

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

(再生医療関係分野)

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 千住 覚

平成26(2014)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 覚

II . 分担研究報告

1 . ヒトiPS細胞に由来するミエロイド細胞の遺伝子標的改変 ----- 15

研究代表者 千住 覚 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 -----

20

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 -----

23

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 助教

岡田麻里奈 慶應義塾大学 循環器内科 助教

III . 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 29

IV . 研究成果の刊行物・別刷 ----- 33

I . 平成 2 5 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

研究代表者らは、長年にわたり多能性幹細胞の医療応用に関連する組織適合性の問題に取り組んできた。今日、iPS細胞を用いた再生医療には大きな期待が寄せられ、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。今後、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は、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必要がある。

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と予想される。また、移植細胞からの癌発生のリスクも懸念されているところである。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
岡田麻里奈	慶應義塾大学循環器内科	助教

A . 研究目的

iPS細胞を用いた再生医療には大きな期待が寄せられ、近年、国内外の数多くの研究者がこの分野に参入している。その結果として、ヒトiPS細胞から様々な細胞を作製する分化誘導技術が報告されている。患者個別に樹立したiPS細胞を用いる再生医療は、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と予想される。さらに、移植細胞からの癌発生のリスクも考慮すると、事前に樹立されたHLA適合アロiPS細胞を使用する方が現実的とも考えられている。

現在、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。しかしながら、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細胞ストックでカバーしきれない可能性がある。すなわち、低頻度HLAハプロタイプのみ保持者は、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。本研究では、以上のようなiPS細胞を用いた細胞医療の実現化に向けて解決しなければならない、組織不適合の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關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。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の条件検討に重点をおいた。

B . 研究方法

研究代表者の千住らの研究グループは、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にあたり、このiPS-MLにおいて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、293T細胞への発現プラスミドベクター(CS11EF: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。

分担研究者の福田、関、岡田は、HLA関連遺伝子の標的破壊を行なった多能性幹細胞由来の分化細胞による免疫拒絶の回避に関する研究を開始した。本年度の研究においては、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った。まず、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, in vivoの分化実験で確認する。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。分化誘導した心筋細胞は各種心筋細胞マーカーを発現し、かつ電気生理学的に機能的であることを確認する。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。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。

分担研究者の中面、関、岡田は、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開始した。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った。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した。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、未分化細胞に対して特異的に傷害できるCTLを誘導可能なペプチドを同定した。

(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」、「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。

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ったところ、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。現在実験系に用いる心筋細胞を得るためにより高効率の誘導系の条件を検討中である。また、両者のアロ移植における細胞の生着性を評価するために、両 ES 細胞を B6 系統のマウスの皮下へ注射し、奇形腫形成の有無を現在確認中である。

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、NODAL、DGF3、LDN6 および OR1D2 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、この中

から特に発現の差が顕著である OCT3/4 および NANOG に関して、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エピトープペプチドの探索を開始した。その結果に基づき、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 25 種 (OCT3/4 由来 13 種、Nanog 由来 12 種)に関して、合成ペプチドを作成した。これらのペプチドを用いて、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しているが、今のところ、ペプチド特異的な CTL を誘導できるペプチドの同定には至っていない。

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。

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が確認された。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が確認された。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

胞特異的抗原と CTL エピトープの同定を試みている。候補ペプチドを合成して、未分化細胞に対して特異的に傷害できる CTL の誘導を試みているが、今のところ有望な CTL エピトープの同定には至っていない。候補抗原・ペプチドの種類を増やしてさらなる検討を行う。

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、レンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行なえることを確認した。

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。

iPS 細胞を用いた再生医療後の悪性腫瘍の発生を未然に防ぐ方法として、未分化細胞において発現レベルの高いタンパク質を標的抗原として選択した。そして、それらのタンパク質に由来し HLA-A*24*02 に結合する構造モチーフを有するペプチドのワクチンとしての効果の検討を開始した。今後は、候補抗原・ペプチドの種類を増やしてさらなる検討を行う必要がある。

F . 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* published online 14 2014 e27927
- 2) Yatsuda J, Irie A, Harada K, Michibata Y, Hirotake T, Senju S, Tomita Y, Yuno A, Hirayama M, Sayem MA, Takeda N, Shibuya I, Sogo S, Fujiki F, Sugiyama H, Eto M, and Nishimura Y. Establishment of *HLA-DR4* transgenic mice for the identification of CD4⁺ T cell epitopes of tumor-associated antigens. *PLoS*

One 8 (12): e84908, 2013.

