

201406015A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

再生医療実用化研究事業

iPS細胞を用いた再生医療における組織不適合の解決

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 千住 覚

平成27 (2015) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

iPS細胞を用いた再生医療における組織不適合の解決 -----	5
研究代表者 千住 寛	

II. 分担研究報告

1. ヒトiPS細胞由来のミエロイド系血液細胞の遺伝子標的改変 -----	17
研究代表者 千住 寛 熊本大学大学院生命科学研究部免疫識別学分野	

2. TAP 欠損 ES 細胞由来の分化細胞による -----	23
組織不適合回避に関する研究	

研究分担者 福田恵一 慶應義塾大学 循環器内科
関 倫久 慶應義塾大学 循環器内科
岡田麻里奈 慶應義塾大学 循環器内科

3. 再生医療の安全性確保のための抗腫瘍免疫誘導法の開発 -----	26
------------------------------------	----

研究分担者 中面 哲也 国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター
関 倫久 慶應義塾大学 循環器内科

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	31
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	35
-----------------------	----

I. 平成26年度総括研究報告

iPS細胞を用いた再生医療における組織不適合の解決
研究代表者 千住 覚 熊本大学 大学院生命科学研究部 准教授

研究要旨

再生医療には、今日の医療技術では対応が困難な様々な難治性の疾患の治療法として大きな期待が寄せられている。特にiPS細胞を用いた再生医療は、人工的にヒトの細胞あるいは組織を創出できる可能性を有する技術であり、ヒトのiPS細胞から様々な細胞を作製する分化誘導技術があいついで報告されている。iPS細胞を基盤とする再生医療に伴う組織不適合と腫瘍化リスクの問題を解決することが、これらの技術を実用化し医療への応用を進めていくために必要である。

患者個別にiPS細胞を樹立し再生医療に用いることを想定すると、iPS細胞樹立と治療用細胞作成に長い期間を必要とし、また、非常に高額のコストが必要となる。また、移植細胞からの癌発生のリスクも懸念される。このような問題を解決し、iPS細胞を用いた再生医療の実用化に資する目的で、HLAハプロタイプホモ接合iPS細胞の治療用細胞バンク(iPS細胞ストック)の構築が進められている。迅速な治療用細胞の提供が可能であることや経済性から、iPS細胞ストック由来のHLA適合アロiPS細胞を使用する方がより現実的であると見られている。しかしながら、iPS細胞ストックには低頻度のHLAハプロタイプに関しては、確率的にホモ接合ドナーの確保が期待できない、という問題が残されている。すなわち、日本人中約10~20%の低頻度HLAハプロタイプ保持者に関しては、iPS細胞ストックではカバーされないため、治療を受けることができないことが予想される。

本研究では、以上のような、iPS細胞を用いた再生医療の実現化に向けて解決しなければならない問題を解決することを目的としている。低頻度HLAハプロタイプ問題の解決法として、iPS細胞においてHLA遺伝子あるいはHLA分子の細胞表面への発現に関与するHLA関連遺伝子を改変することにより、iPS細胞ストックを補完するiPS細胞を作成する技術を開発する。また、iPS細胞由来の分化細胞を用いた再生医療において懸念される腫瘍形成の問題に対処する目的で、未分化細胞に特異的に高発現するタンパク質を標的抗原とする免疫療法を開発する。本年度の研究においては、研究の基盤となる遺伝的改変技術の開発、および、マウスを用いた研究を実施するための実験条件の検討を行なった。

研究分担者

福田恵一 慶應義塾大学循環器内科 教授
中面哲也 国立がん研究センター
東病院臨床開発センター
免疫療法開発分野 分野長
関 倫久 慶應義塾大学循環器内科 助教

A. 研究目的

本計画は、iPS細胞による再生医療の実用化に資するための免疫制御技術を開発することを研究目標としている。現在、iPS細胞を用いた再生医療の実用化に資する目的で、HLAハプロタイプホモ接合の細胞ドナーに由来するiPS細胞ストックの構築が進められている。しかしながら、日本人集団のうち低頻度HLAハプロタイプのみ保持者は、iPS細胞ストックではカバーされないことが予想されている。ところで、同種異系(アロ)移植における拒絶反応においては、HLAクラスIが主要な標的となる。HLAクラスIは、 α 鎖、 β 2ミクログロブリン、抗原ペプチドの3量体を形成し細胞表面に提示される。MHCクラスI経路へ抗原ペプ

チドを供給するペプチドトランスポーター (TAP) を欠損する細胞、あるいは、 $\beta 2$ ミクログロブリン (b2M) 欠損細胞では、MHCクラスIの細胞膜上の発現レベルが著しく低下し、T細胞による認識を回避する。これまでに、本研究グループでは、国際的にも独自性の高い研究として、マウスおよびヒト細胞においてTAP遺伝子を改変し、組織不適合性問題にアプローチしてきた。そこで、本研究では、これまでの技術的基盤を生かして、iPS細胞ストックを補完するシステムを開発する。

本年度は、ヒト細胞および非ヒト霊長類細胞においてMHC遺伝子を改変する技術の開発、iPS細胞に由来する樹状細胞および心筋細胞を用いたアロ免疫反応性の評価法と移植後の生着を観察するためのマウスモデルの樹立、マイナー抗原不適合による拒絶に対応するためのiPS細胞由来ミエロイド系細胞による免疫制御法の開発、GMP準拠培養によるヒトiPS細胞由来のミエロイド細胞の大量生産システムの開発を行なうことを目的とした。さらに、自己iPS細胞による再生医療の場合に生じる腫瘍発生の問題を解決する手段として、未分化細胞抗原を標的とする免疫機序による腫瘍排除の研究を行なった。

B. 研究方法

ヒトのiPS細胞においてHLA遺伝子の標的破壊を行なうための手法を開発している。本年度は、ヒトのiPS細胞から作成したミエロイド系血液細胞 (iPS-ML) を用いて、25年度に開発したCRISPRをベースとして、HLA-A, B, DRBの遺伝子の標的破壊を行なうシステムを確立する。さらに、アロ反応性のT細胞ラインを樹立し、HLA遺伝子の破壊および置換によるT細胞認識からの回避についても検討する。

レンチウイルスベクターを用いて iPS-ML への遺伝子改変を行なう技術を開発するべく検討を行った。レンチウイルスベクターは、293T 細胞への発現プラスミドベクター (CSIIEF: 理化学研究所 三好浩之博士より分与をうけたもの) および packaging プラスミドの導入と超遠心法による細胞培養上清からのウイルス回収により作製・濃縮した。作製したレンチウイルスを直接 iPS-ML に感染させることにより、遺伝子導入を行なった。

また、分化細胞への組織不適合性に対する評価と

して、マウス心筋細胞を用いた実験で評価を行う。iPS 細胞または ES 細胞を、浮遊培養させ、胚葉体を作成することで心筋細胞へ分化誘導する。既に TAP 欠損マウス多能性幹細胞が心筋細胞への分可能を含む多分化能を有していることを *in vitro* の浮遊培養分化系において確認した。今後分化誘導した心筋細胞の各種心筋細胞マーカーを発現、電気生理学的評価を進める。さらに、分化誘導した心筋細胞を他系統マウスへ移植し、その生着性を評価する。移植場所は心臓が望ましいが、生着性の比較評価が困難である場合は体幹部への移植を考慮する。より詳細な生着性の評価および臨床応用を見据えた実験系構築のため、タクロリムス経口投与による段階的な薬剤血液濃度コントロールを可能とする系によって評価を行う。移植後 1 週~12 週の範囲で、同部を病理学的に評価し、心筋細胞の生着性、各種免疫細胞の遊走を比較し、MHC によるアロ認識反応を回避することによる移植細胞の生着性への影響を評価した。

