

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 Neprilysin-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., Shiraishi, 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.

Sawada Y., Komori, H., Tsunoda, Y., Shimomura, M., Takahashi, M., Baba, H., Ito, M., Saito, N., Kuwano, H., Endo, I., Nishimura, Y. and Nakatsura, T. Identification of HLA-A2 or HLA-A24-restricted CTL epitopes for potential HSP105-targeted immunotherapy in colorectal cancer. *Oncology Reports* 31: 1051-1058, 2014. (Open access)

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)

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、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 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、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）

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）

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、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）

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)

湯野晃、富田雄介、平山真敏、福岡大喜、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)

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)

H. 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

iPS-ML における遺伝子改変技術の開発

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

iPS 細胞を用いる再生医療においては、任意の細胞ドナー由来の細胞や組織を治療に用いることが可能である。一方、自己 iPS 細胞を医療応用することを想定すると、iPS 細胞樹立と治療用細胞作成に要する期間が長く、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のコストが必要となり、細胞生産の規模を拡大することによる経済的なスケールメリットがあまり期待できない。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。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。そこで、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研究を開始した。

A. 研究目的

現在、京都大学 iPS 細胞研究所を中心として、HLA ハプロタイプのホモ接合の iPS 細胞を集積した iPS 細胞ストックの構築が進められている。HLA は、高度の遺伝的多型を有することを特徴とし、かつ、多重遺伝子がハプロタイプを形成していて、その組み合わせにより膨大な多様性が形成される。一方で、民族毎に特徴的な頻度の高いハプロタイプが存在するため、日本人集団においても、典型的とされる HLA ハプロタイプが存在するので、そのハプロタイプのホモ接合ドナー由来の iPS 細胞を作製することにより、50 株程度の iPS 細胞により、HLA-A-B-DR ハプロタイプに関しては、日本人集団の 8 割程度をカバーできると考えられる。しかしながら、日本人中約 10～20% の低頻度 HLA ハプロタイプのみ保持者に関しては、iPS 細胞ストックではカバーされな

い可能性がある。このため、iPS 細胞ストックに由来する分化細胞組織を用いた治療を受けることができないことが予想される。そこで、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研究を開始した。

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、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ウイルス回収により作製した。

(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。

D. 考察

研究代表者らは、以前の研究において Zinc Finger Nuclease を用いた遺伝子の標的破壊により、ヒトの iPS 細胞において TAP2 遺伝子を標的破壊でき

ることを示している。本年度の研究結果により、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ものである。最近、遺伝子改変の新たな手法が開発されており、哺乳動物細胞の遺伝指標的改変を行なうための技術に関しては著しい進歩がみられる。本研究においては、適切な技術を取り入れることにより、より効率よく治療用細胞の作成を行なうよう手法の改善に取り組んでいきたいと考えている。

E. 結論

本研究の成果は、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

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 allogeneic 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況	なし
1.特許取得	
なし	3.その他
	なし
2.実用新案登録	

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）
委託業務成果報告（業務報告）

マウスモデルを用いた抗腫瘍効果の検討-1

業務主任者 千住 寛 熊本大学大学院生命科学研究部 准教授
担当責任者 馬場 秀夫 熊本大学大学院生命科学研究部 教授

研究要旨

我々は、iPS-ML 技術を基盤として、難治性癌の代表である胃癌腹膜播種と膵臓癌に対する治療法を開発することをめざしている。免疫不全マウス(scid マウス)を用いて作成した GFP 発現腫瘍の担癌モデルマウスに蛍光色素 (PKH) 標識した iPS-ML を投与し、がん組織への集積を検討した。さらに、腫瘍組織を摘出、固定し、凍結切片を作製して、蛍光顕微鏡による観察を行った。また、発光タンパク質（ルシフェラーゼ）を発現させたヒト腫瘍細胞を免疫不全マウスの腹腔内へ移植する腹腔播種がんモデルを作成した。、さして、インターフェロンを発現させた iPS-ML の投与により、scid マウス腹腔内に生着したヒト腫瘍に対する治療効果を確認することができた。

A. 研究目的

我々は、iPS-ML を用いた細胞治療により、胃癌腹膜播種に対する有効な治療法を開発をめざしている。本研究は、マウスモデルを用いてインターフェロンを発現させた iPS-ML の投与による治療効果を確認することを目的とした。