- 3) 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, Kohroggi H, Yoshitake Y, Nakamura Y, Shinohara M and Nishimura, Y.; 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.
- 4) 千住 覚 ヒト iPS 細胞からの樹状細胞作製法の進歩 *実験医学* 31 (12) 1994-1997, 2013
- 5) 千住 覚 iPS 細胞由来のミエロイド細胞のがん治療への応用 別冊・医学のあゆみ 98-104, 2013
- 6) 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. *OncoImmunology* in press
- 7) 千住 覚、西村泰治 iPS 細胞から分化させた樹状細胞とマクロファージによるがん治療 *臨床免疫・アレルギー科* 2014 印刷中
- 8) Seki T, Yuasa S, Kusumoto D, Kunitomi A, Saito Y, Tohyama S, Yae K, Kishino Y, Okada M, Hashimoto H, Takei M, Egashira T, Kodaira M, Kuroda Y, Tanaka A, Okata S, Suzuki T, Murata M, Fujita J, Fukuda K. Generation and characterization of functional cardiomyocytes derived from human T cell-derived induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2014 DOI: 10.1371/journal.pone.008564

- 9) Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Sawada Y, Sakai M, Shirakawa H, Nobuoka D, Nakatsura T. Analysis of cytotoxic T lymphocytes from a patient with hepatocellular carcinoma who showed a clinical response to vaccination with a glypican-3-derived peptide. *Int. J. Oncol.* 43(4):1019-1026, 2013
- 10) Sawada Y, Komori H, Tsunoda Y, Shimomura M, Takahashi M, Baba H, Ito M, Saito N, Kuwano H, Endo I, Nishimura Y, Nakatsura T. Identification of HLA-A2 or HLA-A24-restricted CTL epitopes for potential HSP105-targeted immunotherapy in colorectal cancer. *Oncol. Rep.* 31(3):1051-1058, 2013
- 11) Suzuki S, Shibata K, Kikkawa F, Nakatsura T. Significant Clinical Response of Progressive Recurrent Ovarian Clear Cell Carcinoma to Glypican-3-derived Peptide Vaccine Therapy: Two Case Reports. *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* 10(2):1-8, 2014
- 12) Chiba T, Suzuki E, Yuki K, Zen Y, Oshima Y, Miyagi S, Saraya A, Koide S, Motoyama T, Ogasawara S, Ooka Y, Tawada A, Nakatsura T, Hayashi T, Yamashita T, Kaneko S, Miyazaki M, Iwama A, Yokosuka O. Disulfiram Eradicates Tumor-Initiating Hepatocellular Carcinoma Cells in ROS-p38 MAPK Pathway-Dependent and -Independent Manners. *PLOS ONE.* in press.

2. 学会発表

- 1) Senju S, Haruta M, Matsumura K, Nishimura Y. Cancer therapy with human iPS cell-derived immune cells. Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Makuhari Messe, December, 2013
- 2) 千住覚、春田美和、富田雄介、湯野晃、松村桂子、池田徳典、西村泰治：TAP2欠損iPS-MLを基盤とするあらゆるHLA型に対応可能な樹状細胞産生システム。第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（横浜市）2013年10

月3日～5日

- 3) 湯野晃、富田雄介、塚本博丈、黒田泰弘、平山真敏、福間大喜、吉武義泰、千住覚、角田卓也、醍醐弥太郎、中村祐輔、篠原正徳、西村泰治：新規癌精巢抗原KIF-20A由来のCTL誘導活性を有するTh1細胞エピトープの同定。第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（横浜市）2013年10月3日～5日
- 4) 矢津田旬二、入江厚、湯野晃、富田雄介、塚本博丈、千住覚、竹田直樹、澁谷功、十河真司、藤木文博、杉山治夫、江藤正俊、西村泰治：腫瘍関連抗原のCD4⁺ T細胞エピトープの同定に利用可能なHLA-DR4トランスジェニックマウスの樹立。第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（横浜市）2013年10月3日～5日
- 5) 平山真敏、富田雄介、湯野晃、塚本博丈、千住覚、吉武義泰、福間大喜、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72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（横浜市）2013年10月3日～5日
- 6) 西村泰治、富田雄介、湯野晃、塚本博丈、千住覚、入江厚、黒田泰弘、濱田哲暢、吉田浩二、角田卓也、吉武義泰、中村祐輔、篠原正徳：Th1/CTL エピトープが共存する新規CT抗原ペプチドの同定とCTL誘導ペプチド接種患者における特異的Th細胞の増加。第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（横浜市）2013年10月3日～5日（10/5 JCA-AACR joint symposium 発表）
- 7) 張エイ、劉天懿、千住覚、廣澤成美、辻村邦夫、中西速夫、藺田精昭、坂本安、西村泰治、葛島清隆、植村靖史：多能性幹細胞由来の増殖性ミエロイド細胞を用いたがん免疫療法の開発。第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（横浜市）2013年10月3日～5日
- 8) 牧寛之、植村靖史、張エイ、竹田和由、劉天

- 懿、鈴木元晴、都築忍、岡村文子、赤塚美樹、西村泰治、千住覚、葛島清隆：TRAILを発現する多能性幹細胞由来ミエロイド細胞を用いた細胞医薬の開発。第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（横浜市）2013年10月3日～5日
- 9) 千住覚：iPS細胞を用いた癌治療法の開発。熊本大学拠点形成研究B主催特別講演会、2013年11月15日、熊本大学薬学部 宮本記念館
- 10) 池田徳典、高松孝太郎、西村泰治、千住覚：多能性幹細胞由来樹状細胞を利用した自己免疫疾患の細胞治療法。第41回日本臨床免疫学会総会、海峡メッセ下関(山口県下関市) 2013年11月27日～29日
- 11) Hirayama, M., Tomita, Y., Yuno, A., Tsukamoto, H., Senju, S., Yoshitake, Y., Fukuma, D., Hamada, A., Jono, H., Tsunoda, T., Nakamura, Y., Shinohara, M., and Nishimura, Y. : Identification of a promiscuous IMP-3-derived long peptide that can induce both Th cells and CTLs. 第42回日本免疫学会学術集会、幕張メッセ(千葉市) 2013年12月11日～13日
- 12) Yuno, A., Tomita, Y., Tsukamoto, H., Kuroda, Y., Hirayama, M., Fukuma, D., Yoshitake, Y., Senju, S., Tsunoda, T., Daigo, Y., Nakamura, Y., Shinohara, M., and Nishimura, Y. : Identification of a promiscuous KIF-20A derived CD4+ T cell epitope that can induce CTLs both in vitro and in vivo. 第42回日本免疫学会学術集会、幕張メッセ(千葉市) 2013年12月11日～13日
- 13) Tsukamoto, H., Senju, S., and Nishimura, Y. : Soluble IL-6 receptor diminishes the differentiation of tumor-specific TH1 cells to exacerbate tumor progression. 第42回日本免疫学会学術集会、幕張メッセ(千葉市) 2013年12月11日～13日
- 14) Seki T, Yuasa S, Kusumoto D, Nakata H, Yae K, Kunitomi A, Saito Y, Tohyama S, Hashimoto H, Oda M, Egashira T, Kodaira M, Kuroda Y, Tanaka A, Okata S, Fujita J, Murata M, Fukuda K. Drivation of functional cardiomyocytes from human peripheral T cell derived induced pluripotent stem cells. The 30th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section, San Diego, June, 2013
- 15) Kishino Y, Seki T, Miyamoto K, Tohyama S, Yuasa S, Fujita J, Sano M, Fukuda K. Novel Pathological Detection System of Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes Using T-cell Receptor Gene Locus for Cell Transplantation Therapy. American Heart Association's Scientific Sessions, Dallas, Texas. November 2013
- 16) 肝細胞がんと小児がんに対するペプチドワクチン療法の開発、中面哲也、コアシンポジウム がんペプチドワクチン療法の最近の進歩と臨床応用の展望、第72回日本癌学会(横浜) 2013年10月3日～5日
- 17) 抗 GPC3 抗体と抗 SPARC 抗体のメラノーマ診断への応用、齊藤桂吾、得光友美、澤田雄、下村真菜美、岩間達章、木庭幸子、松下茂人、福島聡、齋田美江、中面哲也、第72回日本癌学会(横浜) 2013年10月3日～5日
- 18) Glypican-3 ペプチドワクチン投与によって誘導されたペプチド特異的 CTL の腫瘍内浸潤の証明、吉川聡明、下村真菜美、酒井麻友子、大藤和也、高橋真理、澤田雄、信岡大輔、中面哲也、第72回日本癌学会(横浜) 2013年10月3日～5日
- 19) 肝細胞がんに対する T 細胞の細胞傷害性はゾレドロン酸処理で増強する、須貝詩織、吉川聡明、下村真菜美、中面哲也、第72回日本癌学会(横浜) 2013年10月3日

