

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：ヒトiPS細胞の分化能と腫瘍化傾向を反映するマーカー遺伝子群の探索

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

研究代表者

古関 明彦 ((独)理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター グループディレクター)

3. 研究実施概要

本研究の目標は、造血・免疫系をモデルとして、iPS細胞を用いた細胞治療の有効性と安全性を検証し、またそれに基づいてiPS細胞の形質を反映する分子マーカーの探索を試みることである。本研究は、①造血・免疫系細胞からのヒトiPS細胞の誘導と遺伝子発現・エピゲノム状態の発現プロファイリング、②iPS細胞からの造血系細胞への分化誘導、③マウスおよびヒトiPS細胞からのNKT細胞の誘導系の標準化、の3つの小目標を設定して進められた。

①マウス末梢リンパ球から計25系統の独立したiPS細胞株を樹立し、遺伝子発現プロファイルを明らかにした。その結果、リプログラミングに抵抗するエピジェネティック因子候補としてポリコム群を抽出した。このポリコム群は、ノックダウンするとリプログラミングが促進され、逆に、過剰に発現させると、抑制されることを示した。さらに、ポリコム群の標的遺伝子にリプログラミングの異常が顕われ易いことを示し、その原因が内因性コアサーキット樹立後の、iPS細胞安定化のプロセスにあることを明らかにした。現在、マウスで得られた知見を活かし、ヒト末梢血リンパ球のリプログラミングの至適化を終了し、それらの遺伝子発現プロファイルとエピゲノム状況の解析を進めている。

②ヒトT細胞由来iPS細胞(T-iPS)からT細胞を分化誘導する培養系の開発を行った。臍帯血中および成人末梢血中のCD8T細胞(キラーT細胞)から作製した複数のヒトT-iPSを用いて、OP9-DL1細胞との共培養系により、DP細胞を誘導し、そこに抗CD3抗体によりTCRを介した刺激を入れることで、CD8陽性T細胞を誘導することに成功した。この系により、ヒトメラノーマ特異的キラーT細胞から樹立したiPS細胞を再分化させたところ、TCRへの再刺激により、IFN- $\gamma$ の産生が認められた。すなわち、iPS細胞技術を用いることにより、抗原特異的T細胞を大量に再生できることを示した。

③マウスiPS細胞由来NKT細胞を用いたがん治療モデルの作出に成功し、iPS細胞由来NKT細胞が、生体内でもアジュバント効果を発揮することを示した。また、NKT細胞のサブクラスを特異的に誘導する技術開発に成功した。現在、NKT細胞受容体を発現するヒトiPS細胞の樹立を試みている。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

マウス末梢血リンパ球からiPS細胞を樹立する過程で、リプログラミング抵抗性のエピジェネティック因子として、ポリコム群(PRC1の構成蛋白質であるRing1ファミリー)を同定し、その再構築過程で起こる異常がiPS細胞樹立の一つのボトルネックであることを示した。ヒト末梢血については未だ解析が終了していないが、ヒトiPS細胞でも同様のことが検証されれば、iPS細胞生成の効率化に寄与するだけでなくiPS細胞の品質管理の基準となり得る有用な知見となり、今後iPS細胞の品質管理基準作りに貢献できると期待される。

ヒトCD8陽性細胞からiPS細胞を誘導して機能的なCD8陽性細胞に再分化させる実用的な方法を確立した。さらに、ヒトメラノーマ抗原Mart1特異的T細胞クローン由来iPS細胞から機能的に成熟した抗原特異的キラーT細胞を分化誘導・産生、iPS細胞からの造血系幹細胞や造血系前駆細胞(CD34+ CD38-)の誘導およびそれらの造血系幹細胞・前駆細胞の顆粒球系、単球系、赤芽球系への分化誘導に成功した。造血系細胞への分化誘導について一定の成果は上げたが、その分化機構の解明やマーカー遺伝子群の特定までには至らなかった。

マウスの脾臓に存在する NKT 細胞から iPS 細胞を誘導して、NKT 細胞に再分化させる実用的な方法を確立し特許出願も行っている。更に培地に添加するサイトカインの組み合わせにより効率よく IFN- $\gamma$  を産生する NKT 細胞を高効率に誘導する系を構築することに成功し、この新しい培養法で誘導した NKT 細胞が強力な抗腫瘍活性を有することを示した。しかし、未だ最重要課題であるヒト NKT 細胞から iPS を誘導する方法の確立には至っておらず、また iPS 細胞を用いた細胞治療の有効性は示したものの安全性が十分に検証されていないことは残念である。

