, D3, CCE, E14など)から、ES-DCを作製可能である。

## 2 遺伝的改変を行ったES細胞由来の樹状細胞による抗腫瘍免疫の誘導

### 1) 遺伝子導入ES-DCの抗腫瘍効果

細胞ワクチンとして生体に投与するために樹状細胞に腫瘍抗原を負荷する方法として、樹状細胞に腫瘍細胞の分解産物を貪食させる方法、あるいは、腫瘍抗原に由来しT細胞から認識されるエピトープに相当する合成ペプチドをパルスする方法などがある。一方、腫瘍抗原の遺伝子を樹状細胞に導入し、樹状細胞自身に腫瘍抗原を発現させることにより、生体投与後も持続

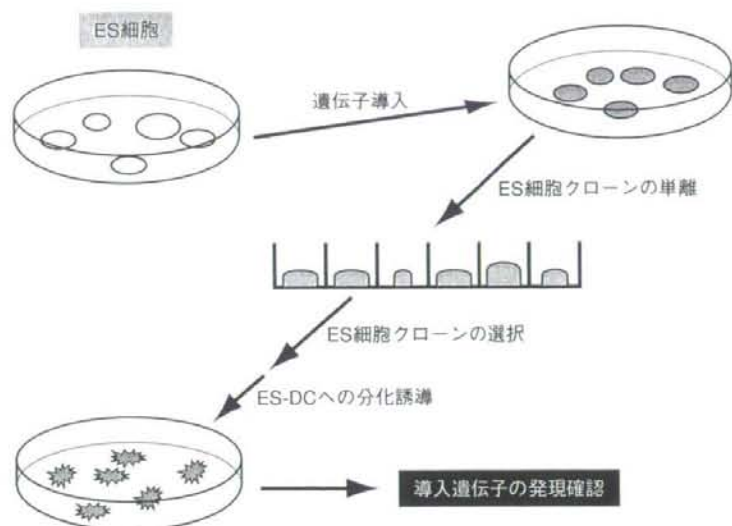


図3 ES-DCの遺伝的改変の方法

未分化状態のES細胞に対して、電気穿孔法などにより遺伝子導入を行う。薬剤選択の後、適切な遺伝子導入ES細胞のクローンを選択して分化誘導培養を行うことにより、遺伝子導入ES-DCを作製する

的な抗原提示が起こり、より効率良くT細胞刺激を行えると期待される。

われわれは、図3に示す遺伝子導入ES-DCを作製する手順により、モデル腫瘍抗原としてOVA（卵白アルブミン）抗原を発現するES-DCを作製した<sup>2)</sup>。OVA発現ES-DCをES細胞と同系のマウス個体に移入することにより、OVA抗原に特異的な細胞傷害性T細胞（CTL）を感作することができた。また、このES-DCは、*in vitro*でマウスの脾臓由来の非感作T細胞と共培養することによっても、OVA抗原特異的なCTLを活性化することができた。さらに、この樹状細胞を投与することによりOVA抗原に対して感作したマウスは、OVAを発現するマウス腫瘍細胞（MO4）を拒絶した<sup>3)</sup>。

モデル抗原でなく腫瘍細胞に自然に発現している腫瘍抗原を標的とした抗腫瘍免疫応答の誘導も可能であるかどうかについても検討した。Glypican3は、中面らがヒトの肝細胞がんおよび黒色腫（メラノーマ）に発現する腫瘍抗原として同定したものである<sup>4)</sup>。Glypican3は、また、マウスのメラノーマ細胞株B16-F10にも発現している。そこで、ES-DCにGlypican3を強制発現させたものをマウス個体に投与することにより、B16-F10に対する拒絶効果を誘導できるかどうか

検討した。その結果、B16-F10の皮下移植モデル、および、肺転移モデルにおいて、腫瘍拒絶効果の誘導が認められた<sup>5)</sup>。

## 2) 抗原とケモカインを共発現するES-DCを用いた抗腫瘍免疫効果の増強

ナイーブ（抗原に暴露されていない）T細胞は、リンパ節などのT細胞領域において樹状細胞による抗原提示を受け、エフェクターT細胞やメモリーT細胞となる。しかしながら、樹状細胞を体外から投与した場合、リンパ節へ到達するのは投与した樹状細胞のうちのごく一部である。例えば、樹状細胞を皮下投与した場合、所属リンパ節へ到達するのは1%以下に過ぎない。したがって、体外から移入した樹状細胞のうち、抗原特異的なナイーブT細胞と遭遇しT細胞を感作するという役目を果たせるものは、ごく一部であると考えられる。

われわれは、ES-DCにT細胞の遊走を促すケモカインを発現させることにより、ES-DCが抗原特異的T細胞に遭遇する効率を改善し、抗原を負荷した樹状細胞による免疫効果を向上させられると予想した。生体移入したES-DCがリンパ性臓器へ遊走できなくても、ES-DCにT細胞の遊走を促すケモカインを強制発現させておけば、ES-DCが存在する場所へT細胞