日～5日

20) リンパ球減少誘導後のホメオスタティックプロリフェレーションを利用した癌抗原特異的免疫療法の増強を目指した検討、藤浪紀洋、吉川聡明、澤田雄、下村真菜美、岩間達章、中面哲也、第72回日本癌学会(横浜) 2013年10月3日～5日

21) Possibility of immunotherapy Targeting EGFR T790M Mutation for EGFR TKI-resistant Non-Small Cell Lung Cancer. Ofuji K, Yoshikawa T, Tada Y, Sakai M, Shimomura M, Yamada T, Sasada T, Nakatsura T, The International Symposium on Immunotherapy (London), October 11-12, 2013

22) 癌ペプチドワクチンの展望:企業治験と医師主導臨床治験、シンポジウム、中面哲也、第26回日本バイオセラピー学会(盛岡) 2013年12月5日～6日

23) 非小細胞肺癌におけるEGFR-TKIに対する耐性獲得変異EGFR T790M由来抗原の免疫原性の評価、大藤和也、吉川聡明、下村真菜美、

多田好孝、酒井麻友子、中面哲也、第26回日本バイオセラピー学会(盛岡) 2013年12月5日～6日

24) CTLおよびT細胞の細胞移入療法と効果増強を目指した検討、粕谷匡史、下村真菜美、多田好孝、吉川聡明、安部良、中面哲也、第26回日本バイオセラピー学会(盛岡) 2013年12月5日～6日

25) 放射線治療との融合も期待される最近のがん免疫療法の進歩、中面哲也、第5回日本放射線外科学会(高崎) 2014年1月18日

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

11 . 平成 2 5 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 寛 熊本大学 大学院生命科学研究部 准教授

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な費用が必要となり、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。さらに、移植細胞からがんが発生するリスクがあることは、臨床試験の実施に際し最も慎重に考慮すべき問題である。

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、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細胞を使用すべきとも考えられる。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。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参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。本年度は、iPS細胞あるいはiPS細胞由来の分化細胞における遺伝子の標的破壊技術を確立するべく、研究を開始した。

A. 研究目的

iPS細胞を用いた再生医療には非常に大きな期待が寄せられている。特に、近年は、国内外の研究者からヒトiPS細胞を用いて様々な細胞や組織を人工的に作製する分化誘導技術があいついで報告されている。ところで、患者個別に樹立したiPS細胞を用いる再生医療は、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、個別の細胞プロセッシングのために非常に高額な費用が必要となると予想される。また、移植細胞からの悪性腫瘍発生リスクも懸念されるところである。これに対して、事前に樹立されたHLA適合アロiPS細胞を使用する方が現実的であるとの見方もされている。

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。

本研究グループでは、以上のようなiPS細胞を用いた細胞医療の実現化に向けて解決しなければならない、組織不適合の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を目指した基礎的な検討を行った。

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、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 にいおい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(CSIIIF: 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。

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。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。最近、Zinc Finger Nuclease に加えて、TALEN および CRISPR といった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。来年度以降、本研究グループでは、これらの手法を取り入れつつ、研究目的を達成するための最適な手法を開発していくことを計画している。

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、レンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入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) 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* published online 14 2014 e27927
- 2) Yatsuda J, Irie A, Harada K, Michibata Y, Hirotake T, Senju S, Tomita Y, Yuno A, Hirayama M, Sayem MA, Takeda N, Shibuya I, Sogo S, Fujiki F, Sugiyama H, Eto M, and Nishimura Y. Establishment of *HLA-DR4* transgenic mice for the identification of CD4⁺ T cell epitopes of tumor-associated antigens. *PLoS One* 8 (12): e84908, 2013.
- 3) 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.; 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.
- 4) 千住 覚 ヒト iPS 細胞からの樹状細胞作製法の進歩 *実験医学* 31 (12) 1994-1997, 2013
- 5) 千住 覚 iPS 細胞由来のミエロイド細胞のがん治療への応用 別冊・医学のあゆみ 98-104, 2013
- 6) 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. *OncImmunity* in press

- 7) 千住 覚、西村泰治 iPS 細胞から分化させた樹状細胞とマクロファージによるがん治療 臨床免疫・アレルギー科 2014 印刷中

2 . 学会発表

- 1) Senju S, Haruta M, Matsumura K, Nishimura Y. Cancer therapy with human iPS cell-derived immune cells. Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Makuhari Messe, December, 2013
- 2) 千住覚、春田美和、富田雄介、湯野晃、松村桂子、池田徳典、西村泰治：TAP2欠損 iPS-ML を基盤とするあらゆるHLA型に対応可能な樹状細胞産生システム。第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（横浜市）2013年10月3日～5日
- 3) 湯野晃、富田雄介、塚本博丈、黒田泰弘、平山真敏、福間大喜、吉武義泰、千住覚、角田卓也、醍醐弥太郎、中村祐輔、篠原正徳、西村泰治：新規癌精巢抗原KIF-20A由来のCTL誘導活性を有するTh1細胞エピトープの同定。第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（横浜市）2013年10月3日～5日
- 4) 矢津田旬二、入江厚、湯野晃、富田雄介、塚本博丈、千住覚、竹田直樹、澁谷功、十河真司、藤木文博、杉山治夫、江藤正俊、西村泰治：腫瘍関連抗原のCD4⁺ T細胞エピトープの同定に利用可能なHLA-DR4トランスジェニックマウスの樹立。第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（横浜市）2013年10月3日～5日
- 5) 平山真敏、富田雄介、湯野晃、塚本博丈、千住覚、吉武義泰、福間大喜、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72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（横浜市）2013年10月3日～5日

- 6) 西村泰治、富田雄介、湯野晃、塚本博丈、千住覚、入江厚、黒田泰弘、濱田哲暢、吉田浩二、角田卓也、吉武義泰、中村祐輔、篠原正徳：Th1/CTL エピトープが共存する新規 CT 抗原ペプチドの同定と CTL 誘導ペプチド接種患者における特異的 Th 細胞の増加。第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(横浜市)2013年10月3日～5日(10/5 JCA-AACR joint symposium 発表)
- 7) 張エイ、劉天懿、千住覚、廣澤成美、辻村邦夫、中西速夫、園田精昭、坂本安、西村泰治、葛島清隆、植村靖史：多能性幹細胞由来の増殖性ミエロイド細胞を用いたがん免疫療法の開発。第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（横浜市）2013年10月3日～5日
- 8) 牧寛之、植村靖史、張エイ、竹田和由、劉天懿、鈴木元晴、都築忍、岡村文子、赤塚美樹、西村泰治、千住覚、葛島清隆：TRAILを発現する多能性幹細胞由来ミエロイド細胞を用いた細胞医薬の開発。第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（横浜市）2013年10月3日～5日
- 9) 千住覚：iPS細胞を用いた癌治療法の開発。熊本大学拠点形成研究B主催特別講演会、2013年11月15日、熊本大学薬学部 宮本記念館
- 8) 池田徳典、高松孝太郎、西村泰治、千住覚：多能性幹細胞由来樹状細胞を利用した自己免疫疾患の細胞治療法。第41回日本臨床免疫学会総会、海峡メッセ下関(山口県下関市)2013年11月27日～29日
- 9) Hirayama, M., Tomita, Y., Yuno, A., Tsukamoto, H., Senju, S., Yoshitake, Y., Fukuma, D., Hamada, A., Jono, H., Tsunoda,

T., Nakamura, Y., Shinohara, M., and Nishimura, Y. : Identification of a promiscuous IMP-3-derived long peptide that can induce both Th cells and CTLs. 第42回日本免疫学会学術集会、幕張メッセ(千葉市)2013年12月11日～13日

- 10) Yuno, A., Tomita, Y., Tsukamoto, H., Kuroda, Y., Hirayama, M., Fukuma, D., Yoshitake, Y., Senju, S., Tsunoda, T., Daigo, Y., Nakamura, Y., Shinohara, M., and Nishimura, Y. : Identification of a promiscuous KIF-20A derived CD4+ T cell epitope that can induce CTLs both in vitro and in vivo. 第42回日本免疫学会学術集会、幕張メッセ(千葉市)2013年12月11日～13日
- 11) Tsukamoto, H., Senju, S., and Nishimura, Y. : Soluble IL-6 receptor diminishes the differentiation of tumor-specific TH1 cells to exacerbate tumor progression. 第42回日本免疫学会学術集会、幕張メッセ(千葉市)2013年12月11日～13日

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。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。そこで、TAP あるいは β 2M 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、組織不適合性をどの程度回避できるのか検討するために、これらの多能性幹細胞が適正に心筋細胞へ分化可能かの評価を行った。結果として TAP 欠損細胞において拍動する心筋細胞塊への分化誘導を行うことに成功した。

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。

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。まず、

TAP 欠損マウス多能性幹細胞が心筋細胞への分化可能を含む多分化能を有していることを *in vitro*, *in vivo* の分化実験で確認した。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した。分化誘導した心筋細胞は各種心筋細胞マーカーを発現し、かつ電気生理学的に機能的であることを確認した。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。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 によるアロ免疫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 broop 法により分化誘導を行ったところ、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。現在実験系に用いる心筋細胞を得るためにより高効率の誘導系の条件を検討中である。また、両者のアロ移植における細胞の生着性を評価するために、両 ES 細胞を B6 系統のマウスの皮下へ注射し、奇形腫形成の有無を現在確認中である。

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が確認された。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が確認された。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应用可能である可能性が示唆された。

F . 研究発表

1. 論文発表

1) Seki T, Yuasa S, Kusumoto D, Kunitomi A, Saito Y, Tohyama S, Yae K, Kishino Y, Okada M, Hashimoto H, Takei M, Egashira T, Kodaira M,

Kuroda Y, Tanaka A, Okata S, Suzuki T, Murata M, Fujita J, Fukuda K. Generation and characterization of functional cardiomyocytes derived from human T cell-derived induced pluripotent stem cells. PLoS One. 2014 DOI: 10.1371/journal.pone.008564

2. 学会発表

1) Seki T, Yuasa S, Kusumoto D, Nakata H, Yae K, Kunitomi A, Saito Y, Tohyama S, Hashimoto H, Oda M, Egashira T, Kodaira M, Kuroda Y, Tanaka A, Okata S, Fujita J, Murata M, Fukuda K. Drivation of functional cardiomyocytes from human peripheral T cell derived induced pluripotent stem cells. The 30th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section, San Diego, June, 2013

2) Kishino Y, Seki T, Miyamoto K, Tohyama S, Yuasa S, Fujita J, Sano M, Fukuda K. Novel Pathological Detection System of Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes Using T-cell Receptor Gene Locus for Cell Transplantation Therapy. American Heart Association's Scientific Sessions, Dallas, Texas. November 2013

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

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
（再生医療関係研究分野）
分担研究報告書

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

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 免疫療法開発分野長
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

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と CTL エピトープの同定を試みている。ペプチド 25 種（OCT3/4 由来 13 種、Nanog 由来 12 種）を合成して、これらのペプチドを用いて、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しているが、今のところ、ペプチド特異的な CTL を誘導できるペプチドの同定には至っていない。今後は、候補抗原・ペプチドの種類を増やしてさらなる検討を行う。

A . 研究目的

iPS 細胞ストック由来でなく、本人由来の iPS 細胞を用いた再生医療においては、組織不適合性はほぼ皆無である。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、腫瘍化という観点からは、iPS 細胞ストックを利用した同種異系（アロ）移植よりも、こちらの方が危険性が高い。自己 iPS 細胞の臨床応用においては、残存幹細胞混入による腫瘍発生を回避する技術を開発することが必須となる。本研究では、これまでの抗腫瘍免疫研究の経験を生かし、ペプチドワクチンを用いて未分化細胞のみを除去する細胞傷害性 T 細胞を誘導し、腫瘍細胞を除去する手法を検討する。

B . 研究方法

・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

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、未分化細胞に対して特異的に傷害できる CTL を誘導可能なペプチドを同定する。

（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。国立がん研究センターおよび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

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、NODAL、DGF3、LDN6 および OR1D2 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、この中から特に発現の差が顕著である OCT3/4 および NANOG に関して、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エピトープペプチドの探索を開始した。その結果に基づき、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 25 種 (OCT3/4 由来 13 種、Nanog 由来 12 種)に関して、合成ペプチドを作成した。これらのペプチドを用いて、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しているが、今のところ、ペプチド特異的な CTL を誘導できるペプチドの同定には至っていない。

D . 考察

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と CTL エピトープの同定を試みている。候補ペプチドを合成して、未分化細胞に対して特異的に傷害できる CTL の誘導を試みているが、今のところ有望な CTL エピトープの同定には至っていない。候補抗原・ペプチドの種類を増やしてさらなる検討を行う。

E . 結論

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 25 種 (OCT3/4 由来 13 種、Nanog 由来 12 種) を合成して、これらのペプチドを用いて、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しているが、今のところ、ペプチド特異的な CTL を誘導できるペプチドの同定には至っていない。今後は、候補抗原・ペプチドの種類を増やしてさらなる検討を行う。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Sawada Y, Sakai M, Shirakawa H, Nobuoka D, [Nakatsura T](#). Analysis of cytotoxic T lymphocytes from a patient with hepatocellular carcinoma who showed a clinical response to vaccination with a glypican - 3 - derived peptide. *Int. J. Oncol.* 43(4):1019-1026, 2013 Oct.
- 2) Sawada Y, Komori H, Tsunoda Y, Shimomura M, Takahashi M, Baba H, Ito M, Saito N, Kuwano H, Endo I, Nishimura Y, [Nakatsura T](#). Identification of HLA-A2 or HLA-A24-restricted CTL epitopes for potential HSP105-targeted immunotherapy in colorectal cancer. *Oncol. Rep.* 31(3):1051-1058, 2014 Jan.
- 3) Suzuki S, Shibata K, Kikkawa F, [Nakatsura T](#). Significant Clinical Response of Progressive Recurrent Ovarian Clear Cell Carcinoma to Glypican-3-derived Peptide Vaccine Therapy: Two Case Reports. *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* 10(2):1-8, 2014 Feb.

- 4) Chiba T, Suzuki E, Yuki K, Zen Y, Oshima Y, Miyagi S, Saraya A, Koide S, Motoyama T, Ogasawara S, Ooka Y, Tawada A, Nakatsura T, Hayashi T, Yamashita T, Kaneko S, Miyazaki M, Iwama A, Yokosuka O. Disulfiram Eradicates Tumor-Initiating Hepatocellular Carcinoma Cells in ROS-p38 MAPK Pathway-Dependent and -Independent Manners. PLOS ONE. in press.
2. 学会発表
- 1) 肝細胞がんと小児がんに対するペプチドワクチン療法の開発、中面哲也、コアシンポジウム がんペプチドワクチン療法の最近の進歩と臨床応用の展望、第 72 回日本癌学会（横浜）2013 年 10 月 3 日～5 日
- 2) 抗 GPC3 抗体と抗 SPARC 抗体のメラノーマ診断への応用、齊藤桂吾、得光友美、澤田雄、下村真菜美、岩間達章、木庭幸子、松下茂人、福島聡、齋田美江、中面哲也、第 72 回日本癌学会（横浜）2013 年 10 月 3 日～5 日
- 3) Glypican-3 ペプチドワクチン投与によって誘導されたペプチド特異的 CTL の腫瘍内浸潤の証明、吉川聡明、下村真菜美、酒井麻友子、大藤和也、高橋真理、澤田雄、信岡大輔、中面哲也、第 72 回日本癌学会（横浜）2013 年 10 月 3 日～5 日
- 4) 肝細胞がんに対する T 細胞の細胞傷害性はゾレドロン酸処理で増強する、須貝 詩織、吉川 聡明、下村 真菜美、中面 哲也、第 72 回日本癌学会（横浜）2013 年 10 月 3 日～5 日
- 5) リンパ球減少誘導後のホメオスタティックプロリファレーションを利用した癌抗原特異的免疫療法の増強を目指した検討、藤浪紀洋、吉川聡明、澤田雄、下村真菜美、岩間達章、中面哲也、第 72 回日本癌学会（横浜）2013 年 10 月 3 日～5 日
- 6) Possibility of immunotherapy Targeting EGFR T790M Mutation for EGFR TKI-resistant Non-Small Cell Lung Cancer. Ofuji K, Yoshikawa T, Tada Y, Sakai M, Shimomura M, Yamada T, Sasada T, Nakatsura T, The International Symposium on Immunotherapy (London), October 11-12, 2013
- 7) 癌ペプチドワクチンの展望：企業治験と医師主導臨床治験、シンポジウム、中面哲也、第 26 回日本バイオセラピー学会（盛岡）2013 年 12 月 5 日～6 日
- 8) 非小細胞肺癌における EGFR-TKI に対する耐性獲得変異 EGFR T790M 由来抗原の免疫原性の評価、大藤和也、吉川聡明、下村真菜美、多田好孝、酒井麻友子、中面哲也、第 26 回日本バイオセラピー学会（盛岡）2013 年 12 月 5 日～6 日
- 9) CTL および T 細胞の細胞移入療法と効果増強を目指した検討、粕谷匡史、下村真菜美、多田好孝、吉川聡明、安部良、中面哲也、第 26 回日本バイオセラピー学会（盛岡）2013 年 12 月 5 日～6 日
- 10) 放射線治療との融合も期待される最近のがん免疫療法の進歩、中面哲也、第 5 回 日本放射線外科学会（高崎）2014 年 1 月 18 日

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

III . 平成 2 5 年度研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
千住 覚	iPS細胞由来のミエロイド細胞のがん治療への応用	河上 裕	別冊 ・医学のあゆみ	医歯薬出版株式会社	東京	2014年	98-104

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Senju S, Koba C, Haruta M, Matsunaga Y, Matsuura K, Haga E, Sasaki Y, Ikeda T, Takamatsu, K, and Nishimura Y.	Application of iPS cell-derived macrophages to cancer therapy.	OncoImmunology	14	e27927	2014
Yatsuda J, Irie A, Harada K, Michibata Y, Hirota T, Senju S, Tomita Y, Yuno A, Hirayama M, Samiyem MA, Takeda N, Shibuya I, Sogo S, Fujiki F, Sugiyama H, Eto M, and Nishimura Y.	Establishment of <i>HLA-DR4</i> transgenic mice for the identification of CD4 ⁺ T cell epitopes of tumor-associated antigens.	PLoS One	8 (12):	e84908	2013
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	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
千住 覚	ヒトiPS細胞からの樹状細胞作製法の進歩	実験医学	31 (12)	1994-1997	2013
Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Sawada Y, Sakai M, Shirakawa H, Nobuoka D, <u>Nakatsura T.</u>	Analysis of cytotoxic T lymphocytes from a patient with hepatocellular carcinoma who showed a clinical response to vaccination with a glypican-3-derived peptide.	Int. J. Oncol.	43(4)	1019-1026	2013
Sawada Y, Komori H, Tsunoda Y, Shimomura M, Takahashi M, Baba H, Ito M, Saito N, Kuwano H, Endo I, Nishimura Y, <u>Nakatsura T.</u>	Identification of HLA-A2 or HLA-A24-restricted CTL epitopes for potential HSP105-targeted immunotherapy in colorectal cancer.	Oncol. Rep.	31(3)	1051-1058	2014
Suzuki S, Shibata K, Kikkawa F, <u>Nakatsura T.</u>	Significant clinical response of progressive recurrent ovarian clear cell carcinoma to glypican-3-derived peptide vaccine therapy: Two case reports.	Human Vaccines & Immunotherapeutics	10(2)	1-8	2014