また、未分化細胞抗原を標的とする iPS 細胞再生医療における腫瘍拒絶法の検討を行なった。iPS 細胞による再生医療において問題となる、未分化細胞の混入とがん化の問題を解決するために、未分化細胞特異的抗原と CTL エピトープの同定を行なう。標的抗原の候補となるタンパク質のアミノ酸配列から、ペプチド HLA 結合予測システム (BIMAS) を用いて HLA-A02、HLA-A24 に結合が予測される 9-10 個のアミノ酸からなるヒトとマウスで共通の配列が存在する未分化細胞特異的 CTL エピトープ候補ペプチドをピックアップして合成する。これらの候補ペプチドを用いて、ヒト末梢血単核球を刺激し、あるいは、ヒト HLA 遺伝子導入マウスに免疫して、誘導された CTL のペプチド特異性を解析することにより、特異的 CTL の誘導が可能な未分化細胞特異的抗原由来ペプチドを同定する。さらに、同定されたペプチドにより誘導される CTL が未分化 iPS 細胞に対して傷害能を示すかを確認する。

(倫理面への配慮)

動物を用いる実験においては「動物愛護管理法」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を踏まえ、各施設における動物取扱の取り決めに遵守し

て、事前に各施設における動物実験委員会承認を得た後に行う。遺伝子組換え実験については、各施設の遺伝子組換え実験委員会の承認後に実施した。また、遺伝子改変動物の取り扱いについては「カルタヘナ法」を順守し、各施設における動物実験委員会および遺伝子組換え実験委員会の審査を受けて実施した。熊本大学大学院生命科学研究部、慶應大学医学部、および国立がん研究センターでは、教育研究に関わる生命倫理ならびに安全管理に関する問題を審議して、これらが適切に遂行されるように、倫理審査委員会が設置され規則が整備されている。本研究において、倫理審査委員会の承認が必要な研究においては、各施設の倫理審査委員会に研究計画書を提出して承認後に行った。

C. 研究結果

ヒト iPS 細胞由来のミエロイド細胞において、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入により効率的に遺伝子改変を行ないその機能を修飾する手法を確立した。さらに、Zinc Finger Nuclease を用いた遺伝子の標的破壊により、ヒトの iPS 細胞あるいはヒト iPS 細胞由来のミエロイド細胞において、特定の遺伝子を欠失させる手法も確立した。また、iPS-ML の医療応用を目指して、GMP (Good Manufacturing Practice) 基準に準拠して細胞の分化、増殖、プロセッシングを行なうための基本的な条件の検討、情報の収集などを行なう事ができた。GMP 基準で製造されている材料のみで細胞を製造するための、細胞分化及び増殖の工程を改良した。さらに、完全閉鎖式の自動培養装置を用いて大量増殖するための条件を決定する事ができた。

TAP 欠損マウス ES 細胞とコントロールである ES 細胞 (E14) に対して共に hanging broop 法により分化誘導を行い、両者ともに胚葉体を形成することを確認した。これらを浮遊培養の後に接着培養へ切り替え、観察を続けたところ両者ともに拍動する心筋細胞塊の出現を認めた。また、両者のアロ移植における細胞の生着性の評価を目的として、マウスに対するタクロリムス投与量を調整し、タクロリムス経口投与による段階的な血中濃度コントロールが可能な移植実験系を作成した。

NIH の Stem Cell Database からマイクロアレイのデータを入手し、GeneSpring を用いて未分化抗

原の候補になる分子をリストアップした。具体的には、OCT3/4、Nanog などの 6 個の遺伝子であり、これらは、iPS 細胞に高発現し、かつ、正常な体細胞にはほとんど発現が認められないものである。まず BIMAS (Bio Informatics and Molecular Analysis) を用いて、CTL (細胞傷害性 T 細胞) による認識の標的となる未分化抗原由来エピトープペプチドの探索を行った。その結果、日本人集団において高頻度に認められる HLA クラス I である HLA-A*24:02 あるいは 02:01 に対する結合アフィニティーが高いと予測されるペプチド 89 種に関して、合成ペプチドを作成した。次に、これらのペプチドを用いて、ヒト末梢血単核球を刺激、あるいは、ヒト HLA 遺伝子導入マウスに免疫し、3 つのペプチドに対して特異的な CTL の誘導を確認した。さらに、機能解析を行うため、誘導された CTL から CD107a アッセイを用いて、CLDN6 由来ペプチド特異的 CTL クローンを樹立した。

D. 考察

Zinc Finger Nuclease を用いることにより分化細胞である iPS-ML においても遺伝子の標的破壊が可能であるということが示された。この結果は、今後の、HLA 関連遺伝子の遺伝子改変技術を開発していく上で、重要な意味を有する成果であると考えている。また、生物由来原材料基準に適合する培養液等のみを使用して、人体への投与が許容される iPS-ML を作成する方法開発のめどを立てる事ができた。

TAP 欠損マウス ES 細胞とコントロールである ES 細胞 (E14) ともに *in vitro* において従来の心筋分化誘導系である hanging drop 法が応用可能であることを確認した。TAP を欠損させた細胞株においても、*in vitro* の分化系により機能的な心筋細胞を作製可能であることを確認した。今後、現在の培養系をもとにしてさらなる高効率の系の確立を試みる。また、そののちにアロ移植の実験系における生着性の評価を行う予定である。

自己 iPS 細胞を作成し再生医療を実施する手法は、組織不適合性問題を解決するという観点からは理想的である。しかしながら、移植細胞から腫瘍が発生した場合に、組織不適合による安全機構が働かないため、この点から考えるとむしろ危険性が高いとも言える。問題となる未分化細胞の混入とがん化の問題を解決するために、未分化細胞特異的抗原に

由来する CTL エピトープの同定を試み、ペプチド 3 つを同定した。誘導されたペプチド特異的 CTL は未分化 iPS 細胞特異的な細胞傷害を示す可能性がある。誘導された CTL の機能解析を行うため、これらの CTL からペプチド特異的 CTL クローンを樹立した。今後、樹立した CTL クローンの未分化 iPS 細胞への反応性の評価を行う。

E. 結論

iPS 細胞に由来するミエロイド系血液細胞 (iPS-ML) の大量生産技術を確立した。さらに、GMP 準拠システムでの細胞製造技術に関し様々な情報を得ることができた。また、レンチウイルスベクターを用いて iPS-ML の遺伝子改変を行なえることを確認することができた。

TAP 欠損マウス ES 細胞は *in vitro* で機能的な心筋細胞に分化可能であり、分化細胞の組織不適合性評価の実験系に応用可能である可能性が示唆された。今後タクロリムス血中濃度を段階的に設定したマウスに対する移植実験、生着性評価を進める。

未分化細胞特異的抗原由来 CTL エピトープペプチドの同定を目指して、ペプチド 89 種を合成し、これらのペプチドを用いて、ヒト末梢血単核球を刺激、あるいは、ヒト HLA 遺伝子導入マウスに免疫して、誘導された CTL のペプチド特異性を解析した結果、3 つのペプチドに対してペプチド特異的な CTL の誘導が確認された。誘導された CTL の機能解析を行うため、これらの CTL からペプチド特異的 CTL クローンを樹立した。今後は、樹立した CTL クローンの未分化 iPS 細胞への反応性の評価を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikeda, T., Hirata, S., Takamatsu, K., Haruta, M., Tsukamoto, H., Ito, T., Uchino, M., Ando, Y., Nagafuchi, S., Nishimura, Y., and Senju, S.: Suppression of Th1-mediated autoimmunity by embryonic stem cell-derived dendritic cells. *Plos One* 0115198, 2014
- 2) Takamatsu, K., Ikeda, T., Haruta, M.,

Matsumura, K., Ogi, Y., Nakagata, N., Uchino, M., Ando, Y., Nishimura, Y., and Senju, S.; Degradation of amyloid beta by human induced pluripotent stem cell-derived macrophages expressing Neprilysin-2. *Stem Cell Research* 13: 442-453, 2014

