

201438076A

厚生労働科学研究委託費
革新的がん医療実用化研究事業

(委託業務題目)

iPS 細胞ストックを基盤とする進行胃がんに対する
免疫細胞療法の開発

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 千住 覚

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究
委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
による委託業務として、国立大学法人熊本大学
が実施した平成26年度「iPS細胞ストックを
基盤とする進行胃がんに対する免疫細胞療法
の開発」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

iPS 細胞ストックを基盤とする進行胃がんに対する免疫細胞療法の開発 ----- 3

千住 覚 熊本大学大学院生命科学研究部免疫識別学分野

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. iPS-ML 生産技術の開発 ----- 21

千住 覚 熊本大学大学院生命科学研究部免疫識別学分野
西村 泰治 熊本大学大学院生命科学研究部免疫識別学分野

2. iPS-ML における遺伝子改変技術の開発 ----- 27

千住 覚 熊本大学大学院生命科学研究部免疫識別学分野
西村 泰治 熊本大学大学院生命科学研究部免疫識別学分野

3. マウスモデルを用いた抗腫瘍効果の検討 -1 ----- 30

千住 覚 熊本大学大学院生命科学研究部免疫識別学分野
馬場 秀夫 熊本大学大学院生命科学研究部消化器外科学分野

マウスモデルを用いた抗腫瘍効果の検討 -2 ----- 35

植村 靖史 国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター

4. 非ヒト霊長類個体を用いた前臨床研究の実施 ----- 39

千住 覚 熊本大学大学院生命科学研究部免疫識別学分野
西村 泰治 熊本大学大学院生命科学研究部免疫識別学分野

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 41

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 45

I . 委託業務成果報告（総括）

iPS 細胞ストックを基盤とする進行胃がんに対する免疫細胞療法の開発

業務主任者 千住 覚 熊本大学大学院生命科学研究部 准教授

研究要旨

本研究グループでは、ヒトの iPS 細胞からミエロイド系血液細胞(iPS-ML)を大量に作製する方法を開発している。我々の手法は、ヒトの樹状細胞あるいはマクロファージの大量生産を可能とする世界発の技術である。iPS-ML は、生体内に本来存在するマクロファージ等と同様に、腫瘍組織に対する強い指向性を有しており、ヒト由来の腫瘍細胞を体内に生着させた免疫不全マウスに投与すると腫瘍組織内への顕著な集積と浸潤が認められる。さらに、抗腫瘍効果を有する IFN-β あるいは IFN-γ を発現させた iPS-ML の投与により、ヒトの胃がんおよび膵臓癌の腹膜播種および肝転移のゼノグラフトモデルにおいて、高い治療効果を認めている。本研究は、このような非臨床 POC に基づき、iPS-ML を胃がん腹膜播種および肝転移に対する新たな免疫細胞医薬（再生医療製品）として開発するものである。本年度は、iPS-ML 作成技術の確認、培養の GMP 対応化、自動培養システムを用いた培養手順の開発、iPS-ML の遺伝子標的改変法の開発、および、マウスモデルを用いた非臨床 POC の確認等の研究を実施した。

A. 研究目的

近年の日本国内における胃がんによる死亡者数は、年間約 5 万人であり、その半数以上は腹膜播種あるいは肝転移によるものと想定される。このような進行胃がんに対し QOL を保ちつつ延命をはかれるような新たな治療法を開発することは、生命科学分野の研究開発において優先的に取り組むべき非常に重要な課題の一つである。

腹膜播種は、胃癌、膵臓癌、胆嚢癌、胆管癌、肝臓癌あるいは大腸癌等において、腹腔内に播種性に転移巣が形成される病態である。今日、腹膜播種をきたした胃癌あるいは膵臓癌等に対して根治を期待できる治療法は存在しない。また、癌の腹膜播種は、大量の腹水の貯留による呼吸困難や圧迫感、さらに、病巣形成による腸管狭窄などの腹腔内臓器の障害をともなうものであり、身体的にも精神的にも耐えられない程の多大な苦痛を生じるものである。

癌に対する従来の免疫細胞療法は、患者自身から採取した免疫細胞を使用するものであるが、担

癌患者の体内環境は一般的に免疫抑制状態にあり、免疫細胞の機能が低下している。さらに、患者個別に採取される細胞を用いるため規格化が困難であり、また、作製費用も非常に高額となる。一方、iPS-ML は、iPS 細胞ストック由来の HLA 適合 iPS 細胞を用いることによりロット生産が可能であり、さらに、自動培養装置を用いた大量生産により製造コストの大幅な削減が可能である。

本年度は、iPS-ML 作成技術の確認、培養の GMP 対応化、自動培養システムを用いた培養手順の開発、iPS-ML の遺伝子標的改変法の開発、マウスモデルを用いた非臨床 POC の確認、および、非ヒト霊長類（カニクイザル）の多能性幹細胞からの iPS-ML 相当細胞作成、等の研究を実施した。

