

に制御し、過剰な免疫反応の抑制、あるいは自己に対する免疫寛容の維持にも働いていると考えられる。つまり、樹状細胞は免疫応答の正・負両方向への制御を行っている免疫制御細胞であるといえる。

そこで、免疫応答を人為的に抗原特異的に制御するための方策として、生体外で培養し、何らかの方法により特定の抗原に対する免疫応答を任意に制御する機能を付与した樹状細胞を生体に投与する細胞治療が有用ではないかと考えられる。筆者らは以前より、ES細胞をソースとして人工的に樹状細胞を作製する技術の開発と、遺伝的改変により機能を修飾したES細胞由来の樹状細胞による抗原特異的免疫制御について、マウスモデルを用いた研究を行ってきた。iPS細胞作製技術の開発により、これまでの研究成果の臨床医学への応用がより現実的となったと考えている。以下、筆者らの研究を含めた多能性幹細胞由来の樹状細胞に関する研究について紹介する。

1. 樹状細胞療法における細胞ソースとしての多能性幹細胞の有用性

樹状細胞に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は、抗腫瘍免疫療法的手段として期待されている。現在、患者本人からアフレーシス(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等のサイトカインを加えて培養し分化誘導することに樹状細胞を作製し、これにがん抗原由来のペプチドを負荷するなどしたものがワクチンとして投与されている。樹状細胞療法の一つの問題として、細胞ソースの問題がある。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レ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ド

ナーにより大きな個人差があり、アフレ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、その臨床の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うえで支障になるものと予想される。

ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞は、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。筆者らは、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樹状細胞を安定して作製できるようになると考えた。また、多能性幹細胞は、電気穿孔法あるいはリポフェクション法により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制御分子を人為的に発現させるなど、機能を様々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(ES-DC)の作製

筆者らはまず、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(M-CSF遺伝子に変異のあるop/opマウスに由来する骨髄ストローマ細胞株)をフィーダー細胞として用いる方法が、仲野ら¹⁾により報告されていた。筆者らはこの方法を参考にして、OP9細胞等のフィーダー細胞

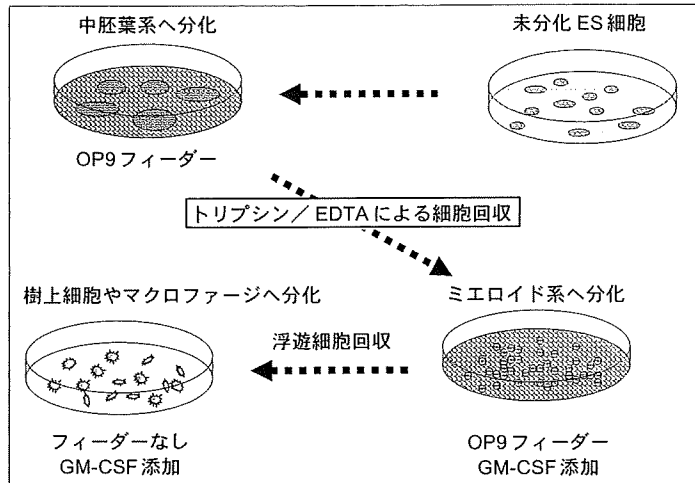


図1 マウスの多能性幹細胞から樹状細胞への分化誘導法の概要

マウス ES 細胞からの樹状細胞分化誘導法は、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＞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＞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 段階のステップからなる。(筆者作成)

と共培養することにより、ES 細胞から血球系の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を開発することを試みた。そして試行錯誤の結果、OP9 細胞と GM-CSF を用いることにより、マウス ES 細胞から樹状細胞 (ES-DC) を安定して作製できる培養法を開発した²⁾。

筆者らのマウス ES 細胞から樹状細胞への分化誘導の方法の概要を図 1 に示す。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 細胞の上へ播種し培養する。5～6日後、最初は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。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 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 細胞由来の小型の球形の細胞が出現する。球形の細胞は GM-CSF に依存して増殖し、同時にやや大型化し、形も球形から少し不規則な形態を示すようになる。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日目頃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 クラス II 等を発現している。これをさらに TNF- α , IL-4, 抗 CD40 刺激抗体、あるいは LPS 等で刺激すると、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。筆者らはこの ES 細胞由来の樹状細胞を、ES-DC と名付けた。ES-DC は、GM-CSF に依存して分化すること、および表面マーカー (CD11b 陽性等) から、ミエロイド系樹状細胞に相当すると考えている。