- 3) Ishimura, R., Nagy, G., Dotu, I., Zhou, H., Yang, X-L., Schimmel, P., Senju, S., Nishimura, Y., Chuang, J.H. and Ackerman, S.L.; Ribosome stalling induced by mutation of a CNS-specific tRNA causes neurodegeneration. *Science* 345: 455-459, 2014.
- 4) Haga, E., Endo, Y., Haruta, M., Koba, C., Matsumura, K., Takamatsu, K., Ikeda, T., Nishimura, Y., and Senju, S.; Therapy of peritoneally disseminated colon cancer by TAP-deficient ES cell-derived macrophages in allogeneic recipients. *J.Immunol.* 193: 2024-2033, 2014.
- 5) Tomita, Y., Yuno, A., Tsukamoto, H., Senju, S., Kuroda, Y., Hirayama, M., Imamura, Y., Yatsuda, J., Sayem, M. A., Irie, A., Hamada A., Jono, H., Yoshida, K., Tsunoda, T., Daigo, Y., Kohrogi, H., Yoshitake, Y., Nakamura, Y., Shinohara, M. and Nishimura, Y.; LY6K-specific CD4⁺ T-cell immunity in patients with malignant tumor: Identification of LY6K long peptide encompassing both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell epitopes. *OncoImmunology* 3: e28100-1-15, 2014.
- 6) 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. (*equal contribution)

- Identification of CDCA1 long peptides bearing both CD4+ and CD8+ T-cell epitopes: CDCA1-specific CD4+ T-cell immunity in cancer patients. *Int. J. Cancer* 134, 352–366, 2014.
- 7) Senju, S., Koba, C., Haruta, M., Matsunaga, Y., Matsumura, K., Haga, E., Sasaki, Y., Ikeda, T., Takamatsu, K., and Nishimura, Y. [Author's view] Application of iPS cell-derived macrophages to cancer therapy. *OncImmunity* 3: e27927-1-3, 2014.
 - 8) Yoshimura M, Tada Y, Ofuji K, Yamamoto M, Nakatsura T. Identification of a novel HLA-A*02:01-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope derived from the EML4-ALK fusion gene. *Oncol. Rep.* 32(1):33-39,2014 Jul
 - 9) Ofuji K, Saito K, Yoshikawa T, Nakatsura T. Critical analysis of the potential of targeting GPC3 in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatocellular Carcinoma.* 1:35-42,2014 May
 - 10) Yoshikawa T, Takahara M, Tomiyama M, Nieda M, Maekawa R, Nakatsura T. Large-scale expansion of $\gamma\delta$ T cells and peptide-specific cytotoxic T cells using zoledronate for adoptive immunotherapy. *Int. J. Oncol.* 45:1847-1856,2014
 - 11) Sawada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Iwama T, Endo I, Nakatsura T. Programmed death-1 blockade enhances the antitumor effects of peptide vaccine-induced peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. J. Oncol.* 46:28-36,2015 Jan
 - 12) Ofuji K, Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Yoshimura M, Saito K, Nakamoto Y, Nakatsura T. A peptide antigen derived from EGFR T790M is immunogenic in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.* 46:497-504,2015 Feb
 - 13) Kishino Y, Seki T, Fujita J, Yuasa S, Tohyama S, Kunitomi A, Tabei R, Nakajima K, Okada M, Hirano A, Kanazawa H, Fukuda K. Derivation of transgene-free human induced pluripotent stem cells from human peripheral T cells in defined culture condition. *PLoS One.* 2014 May 13;9(5):e97397. doi: 10.1371/journal.pone.0097397. eCollection 2014.
 - 14) Hemmi N, Tohyama S, Nakajima K, Kanazawa H, Suzuki T, Hattori F, Seki T, Kishino Y, Hirano A, Okada M, Tabei R, Ohno R, Fujita C, Haruna T, Yuasa S, Sano M, Fujita J, Fukuda K. A massive suspension culture system with metabolic purification for human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells Transl Med.* 2014 Dec;3(12):1473-83. doi: 10.5966/sctm.2014-0072. Epub 2014 Oct 29.
 - 15) Tanaka A, Yuasa S, Mearini G, Egashira T, Seki T, Kodaira M, Kusumoto D, Kuroda Y, Okata S, Suzuki T, Inohara T, Arimura T, Makino S, Kimura K, Kimura A, Furukawa T, Carrier L, Node K, Fukuda K. Endothelin-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector variability in hypertrophic cardiomyopathy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc.* 2014 Nov 11;3(6):e001263. doi: 10.1161/JAHA.114.001263.
 - 16) Egashira T, Yuasa S, Tohyama S, Kuroda Y, Suzuki T, Seki T, Fukuda K. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell Models: Characterization of iPS Cell-Derived Cardiomyocytes. *Methods Mol Biol.* 2014 Dec 18.
 - 17) Seki T, Fukuda K. Methods of induced pluripotent stem cells for clinical application. *World J Stem Cells.* 2015 Jan 26;7(1):16-25. doi: 10.4252/wjsc.v7.i1.116.
 - 18) Kodaira M, Hatakeyama H, Yuasa S, Seki T, Egashira T, Tohyama S, Kuroda Y, Tanaka A, Okata S, Hashimoto H, Kusumoto D, Kunitomi A, Takei M, Kashimura S, Suzuki T, Yozu G, Shimojima M, Motoda C, Hayashiji N, Saito Y, Goto Y, Fukuda K. Impaired respiratory function in MELAS-induced pluripotent stem cells with high heteroplasmy levels. *FEBS Open Bio.* 2015 Mar 20;5:219-25. doi: 10.1016/j.fob.2015.03.008. eCollection 2015.
 - 19) Hayashiji N, Yuasa S, Miyagoe-Suzuki Y, Hara M, Ito N, Hashimoto H, Kusumoto D, Seki T, Tohyama S, Kodaira M, Kunitomi A, Kashimura S, Takei M, Saito Y, Okata S, Egashira T, Endo J, Sasaoka T, Takeda S, Fukuda K. G-CSF supports long-term muscle regeneration in mouse models of muscular dystrophy. *Nat Commun.* 2015 Apr 13;6:6745. doi: 10.1038/ncomms7745.

学会発表

- 1) 千住覚：肝免疫・ウイルスに関する講演会。第 10 回肝免疫・ウイルス・フロンティア (Liver2014) イイノホール&カンファレンスセンター (東京都) 2014 年 4 月 5 日
- 2) 池田徳典、高松孝太郎、安東由喜雄、西村泰治、千住覚：ES 細胞由来樹状細胞 (ES-DC)