B. 研究方法

本年度の研究では、人体投与可能な iPS-ML を作成する方法を開発するべく、培養液や培養手技その他、様々な試行錯誤を行なって方法の改善を行った。具体的には、GMP（Good Manufacturing

procedure) 準拠製造として市販されている培養液、血清、培養液サプリメント、細胞解離液等を使用し、細胞の分化増殖に関する検討を行なった。

また、非臨床 POC を得るべく、ゼノグラフト(異種腫瘍移植)、すなわち、ヒト腫瘍細胞を免疫不全マウス(SCID マウス)の腹腔内へ移植するモデルを作成し、薬効評価を行った。腫瘍細胞へは、遺伝子導入により、発光タンパクであるホタルルシフェラーゼ(Firefly Luciferase)を発現させた。腫瘍細胞を移植後のマウス体内での腫瘍増殖は、バイオ発光イメージング装置を用いてモニタリングした。

また、胃がん患者の腹腔内あるいは癌組織中から分離された癌細胞を培養することを試みた。診断あるいは治療の目的で採取された腹腔洗浄液および切除された腫瘍組織から分離した癌細胞を、短い期間(一ヶ月以内程度)の培養により増殖させたものを用いて、治療効果の評価に用いることを計画した。腹腔内転移が疑われるがん患者に対して、治療方針を決定するための情報を得る目的で、腹腔鏡による観察および腹腔洗浄液の細胞診および組織の採取が実施される。本研究では、事前に本研究計画への協力の同意が得られた場合において、腹腔洗浄液中の腫瘍細胞、あるいは、切除組織中の腫瘍細胞の一部を研究に用いる。また、各種の悪性腫瘍の切除手術に際して、手術前に本研究計画への協力の同意が得られた場合において、切除された腫瘍組織の一部から腫瘍細胞を分離した。組織中腫瘍細胞は、組織を細切した後、酵素処理を行なうことにより、腫瘍細胞を遊離させた。さらに、細胞分離装置(Miltenyi Biotec 社 Gentle MACS)を用いた分離操作も試みた。また、腹腔洗浄液中または腹水中から遠心分離操作による腫瘍細胞の回収も行なった。

さらに、非ヒト霊長類を用いた非臨床安全性試験において使用することを想定して、カニクイザルの ES 細胞から iPS-ML と同等の増殖性ミエロイド細胞を作製することを試みた。カニクイザル ES 細胞からミエロイド細胞への分化誘導には、ヒト iPS 細胞からの分化誘導法と同様の手法を用

いた。

(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」、「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なった。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。

臨床検体を用いた研究においては、熊本大学生命科学研究部等倫理審査委員会へ、研究課題名(腫瘍に対する免疫細胞療法の開発)により、倫理審査申請書、研究計画書、および、ドナーへの提供依頼書等を提出し、審査を受けた。そして、委員会による承認の後、倫理審査委員会で認められた説明文書を用い、1) 研究協力の任意性と撤回の自由、2) 研究協力を要請する理由、3) 研究責任者の氏名および職名、4) 予測される研究結果と被験者の危険・不利益、5) 研究計画、方法の開示、6) 試料の匿名化、7) 研究結果の開示、8) 知的財産権、研究成果の公表、9) 試料の保管と廃棄、10) 費用負担に関する事項、11) 研究従事者の利益相反 について適切かつ十分な説明を行い、書面による試料提供への同意が得られた場合に研究を実施した。

C. 研究結果

iPS-ML を培養し治療用細胞を製造する工程において、概ね全ての培養材料(培養液、細胞解離液、ウシ血清、サプリメント)を GMP 準拠工程により製造されたもので実施可能であることを確認することができた。iPS-ML の大量生産システムを確立するべく、完全閉鎖式自動細胞培養装置を用いた培養条件の検討を行い、一度に 10^9 個以上の細胞を生産できる目処を立てることができた。さらに、自動細胞プロセッシング装置の稼働も開始

した。また、iPS-ML において、ZFN を用いた遺伝子の標的改変が可能であることを確認した。

SCID マウスへヒトの腫瘍細胞株を移植することにより進行がんのゼノグラフトモデルを作成した。このモデルを使用して iPS-ML による抗腫瘍効果の確認を行なった。

また、12名の患者由来の臨床検体を用いた研究を実施することができた。その中から、腹腔洗浄液検体1検体、および、腹水検体1検体について、腫瘍細胞の増殖を認めることができた。

カニクイザルの ES 細胞からヒト iPS-ML に類似した増殖性ミエロイド細胞 (ES-ML) を作成することができた。

D. 考察

iPS-ML を用いた進行胃がん治療技術の開発において治験を実施する前に必要とされる、培養技術の開発、遺伝子改変法、非臨床試験における POC 取得に関して成果を得た。

E. 結論

本年度の研究では、iPS-ML 作成技術の確認、培養の GMP 対応化、自動培養システムを用いた培養手順の開発、iPS-ML の遺伝子標的改変法の開発、および、マウスモデルを用いた非臨床 POC の確認等の研究を実施した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

Yoshitake, Y., Fukuma, D., Yuno, A., Hirayama, M.,

Nakayama, H., Tanaka, T., Nagata, M., Takamune, Y., Kawahara, K., Nakagawa, Y., Yoshida, R., Hirose, A., Ogi, H., Hiraki, A., Jono, H., Hamada, A., Yoshida, K., Nishimura, Y., Nakamura, Y., and Shinohara, M.; Phase II clinical trial of multiple peptide vaccination for advanced head and neck cancer patients revealed induction of immune responses and improved OS. *Clin. Cancer Res.* 21: 312-325, 2014

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 Nephrilysin-2. *Stem Cell Research* 13: 442-453, 2014

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.

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.

