

多能性幹細胞からのNK細胞分化法開発について

研究分担者	中畑 龍俊	京都大学iPS細胞研究所
研究協力者	丹羽 明	京都大学iPS細胞研究所
研究協力者	松原弘幸	京都大学iPS細胞研究所
研究協力者	斎藤 潤	京都大学iPS細胞研究所

研究要旨

原発性免疫不全症候群(PIDs)の多くにNK細胞の機能異常や欠損を伴うことが知られている。PIDsにおけるNK細胞異常の病態を正確に理解するためには、NK細胞の分化段階をトレースすることが出来る、ヒトiPS細胞からの分化系が有用であると考えられる。そこで、我々が開発したヒト血球細胞分化系を応用し、新規NK細胞分化誘導系の開発を行った。

A. 研究目的

原発性免疫不全症候群(PIDs)の多くにNK細胞の機能異常や欠損を伴うことが知られている(Orange JS, J Allergy Clin Immunol 2013)。NK細胞欠損はウイルスへの易感染性やウイルス関連悪性疾患の発症に関連することが示唆されている。例えば、GATA2欠損症57名の検討では、約1/3がHPV関連の悪性疾患に罹患している(Spinner MA, Blood 2014)。また、MCM4変異を持つCNKD(classical natural killer cell deficiency)患者さんにおけるEBV誘発性リンパ腫の合併が報告されている(Eidenschenk C, Am J Hum Genet 2006)。

PIDsにおけるNK細胞異常の病態を正確に理解するためには、NK細胞の分化段階をトレースすることが出来る、ヒト多能性細胞からの分化系が有用であると考えられる。従来の分化系はフィーダー細胞や血清を必要としていたため、造血前駆細胞の陽性率の低さや血清含有培地の使用によるバッチ依存性我々が問題となっていた(Knorr DA, Stem Cells Trans Med, 2013)。そこで、独自開発したヒト血球細胞分化系を応用して、新規NK細胞分化誘導系の開発を行った(Matsubara H, BBRC 2019)。

B. 研究方法

ヒト胚性幹細胞(ES)細胞株KhES1、およびヒト人工多能性幹(iPS)細胞株A11を用いて分化実験を行った。

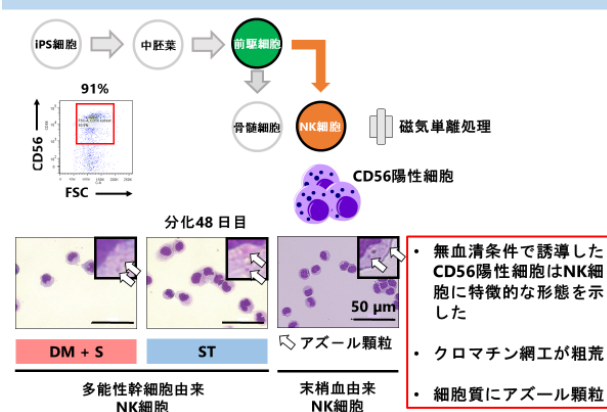
(倫理面への配慮)

ヒトES細胞の使用にあたり、文部科学省の指針に従って研究計画書を策定し、承認をいただいている。

C. 研究結果

分化諸条件を検討し、LM511-E8コーティングディッシュ上で血球分化を開始し、得られた前駆細胞をStemLine II培地(完全無血清培地)中でStem cell factor (50ng/ml), Flt3Ligand (50 ng/ml), IL-7 (50 ng/ml), IL-3 (50 ng/ml), IL-15 (50 ng/ml)を加えて培養することにより、CD56陽性のNK細胞様細胞を誘導することに成功した。得られたNK細胞様細胞は、特徴的な細胞形態を示した(下図)。