- を用いたマウス自己免疫疾患モデルに対する細胞治療療法。第 111 回日本内科学会総会 東京国際フォーラム (東京都) 平成 26 年 4 月 11 日～13 日 (4/11 一般口演)
- 3) 千住覚 : iPS 細胞由来のミエロイド細胞 (iPS-ML) によるがん治療 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、奈良県文化会館、奈良県新公会堂 東大寺総合文化センター (奈良市) 2014 年 5 月 16 日 (5/16 シンポジウム 7 講演)
 - 4) 池田徳典 : 多能性幹細胞由来樹状細胞を利用した実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する細胞療法。第 55 回日本神経学会学術大会 福岡国際会議場・福岡サンパレス・福岡国際センター (福岡市) 2014 年 5 月 21 日～24 日 (5/23 一般口演)
 - 5) 西村泰治 : CTL と Th 細胞を活性化できる癌抗原ペプチドの同定。文部科学省・新学術領域研究 (領域提案型) 先端技術を駆使した HLA 多型・進化・疾病に関する統合的研究 (HLA 進化と疾病) 平成 26 年度第 1 回班会議 東京大学・伊藤国際学術研究センター (東京都) 2014 年 6 月 18 日～19 日 (6/18 口頭発表)
 - 6) 匂坂正孝 千住覚 : 胃がん肝転移に対する iPS マクロファージを用いた治療。熊本大学第 1 回拠点形成研究 A「代謝を基盤とした癌のグローバル先端研究教育拠点」発表会 山崎記念館 2014 年 6 月 30 日 (ポスター発表)
 - 7) Yasuharu NISHIMURA, Yusuke TOMITA, Akira YUNO, Hirotake TSUKAMOTO, Satoru SENJU, Atsushi IRIE, Yasuhiro KURODA, Akinobu HAMADA, Hirofumi JONO, Koji YOSHIDA, Takuya TSUNODA, Yoshihiro YOSHITAKE, Yusuke NAKAMURA, Masanori SHINOHARA : Promiscuous oncoantigenic long peptides activating both tumor-reactive Th1 cells and CTLs. 第 18 回日本がん免疫学会総会 ひめぎんホール (愛媛県松山市) 2014 年 7 月 30 日～8 月 1 日 (合同シンポジウム発表)
 - 8) 塚本博丈、千住覚、松村桂子、Swain Susan、西村泰治 : 高齢個体で増加する IL-6 は、CD4⁺T 細胞を介した抗腫瘍免疫応答を抑制する。第 18 回日本がん免疫学会総会 ひめぎんホール (愛媛県松山市) 2014 年 7 月 30 日～8 月 1 日 (7/31 一般演題 O04 バイオマーカー (II) 一般口演)
 - 9) 平山真敏、富田雄介、湯野晃、塚本博丈、千住覚、Mohammad Abu Sayem、吉武義泰、福岡大喜、角田卓也、吉田浩二、中村祐輔、篠原正徳、西村泰治 : 癌胎児性抗原 IMP-3 由来の CTL と Th1 細胞の誘導活性を併せ持つ単一癌抗原ペプチドの同定。第 18 回日本がん免疫学会総会 ひめぎんホール (愛媛県松山市) 2014 年 7 月 30 日～8 月 1 日 (7/31 一般演題 O09 腫瘍抗原とワクチン療法 (I) 一般口演)
 - 10) 今村悠哉、春田美和、富田雄介、松村桂子、池田徳典、高松孝太郎、西村泰治、千住覚 : ヒトの末梢血単球の増殖誘導法を用いた樹状細胞の大量産生。第 18 回日本がん免疫学会総会 ひめぎんホール (愛媛県松山市) 2014 年 7 月 30 日～8 月 1 日 (8/1 一般演題 O17 腫瘍抗原とワクチン療法 (III) 一般口演)
 - 11) 宮下梓、福島聡、千住覚、西村泰治、神人正寿、尹浩信 : I 型インターフェロン遺伝子を導入した iPS 細胞由来ミエロイドラインを用いたメラノーマの免疫療法。第 18 回日本がん免疫学会総会 ひめぎんホール (愛媛県松山市) 2014 年 7 月 30 日～8 月 1 日 (8/1 一般演題 O19 抗腫瘍エフェクター細胞 (III) 一般口演)
 - 12) 千住覚 : iPS 細胞を用いた癌に対する免疫細胞療法。遺伝子・デリバリー研究会第 14 回夏期セミナー 阿蘇いこいの村 (阿蘇市)

- 2014年8月20日～21日(8/20 特別講演2)
- 13) 今村悠哉、春田美和、冨田雄介、松村桂子、池田徳典、高松孝太郎、西村泰治、千住覚：HLA拘束性T細胞を誘導可能な末梢血モノサイト由来樹状細胞の大量産生法の開発。第23回日本組織適合性学会大会 長崎大学医学部・坂本キャンパス(長崎市)2014年9月13日～15日(9/14 学術奨励賞候補口演発表)
- 14) 平山真敏、冨田雄介、湯野晃、塚本博丈、千住覚、Mohammad Abu Sayem、吉武義泰、福間大喜、吉田浩二、角田卓也、中村祐輔、篠原正徳、西村泰治：癌胎児性抗原IMP-3由来のCTLとTh1細胞の誘導活性を併せ持つ単一癌抗原ペプチドの同定。第23回日本組織適合性学会大会 長崎大学医学部・坂本キャンパス(長崎市)2014年9月13日～15日(9/14 口演2「免疫」 一般口演)
- 15) 入江厚、道端弥生、久保多津子、今村隆寿、矢津田旬二、竹田直樹、荒木喜美、江藤正俊、澁谷功、十河真司、西村泰治：HLA-DR4トランスジェニックマウスのホモ接合体のリンパ組織形成不全と大腸炎および肺炎の発症。第23回日本組織適合性学会大会 長崎大学医学部・坂本キャンパス(長崎市)2014年9月13日～15日(9/14 口演2「免疫」 一般口演)
- 16) 水上修作、Dao Huy Manh、千住覚、西村泰治、森田公一、平山謙二：ワクチン開発を目指した Dengue ウイルス抗原エピトープ予測モデル構築の基礎実験。第23回日本組織適合性学会大会 長崎大学医学部・坂本キャンパス(長崎市)2014年9月13日～15日(9/14 ポスター2「免疫」 ポスター発表)
- 17) 千住覚：細胞治療に向けた樹状細胞の可能性。第42回日本臨床免疫学会総会 京王プラザホテル(東京都)2014年9月25日～27日(9/25 専門スタディフォーラム講演)
- 18) 今村悠哉、春田美和、冨田雄介、松村桂子、池田徳典、高松孝太郎、西村泰治、千住覚：ヒトの末梢血単球の増殖誘導法を用いた樹状細胞の大量産生。第73回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(横浜市)2014年9月25～27日(9/25 がん免疫制御法とバイオマーカー 一般口演)
- 19) 平山真敏、冨田雄介、湯野晃、塚本博丈、千住覚、MD Abu Sayem、吉武義泰、濱田哲暢、城野博史、角田卓也、中村祐輔、篠原正徳、西村泰治：癌胎児性抗原IMP-3由来のCTLとTh細胞の誘導活性を併せ持つ癌抗原ペプチドの同定。第73回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(横浜市)2014年9月25～27日(9/25 腫瘍抗原に対するT細胞応答と応用技術 一般口演)
- 20) 湯野晃、冨田雄介、平山真敏、福間大喜、吉武義泰、尾木秀直、中山秀樹、平木昭光、角田卓也、醍醐弥太郎、中村祐輔、西村泰治、篠原正徳：腫瘍関連抗原特異的なCTLとTh1細胞を活性化するTh細胞エピトープの同定。第73回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(横浜市)2014年9月25～27日(9/25 抗腫瘍エフェクター細胞とその誘導(5) ポスター発表)
- 21) 千住覚、匂坂正孝、春田美和、羽賀栄理子、松村桂子、今村悠哉、池田徳典、西村泰治：ゼノグラフトモデルにおける胃がん肝転移に対するiPS-MLによる治療の効果。第73回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(横浜市)2014年9月25～27日(9/26 胃がん・抗腫瘍効果(2) 口頭発表)
- 22) 西村泰治、千住覚、Swain Susan、塚本博丈：担がん個体におけるIL-6シグナルを介したCD4+T細胞性腫瘍免疫の抑制。第73回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(横浜市)2014年9月25～27日(9/27 悪性腫瘍と免疫系の相互作用 シンポジウム発表)
- 23) がん免疫療法の開発、中面哲也、プラクティカルセッション～明日から役立つ個別化医療、