3. マウスモデルを用いた ES-DC による抗腫瘍免疫誘導の検討

抗腫瘍細胞ワクチンとして用い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する T 細胞エピトープに相当する合成ペプチドをパルスする方法等がある。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れば、生体投与後も持

統的な抗原の産生と提示が起こり、より効率良くT細胞刺激を行えることができると期待される。ES細胞は、電気穿孔法やリポフェクション法により遺伝子導入を行うことが可能であり、トランスフェクタントのクローニングも比較的簡単に行うことができる。そこで、未分化状態のES細胞に遺伝子導入を行い、適切なトランスフェクタントクローンを単離しておけば、それを元にトランスフェクタントES-DCを容易に作製できる。

筆者らは、ES-DCを用いた抗腫瘍免疫の研究をはじめにあたって、まずモデル腫瘍抗原としてOVA (ovalbumin: 卵白アルブミン) 抗原を発現するES-DCを作製した。このES-DCは、*in vitro*でES細胞と同系(遺伝的背景が同一)のマウスの脾臓由来のT細胞と共培養すると、OVA抗原特異的な細胞傷害性T細胞(CTL)を感作(priming)することができた。さらに、このOVA発現ES-DCを同系のマウス個体に移入することにより、マウス体内でOVA抗原に特異的なCTLを感作することもできた。また、マウスにこのOVA発現ES-DCを投与することによりOVA抗原に対して感作しておく、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^{3, 4)}。以上より、少なくともモデル抗原を用いた場合は、抗原遺伝子を導入したES-DCを細胞ワクチンとして投与することにより、抗腫瘍免疫応答を誘導できることが示された。

モデル抗原ではなく、腫瘍細胞において本来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検討した。Glypican3は、筆者らの研究室の中面(現所属: 国立がんセンター東病院)らがヒトの肝細胞がん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⁵⁾。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⁶⁾。

さらに、抗腫瘍免疫の効果を高めるために、複数の癌抗原を標的とした免疫療法についても検討を行った⁷⁾。マウスのES細胞に、メラノーマ関連抗原であるSPARC, TRP2, gp100の3つの遺伝子をそれぞれ電気穿孔法で導入し、各々の抗原を発現するES-DCを作製した。これらのES-DCを投与することにより、各々を単独で投与するよりも、より強力な抗メラノーマ免疫効果が得られることを観察した。また、NKT細胞のリガンドである α ガラクトシルセラミド(α GalCer)を抗原を発現するES-DCに負荷して投与することにより、肺転移モデルや腹膜播種モデルにおいて、さらに強い抗腫瘍効果が認められた^{7, 8)}。

4. 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

生体内に生理的に存在する樹状細胞は、組織内において抗原を捕捉した後、リンパ管を經由して所属リンパ節へ移行する。そしてこの樹状細胞は、リンパ節のT細胞領域においてT細胞と遭遇し、抗原特異的なT細胞のプライミングを行う。体外で培養した樹状細胞を投与した場合には、リンパ組織への移行の効率が非常に低いことが報告されており、樹状細胞によるワクチン療法の一つの欠点であるとして指摘されている。

筆者らは、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

OVA (ovalbumin; 卵白アルブミン) CTL (細胞傷害性T細胞) α GalCer (α ガラクトシルセラミド)

ることにより、ES-DCが抗原特異的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³⁾。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細胞を分化させることによりOVAとケモカインを同時に発現するES-DCを作製した⁷⁾。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。そして、OVAと各々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、OVA発現腫瘍に対する拒絶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ことが判明した。さらに、OVAとSLCを共発現するES-DCに α GalCerを負荷して投与することにより、OVA発現腫瘍の腹膜播種モデルにおいて、より強い抗腫瘍効果が認められた⁸⁾。

5. 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^{9, 10)}。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。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OVAと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。さらに、これらのES-DCを投与したマウスにおいて、外来抗原蛋白 (KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin) に対する免疫応答能力には変化がなかった。以上より、標的自己抗原と免疫抑制分子を同時に発現するES-DCを投与することにより、免疫応答の抗原特異的な抑制的制御が可能であることが示された。

6. ヒトES-DCの作製

次に、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

EAE (実験的自己免疫性脳脊髄炎) MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein)
KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)

発に取組んだ¹¹⁾。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、また効率的なヒトES-DCの作製には、フィーダー細胞なしで培養するステップの最初から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、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。