B. 研究方法

本年度の研究では、これまでに得ている非臨床 POC を確認するべく、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を、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。

（倫理面への配慮）

熊本大学大学院生命科学研究部には、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。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。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。

C. 研究結果

scid マウス腹腔内にヒトの腫瘍細胞を生着させた腹膜播種癌モデルにおいて、iPS-ML を腹腔内投与すると腫瘍組織内への集積・浸潤が認められた。さらに、SCID マウスを用いたゼノグラフトモデルにおいては、iPS-ML を用いた治療により、極めて高い腫瘍増殖抑制効果が得られることを確認することができた。

D. 考察

非臨床での薬効薬理試験として免疫不全マウスにヒト胃癌細胞を移植して腹膜播種モデルを作成した。そして、このモデル腫瘍に対して iPS-ML が極めて有効であるという結果を得ることがで

きた。これらの確認された研究結果から、iPS-MLは進行胃癌に対する治療薬として有望であり、迅速に臨床開発を進めて行くべきものであると考えられる。

E. 結論

iPS-MLによるがん治療の実現へ向け、ゼノグラフトモデルを用いた薬効評価に関してあらたなエビデンスを得ることができた。

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

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

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., Kohroggi, 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. *OncImmunity* 3: e28100-1-15, 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. *OncImmunity* 3: e27927-1-3, 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）

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）	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

マウスモデルを用いた抗腫瘍効果の検討-2

担当責任者 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 ユニット長

研究要旨

我々は、最近ヒト iPS 細胞からミエロイド細胞を誘導する過程に、増殖因子と抗老化因子を導入して、サイトカイン依存性に無限に増殖するミエロイド細胞の作製に成功し、免疫不全マウスを用いた異種移植がんモデルにおける抗腫瘍効果を明らかにした。また、このミエロイド様細胞は樹状細胞（DC）への分化が可能であり、DC ワクチンとしての応用も可能である。しかしながら、同種がんにおける抗腫瘍効果、および安全性に関しては明らかとなっていない。

本研究課題は、マウス多能性幹細胞からミエロイド細胞への分化誘導過程に自己増殖因子を導入することにより、サイトカイン依存性に無限に増殖するミエロイド様細胞を作製した。この細胞から DC 分化を誘導し、抗原ペプチドを負荷して生体内に投与することで、抗原特異的細胞傷害性 T 細胞を誘導し、抗原特異的に抗腫瘍効果を示すこと、および生体内投与における安全性を示して、同種がん移植モデルを用いた非臨床 POC を確認した。

A. 研究目的

免疫制御の中心的役割を果たす樹状細胞 (dendritic cell: DC) は、生体内に潜在するがん抗原特異的 T 細胞を活性化することで、持続的にがんの選択的排除を誘導することができるため、これを細胞ワクチンとして投与する治療法に期待が寄せられている。アメリカ・デンドレオン社によって開発された DC ワクチン(プロベンジ)は、その有効性が証明されて米国 FDA (米国食品医薬局) の認可を得て臨床応用が開始されている。しかしながら、この治療は、1) DC の前駆細胞を得るために、がん患者から大量の成分採血を必要とすること、2) 治療費が高額 (3 回投与で 9 万 3000 ドル) であること等が問題となっており、広く応用されていないのが現状である。したがって、患者の負担を減らす新たな DC ワクチンの開発が必要不可欠と考えられる。

胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は自己複製能を有する為、これから DC を誘導することにより無限の DC を得ることが可能である。しかし、これの誘導操作は煩雑であり、コストパフォーマンスが悪い為、広く応用するのは現状では困難である。したがって、大量に DC

を提供する方法を開発することができれば、患者への負担の少ない DC ワクチン実現化に資することができる。

我々は、最近ヒト iPS 細胞からミエロイド細胞を誘導する過程に、増殖因子と抗老化因子を導入することで、サイトカイン依存性に無限に増殖するミエロイド細胞の作製に成功し、免疫不全マウスを用いた異種移植がんモデルにおける抗腫瘍効果を明らかにしてきた。また、このミエロイド様細胞は DC への分化が可能であり、DC ワクチンとしての応用も可能であることが明らかとなっている。しかしながら、同種がんにおける抗腫瘍効果、および安全性に関しては明らかとなっていなかった。