- 第 18 回国際個別化医療学会学術集会 (札幌)
2014 年 6 月 14 日
- 24) がんワクチン開発の現状と課題、中面哲也、
教育講演「がんワクチン開発の現状と課題」、
第 41 回日本毒性学会学術年会 (神戸) 2014 年
7 月 2 日～4 日
- 25) がんに対する免疫療法の基本、中面哲也、教
育セミナー「がん専門 CRC のためのアドバン
ストセミナー」、第 12 回日本臨床腫瘍学会学
術集会 (福岡) 2014 年 7 月 17 日～19 日
- 26) Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチン投与後
の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的
CTL の解析、吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、
高橋真理、吉原宏樹、上野浩生、真部淳、細
野亜古、植村靖史、中面哲也、第 18 回日本が
ん免疫学会総会 (松山) 2014 年 7 月 30 日～8
月 1 日
- 27) Glypican-3 由来エピトープペプチド結合リポ
ソームの CTL 誘導能の評価、岩間達章、内田
哲也、下村真菜美、吉川聡明、中面哲也、第
18 回日本がん免疫学会総会 (松山) 2014 年 7
月 30 日～8 月 1 日
- 28) Analysis of glypican-3 specific CTLs in the
tumor tissue and vaccination site after
administration of GPC3 peptide.
(Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチン投与後
の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的
CTL の解析)、吉川聡明、下村真菜美、澤田 雄、
植村靖史、中面哲也、第 73 回日本癌学会学術
総会 (横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日
- 29) Evaluation of peptide-specific CTL-
inducible ability of glypican-3-derived p
eptide-coupled liposome vaccine.
(Glypican-3 由来ペプチドを結合したリポソ
ームワクチンのペプチド特異的 CTL 誘導能評
価)、岩間達章、内田哲也、下村真菜美、吉川
聡明、中面哲也、第 73 回日本癌学会学術総会
(横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日
- 30) The enhancement of the CTL induction by
peptide vaccine therapy in combination with
anti-CD4 antibody. (抗 CD4 抗体の併用投与
は抗腫瘍ペプチドワクチン療法の CTL プライ
ミング効率を高める)、藤浪紀洋、吉川聡明、
澤田雄、下村真菜美、岩間達章、植村靖史、
中面哲也、第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜)
2014 年 9 月 25 日～27 日
- 31) EGFR T790M mutation-derived antigen
provides the immunogenicity in NSCLC
patients. (非小細胞肺癌における EGFR
T790M 変異由来抗原は免疫原性を与える)、大
藤和也、吉川聡明、多田好孝、吉村麻友子、
下村真菜美、中本安成、中面哲也、第 73 回日
本癌学会学術総会 (横浜) 2014 年 9 月 25 日～
27 日
- 32) Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチン投与後
の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的
CTL の解析、吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、
高橋真理、植村靖史、中面哲也、第 12 回日本
免疫治療学研究会学術集会 (東京) 2015 年 2
月 28 日
- 33) Seki T, Kusumoto D, Kishino Y, Tohyama S,
Okada M, Nakajima K, Ohno R, Henmi N,
Kunitomi A, Saito Y, Oda M, Yuasa S, Fujita
J, Fukuda K. 分化誘導に適した iPS 細胞株選
抜を目的とした iPS 細胞株間の遺伝子発現の
差異の解析. 第 13 回日本再生医療学会総会、
京都、3 月、2014 年
- 34) Kishino Y, Seki T, Miyamoto K, Tohyama S,
Yuasa S, Fujita J, Sano M, Fukuda K. The
Novel Method of Identifying Transplanted
Cells Using T-cell Receptor Gene Locus 第
13 回日本再生医療学会総会、京都、3 月、2014
年
- 35) Seki T, Yuasa S, Egashira T, Tohyama S, Yae
K, Kusumoto D, Kunitomi A, Saito Y,
Hashimoto H, Oda M, Kodaira M, Kuroda Y,
Tanaka A, Ookata S, Ohno Y, Fujita J, Kodo
K, Yamagishi H, Fukuda K. Generation of
Induced Pluripotent Stem Cells from Patient
with Familial Atrial/Ventricular Septum
Defect. 第 78 回日本循環器学会学術集会、東
京、3 月、2014 年
- 36) 関倫久、福田恵一 T細胞由来 iPS 細胞の再生医
療への応用、シンポジウム、再生医療を支え
る基盤技術の創出 第 14 回日本再生医療学会
総会、横浜、3 月、2015 年

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

II. 平成26年度分担研究報告

ヒト iPS 細胞由来のミエロイド系血液細胞の遺伝子標的改変

研究代表者 千住 覚 熊本大学 大学院生命科学研究部 准教授

研究要旨

iPS細胞の開発によって、任意の細胞ドナーの任意の体細胞から多能性幹細胞を作成することが可能となった。そこで、治療の対象となる患者自身の血液細胞や線維芽細胞からiPS細胞を作成し、このiPS細胞由来の細胞や組織を治療に用いる、自己iPS細胞をベースとする再生医療の実用化が検討されている。しかしながら、自己iPS細胞を医療応用するためには、治療を開始する前に、iPS細胞樹立と治療用細胞作成を行なう必要がある。このための細胞調整に要する期間が長くなるために、対象疾患によっては、細胞調整のための待機時間により治療のタイミングを逸してしまうこともありうる。また、個別の細胞調整には非常に高額な費用が必要となる。さらに、移植細胞からがんが発生する造腫瘍性の危険性に関しては、しばしば見逃されるところであるが、自己由来の細胞であるために免疫学的な拒絶による安全性担保というメカニズムが働かない、というリスクがあることを認識しておくことも重要である。

自己iPS細胞を用いた再生医療に伴うこのような欠点を補う目的で、京都大学iPS細胞研究所においてHLAハプロタイプホモ接合iPS細胞の治療用細胞バンク(iPS細胞ストック)の構築が進められている。これは、HLA-A-B-DRBにおいて形成されているハプロタイプのうち、日本人手段に置いて頻度の高いものの、ホモ接合のiPS細胞を作成し、バンキングするものである。

迅速な治療用細胞の提供が可能であることや経済性から、医療技術としての普及を考慮するとiPS細胞ストック由来のHLA適合アロiPS細胞は非常に有益である。しかしながら、iPS細胞ストックには、低頻度のHLAハプロタイプに関しては、確率的にホモ接合ドナーの確保が期待できない、という問題が残されている。すなわち、低頻度HLAハプロタイプ保持者に関しては、iPS細胞ストックではカバーされないため、治療を受けることができないことが予想される。本研究グループでは、iPS細胞を用いた細胞医療の実現化に向けて組織不適合の問題を解決することを目的としている。本研究では、低頻度HLAハプロタイプ問題の解決法として、iPS細胞においてHLA遺伝子あるいはHLA分子の細胞表面への発現に関与する遺伝子を改変することにより、iPS細胞ストックを補完するiPS細胞を作成する技術を開発することを目標としている。

A. 研究目的

本計画は、iPS細胞による再生医療の実用化に資するための免疫制御技術を開発することを研究目標としている。現在、iPS細胞を用いた再生医療の実用化に資する目的で、HLAハプロタイプホモ接合の細胞ドナーに由来するiPS細胞ストックの構築が進められている。しかしながら、日本人集団のうち低頻度HLAハプロタイプのみ保持者は、iPS細胞ストックではカバーされないことが予想されている。ところで、同種異系(アロ)移植における拒絶反応においては、HLAクラスIが主要な標的となる。HLAクラスIは、 α 鎖、 β 2ミク

ログロブリン、抗原ペプチドの3量体を形成し細胞表面に提示される。MHCクラスI経路へ抗原ペプチドを供給するペプチドトランスポーター(TAP)を欠損する細胞、あるいは、 β 2ミクログロブリン(β 2M)欠損細胞では、MHCクラスIの細胞膜上の発現レベルが著しく低下し、T細胞による認識を回避する。これまでに、本研究グループでは、国際的にも独自性の高い研究として、マウスおよびヒト細胞においてTAP遺伝子を改変し、組織不適合性問題にアプローチしてきた。そこで、本研究では、これまでの技術的基盤を生かして、iPS細胞ストックを補完するシステムを開発する。

平成26年度の研究では、ヒト細胞および非ヒト霊長類細胞においてMHC遺伝子を改変する技術の開発、iPS細胞に由来する樹状細胞および心筋細胞を用いたアロ免疫反応性の評価法と移植後の生着を観察するためのマウスモデルの樹立、マイナー抗原不適合による拒絶に対応するためのiPS細胞由来ミエロイド系細胞による免疫制御法の開発、GMP準拠培養によるヒトiPS細胞由来のミエロイド細胞の大量生産システムの開発を行なうことを目的とした。

さらに、iPS細胞由来の増殖性ミエロイド細胞を用いた悪性腫瘍に対する免疫細胞療法の実用化に向けて、GMP対応システムによる、分化誘導培養および大量増殖培養などの検討も行った。

今日の医療では対応不可能な様々な難治性疾患に対する再生医療の実現と普及は、厚生労働行政上の重要課題である。本研究の成果は、iPS細胞ストックを基盤とした再生医療に付随する組織不適合（免疫拒絶）と腫瘍発生に関する問題を解決し、低コストで、かつ、より安全に治療を実施できる技術を提供するものである。

iPS細胞におけるHLA関連遺伝子改変技術により、iPS細胞ストックでカバーできないことが予想される低頻度HLA型に対応できるようになれば、HLA型にかかわらず全ての患者が、事前作成されたiPS細胞由来を用いた再生医療を受けることが可能となる。また、自己iPS細胞による再生医療の場合に生じる腫瘍発生の問題を回避することが可能となる。さらに、iPS細胞ストックを用いたがん免疫細胞療法を実現化する際に直面する免疫学的排除の問題を解決し、広く応用可能ながん免疫細胞療法の開発に資することができる。

本研究で開発する技術は、iPS細胞由来細胞の臨床応用の幅を拡げるだけでなく、iPS細胞の腫瘍化抑制ペプチドワクチン療法自体が膨大な収益に繋がり、我が国の製薬業界の産業活性化、輸出産業の創出にも貢献できることは疑う余地がなく、厚生労働行政の課題に合致するものである。

B. 研究方法

研究代表者は、これまでの研究において、iPS細胞からミエロイド系血液細胞を大量生産する技術（iPS-ML技術）を開発している。この方法は、ヒトiPSを分化誘導することによりミエロイド系血液細胞（iPS-MC）を作製するステップ、および、このiPS-MCにレンチウイルスベクターを用いて細胞増殖因子（cMYCおよびBMI1など）を導入するステップからなる。本研究では、iPS細胞におけるHLA遺伝子改変を行なうことを最終目標としているが、iPS細胞は非常に脆弱であり、遺伝子改変技術を開発する段階では、このiPS-MLにいいHLAあるいはHLA関連遺伝子の標的破壊を行なうことを当面の目標とする。本年度の研究では、レンチウイルスベクターを用いてiPS-MLへの遺伝子改変を行なう技術を開発するべく検討を行った。レンチウイルスベクターは、情報に従い、293T細胞への発現プラスミドベクター（CSIIEF: 理化学研究所 三好浩之博士より分与を受けたもの）およびpackagingプラスミドの導入と超遠心法によるウイルス回収により作製した。

（倫理面への配慮）

動物を用いる実験においては「動物愛護管理法」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を踏まえ、各施設における動物取扱いの取り決めを遵守して、事前に各施設における動物実験委員会承認を得た後に行う。

遺伝子組換え実験については、熊本大学の遺伝子組換え実験委員会の承認を得た研究計画に沿って実施した。また、遺伝子改変動物の取り扱いについては「カルタヘナ法」を順守し、動物実験委員会および遺伝子組換え実験委員会の審査を受けて実施する。

熊本大学大学院生命科学研究部では、教育研究に関わる生命倫理ならびに安全管理に関する問題を審議して、これらが適切に遂行されるように、倫理審査委員会が設置され規則が整備されている。本研究において、倫理審査委員会の承認が必要な研究においては、各施設の倫理審査委員会に研究計画書を提出して承認後に行った。

C. 研究結果

ヒトiPS細胞由来のミエロイド細胞において、レ

ンチウイルスベクターによる遺伝子導入により効率的に遺伝子改変を行ないその機能を修飾する手法を確立した。さらに、Zinc Finger Nucleaseを用いた遺伝子の標的破壊により、ヒトの iPS 細胞あるいはヒト iPS 細胞由来のミエロイド細胞において、特定の遺伝子を欠失させる手法も確立した。また、人体投与可能な iPS-ML を大量生産するために、生物由来原料に適合する培養液等を用いて増殖培養を行なうための治験を得る事ができた。

D. 考察

Zinc Finger Nuclease を用いることにより、分化細胞である iPS-ML においても遺伝子の標的破壊が可能であるということを示した。この成果は、今後の、HLA 関連遺伝子の遺伝子改変技術を開発していく上で、重要な意味を有する結果であると考えている。また、人体投与可能な iPS-ML を作成するための培養条件について情報を蓄積する事ができた。

E. 結論

iPS 細胞に由来するミエロイド系血液細胞の大量生産技術を確立し、標的遺伝子改変を行なえることを確認した。さらに、Zinc Finger Nuclease を用いることによりヒト iPS 細胞に加えて、iPS 細胞由来の分化細胞である iPS-ML においても遺伝子の標的破壊が可能であることを示すことができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikeda, T., Hirata, S., Takamatsu, K., Haruta, M., Tsukamoto, H., Ito, T., Uchino, M., Ando, Y., Nagafuchi, S., Nishimura, Y., and Senju, S.: Suppression of Th1-mediated autoimmunity by embryonic stem cell-derived dendritic cells. *Plos One* 0115198, 2014
- 2) Takamatsu, K., Ikeda, T., Haruta, M., Matsumura, K., Ogi, Y., Nakagata, N., Uchino, M., Ando, Y., Nishimura, Y., and Senju, S.; Degradation of amyloid beta by

human induced pluripotent stem cell-derived macrophages expressing Neprilysin-2. *Stem Cell Research* 13: 442-453, 2014

- 3) Ishimura, R., Nagy, G., Dotu, I., Zhou, H., Yang, X-L., Schimmel, P., Senju, S., Nishimura, Y., Chuang, J.H. and Ackerman, S.L.; Ribosome stalling induced by mutation of a CNS-specific tRNA causes neurodegeneration. *Science* 345: 455-459, 2014.
- 4) Haga, E., Endo, Y., Haruta, M., Koba, C., Matsumura, K., Takamatsu, K., Ikeda, T., Nishimura, Y., and Senju, S.; Therapy of peritoneally disseminated colon cancer by TAP-deficient ES cell-derived macrophages in allogeneic recipients. *J.Immunol.* 193: 2024-2033, 2014.
- 5) Tomita, Y., Yuno, A., Tsukamoto, H., Senju, S., Kuroda, Y., Hirayama, M., Imamura, Y., Yatsuda, J., Sayem, M. A., Irie, A., Hamada A., Jono, H., Yoshida, K., Tsunoda, T, Daigo, Y., Kohrogi, H., Yoshitake, Y., Nakamura, Y., Shinohara, M. and Nishimura, Y.; LY6K-specific CD4⁺ T-cell immunity in patients with malignant tumor: Identification of LY6K long peptide encompassing both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell epitopes. *OncoImmunology* 3: e28100-1-15, 2014.
- 6) 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. (*equal contribution) Identification of CDCA1 long peptides bearing both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell epitopes: CDCA1-specific CD4⁺ T-cell

immunity in cancer patients. *Int. J. Cancer* 134, 352–366, 2014.

- 7) Senju, S., Koba, C., Haruta, M., Matsunaga, Y., Matsumura, K., Haga, E., Sasaki, Y., Ikeda, T., Takamatsu, K., and Nishimura, Y. [Author's view] Application of iPS cell-derived macrophages to cancer therapy. *OncoImmunology* 3: e27927-1-3, 2014.