マウス iPS 細胞由来 NKT 細胞を用いたがん治療モデルの作製など新たな展開も見られた。一方、本プロジェクトの中心課題である「ヒト iPS 細胞の分化能と腫瘍化傾向を反映するマーカー遺伝子」に関しては、当初計画のうちヒト化マウスを用いた種々白血球発症モデルの樹立の中止等もあり十分に達成したとはいえない。全体として、研究内容および成果が著しくマウスに偏ってしまった点が惜まれる。今後の発展が期待できる分野であり、得られた知見を活かし研究を継続されることを期待する。

2012 年の PLoS Genetics の論文は研究代表者が中心となった良い成果であり、この分野の一流誌にコンスタントに論文を発表し続けた事は評価できる。海外学会での招待講演が 4 件、口頭発表が 4 件と世界に向けての情報発信が少なく、研究費の規模を考えると寂しいものがある。特許に関しては、国内 1 件、国際 3 件の出願が行われた。今後の実用化に向けて、ヒトの NKT 細胞に関する国際出願およびそのための研究成果の創出が強く望まれる。

実質的には代表者の所属するセンターの 4 グループが統合した研究体制で、それぞれの強みを生かし予算面でも相応の規模の研究を展開したと考えられるが、研究代表者の持ち味が発揮された成果が十分に出ておらず、効果的に研究が推進されたとは言い難い。概ね当初の計画通りに進行しているものの、一部未達や方針変更により実施が見送られた課題があり、研究の方向性としては NKT 細胞の iPS 化、特にヒトへの展開をより重視すべきであった。

#### 4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

*in vitro* でのヒト CD8 陽性細胞から作製したヒト T 細胞由来 iPS 細胞から 抗原刺激依存的に IFN- $\gamma$  を産生する T 細胞を再分化誘導する系を構築したことは、今後の免疫細胞療法に新たな選択肢を与える成果であり、ヒト T 細胞由来の iPS 細胞および再分化 T 細胞などのバンク化が実現すれば医療応用上極めて有用であり、科学的・技術的に大きなインパクトを与えるものと評価できる。

また、iPS 細胞から抗腫瘍効果を有する NKT 細胞を誘導するシステムを構築し、マウス iPS 細胞由来 NKT 細胞を用いて *in vivo* での癌転移や再発の抑制に成功したことは大きな成果といえる。ヒト NKT 細胞から iPS 細胞への誘導法の確立が待たれるが、ヒト免疫療法に利用できる可能性が十分にあり、戦略目標達成への貢献が認められる。

成熟リンパ球から iPS 細胞を効率よく樹立する系をヒトとマウスの両方で確立したこと。それらの iPS 細胞の遺伝子発現解析・エピゲノム解析からリプログラミング抵抗性のエピジェネティック因子として、ポリコム群を見出したこと。そして、ポリコム群が iPS 細胞樹立の後期の過程で起こる安定化に寄与することを示したことは、iPS 細胞誘導の効率化や品質管理の基準を考える上で学術面での重要な進歩である。

本プロジェクトで開発された NKT 細胞の研究・応用技術は独自性の高いものであり、これまでの研究で課題が明確となったことを受け、iPS 技術との融合によりさらなる実用性の拡大が期待される。また、特許の取得、新たながん治療モデルの作製など、社会的インパクトにつながる成果が創出された。

#### 4-3. 総合的評価

マウス NKT 細胞から iPS 細胞を誘導して、抗腫瘍活性の高い NKT 細胞に再分化させる手法を確立し、国際特許を出願している。マウスにおいて iPS 細胞由来 NKT 細胞を用いたがん治療モデルの作製など新たな展開が見られ、iPS 細胞を用いた細胞治療の可能性を示した。しかしながら、未だヒト NKT 細胞から iPS 細胞を誘導する方法の確立には至っておらず、ヒトへの応用については未だ道程は長く、医療応用時の安全性の検証等ま

だまだ克服すべき課題がある。

テーマ、チーム編制においても理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センターの粋を集めた提案であったが、研究の規模を考えると創出された成果は必ずしも十分とは言えない。また、研究全般にわたって、研究代表者の主体性が明確でなかったと考えられる。

ヒト末梢血由来のiPS細胞の遺伝子発現プロファイルとエピゲノムの解析はまだ進行中の段階である。マウスの研究で得られたポリコーン群の機能がiPS細胞樹立の一つのボトルネックとなることのヒトでの証明や、ヒトNKT細胞由来のiPS細胞からNKT細胞への再分化させる系の確立など、特にヒト細胞を用いた研究で未達の項目が見られる。残りわずかの期間ではあるが、特にヒトへの展開をより重視して研究項目を絞り込み、当初目標の達成を目指していただきたい。