が集まるので、抗原特異的なT細胞を活性化する効果を高めることができると考えた。

前述のOVA遺伝子を導入したマウスES細胞に、さらに、T細胞に対する遊走活性を有するケモカインの遺伝子を導入し、このES細胞からOVAとケモカインを同時に発現するES-DCを作製した<sup>3)</sup>。T細胞の遊走を促すケモカインとして、生理的に存在する樹状細胞からは産生されない、SLC (CCL21)、Mig (CXCL9)、および Lymphotactin (XCL1) の3種類を選択した。

これらOVAとおのおののケモカインを同時に発現するES-DCをマウスに投与した時の免疫効果を比較した。その結果、この3種類のケモカインのいずれについても、OVAを単独で発現するES-DCよりも、OVAとケモカインを同時に発現するES-DCの方が、より効果的にCTLを活性化できることがわかった。さらに、SLCあるいはMigをOVAと同時に発現するES-DCは、OVA単独発現のES-DCよりも、抗腫瘍効果の誘導においても優れていた。特にSLCの共発現により、最も強い抗腫瘍免疫の増強効果が得られた。

### 3) $\alpha$ -ガラクトシルセラミド( $\alpha$ -GalCer)を負荷した抗原発現ES-DCによる抗腫瘍免疫の誘導

樹状細胞に $\alpha$ -GalCerを負荷して投与することにより、NKT細胞によるIFN- $\gamma$ の産生を強力に誘導できることが知られており、 $\alpha$ -GalCerを負荷した樹状細胞による抗腫瘍免疫療法の臨床試験も行われている。

マウスES-DCも、通常の樹状細胞と同様に $\alpha$ -GalCerを負荷した場合にNKT細胞を活性化することができる<sup>6)</sup>。そこで、腫瘍抗原を発現するES-DCに $\alpha$ -GalCerを負荷して投与することにより、抗原特異的なT細胞とNKT細胞を同時に活性化し、より強力な抗腫瘍効果が得られるのではないかと考え実験を行った。

前述のOVA抗原を人為的に発現させたマウスメラノーマ細胞MO4をマウス腹腔内に移植し、その3日後にES-DCを投与し、その後のマウスの生存期間を観察した<sup>6)</sup>。その際、OVA抗原を発現する、あるいは発現しないES-DCに、おのおの、 $\alpha$ -GalCerを負荷した場合と負荷しない場合の4通りを比較した。 $\alpha$ -GalCerを負荷していない抗原非発現ES-DCを投与した場合に比べて、 $\alpha$ -GalCerを負荷したOVA抗原非発現のES-DCあるいは $\alpha$ -GalCerを負荷していない

抗原発現ES-DCを投与した場合、わずかではあるが有意な生存期間の延長がみられた。一方、 $\alpha$ -GalCerを負荷したOVA抗原発現ES-DCを投与した場合には、著明な生存期間の延長がみられた。

臨床上に腹膜播種をきたした悪性腫瘍のコントロールは非常に困難であり、大きな問題である。われわれは、以上の実験結果は、ES-DCによる腹膜播種がんに対する新たな治療法の可能性を示すものであると考えている。

## 3 遺伝子改変ES-DCを用いた免疫応答の抑制的制御

自己免疫疾患の標的となる自己抗原と免疫抑制分子とを同時に発現させたES-DCによる自己免疫疾患の治療についても検討を行った<sup>7) 8)</sup>。EAE(実験的自己免疫性脳脊髄炎)は、ミエリン鞘抗原であるMOG(myelin oligodendrocyte glycoprotein)などをアジュバントと混合して動物に投与することにより、中枢神経系への炎症細胞浸潤と下肢を中心とする運動麻痺が惹起される自己免疫疾患のモデルである。

MOG由来するペプチドとT細胞応答を抑制する機能を有するTRAILあるいはPD-L1を共発現するES-DCをマウス個体に投与することにより、EAEの発症を抑制できるかどうかを検討した。ES-DCのMHCクラスII分子上にMOGペプチドを効率よく提示させるために、インバリアント鎖(CD74)のCLIP部分をMOGペプチドで置換した発現ベクターを導入した<sup>9)</sup>。

TRAILとMOGあるいはPD-L1とMOGを発現したES-DCを投与したマウスにおいて、MOGペプチドで誘導されるEAEの抑制が観察された。一方で、無関係な抗原であるOVAとTRAILあるいはPD-L1を発現したES-DCを投与したマウスでは、MOGペプチド投与により誘導されたEAE発症の抑制は認められなかった。さらに、ES-DC-TRAIL/MOGやPD-L1/MOGを投与したマウスに、無関係な抗原であるKLHをアジュバントとともに免疫し、*ex vivo*でKLHに対する増殖反応を測定したところ、KLHに対する増殖反応には影響はみられなかった。この結果は、無関係な外来抗原に対する免疫応答を損なうことなく、遺伝子導入ES-DCによる免疫制御が可能であることを示すものである。