7. iPS細胞からの樹状細胞作製

ES細胞を用いて確立した樹状細胞分化誘導法を用いて、マウスのiPS細胞から樹状細胞を作製できるかどうか検討を行った¹²⁾。本研究では、京都大学再生医科学研究所の山中らの研究グループにより樹立されたマウスiPS細胞の分与を受け、マウスのES細胞の場合に準じて分化誘導することを試みた。その結果、ES細胞の場合と同様に、iPS細胞からも樹状細胞の作製が可能であることが判明した。iPS細胞由来の樹状細胞(iPS-DC: iPS cell-derived dendritic cells)は、樹状細胞様の形態を有するのみでなく、細胞表面にMHCクラスII、CD80、CD86を発現し、またIL-12とTNF- α を産生した。すなわち、T細胞に対する抗原提示細胞として必要な分子を発現しており、また、タンパク質抗原のプロセッシング機能を有していた。さらに、樹状細胞に特徴的な性質とも言える、アロ(同種異系)のT細胞に対す

る非常に強力な増殖反応(一次MLR)誘導活性を有していた。

以上の分化誘導の過程における形態の変化や最終的に産生される樹状細胞の機能において、iPS細胞はES細胞とほぼ同等であったが、微妙な差異も認められた。iPS細胞は、我々がこれまでに扱ってきた色々な系統のES細胞株と比較すると、全てのステップにおいて分化の速度がやや遅く、最終的に樹状細胞へ分化するまでの期間が2割程度長くなる傾向があった。また、ES細胞からの分化誘導では、分化段階が進んで成熟するにつれ細胞の増殖能力が低下する、つまり分化誘導のステップのあとの方になると細胞があまり増えない傾向があった。ところが、iPS細胞の場合は分化段階が進み成熟した樹状細胞に近い段階でも、ある程度の増殖能力を保持しているという違いも認められた。結果的に、Nanog-iPS細胞からはマウスES細胞の場合よりも、同じ数の未分化細胞あたりでは、より数多くの樹状細胞を得ることができた。

我々はさらに、遺伝子導入により抗原を発現させたiPS-DCによる抗腫瘍細胞ワクチンの実験も行った¹²⁾。まず未分化なiPS細胞に、モデル抗原であるOVAの発現ベクターを導入した。この抗原遺伝子導入iPS細胞から作製したOVA抗原発現iPS-DCをマウス個体へ投与すると、マウス体内においてOVA特異的なCTLが誘導された。そして、OVA抗原発現iPS-DCによる細胞ワクチンを施したマウスは、OVA抗原を発現するメラノーマ(MO4株)に対して拒絶あるいは増殖抑制効果を示した。すなわち、抗原遺伝子を発現させたiPS-DCの投与により、抗原特異的な抗腫瘍免疫応答を惹起することができた。

引き続き、ヒトiPS細胞からの樹状細胞作製についても検討した。ヒトiPS細胞は、健常人の

iPS-DC (iPS cell-derived dendritic cells ; iPS細胞由来の樹状細胞)

皮膚線維芽細胞にレンチウイルスベクターを用いて、Oct3/4, SOX2, KLF4, cMyc の4因子を導入することにより行った。初期化因子導入から20～30日の後、ヒトES細胞と同様の形態を示す細胞クローンをiPS細胞であると判断して単離し培養を行い、安定した細胞株として維持できる約60クローンを樹立した。そして、これらのiPS細胞クローンをヒトES細胞を用いて開発した分化誘導法を用いてiPS-DCへ分化させることを試みた。その結果、少なくとも半数以上のiPS細胞クローンを樹状細胞様の形態を有する細胞へ分化させることが可能であった(図2)。さらに、ヒトiPS-DCはヒトES-DCと同様に、CD80, CD86, HLAクラスII等を発現し、アロのT細胞刺激活性を有しており、樹状細胞としての特性を有しているものと判断された。

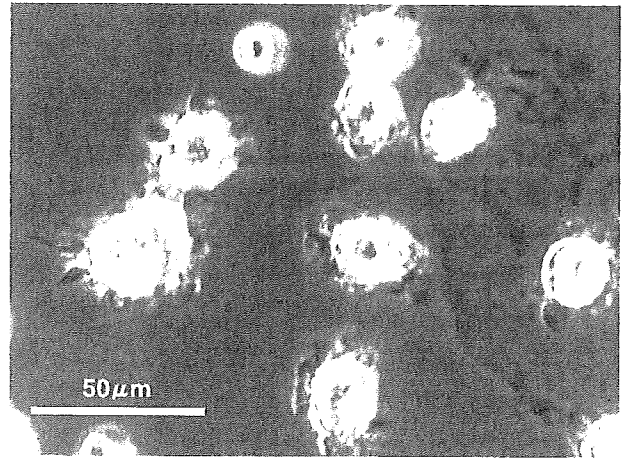


図2 ヒトiPS細胞由来の樹状細胞の形態

ヒトのiPS細胞から、樹状細胞様の形態と機能的特性を有する細胞(iPS-DC)を作製することができた。(筆者作成)

iPS細胞作製技術の開発により、生命倫理に関連する問題と組織適合性の問題を解決できるめどが見つかったことは、多能性幹細胞由来の樹状細胞の医療応用を考えた場合に非常に画期的なことであった。治療を必要とする患者毎に樹状細胞を作製するためにiPS細胞を樹立することは、費用を考えると実用的でないとの見方もある。この点に関しては、HLAハプロタイプを網羅するようなヒトiPS細胞バンクの設立¹⁷⁾、あるいは遺伝的改変によるMHC置換¹⁸⁾が解決策になると考えている。今後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。

文献

- 1) Nakano T, Kodama H, Honjo T: Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265:1098-1101, 1994
- 2) Senju S, Hirata S, Matsuyoshi H, et al: Generation and genetic modification of dendritic

おわりに

以上のように、筆者らはマウスとヒトのES細胞とiPS細胞から機能的な樹状細胞を作製する方法を開発している。マウスの移植腫瘍モデルを用いて、遺伝子導入により腫瘍抗原を発現させたES-DCにより、抗腫瘍ワクチン効果が得られることを確認している。また、自己免疫疾患モデルであるEAEを用いて、遺伝的改変により機能を修飾したES-DCが³⁾、免疫応答の抑制的制御にも有用であることを示した。

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、筆者らの他に、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¹³⁾。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^{14, 15)}。また、最近Slukvinらのグループから、ヒトiPS細胞からのマクロファージ、樹状細胞、顆粒球の作製が報告された¹⁶⁾。

- cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood* **101** : 3501-3508, 2003
- 3) Matsuyoshi H, Senju S, Hirata S, et al : 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** : 776-786, 2004
 - 4) Fukuma D, Matsuyoshi H, Hirata S, et al : Cancer prevention with semi-allogeneic ES cell-derived dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* **335** : 5-13, 2005
 - 5) Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, et al : Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* **306** : 16-25, 2003
 - 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) Fukushima S, Hirata S, Motomura Y, et al : Multiple antigen-targeted immunotherapy with α -galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells. *J Immunotherapy* **32** : 219-231, 2009
 - 8) Matsuyoshi H, Hirata S, Yoshitake Y, et al : Therapeutic effect of α -galactosylceramide-loaded dendritic cells genetically engineered to express SLC/CCL21 along with tumor antigen against peritoneally disseminated tumor cells. *Cancer Sci* **96** : 889-896, 2005
 - 9) Hirata S, Senju S, Matsuyoshi H, et al : Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing Myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide along with TRAIL or programmed death-1 ligand. *J Immunol* **174** : 1888-1897, 2005
 - 10) 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
 - 11) 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
 - 12) Senju S, Haruta M, Matsunaga Y, et al : Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* **27** : 1021-1031, 2009
 - 13) Fairchild PJ, Brook FA, Gardner RL, et al : Directed differentiation of dendritic cells from mouse embryonic stem cells. *Curr Biol* **10** : 1515-1518, 2000
 - 14) Zhan X, Dravid G, Ye Z, et al : Functional antigen-presenting leucocytes derived from human embryonic stem cells *in vitro*. *Lancet* **364** : 163-171, 2004
 - 15) Slukvin II, Vodyanik MA, Thomson JA, et al : Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional dendritic cells through the myeloid pathway. *J Immunol* **176** : 2924-2932, 2006
 - 16) 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* **119** : 2818-2829, 2009
 - 17) Nakatsuji N, Nakajima F, Tokunaga K : HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nature Biotechnology* **26** : 739-740, 2008
 - 18) Matsunaga Y, Fukuma D, Hirata S, et al : Activation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by β 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* **181** : 6635-6643, 2008