Kusano, S., Kukimoto-Niino, M., Satta, Y., Ohsawa, N., Uchikubo-Kamo, T., Wakiyama, M., Ikeda, M., Terada, T., Yamamoto, K., Nishimura, Y., Shirouzu, M., Sasazuki, T., and Yokoyama, S.; Structural basis for the specific recognition of the major antigenic peptide from the Japanese cedar pollen allergen Cry j 1 by HLA-DP5. *J. Mol.Biol.* 426: 3016-3027, 2014.

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.
- Inaguma, Y., Akahori, Y., Murayama, Y., Shiraiishi, K., Tsuzuki-Iba, S., Endoh, A., Tsujikawa, J., Demachi-Okamura, A., Hiramatsu, K., Saji, H., Yamamoto, Y., Yamamoto, N., Nishimura, Y., Takahashi, T., Kuzushima, K., Emi, N., and Akatsuka, Y.; Construction and molecular characterization of a T-cell receptor-like antibody and CAR-T cells specific for minor histocompatibility antigen HA-1H. *Gene Therapy* 21: 575-584, 2014.
- Ueda, S.*, Oryoji, D.*, Yamamoto K.*, Noh, J.Y., Okamura, K., Noda, M., Kashiwase, K., Kosuga, Y., Sekiya, K., Inoue, K., Yamada, H., Oyamada, A., Nishimura, Y., Yoshikai, Y., Ito, K., Sasazuki, T. (*equal contribution); Identification of independent susceptible and protective HLA alleles in Japanese autoimmune thyroid disease and their epistasis. *J Clin Endocrinol Metab.* 99: E379-383, 2014.
- 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.
- 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.
- Hiyoshi Y, Morita M, Kawano H, Otsu H, Ando K, Ito S, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Saeki H, Oki E, Ikeda T, **Baba H**, Maehara Y: Clinical Significance of Surgical Resection for the Recurrence of Esophageal Cancer After Radical Esophagectomy. *Ann Surg Oncol* 22(1):240-6, 2015.
- Arima K, Watanabe M, Iwatsuki M, Ida S, Ishimoto T, Nagai Y, Iwagami S, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Baba H: Volvulus of an ileal pouch-rectal anastomosis after subtotal colectomy for ulcerative colitis: report of a case. *Surg Today* 44(12):2382-4, 2014.
- Ishikawa S, Hayashi H, Kinoshita K, Abe M, Kuroki H, Tokunaga R, Tomiyasu S, Tanaka H, Sugita H, Arita T, Yagi Y, Watanabe M, Hirota M, Baba H: Statins inhibit tumor progression via an enhancer of zeste homolog 2-mediated epigenetic alteration in colorectal cancer. *Int J Cancer* 135(11):2528-36, 2014.
- Itoyama R, Hashimoto D, Chikamoto A, Hayashi H, Beppu T, Baba H: Hepatobiliary and Pancreatic: Sigmoidal mesenterial lymph node metastasis from pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 29(12):1953, 2014.
- Miyamoto Y, Watanabe M, Sakamoto Y, Shigaki H, Murata A, Sugihara H, Etoh K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Baba Y, Iwagami S, Yoshida N, Baba H: Evaluation of the necessity of primary tumor resection for synchronous metastatic colorectal cancer. *Surg Today* 44(12):2287-92, 2014.

- Tsukamoto M, Hashimoto D, Chikamoto A, Abe S, Ohmuraya M, Baba H: Clinical features and management of pancreatic solid pseudopapillary tumor. *Am Surg* 80(12):1212-5, 2014.
- Watanabe M, Miyata H, Gotoh M, Baba H, Kimura W, Tomita N, Nakagoe T, Shimada M, Kitagawa Y, Sugihara K, Mori M: Total Gastrectomy Risk Model: Data From 20,011 Japanese Patients in a Nationwide Internet-Based Database. *Ann Surg* 260(6):1034-9, 2014.
- Beppu T, Emi Y, Tokunaga S, Oki E, Shirabe K, Ueno S, Kuramoto M, Kabashima A, Takahashi I, Samura H, Eguchi S, Akagi Y, Natsugoe S, Ogata Y, Kakeji Y, Baba H, Maehara Y, Kyushu Study Group Of Clinical C: Liver Resectability of Advanced Liver-limited Colorectal Liver Metastases Following mFOLFOX6 with Bevacizumab (KSCC0802 Study). *Anticancer Res* 34(11):6655-62, 2014.
- Ida S, Watanabe M, Yamao T, Ishimoto T, Nagai Y, Iwatsuki M, Baba Y, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Baba H: False-positive ¹⁸F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) findings of bone metastasis from esophagogastric cancer: report of two cases. *Surg Today* 44(11):2191-4, 2014.
- Imai K, Beppu T, Yamao T, Okabe H, Hayashi H, Nitta H, Hashimoto D, Mima K, Nakagawa S, Sakamoto K, Chikamoto A, Ishiko T, Baba H: Clinicopathological and prognostic significance of preoperative serum zinc status in patients with hepatocellular carcinoma after initial hepatectomy. *Ann Surg Oncol* 21(12):3817-26, 2014.
- Toihata T, Hashimoto D, Hayashi H, Chikamoto A, Beppu T, Baba H: Intraoperative gastrojejunoscopy-assisted fistulojejunostomy for postoperative pancreatic fistula. *Asian J Endosc Surg* 7(4):311-3, 2014.
- Shahjalal HM, Shiraki N, Sakano D, Kikawa K, Ogaki S, Baba H, Kume K, Kume S: Generation of insulin-producing beta-like cells from human iPS cells in a defined and completely xeno-free culture system. *J Mol Cell Biol* 6(5):394-408, 2014.
- Ishimoto T, Baba H: Targeting cancer stem cells in gastric cancer *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy* 2014(4):123-9, 2014.
- Baba Y, Murata A, Watanabe M, Baba H: Clinical implications of the LINE-1 methylation levels in patients with gastrointestinal cancer. *Surg Today* 44(10):1807-16, 2014.
- Ida S, Watanabe M, Karashima R, Imamura Y, Ishimoto T, Baba Y, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H: Changes in Body Composition Secondary to Neoadjuvant Chemotherapy for Advanced Esophageal Cancer are Related to the Occurrence of Postoperative Complications After Esophagectomy. *Ann Surg Oncol* 21(11):3675-9, 2014.
- Ikuta Y, Chikamoto A, Hayashida S, Hashimoto D, Eto T, Beppu T, Asonuma K, Inomata Y, Baba H: Cancer of the head of the pancreas treated with pancreaticoduodenectomy with reconstruction of the replaced common hepatic artery. *Int Canc Conf J* 3(4):264-7, 2014.
- Nagai Y, Beppu T, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Hayashi H, Nitta H, Imai K, Masuda T, Okabe H, Hirashima K, Imamura Y, Baba Y, Chikamoto A, Baba H: Carcinoembryonic Antigen Half-life Is an Early Predictor of Therapeutic Effects in Induction Chemotherapy for Liver Metastases from Colorectal