本研究課題では、マウス多能性幹細胞からミエロイド細胞への分化誘導過程に自己増殖因子等を遺伝子導入することにより、サイトカイン依存性に無限に増殖するミエロイド様細胞を作製する。この細胞から DC 分化を誘導して、これにがん抗原ペプチドを負荷して生体内に投与することで、がん抗原ペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性を誘導し、がん抗原を発現するがんに対する抗腫瘍効果を示すこと、及び生体内投与における安全性を検討して、非臨床 POC を確認することを目的とした。

B. 研究方法

1. サイトカイン依存性に増殖するマウス由来ミエロイド様細胞の作製

造血系分化を誘導するフィーダー細胞 (M-CSF 欠損マウス骨髄ストローマ細胞) 上で C57BL/6 マウス由来の iPS 細胞を 6-7 日間培養した (図 1A)。中胚葉分化した細胞を新たな OP9 上に移し替えて、GM-CSF 存在下 7-8 日間培養した。これによって得られたミエロイド様細胞 (CD11b 陽性) に、レンチウイルスを用いて *c-Myc* 遺伝子を導入した。これに M-CSF と GM-CSF を添加して約 10 日間培養することで、GM-CSF 依存性に増殖するミエロイド様細胞 (proliferating myeloid cell: pMC) を得た。これを IL-4 と GM-CSF で 3 日間処理すると、CD11c 陽性 DEC205 陽性の比較的均一な DC 様細胞 (pMC-DC) を得ることができた。この DC 様細胞は *c-Myc* 導入しないものに比較して 160 倍以上の細胞数を得ることができた (図 1B)。

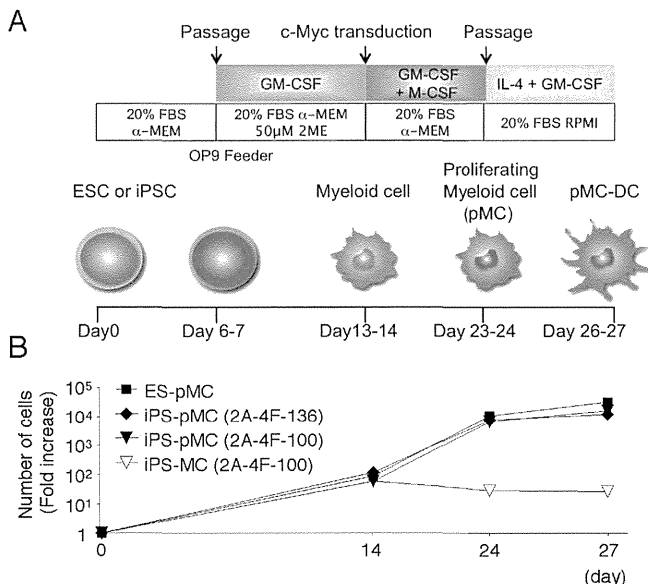


図 1 マウス iPS 由来増殖ミエロイド細胞および DC の誘導

2. 抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導能の検討

作製した DC 様細胞にモデル抗原 OVA の T 細胞エピトープペプチドを負荷して、腹腔内に 7 日間おきに 2 回連続投与した。さらに 7 日後、脾細胞を分離して、OVA ペプチドを添加して 5 日間 *in vitro* で培養後、OVA 負荷マウス胸腺腫細胞株 (EL-4)、あるいは OVA 発現メラノーマ細胞株 (MO4) に対する細胞傷害活性を評価した。

3. 生体内抗腫瘍効果の検討

iPS-pMC-DC に OVA ペプチドを負荷して、腹腔内に 7 日間おきに 2 回連続投与した。さらに 7 日後、OVA 発現メラノーマ細胞株 (MO4) を皮下移植して、がんの生着、およびマウスの生存を評価した。

4. 安全性の評価

iPS-pMC-DC を治療実験に用いた細胞数 (1.0×10^5 cells/mouse)、あるいは、これの 100 倍量 (1.0×10^7 cells/mouse) を投与して、自己免疫応答、白血病の発現などの発症の有無を 3 ヶ月間観察した。

(倫理面への配慮)

動物を用いる実験において「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、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った。遺伝子組換え実験については、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、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・承認を受けて実施した。