学会発表

- 1) 千住覚：肝免疫・ウイルスに関する講演会。第 10 回肝免疫・ウイルス・フロンティア (Liver2014) イイノホール&カンファレンスセンター (東京都) 2014 年 4 月 5 日
- 2) 池田徳典、高松孝太郎、安東由喜雄、西村泰治、千住覚：ES 細胞由来樹状細胞 (ES-DC) を用いたマウス自己免疫疾患モデルに対する細胞治療法。第 111 回日本内科学会総会 東京国際フォーラム (東京都) 平成 26 年 4 月 11 日～13 日 (4/11 一般口演)
- 3) 千住覚：iPS 細胞由来のミエロイド細胞 (iPS-ML) によるがん治療 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、奈良県文化会館、奈良県新公会堂 東大寺総合文化センター (奈良市) 2014 年 5 月 16 日 (5/16 シンポジウム 7)
- 4) 池田徳典：多能性幹細胞由来樹状細胞を利用した実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する細胞療法。第 55 回日本神経学会学術大会 福岡国際会議場・福岡サンパレス・福岡国際センター (福岡市) 2014 年 5 月 21 日～24 日 (5/23 一般口演)
- 5) 匂坂正孝 千住覚：胃がん肝転移に対する iPS マクロファージを用いた治療。熊本大学第 1 回拠点形成研究 A 「代謝を基盤とした癌のグローバル先端研究教育拠点」発表会 山崎記念館 2014 年 6 月 30 日 (ポスター発表)
- 6) Yasuharu NISHIMURA, Yusuke TOMITA, Akira YUNO, Hirotake TSUKAMOTO, Satoru SENJU, Atsushi IRIE, Yasuhiro KURODA, Akinobu HAMADA, Hirofumi JONO, Koji YOSHIDA, Takuya TSUNODA, Yoshihiro YOSHITAKE, Yusuke NAKAMURA, Masanori SHINOHARA : Promiscuous oncoantigenic long peptides activating both tumor-reactive Th1 cells and CTLs. 第 18 回日本がん免疫学会総会 ひめぎんホール (愛媛県松山市) 2014 年 7 月 30 日～8 月 1 日 (合同シンポジウム発表)
- 7) 塚本博丈、千住覚、松村桂子、Swain Susan、西村泰治：高齢個体で増加する IL-6 は、CD4⁺T 細胞を介した抗腫瘍免疫応答を抑制する。第 18 回日本がん免疫学会総会 ひめぎんホール (愛媛県松山市) 2014 年 7 月 30 日～8 月 1 日 (7/31 一般演題 O04 バイオマーカー (II) 一般口演)
- 8) 平山真敏、富田雄介、湯野晃、塚本博丈、千住覚、Mohammad Abu Sayem、吉武義泰、福岡大喜、角田卓也、吉田浩二、中村祐輔、篠原正徳、西村泰治：癌胎児性抗原 IMP-3 由来の CTL と Th1 細胞の誘導活性を併せ持つ単一癌抗原ペプチドの同定。第 18 回日本がん免疫学会総会 ひめぎんホール (愛媛県松山市) 2014 年 7 月 30 日～8 月 1 日 (7/31 一般演題 O09 腫瘍抗原とワクチン療法 (I) 一般口演)
- 9) 今村悠哉、春田美和、富田雄介、松村桂子、池田徳典、高松孝太郎、西村泰治、千住覚：ヒトの末梢血単球の増殖誘導法を用いた樹状細胞の大量産生。第 18 回日本がん免疫学会総会 ひめぎんホール (愛媛県松山市) 2014 年 7 月 30 日～8 月 1 日 (8/1 一般演題 O17 腫瘍抗原とワクチン療法 (III) 一般口演)
- 10) 宮下梓、福島聡、千住覚、西村泰治、神人正寿、尹浩信：I 型インターフェロン遺伝子を導入した iPS 細胞由来ミエロイドラインを用いたメラノーマの免疫療法。第 18 回日本がん免疫学会総会 ひめぎんホール (愛媛県松山市) 2014 年 7 月 30 日～8 月 1 日 (8/1 一般演題 O19 抗腫瘍エフェクター細胞 (III) 一般口演)
- 11) 千住覚：iPS 細胞を用いた癌に対する免疫細胞療法。遺伝子・デリバリー研究会第 14 回夏期セミナー 阿蘇いこいの村 (阿蘇市) 2014 年 8 月 20

- 日～21日(8/20 特別講演 2)
- 12) 今村悠哉、春田美和、富田雄介、松村桂子、池田徳典、高松孝太郎、西村泰治、千住覚：HLA 拘束性 T 細胞を誘導可能な末梢血モノサイト由来樹状細胞の大量産生法の開発。第 23 回日本組織適合性学会大会 長崎大学医学部・坂本キャンパス(長崎市)2014年9月13日～15日(9/14 学術奨励賞候補口演発表)
- 13) 平山真敏、富田雄介、湯野晃、塚本博丈、千住覚、Mohammad Abu Sayem、吉武義泰、福間大喜、吉田浩二、角田卓也、中村祐輔、篠原正徳、西村泰治：癌胎児性抗原 IMP-3 由来の CTL と Th1 細胞の誘導活性を併せ持つ単一癌抗原ペプチドの同定。第 23 回日本組織適合性学会大会長崎大学医学部・坂本キャンパス(長崎市)2014年9月13日～15日(9/14 口演 2「免疫」 一般口演)
- 14) 入江厚、道端弥生、久保多津子、今村隆寿、矢津田旬二、竹田直樹、荒木喜美、江藤正俊、澁谷功、十河真司、西村泰治：HLA-DR4 トランスジェニックマウスのホモ接合体のリンパ組織形成不全と大腸炎および肺炎の発症。第 23 回日本組織適合性学会大会 長崎大学医学部・坂本キャンパス(長崎市)2014年9月13日～15日(9/14 口演 2「免疫」 一般口演)
- 15) 水上修作、Dao Huy Manh、千住覚、西村泰治、森田公一、平山謙二：ワクチン開発を目指した Dengue ウイルス抗原エピトープ予測モデル構築の基礎実験。第 23 回日本組織適合性学会大会長崎大学医学部・坂本キャンパス(長崎市)2014年9月13日～15日(9/14 ポスター2「免疫」 ポスター発表)
- 16) 千住覚：細胞治療に向けた樹状細胞の可能性。第 42 回日本臨床免疫学会総会 京王プラザホテル(東京都)2014年9月25日～27日(9/25 専門スタディフォーラム講演)
- 17) 今村悠哉、春田美和、富田雄介、松村桂子、池田徳典、高松孝太郎、西村泰治、千住覚：ヒトの末梢血単球の増殖誘導法を用いた樹状細胞の大量産生。第 73 回日本癌学会学術総会 パシ
- ィコ横浜(横浜市)2014年9月25～27日(9/25 がん免疫制御法とバイオマーカー 一般口演)
- 18) 平山真敏、富田雄介、湯野晃、塚本博丈、千住覚、MD Abu Sayem、吉武義泰、濱田哲暢、城野博史、角田卓也、中村祐輔、篠原正徳、西村泰治：癌胎児性抗原 IMP-3 由来の CTL と Th 細胞の誘導活性を併せ持つ癌抗原ペプチドの同定。第 73 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(横浜市)2014年9月25～27日(9/25 腫瘍抗原に対する T 細胞応答と応用技術 一般口演)
- 19) 湯野晃、富田雄介、平山真敏、福間大喜、吉武義泰、尾木秀直、中山秀樹、平木昭光、角田卓也、醍醐弥太郎、中村祐輔、西村泰治、篠原正徳：腫瘍関連抗原特異的な CTL と Th1 細胞を活性化する Th 細胞エピトープの同定。第 73 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(横浜市)2014年9月25～27日(9/25 抗腫瘍エフェクター細胞とその誘導(5) ポスター発表)
- 20) 千住覚、匂坂正孝、春田美和、羽賀栄理子、松村桂子、今村悠哉、池田徳典、西村泰治：ゼノグラフトモデルにおける胃がん肝転移に対する iPS-ML による治療の効果。第 73 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(横浜市)2014年9月25～27日(9/26 胃がん・抗腫瘍効果(2) 口頭発表)
- 21) 西村泰治、千住覚、Swain Susan、塚本博丈：担がん個体における IL-6 シグナルを介した CD4+T 細胞性腫瘍免疫の抑制。第 73 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(横浜市)2014年9月25～27日(9/27 悪性腫瘍と免疫系の相互作用 シンポジウム発表)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