Cancer. *Anticancer Res* 34(10):5529-35, 2014.

Nitta H, Murakami Y, Wada Y, Eto M, Baba H, Imamura T: Cancer cells release anaphylatoxin C5a from C5 by serine protease to enhance invasiveness. *Oncol Rep* 32(4):1715-9, 2014.

Sakamoto Y, Nakagawa S, Abe S, Hashimoto D, Chikamoto A, Watanabe M, Beppu T, Baba H: Widespread portal venous thrombosis in a patient with pancreatic cancer. *Int Canc Conf J* 3(4):237-41, 2014.

Yoshida M, Shiraishi S, Sakamoto F, Beppu T, Utsunomiya D, Okabe H, Tomiguchi S, Baba H, Yamashita Y: Assessment of hepatic functional regeneration after hepatectomy using Tc-GSA SPECT/CT fused imaging. *Ann Nucl Med* 28(8):780-8, 2014.

Itoyama A, Hashimoto D, Tsutsumi H, Chikamoto A, Beppu T, Sasaki Y, Baba H: Hemorrhage from the pancreatic cut end into the jejunum after binding pancreaticojejunostomy: report of a case. *Surg Today* 44(9):1754-6, 2014.

Matsubara N, Miyata H, Gotoh M, Tomita N, Baba H, Kimura W, Nakagoe T, Simada M, Kitagawa Y, Sugihara K, Mori M: Mortality after common rectal surgery in Japan: a study on low anterior resection from a newly established nationwide large-scale clinical database. *Dis Colon Rectum* 57(9):1075-81, 2014.

Nakagawa S, Beppu T, Okabe H, Sakamoto K, Kuroki H, Mima K, Nitta H, Imai K, Hayashi H, Sakamoto Y, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Watanabe M, Baba H: Triple positive tumor markers predict recurrence and survival in early stage hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 44(9):964-74,

2014.

Suzuki M, Ikeda K, Shiraishi K, Eguchi A, Mori T, Yoshimoto K, Shibata H, Ito T, Baba Y, Baba H: Aberrant methylation and silencing of expression in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* 8(3):1025-30, 2014.

Watanabe M, Baba Y, Yoshida N, Ishimoto T, Nagai Y, Iwatsuki M, Iwagami S, Baba H: Outcomes of Preoperative Chemotherapy with Docetaxel, Cisplatin, and 5-Fluorouracil Followed by Esophagectomy in Patients with Resectable Node-Positive Esophageal Cancer. *Ann Surg Oncol* 21(9):2838-44, 2014.

Ikuta Y, Takamori H, Sakamoto Y, Hashimoto D, Chikamoto A, Kuroki H, Sakata K, Sakamoto K, Hayashi H, Imai K, Nitta H, Hirota M, Kanemitsu K, Beppu T, Baba H: The modified Glasgow Prognostic Score (mGPS) is a good predictor of indication for palliative bypass surgery in patients with unresectable pancreatic and biliary cancers. *Int J Clin Oncol* 19(4):629-33, 2014.

Kuroki H, Hayashi H, Okabe H, Hashimoto D, Takamori H, Nakahara O, Nakagawa S, Fukushima Y, Chikamoto A, Beppu T, Hirota M, Iyama K, Baba H: EZH2 Is Associated with Malignant Behavior in Pancreatic IPMN via p27Kip1 Downregulation. *PLOS ONE* 9(8):e100904, 2014.

Miyamoto Y, Sakamoto Y, Yoshida N, Baba H: Efficacy of S-1 in colorectal cancer. *Expert Opin Pharmacother* 15(12):1761-70, 2014.

Okabe H, Beppu T, Chikamoto A, Hayashi H, Yoshida M, Masuda T, Imai K, Mima K, Nakagawa S, Kuroki H, Nitta H, Ishiko T, Hashimoto D, Yamashita Y, Baba H: Remnant liver volume-based predictors of postoperative liver dysfunction after

hepatectomy: analysis of 625 consecutive patients from a single institution. *Int J Clin Oncol* 19(4):614-21, 2014.

Ozaki N, Hashimoto D, Ikuta Y, Chikamoto A, Takamori H, Baba H: Definitive diagnosis of a duplicate gallbladder can only be made intraoperatively: report of a case. *Clin J Gastroenterol* 7(4):338-41, 2014.

Takeuchi H, Miyata H, Gotoh M, Kitagawa Y, Baba H, Kimura W, Tomita N, Nakagoe T, Shimada M, Sugihara K, Mori M: A risk model for esophagectomy using data of 5354 patients included in a Japanese nationwide web-based database. *Ann Surg* 260(2):259-66, 2014.

Beppu T, Sakamoto Y, Imai K, Hayashi H, Nitta H, Miyamoto Y, Chikamoto A, Watanabe M, Baba H: A patient with colorectal liver metastases with para-aortic regional lymph node metastases who survived for 7 years. *Int Canc Conf J* 3(3):153-7, 2014.

Hashimoto D, Chikamoto A, Ohmuraya M, Sakata K, Miyake K, Kuroki H, Watanabe M, Beppu T, Hirota M, Baba H: Pancreatic cancer in the remnant pancreas following primary pancreatic resection. *Surg Today* 44(7):1313-20, 2014.

Ishimoto T, Sawayama H, Sugihara H, Baba H: Interaction between gastric cancer stem cells and the tumor microenvironment. *J Gastroenterol* 49(7):1111-20, 2014.

Miyamoto Y, Ishii T, Tashiro J, Satoh T, Watanabe M, Baba H, Yamaguchi S: Effects of obesity on the outcome of laparoscopic surgery for colorectal cancer. *Surg Today* 44(7):1293-9, 2014.

Nakamura K, Watanabe M, Nagai Y, Imamura Y,

Iwagami S, Iwatsuki M, Ishimoto T, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Baba H: Cervical intramedullary spinal cord metastasis from esophageal cancer. *Int Canc Conf J* 3(3):161-4, 2014.

Oki E, Emi Y, Kusumoto T, Sakaguchi Y, Yamamoto M, Sadanaga N, Shimokawa M, Yamanaka T, Saeki H, Morita M, Takahashi I, Hirabayashi N, Sakai K, Orita H, Aishima S, Kakeji Y, Yamaguchi K, Yoshida K, Baba H, Maehara Y: Phase II Study of Docetaxel and S-1 (DS) as Neoadjuvant Chemotherapy for Clinical Stage III Resectable Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol* 21(7):2340-6, 2014.

Sato H, Taketomi Y, Ushida A, Isogai Y, Kojima T, Hirabayashi T, Miki Y, Yamamoto K, Nishito Y, Kobayashi T, Ikeda K, Taguchi R, Hara S, Ida S, Miyamoto Y, Watanabe M, Baba H, Miyata K, Oike Y, Gelb MH, Murakami M: The Adipocyte-Inducible Secreted Phospholipases PLA2G5 and PLA2G2E Play Distinct Roles in Obesity. *Cell Metab* 20(1):119-32, 2014.

Komori H, Beppu T, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Hayashi H, Imai K, Nitta H, Watanabe M, Baba H: Irinotecan Plus S-1 Followed by Hepatectomy for a Patient with Initially Unresectable Colorectal Liver Metastases, Who Showed Severe Drug Rash with Oxaliplatin Plus 5-FU and Leucovorin (FOLFOX). *Case Rep Gastrointest Med* 2014 Article ID 906759, 4 pages, 2014.

Beppu T, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Imai K, Nitta H, Hayashi H, Chikamoto A, Watanabe M, Ishiko T, Baba H: Chemotherapy and targeted therapy for patients with initially unresectable colorectal liver metastases, focusing on conversion hepatectomy and long-term survival. *Ann Surg Oncol* 21 (S3):405-13, 2014.