C. 研究結果

OVA ペプチドを負荷した ES-pMC-DC あるいは iPS-pMC-DC を腹腔内に投与したマウスの脾 T 細胞は、OVA を負荷した EL-4 に対して細胞傷害活性を示した。この効果は、BM-DC を用いた場合とほぼ同等レベルであった (図 2A-C)。この CTL 誘導能は、3 ヶ月間培養した iPS-pMC においても認められた (図 2D)。以上より、多能性幹細胞に由来する pMC-DC は、がん抗原ペプチドを負荷して投与することで、生体内で抗原特異的 CTL を誘導できることが明らかとなった。また、3 ヶ月間増殖培養を続けた pMC-DC においてもこの機能を維持できることが明らかとなった。一方、OVA 発現メラノーマ (MO4) に対する細胞傷害性を評価したところ、放射線処理した OVA 負荷 iPS-pMC-DC を投与した場合には脾 T 細胞は MO4 を傷害した。これに対して、70°C 熱処理 (細胞死を誘導) した OVA 負荷 iPS-pMC-DC を投与した場合には MO4 を傷害しなかった (図 2E)。これ

らの観察より、iPS-pMC-DCはT細胞を活性化するサイトカイン産生や共刺激分子を発現して、効率よく抗原特異的 CTL プライミングを誘導することが示唆された。

一方、MO4 皮下移植モデルの検討では、OVA ペプチド負荷 iPS-pMC-DC を予防投与することにより、皮下移植 MO4 の増大を抑制して、MO4 移植マウスの生存期間を延長した (図 3)。また、これに用いた iPS-pMC-DC の 100 倍量の細胞を腹腔内投与しても 3 ヶ月間は自己免疫応答や白血病などが認められなかった (data not shown)。

にする必要がある。

図 3

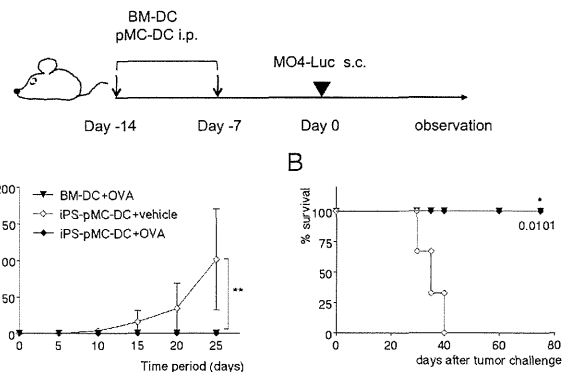
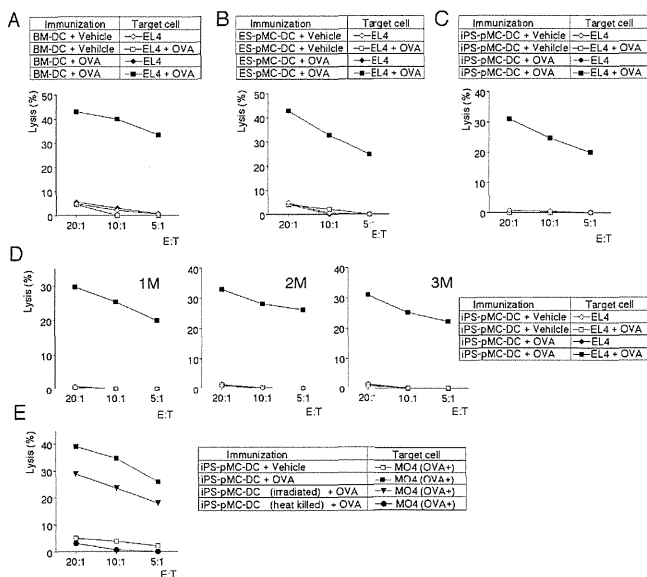


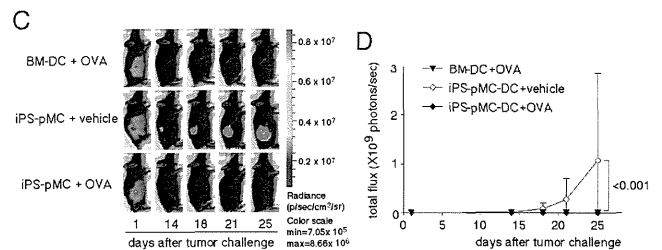
図 2 生体内における抗原特異的 CTL 誘導能



D. 考察

本研究では、マウス ES 細胞、iPS 細胞に由来するミエロイド細胞 (pMC) に *c-Myc* 遺伝子を導入することで、サイトカイン依存性に増殖するミエロイド細胞を構築した。この細胞を IL-4 および GM-CSF で処理することで DC 様の機能を獲得し、マウス生体内で抗原特異的 CTL を誘導できることを明らかにした。また、マウスに大量投与しても自己免疫応答や白血病の発症がないことを確認した。