TAP 欠損 ES 細胞由来の分化細胞による組織不適合回避に関する研究

研究分担者 福田恵一 慶應義塾大学 循環器内科 教授
関 倫久 慶應義塾大学 循環器内科 助教
岡田麻里奈 慶應義塾大学 循環器内科 助教

研究要旨

同種異系移植における拒絶反応においては、MHC クラス I が主要な標的となることが知られており、MHC クラス I 上に提示された抗原ペプチドと移植側の同種 MHC クラス I の複合体が同種移植の免疫拒絶を惹起する一因となることが知られている。MHC クラス I 経路へ抗原ペプチドを供給するペプチドトランスポーター(TAP)を欠損する細胞、あるいは、 β 2 ミクログロブリン (b2M) 欠損細胞では、MHC クラス I の細胞膜上の発現レベルが著しく低下し、T 細胞による認識を回避する。TAP あるいは b2M を欠損したマウスの多能性幹細胞に由来する分化細胞が、組織不適合性を回避し免疫抑制剤の減量を達成できれば临床上 iPS 細胞由来再生細胞の移植を受ける患者のなかでも、現在構築されている iPS ストックでカバーできない患者にとって大きな利益となる可能性が考えられる。既に当研究ではマウスにおいて TAP 欠損多能性幹細胞が適正に心筋細胞へ分化可能であり、正常心筋と同様の拍動性を有する細胞を作成可能であることを確認した。また、マウスへのタクロリムス経口投与の系を構築し、血中濃度を段階的にコントロールする実験系を作成した。今後同実験系を用いて TAP を欠損した多能性幹細胞由来の分化組織の生着性の評価を行い、将来的な臨床応用への可能性の評価を行う。

A. 研究目的

iPS 細胞による再生医療には、自己由来 iPS 細胞を用いる場合と同種 (アロ) iPS 細胞を用いる場合が想定される。本研究課題「iPS 細胞を用いた再生医療における組織不適合の解決」では、

1) TAP 欠損多能性細胞由来の分化細胞による組織不適合 (アロ免疫認識) 回避に関する研究

2) HLA 遺伝子を標的破壊、置換する技術の開発を目指した研究

3) 未分化細胞抗原を標的とする iPS 細胞再生医療における腫瘍拒絶法の検討

を実施するが、それらの研究で開発する技術の評価するためには、iPS 細胞に由来する心筋細胞を用いた評価系が必要である。

iPS 細胞に由来する心筋細胞を作成し、アロ免疫反応性の評価法、および移植後の生着を観察するためのマウスモデルの樹立を行なうとともに、自己 iPS 細胞による再生医療の場合に生じる腫瘍発生の問題を解決する手段として開発する未分化抗原を標的とするペプチドワクチンや CTL 療法による腫瘍排除の研究の評価に使用するための in vitro の評価系および in vivo マウスモデルの構築を行う。

当研究テーマでは MHC クラス I に関連した免疫拒絶の抑制による同種移植系における免疫拒絶回避の評価を行うことを目的とする。同種異系移植における拒絶反応では、MHC クラス I が主要な標的となることが知られている。さらに MHC クラス I 上に提示された抗原ペプチドと移植側の同種 MHC クラス I の複合体が同種移植の免疫拒絶を惹起する一因となることが知られている。MHC クラス I をターゲットとした免疫拒絶回避を in vitro でのマウスモデルを用いて評価する。

B. 研究方法

分化細胞への組織不適合性に対する評価として、マウス心筋細胞を用いた実験で評価を行う。iPS 細胞または ES 細胞を、浮遊培養させ、胚葉体を作成することで心筋細胞へ分化誘導する。既に TAP 欠損マウス多能性幹細胞が心筋細胞への分可能を含む多分化能を有していることを in vitro の浮遊培養分化系において確認した。今後分化誘導した心筋細胞の各種心筋細胞マーカーを発現、電気生理学的評価を進める。さらに、分化誘導した心筋細胞を他系統マウスへ移植し、その生着性を評価する。移植場

所は心臓が望ましいが、生着性の比較評価が困難である場合は体幹部への移植を考慮する。より詳細な生着性の評価および臨床応用を見据えた実験系構築のため、タクロリムス経口投与による段階的な薬剤血液濃度コントロールを可能とする系によって評価を行う。移植後 1 週～12 週の範囲で、同部を病理学的に評価し、心筋細胞の生着性、各種免疫細胞の遊走を比較し、MHC によるアロ認識反応を回避することによる移植細胞の生着性への影響を評価する。

(倫理面への配慮)

動物を用いる実験においては「動物愛護管理法」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を踏まえ、各施設における動物取扱の取り決めを遵守して、事前に各施設における動物実験委員会承認を得た後に行う。遺伝子組換え実験については、各施設の遺伝子組換え実験委員会の承認後に実施する。また、遺伝子改変動物の取り扱いについては「カルタヘナ法」を順守し、各施設における動物実験委員会および遺伝子組換え実験委員会の審査を受けて実施する。慶應大学医学部では、教育研究に関わる生命倫理ならびに安全管理に関する問題を審議して、これらが適切に遂行されるように、倫理審査委員会が設置され規則が整備されている。本研究において、倫理審査委員会の承認が必要な研究においては、各施設の倫理審査委員会に研究計画書を提出して承認後に行う。

C. 研究結果

TAP 欠損マウス ES 細胞とコントロールである ES 細胞 (E14) に対して共に hanging drop 法により分化誘導を行い、両者ともに胚葉体を形成することを確認した。これらを浮遊培養の後に接着培養へ切り替え、観察を続けたところ両者ともに拍動する心筋細胞塊の出現を認めた。また、両者のアロ移植における細胞の生着性の評価を目的として、マウスに対するタクロリムス投与量を調整し、タクロリムス経口投与による段階的な血中濃度コントロールが可能な移植実験系を作成した。両 ES 細胞をタクロリムス血中濃度コントロール下でマウスの皮下へ注射し、奇形腫形成の有無の確認を行う。

D. 考察

TAP 欠損マウス ES 細胞とコントロールである ES 細胞 (E14) ともに *in vitro* において従来の心筋分化誘導系である hanging drop 法が応用可能であることを確認した。TAP を欠損させた細胞株においても、*in vitro* の分化系により機能的な心筋細胞を作製可能であることを確認した。今後、現在の培養系をもとにしてさらなる高効率の系の確立を試みる。また、そののちにアロ移植の実験系における生着性の評価を行う予定である。

E. 結論

TAP 欠損マウス ES 細胞は *in vitro* で機能的な心筋細胞に分化可能であり、分化細胞の組織不適合性評価の実験系に応用可能である可能性が示唆された。今後タクロリムス血中濃度を段階的に設定したマウスに対する移植実験、生着性評価を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kishino Y, Seki T, Fujita J, Yuasa S, Tohyama S, Kunitomi A, Tabei R, Nakajima K, Okada M, Hirano A, Kanazawa H, Fukuda K. Derivation of transgene-free human induced pluripotent stem cells from human peripheral T cells in defined culture conditions. *PLoS One*. 2014 May 13;9(5):e97397. doi: 10.1371/journal.pone.0097397. eCollection 2014.
- 2) Hemmi N, Tohyama S, Nakajima K, Kanazawa H, Suzuki T, Hattori F, Seki T, Kishino Y, Hirano A, Okada M, Tabei R, Ohno R, Fujita C, Haruna T, Yuasa S, Sano M, Fujita J, Fukuda K. A massive suspension culture system with metabolic purification for human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells Transl Med*. 2014 Dec;3(12):1473-83. doi: 10.5966/sctm.2014-0072. Epub 2014 Oct 29.
- 3) Tanaka A, Yuasa S, Mearini G, Egashira T, Seki T, Kodaira M, Kusumoto D, Kuroda Y, Okata S, Suzuki T, Inohara T, Arimura T, Makino S, Kimura K, Kimura A, Furukawa T, Carrier L, Node K, Fukuda K. Endothelin-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector variability in hypertrophic cardiomyopathy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc*. 2014 Nov 11;3(6):e001263. doi: 10.1161/JAHA.114.001263.
- 4) Egashira T, Yuasa S, Tohyama S, Kuroda Y, Suzuki T, Seki T, Fukuda K. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell Models: Characterization of iPS Cell-Derived Cardiomyocytes. *Methods Mol Biol*. 2014 Dec 18.
- 5) Seki T, Fukuda K. Methods of induced pluripotent stem cells for clinical application.