- Hashimoto D, Chikamoto A, Ohmuraya M, Hirota M, Baba H: Pancreaticodigestive anastomosis and the postoperative management strategies to prevent postoperative pancreatic fistula formation after pancreaticoduodenectomy. *Surg Today* 44(7):1207-13, 2014.
- Hirashima K, Uchino R, Kume S, Iyama K, Honda Y, Asato T, Baba H: Intra-abdominal mucinous adenocarcinoma of urachal origin: report of a case. *Surg Today* 44(6):1156-60, 2014.
- Hirashima K, Watanabe M, Shigaki H, Imamura Y, Ida S, Iwatsuki M, Ishimoto T, Iwagami S, Baba Y, Baba H: Prognostic significance of the modified Glasgow prognostic score in elderly patients with gastric cancer. *J Gastroenterol* 49(6):1040-6, 2014.
- Kobayashi H, Miyata H, Gotoh M, Baba H, Kimura W, Kitagawa Y, Nakagoe T, Shimada M, Tomita N, Sugihara K, Mori M: Risk model for right hemicolectomy based on 19,070 Japanese patients in the National Clinical Database. *J Gastroenterol* 49(6):1047-55, 2014.
- Okabe H, Delgado E, Lee JM, Yang J, Kinoshita H, Hayashi H, Tsung A, Behari J, Beppu T, Baba H, Monga SP: Role of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 as a biomarker in hepatocellular carcinoma. *PLOS ONE* 9(6):e98817, 2014.
- Sawayama H, Kanemitsu K, Okuma T, Inoue K, Yamamoto K, Baba H: Safety of polypropylene mesh for incarcerated groin and obturator hernias: a retrospective study of 110 patients. *Hernia* 18(3):399-406, 2014.
- Baba Y, Watanabe M, Yoshida N, Baba H: Neoadjuvant treatment for esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastrointest Oncol* 6(5):121-8, 2014.
- Yoshida N, Watanabe M, Baba Y, Ishimoto T, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Karashima R, Baba H: Influence of preoperative docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil on the incidence of complications after esophagectomy for resectable advanced esophageal cancer. *Dis Esophagus* 27(4):374-9, 2014.
- Beppu T, Nitta H, Tsukamoto M, Imai K, Hayashi H, Okabe H, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Baba H: Percutaneous radiofrequency ablation-assisted laparoscopic hepatectomy. *Asian J Endosc Surg* 7(2):188-92, 2014.
- Ida S, Oki E, Ando K, Kimura Y, Yamashita Y, Saeki H, Ikegami T, Yoshizumi T, Watanabe M, Morita M, Shirabe K, Kusumoto T, Ikeda T, Baba H, Maehara Y: Pure laparoscopic right-sided hepatectomy in the semi-prone position for synchronous colorectal cancer with liver metastases. *Asian J Endosc Surg* 7(2):133-7, 2014.
- Imai K, Emi Y, Iyama KI, Beppu T, Ogata Y, Kakeji Y, Samura H, Oki E, Akagi Y, Maehara Y, Baba H, study KSGoCCa: Splenic volume may be a useful indicator of the protective effect of bevacizumab against oxaliplatin-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome. *Eur J Surg Oncol* 40(5):559-66, 2014.
- Ishimoto T, Sugihara H, Watanabe M, Sawayama H, Iwatsuki M, Baba Y, Okabe H, Hidaka K, Yokoyama N, Miyake K, Yoshikawa M, Nagano O, Komohara Y, Takeya M, Saya H, Baba H: Macrophage-derived reactive oxygen species suppress miR-328 targeting CD44 in cancer cells and promote redox adaptation. *Carcinogenesis* 35(5):1003-11, 2014.

Okabe H, Beppu T, Hayashi H, Mima K, Nakagawa S, Kuroki H, Imai K, Nitta H, Masuda T, Hashimoto D, Chikamoto A, Watanabe M, Ishiko T, Yoshida M, Yamashita Y, Baba H: Rank classification based on the combination of indocyanine green retention rate at 15 min and (99m)Tc-DTPA-galactosyl human serum albumin scintigraphy predicts the safety of hepatic resection. *Nucl Med Commun* 35(5):478-83, 2014.

Masuda T, Kuramoto M, Shimada S, Ikeshima S, Yamamoto K, Nakamura K, Baba H: Splanchnicectomy for pancreatic cancer pain. *BioMed Res Int* 2014:941726, 2014.

Baba Y, Watanabe M, Yoshida N, Kawanaka K, Yamashita Y, Baba H: Radiofrequency ablation for pulmonary metastases from gastrointestinal cancers. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 20(2):99-105, 2014.

Ida S, Morita M, Hiyoshi Y, Ikeda K, Ando K, Kimura Y, Saeki H, Oki E, Kusumoto T, Yoshida S, Nakashima T, Watanabe M, Baba H, Maehara Y: Surgical resection of hypopharynx and cervical esophageal cancer with a history of esophagectomy for thoracic esophageal cancer. *Ann Surg Oncol* 21(4):1175-81, 2014.

Ikeda O, Nakasone Y, Yokoyama K, Inoue S, Takamori H, Baba H, Yamashita Y: Successful treatment of mesenteric varices by retrograde transvenous obliteration by the delivery of N-butyl-2-cyanoacrylate via an abdominal wall vein. *Cardiovasc Intervent Radiol* 37(2):533-6, 2014.

Kaida T, Chikamoto A, Kiyozumi Y, Nitta H, Imai K, Nakahara O, Ikuta Y, Doi K, Ishiko T, Takamori H, Beppu T, Baba H: Neuroendocrine tumor in the Glissonian pedicle of the hepatic hilum. *Int Canc Conf J* 3(2):72-6, 2014.

Kimura W, Miyata H, Gotoh M, Hirai I, Kenjo A, Kitagawa Y, Shimada M, Baba H, Tomita N, Nakagoe T, Sugihara K, Mori M: A pancreaticoduodenectomy risk model derived from 8575 cases from a national single-race population (Japanese) using a web-based data entry system: the 30-day and in-hospital mortality rates for pancreaticoduodenectomy. *Ann Surg* 259(4):773-80, 2014.

Murata A, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Yoshida N, Oki E, Morita M, Nakao M, Baba H: IGF2 DMR0 methylation, loss of imprinting, and patient prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 21(4):1166-74, 2014.

Watanabe M, Baba Y, Yoshida N, Ishimoto T, Sakaguchi H, Kawasuji M, Baba H: Modified gastric pull-up reconstructions following pharyngolaryngectomy with total esophagectomy. *Dis Esophagus* 27(3):255-61, 2014.

2. 学会発表

Hirotake Tsukamoto, Satoru Senju, Susan L. Swain, Yasuharu Nishimura : Age associated increase of IL-6 dampens anti-tumor immune responses through attenuating Th1 differentiation of tumor-specific CD4 T cells. Immunology 2014 (The American Association of Immunologists Annual Meeting), David L. Convention Center (Pittsburgh), May2-6 2014, USA (5/5 ポスター発表)

Yasuharu Nishimura : Long peptide-based cancer immunotherapy targeting both tumor antigen-specific CTLs and Th1 cells. 12th CIMT (Cancer Immunotherapy) Annual Meeting, Rheingold Halle Congress Center (Mainz), May6-8 2014, 2014, Germany (5/6 Plenary Session1 講演)

Yasuharu Nishimura : Cancer Immunotherapy Using Novel Tumor-associated Antigenic Peptides and Human iPS Cell-derived Dendritic Cells. 45th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund, Palace Hotel Tokyo (Tokyo), November 18-20, 2014, Japan (11/20 がんワクチン (2) 口頭発表)

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

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)

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)

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)

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)

塚本博丈 : 炎症性サイトカイン IL-6 による T 細胞性腫瘍免疫の抑制。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 (口演)

平山真敏 : がん抗原ペプチド療法の Translational Research。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)

匂坂正孝 : 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)

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)

塚本博丈、千住覚、松村桂子、Swain Susan、西村泰治 : 老齢個体で増加する 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)

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、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）

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）

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）

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）

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）

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）

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）

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）

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）

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）

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）

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）

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：ゼノグラフィ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）

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）

Tsukamoto, H., Senju, S., Swain, S., Nishimura, Y. IL-6-mediated environmental conditioning of defective Th1 differentiation dampens anti-tumor immune responses in old age. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 京都国際会議場（京都市）2014年12月10日～12日（12/10 口頭発表 ワークショップ 14 Immune Tolerance and Immune Suppression 2-Tumor, Transplantation and Feto-material immunity）

Irie, A., Michibata, Y., Kubo, T., Imamura, T., Takeda, N., Araki, K., Shibuya, I., Sogo, S.,

Nishimura, Y. Novel HLA-DR4 transgenic mice that develop severe colitis and pneumonia with serious defects in lymphoid organs. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 京都国際会議場（京都市）2014年12月10日～12日（12/10 口頭発表 ワークショップ 16 Mucosal immunosurveillance and vaccine）

Haga, E., Endo, Y., Haruta, M., Koba, C., Matsumura, K., Takamatsu, K., Ikeda, T., Nishimura, Y., Senju, S. Therapy of peritoneally disseminated colon cancer by TAP-deficient ES cell-derived macrophages in allogenic recipients in a mouse model. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 京都国際会議場（京都市）2014年12月10日～12日（12/11 口頭発表 ワークショップ 19 Tumor-induced immunosuppression and immunotherapy against cancer）

Hirayama, M., Tomita, Y., Yuno, A., Mohammad Abu Sayem., Tsukamoto, H., Senju, S., Yoshitake, Y., Shinohara, M., Nishimura, Y. An IMP-3-derived long peptide encompassing CTL and promiscuous Th cell epitopes can be efficiently cross-presented by using a novel liposome. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 京都国際会議場（京都市）2014年12月10日～12日（12/12 口頭発表 ワークショップ 40 Human Immunology 2）

西村泰治：悪性腫瘍に対するトランスレーショナルリサーチ 当科における免疫・遺伝子治療の取り組み。生命科学研究部附属臨床研究支援センター／附属病院総合臨床研究部キックオフシンポジウム 臨床医学教育研究センター1階奥窪記念ホール（熊本市）2015年3月6日（基調講演1）

西村泰治：iPS細胞を用いた免疫再生医療による悪性腫瘍に対する新規治療法開発。生命科学研究部附属臨床研究支援センター／附属病院総合臨床研究部キックオフシンポジウム 熊本大学・総

合臨床研究部および臨床研究支援センター支援
シーズ研究紹介 臨床医学教育研究センター1階
奥窪記念ホール（熊本市）2015年3月6日（支
援シーズ研究II）

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

II. 委託業務成果報告（業務項目）

iPS-ML 生産技術の開発

業務主任者 千住 覚 熊本大学大学院生命科学研究部 准教授

担当責任者 西村 泰治 熊本大学大学院生命科学研究部 教授

研究要旨

本研究においては、iPS-ML 技術を基盤とする細胞医薬品を再生医療製品として実用化し広く社会に普及させることを目標としている。まずは、第 I 相試験を実施するために十分な供給能力を有する細胞生産体制を整備する必要がある。そのために、完全閉鎖系かつ自動培養により iPS-ML を大量培養するシステムを確立することをめざした。熊本大学生命科学研究部内の再生医療や細胞医療等の医療用途を目指した細胞培養設備(CPC : Cell Processing Center)には、自動培養装置と自動細胞プロセス装置が設置されている。本年度の研究においては、医薬品グレードでの iPS-ML 製造工程を確立すべく、培養方法および培養工程で使用する様々な原材料をこれまでの研究グレード（実験室グレード）のものから医薬品グレード（GMP: Good Manufacturing Practice）製造のもので置換することができるかどうか試行錯誤を行なった。さらに、製造工程の確定を目指して、細胞培養装置の条件検討および濃縮洗浄工程の効率化をはかるべく、自動培養装置と自動細胞プロセス装置に関し様々設定条件を試み、培養密度、振盪培養器の振盪速度、pH その他の培養条件を検討した。

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞由来のミエロイド系細胞にレンチウイルスベクターを用いて cMYC+BMI1、cMYC+EZH2 等の増殖因子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（マクロファージおよび樹状細胞の前駆細胞）を作製することができる。我々は、これを、iPS-ML(iPS cell-derived myeloid cell line)と名付けている。iPS-ML は、以下のような特性を有している。

- 1) M-CSF の存在化で長期に亘って増殖することが可能であり、大量のマクロファージを単純な培養操作により作製できる。また、遺伝的改変を施すことによってその機能を人為的に修飾することが可能である。
- 2) ヒトの腫瘍細胞を生着させた scid マウスに iPS-ML を投与すると、腫瘍局所に集積し腫瘍組織内へ浸潤する。
- 3) IL-4 の存在下で培養すると、数日で樹状細胞 (ML-DC) へ分化する。

熊本大学生命科学研究部 GMP 準拠細胞培養設備 (CPC : Cell Processing Center)には、自動培養装置と自動細胞プロセス装置が設置されている。本研究においては、がんに対して治療効果を有する iPS-ML を実用化し、医薬品医療機器法において定義されている再生医療製品として広く社会に普及させることを目標としている。そのためには、これらの装置を稼働し、完全閉鎖系かつ自動培養により iPS-ML を大量培養するシステムを完成させ、第 I 相試験を実施するために十分な供給能力を有する細胞生産体制を整備する必要がある。

B. 研究方法

iPS-ML 作製法は、以前に開発した方法によった。まず、ヒト iPS 細胞を血液細胞へ分化させるために、OP9 細胞をフィーダー細胞として用いた分化誘導系により培養した。分化誘導開始から 15-20 日後、分化細胞を細胞分離液を用いて回収し、非付着性の細胞を分離し、GM-CSF と M-CSF の存在下でさらに 5-7 日間培養し、CD11b 等のミエロイド/単球系のマーカーを発現する浮遊細胞

胞(iPS-MC)を得た。次に、iPS-MC へ、レンチウイルスを用いて cMYC+BMI1 を導入することにより、iPS-ML (増殖性を有するミエロイド細胞)を得た。

本年度の研究においては、医薬品グレードでの iPS-ML 製造工程を確立すべく、培養方法および培養工程で使用する様々な原材料を医薬品グレード (GMP: Good Manufacturing Practice) 製造されているもので置換することができるかどうか試行錯誤を行なった。さらに、iPS-ML の大量生産システムを確立するために、完全閉鎖式浮遊系細胞自動培養装置 (GE Healthcare WAVE25) を用いた培養を実施した。また、培養後の細胞の濃縮と洗浄を行なうために、閉鎖式自動細胞プロセッシング装置 (Miltenyi Biotec 社 Clinimacs Prodigy) を用いた培養終了後の細胞浮遊液の処理を行ない、条件を検討した。

(倫理面への配慮)

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後に実施した。

C. 研究結果

ヒト iPS-ML を大量生産するために、通常の培養フラスコから専用の培養用バッグに移行させた後、WAVE25 装置に装着して培養することを試みた。WAVE システムの設定を用いて培養条件を検討し、最終的に大量に増殖させることが可能になった。本年度の研究においては、培養密度、振盪培養器の振盪速度、pH その他の培養条件を最適化するための、種々の検討を行った。

また、洗浄濃縮装置によるプロセッシング過程において、細胞浮遊液を送液する工程、遠心分離工程、および、濃縮・洗浄工程等をコントロールするプログラムの最適化を行なった。

iPS 細胞ストックを基盤とする iPS-ML の実用化に際しては、HLA ハプロタイプ毎に細胞を大量生産しストックする方式をとるため、製造コスト削減に加えて治療用細胞の規格化が可能であり、治験による評価が可能である。本年度の研究

においては、概ね全ての培養材料を GMP 準拠工程により製造されたもので実施可能であることを確認することができた。

D. 考察

iPS-ML の作成には、分化誘導と遺伝子導入の工程が必要であり、治療用細胞を樹立するまでには、数ヶ月の期間を必要とする。しかしながら、一度樹立した後は、自動培養装置を用いた培養が可能であり、再生医療製品としての大量生産が可能な細胞であることを確認できた。今後は、さらに培養条件を改善し、より効率よくかつ安定して iPS-ML を生産するシステムを確立する必要があると考えている。

E. 結論

iPS-ML 樹立及び維持培養の手順について確認できた。iPS-ML は、非常に安定した増殖能力を有する細胞であり、長期間 (2-3ヶ月) の培養を行なっても性質が保持される。また、適切な条件を設定すれば、自動培養装置による大量生産も可能である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

Yoshitake, Y., Fukuma, D., Yuno, A., Hirayama, M., Nakayama, H., Tanaka, T., Nagata, M., Takamune, Y., Kawahara, K., Nakagawa, Y., Yoshida, R., Hirose, A., Ogi, H., Hiraki, A., Jono, H., Hamada, A., Yoshida, K., Nishimura, Y., Nakamura, Y., and