## 4 ヒト ES 細胞からの ES-DC の作製

以上、マウスモデルにおいて、遺伝子導入により機能を修飾した ES-DC を用いることにより、抗腫瘍免疫の誘導および免疫応答の抑制的制御が可能であることを示すことができた。そこで、ES-DC の臨床応用を目指して、ヒトの ES 細胞から ES-DC を作製する分化誘導法の開発に取り組んだ<sup>10)</sup>。

ヒトの ES 細胞の分化誘導においても、複数のストローマ細胞株 (OP9, ST2, PA6) を比較して用いた結果、OP9 を用いることにより最もよい結果が得られた。マウスの場合と異なり、分化誘導の過程で一時的に GM-CSF に加えて M-CSF を添加することが有効であり、また、フィーダー細胞なしで培養するステップで、GM-CSF に加えて IL-4 を添加することが必要であった。Flt3L, IL-3, SCF などの添加は、分化誘導の効率あるいは最終的に得られた ES-DC の機能に対して有益な効果をもたらさなかった。

ヒト ES-DC は、タンパク質抗原をプロセスして T 細胞へ提示する活性やアロ MLR 刺激活性など、樹状細胞としての機能を備えていた。また、マウス ES-DC の場合と同様の手法で、ヒトの遺伝子改変 ES-DC を作製することも可能であった。

### おわりに

マウスの ES 細胞から樹状細胞への分化を誘導する方法としては、Fairchild らにより、胚様体 (embryoid body) 形成を経由する方法が報告されている<sup>11)</sup>。また、Zhan ら、および、Slukvin らも、ヒト ES 細胞から抗原提示細胞、あるいは、樹状細胞を作製する方法を報告している<sup>12) 13)</sup>。これらの論文に示されているデータを見る限りでは、彼らの作製した細胞の性質も、われわれのものと同様である。

ES-DC 技術を臨床応用しようとする場合、ES 細胞ドナーとレシピエントの間の HLA をはじめとする遺伝的多型の差異に起因する組織不適合性の問題を解決する必要がある。しかしながら、マウスを用いた実験では、ES 細胞ドナーとレシピエントが同系でなくとも、MHC のアレルを一部共有していれば、共有された MHC クラス I 分子に提示された抗原により、抗原特異的な T 細胞を活性化し、抗腫瘍免疫効果も得られることを観察している<sup>14)</sup>。

最近、数種類の遺伝子を体細胞に強制発現させることによりリプログラミングを誘導し、ES 細胞と同等の多分化能を有する iPS (induced pluripotent stem) 細胞を作製できるという、驚くべき発見がなされた<sup>15) 16)</sup>。iPS 細胞の作製には、ES 細胞の場合とは異なり胚の滅失を必要としないという利点がある。さらに、iPS 細胞は、皮膚線維芽細胞など、比較的侵襲性の低い方法で採取できる細胞からも作製できるため、治療の対象となる患者自身など任意のドナーから作製することが可能である。iPS 細胞の発見は、われわれの研究においても非常に大きな意味をもつものである。現在、ヒトの iPS 細胞から医療応用が可能な樹状細胞を作製する方法を開発すべく研究を行っている。

### 文献

- 1) Nakano, T. et al.: Science, 265: 1098-1101, 1994
- 2) Senju, S. et al.: Blood, 101: 3501-3508, 2003
- 3) Matsuyoshi, H. et al.: J. Immunol., 172: 776-786, 2004
- 4) Nakatsura, T. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 306: 16-25, 2003
- 5) Motomura, Y. et al.: Cancer Res., 66: 2414-2422, 2006
- 6) Matsuyoshi, H. et al.: Cancer Sci., 96: 889-896, 2005
- 7) Hirata, S. et al.: J. Immunol., 174: 1888-1897, 2005
- 8) Hirata, S. et al.: J. Immunol., 178: 918-925, 2007
- 9) Fujii, S. et al.: Hum. Immunol., 59: 607-614, 1998
- 10) Senju, S. et al.: Stem Cells, 25: 2720-2729, 2007
- 11) Fairchild, P. J. et al.: Curr. Biol., 10: 1515-1518, 2000
- 12) Zhan, X. et al.: Lancet, 364: 163-171, 2004
- 13) Slukvin, I. I. et al.: J. Immunol., 176: 2924-2932, 2006
- 14) Fukuma, D. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 335: 5-13, 2005
- 15) Takahashi, K. et al.: Cell, 131: 1-12, 2007
- 16) Yu, J. et al.: Science, 318: 1917-1920, 2007

### <著者プロフィール>

千住 覚: 1987年九州大学医学部を卒業し、同第一内科(仁保喜之教授)にて内科臨床研修。'89年同大学院入学、九州大学生体防御医学研究所・遺伝学部門(笹月健彦教授)にてHLAの構造と機能の研究。'93年より、米国ワシントン大学、Prof. Dennis Y. Loh研究室にて、Fas分子の機能の研究。'95年より現在まで、熊本大学大学院医学薬学研究部・免疫識別学分野(西村泰治教授)にて、腫瘍免疫、自己免疫、樹状細胞などの研究。大学院生あるいはポスドクとして私たちの研究に参画していただける方を募集しています。