ヒト iPS 細胞に由来するミエロイド細胞の増殖は、細胞増殖因子 (*c-Myc*) 単独導入では困難であり、*Bmi-1* や *Mdm2*, *Ezh2* などの抗老化遺伝子も必要であった。一方、マウス iPS-pMC に *Bmi-1* を追加導入しても増殖性、形態、表現型に変化は認められなかった。ヒト iPS-pMC における抗老化因子依存性に関するメカニズムは今後明らか



今回、我々が構築した iPS-pMC-DC は、BM-DC と比較して IL-12p70 産生、MHC-I, MHC-II, CD40, CD86 などの発現が低かった。これに伴って T 細胞刺激活性がやや劣っていた。生体内では、抗腫瘍効果を発揮したが、これらを改善することで iPS-pMC-DC ワクチン法の抗腫瘍効果をさらに高めることが可能になると考えられる。

ヒト iPS-pMC は M-CSF 依存性に増殖するが、マウス iPS-pMC は GM-CSF 依存性に増殖した。サイトカイン依存性の増殖という観点では、ヒトとマウスで類似している。どちらにおいても長期間の増殖能は、白血病を発症する可能性を否定できない。しかし、増殖に必要なサイトカイン濃度は、生理的な生体内濃度よりも低い為、比較的 に安全と考えられる。また、抗腫瘍効果を発揮できる投与細胞数の 100 倍量を投与しても異常が認められない観察も、安全性を示唆している。さらに、投与前に放射線照射を行っても、抗原特異的 CTL 刺激活性を維持している為、放射線照射後に投与する方法により安全性を向上させることが可能である。

E. 結論

我々は、ヒト iPS 細胞由来増殖ミエロイド細胞に相当するマウス iPS 細胞由来ミエロイド細胞の

構築に成功した。これをサイトカイン処理することでDC様の細胞に分化できることを明らかにした。また、これに抗原ペプチドを負荷して、生体内に投与することで抗原特異的 CTL を誘導し、同種がん移植モデルにおける抗腫瘍効果を発揮できることを明らかにした。さらに、治療効果を発揮できる細胞数の 100 倍量の細胞数を投与しても自己免疫疾患や白血病を発症しないことを明らかにし、非臨床における POC を確認した。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 張エイ, 劉天懿, 鈴木元晴, 廣澤成美, 坂本安, 葛島清隆, 植村靖史
iNKT 細胞と樹状細胞の相互作用による IL-27/osteopontin 産生制御
臨床免疫・アレルギー科, 61: 158-163, 2014
2. 張エイ, 鈴木元晴, 上田格弘, 巽美奈子, 劉天懿, 葛島清隆, 植村靖史,
iNKT 細胞による樹状細胞の機能修飾
臨床免疫・アレルギー科, 62: 307-313, 2014
3. Nakatsuka R, Matsuoka Y, Uemura Y, Sumide K, Iwaki R, Takahashi M, Fujioka T, Sasaki Y, Sonoda Y.
Mouse dental pulp stem cells support human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells in vitro.
Cell Transplantation. 24: 97-113, 2015
4. Matsuoka Y, Nakatsuka R, Sumide K, Kawamura H, Takahashi M, Fujioka T, Uemura Y, Asano H, Sasaki Y, Inoue M, Ogawa H, Takahashi T, Hino M, Sonoda Y.
Prospectively isolated human bone marrow-derived MSCs support primitive human CD34-negative hematopoietic stem cells.
Stem Cells. in press 2015

2. 学会発表

1. 上田格弘, 植村靖史, 張エイ, 劉天懿, 巽美奈子, 安井裕, 葛島清隆, 清井仁, 金子新
BCR-ABL 特異的ヘルパーT細胞のリプログラミングと CML 治療への応用
第 18 回日本がん免疫学会総会 (ひめぎんホー

ル・松山市) 2014 年 7 月 30 日～8 月 1 日

2. 上田格弘, 植村靖史, 張エイ, 劉天懿, 巽美奈子, 安井裕, 葛島清隆, 清井仁, 金子新
Generation of BCR-ABL reactive CD4 T lymphocytes by reprogramming and redifferentiation.
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 日～27 日
3. Norihiro Ueda, Yasushi Uemura, Rong Zhang, Tian-Yi Liu, Minako Tatsumi, Yutaka Yasui, Kiyotaka Kuzushima, Hitoshi Kiyoi, Shin Kaneko
Generation of BCR-ABL reactive CD4 T lymphocytes by reprogramming and redifferentiation
第 43 回日本免疫学会学術集会 (国立京都国際会館・京都市) 2014 年 12 月 10 日～12 日
4. 上田格弘, 植村靖史, 張エイ, 劉天懿, 巽美奈子, 安井裕, 葛島清隆, 清井仁, 金子新
BCR-ABL-specific T helper cells facilitate propagation of antigen-specific CTLs via DC maturation.
第 76 回日本血液学会学術集会 (大阪国際会議場・大阪市) 2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日

1.

H. 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

非ヒト霊長類個体を用いた前臨床研究の実施

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

本年度当初計画において、HLA 適合アロ iPS-ML の投与に伴う免疫刺激性、造腫瘍性等を検討し、さらに、最大耐量の評価を行なうために、非ヒト霊長類（マーモセットあるいはカニクイザル）を用いた非臨床試験を実施することを予定した。まず、既に樹立されているマーモセットの ES 細胞から iPS-ML と同等のミエロイド細胞を作製することを試みた。しかしながら、既存のマーモセット ES 細胞からのミエロイド系細胞の分化誘導には成功しなかった。また、マーモセット末梢血単核細胞（PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cells）から新たな iPS 細胞を樹立することも試みたが、成功しなかった。そこで、カニクイザルの ES 細胞から iPS-ML と同等の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 細胞からは、ヒト iPS-ML 作成の場合とほぼ同様な手法によりミエロイド細胞の分化誘導が可能であった。また、カニクイザル ES-ML(ES 細胞由来の増殖性ミエロイド細胞)の樹立にも成功した。

A. 研究目的

本研究は、将来的にヒト iPS-ML を用いたがん治療医薬（再生医療製品）の治験を実施することを目標としている。治験実施の前に行なうべき非臨床試験として、霊長類個体を用いた細胞投与に際しての安全性薬理試験、薬物動態試験、毒性試験等を実施する必要がある。本年度の当初計画において、HLA 適合アロ iPS-ML の投与に伴う免疫刺激性、造腫瘍性等を検討し、さらに、最大耐量の評価を行なうために、非ヒト霊長類（マーモセットあるいはカニクイザル）を用いた非臨床試験を実施することを予定した。

B. 研究方法

既に樹立されているマーモセットの ES 細胞（実験動物中央研究所 佐々木 えりか 博士 および 九州大学生体防御医学研究所 谷 憲三朗 教授により樹立 Stem Cells 2005）から iPS-ML と同等のミエロイド細胞を作製することを試みた。これまでに確立している多能性幹細胞

からのミエロイド系血液細胞分化誘導法を応用して、分化誘導を試みた。また、マーモセット末梢血単核細胞（PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cells）から iPS 細胞を樹立するべく、マーモセット末梢血を入手した。そして、ヒトの iPS 細胞作製法に準じた方法により、iPS 細胞の樹立を試みた。

また、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）

マーモセット末梢血の採取は、日本エスエルシーの飼育施設において、動物愛護に十分な配慮を行なって実施した。

C. 研究結果

既存のマーモセット ES 細胞からのミエロイド系細胞の分化誘導には成功しなかった。また、マ

一モセット末梢血単核細胞（PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cells）から新たな iPS 細胞を樹立することも試みたが、成功しなかった。

そこで、カニクイザルの ES 細胞から iPS-ML と同等の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 細胞からは、ヒト iPS-ML 作成の場合とほぼ同様な手法によりミエロイド細胞の分化誘導が可能であり、また、カニクイザル ES-ML(ES 細胞由来の増殖性ミエロイド細胞)の樹立にも成功した。

D. 考察

マーモセットの ES 細胞からの分化誘導が成功しなかった理由としては、マーモセット ES 細胞の維持培養系が不安定であり、分化多能性を保持した細胞を使用できなかった可能性、および、ヒトとマーモセットでは種間の差異が大きいため、ヒトの多能性幹細胞からの分化誘導法が適応できなかった可能性が考えられる。

カニクイザルに関しては、ES-ML の樹立に成功したが、増殖速度がヒトの iPS-ML に比較すると遅いものしか樹立できなかった。この細胞では、ヒト iPS-ML と完全に同等とは言えないと考察した。非臨床試験としてカニクイザルにカニクイザルの ES-ML を投与する研究に関しては、当面、保留することとした。

E. 結論

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）
委託業務成果報告（業務報告）

カニクイザル ES 細胞からは、ヒト iPS-ML 作成の場合とほぼ同様な手法によりミエロイド細胞の分化誘導が可能であり、また、カニクイザル ES-ML(ES 細胞由来の増殖性ミエロイド細胞)の樹立にも成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

様式第19

学会等発表実績

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」

機関名

国立大学法人熊本大学 大学院生命科学研究所
 国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
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（口頭）	池田徳典、高松孝太郎、安東由喜雄、西村泰治、千住覚	東京都（第111回日本内科学会総会）	2014.4.11	国内
iPS細胞由来のミエロイド細胞（iPS-ML）によるがん治療（口頭）	千住覚	奈良市（第62回日本輸血・細胞治療学会総会）	2014.05.16	国内
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（口頭）	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	松山市（第18回日本がん免疫学会総会）	2014.8.1	国内
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細胞を用いたメラノーマの免疫療法（口頭）	宮下梓、福島聡、千住覚、西村泰治、神人正寿、尹浩信	松山市（第18回日本がん免疫学会総会）	2014.8.1	国内
iPS細胞を用いた癌に対する免疫細胞療法（口頭）	千住覚	阿蘇市（遺伝子・デリバリー研究会第14回夏期セミナー）	2014.8.20	国内
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（口頭）	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	長崎市（第23回日本組織適合性学会大会）	2014.9.14	国内
細胞治療に向けた樹状細胞の可能性（口頭）	千住覚	東京都（第42回日本臨床免疫学会総会）	2014.9.25	国内
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（口頭）	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	東京都（第73回日本癌学会学術総会）	2014.9.25	国内
ゼノグラフと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（口頭）	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	横浜市（第73回日本癌学会学術総会）	2014.9.26	国内
Therapy of peritoneally disseminated colon cancer by TAP-deficient ES cell-derived macrophages in allogenic recipients in a mouse model.（口頭）	Haga, E., Endo, Y., Haruta, M., Koba, C., Matsumura, K., Takamatsu, K., Ikeda, T., Nishimura, Y., Senju, S.	京都市（第43回日本免疫学会総会・学術集会）	2014.12.11	国内
BCR-ABL特異的ヘルパーT細胞のリプログラミングとCML治療への応用（口頭）	上田格弘、植村靖史、張エイ、劉天懿、巽美奈子、安井裕、葛島清隆、清井仁、金子新	第18回日本がん免疫学会総会（ひめぎんホール・松山市）	2014.7.30～8.1	国内
Generation of BCR-ABL reactive CD4 T lymphocytes by reprogramming and redifferentiation.（ポスター発表）	上田格弘、植村靖史、張エイ、劉天懿、巽美奈子、安井裕、葛島清隆、清井仁、金子新	第73回日本癌学会学術総会（パシフィック横浜・横浜市）	2014.9.25～27	国内
Generation of BCR-ABL reactive CD4 T lymphocytes by reprogramming and redifferentiation.（ポスター発表）	Norihiro Ueda, Yasushi Uemura, Rong Zhang, Tian-Yi Liu, Minako Tatsumi, Yutaka Yasui, Kiyotaka Kuzushima, Hitoshi Kiyoi, Shin Kaneko	第43回日本免疫学会学術集会（国立京都国際会館・京都市）	2014.12.10～12	国内
BCR-ABL-specific T helper cells facilitate propagation of antigen-specific CTLs via DC maturation.（ポスター発表）	上田格弘、植村靖史、張エイ、劉天懿、巽美奈子、安井裕、葛島清隆、清井仁、金子新	第76回日本血液学会学術集会（大阪国際会議場・大阪市）	2014.10.31～11.2	国内