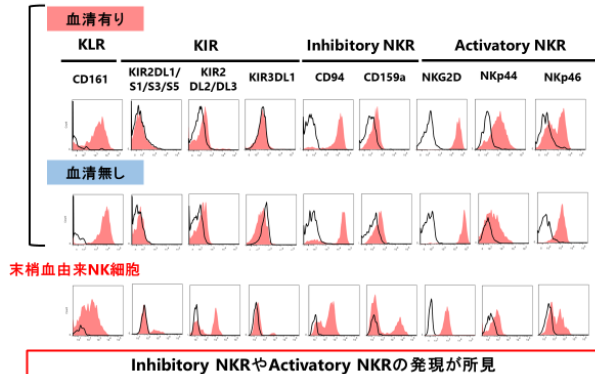
多能性幹細胞由来NK細胞の形態



この細胞の細胞表面マーカーを確認したところ、末梢血NK細胞と同様の発現傾向を認めた(下図)。

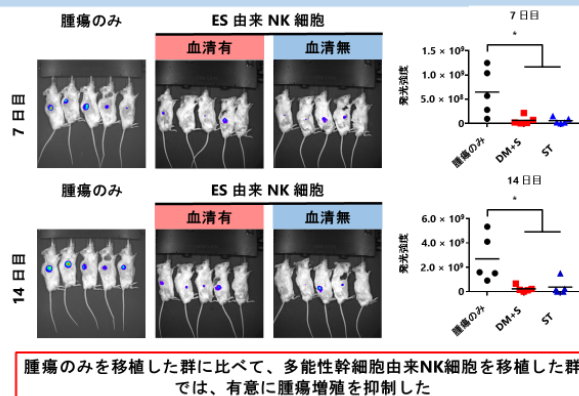
多能性幹細胞由来NK細胞は、NK細胞特異的表面マーカーを発現

多能性幹細胞由来NK細胞(分化48日目)



さらに、この細胞の抗腫瘍活性を確認するため、*in vitro*でK562細胞に対する殺細胞能を評価した。結果、末梢血由来NK再簿には劣るものの、有意な殺細胞能を発揮することが確認された。さらに、*in vivo*での抗腫瘍活性を評価するため、NOGマウスの皮下にK562細胞を多能性幹細胞由来NK様細胞を接種し、腫瘍の大きさを評価した。結果、腫瘍のみ接種群に比較して、NK細胞様細胞を移植した群では腫瘍の増大が有意に抑制された(下図)。

多能性幹細胞由来NK細胞は*in vivo*で腫瘍増殖を抑制



D. 考察

本研究では、ヒト多能性幹細胞から無血清条件下でNK細胞様細胞を誘導することに成功した。多能性幹細胞から誘導したNK細胞は、形態、細胞表面マーカー及び殺細胞能において、NK細胞に特徴的な表現型を示した。

改善すべき点として、①十分な細胞数が得られていない。②末梢血由来NK細胞と比べて、発現していない受容体(KIR・CD159a)が存在し、K562腫瘍細胞株に対する細胞傷害能に関して

も劣っている、という点が挙げられる。今後これらの点の改善が必要である。

E. 結論

多能性幹細胞からNK細胞への分化系は、原発性免疫不全症候群の解析に有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsubara H, Niwa A, Nakahata T, Saito MK.: Induction of human pluripotent stem cell-derived natural killer cells for immune therapy under chemically defined conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Jul 12;515(1):1-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.085. Epub 2019 Apr 2.

2) Zhou Y, Zhang Y, Nakahata T, Ma F. et al: Overexpression of GATA2 enhances development and maintenance of human embryonic Stem Cell-Derived Hematopoietic Stem Cell-like Progenitors. *Stem Cell Reports.* 2019 Jul 9;13(1):31-47. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.05.007. Epub 2019 Jun 6. PMID:31178416

3) Shigemura T, Matsuda K, Kurata T, Nakahata T., Koike K. et al: Essential role of PTPN11 mutation in enhanced haematopoietic differentiation potential of induced pluripotent stem cells of juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2019 Oct;187(2):163-173. doi: 10.1111/bjh.16060. Epub 2019 Jun 20.

2. 学会発表

1) 中畑龍俊: 難病に対する治療法開発のこれから。シンポジウム: 医学と医療の新展開-Precision Medicineはどこまで進んだか、第30回日本医学会総会2019中部、2019年4月27-29日(27日)、名古屋国際会議場

2) Nishinaka-Arai Y., Niwa A., Matsuo S., Kazuki Y., Yakura Y., Oshimura M., Nakahata T., Saito M.K.: Down syndrome-related transient abnormal myelopoiesis is derived from a newly identified hematopoietic subpopulation (ポスター) ISSCR 2019 Annual Meeting, 2019年6月26-29日(26日), Los Angeles

Convention Center

- 3) Niwa A., Nakahata T., Saito MK:
iPSC-based screen revealed an impact
of dysregulated NFκB activity in
AML1-ETO related leukemia (ポスター)
ISSCR 2019 Annual Meeting, 2019年6月
26-29日, Los Angeles Convention
Center
- 4) Shimada A., Hasegawa D., Imamura T.,
Kaneda M., Yagi K., Takahashi Y., Usami I.,
Suenobu S., Nishimura S., Hashii K., Deguchi
T., Saito A., Kato K., Kosaka Y., Hirayama M.,
Iguchi A., Kawasaki H., Hori H., Sato A.,
Nakahata T., Oda M., Ueno H., Sanada M.,
Ogawa S., Hara J., Horibe K.: JACLS ALL02研
究におけるAcute Mixed Leukemiaの遺伝子
変異 (Genetic Alterations in Acute Mixed
Leukemia, Result of JACLS-ALL02 study) (口
演) 日本小児血液がん学会、2019年11月14-16
日、広島コンベンションホール

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし