戦略的創造研究推進事業　CREST
研究領域「人工多能性幹細胞（iPS 細胞）作製・
制御等の医療基盤技術」
研究課題「iPS 細胞由来の樹状細胞とマクロファー
ジを用いた医療技術の開発」

# 研究終了報告書

研究期間　平成20年6月～平成26年3月

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）

## §1. 研究実施の概要

(1)実施概要

**1) ヒト iPS 細胞からの無血清・無フィーダー分化誘導培養による樹状細胞ならびにマクロファージの大量産生技術の開発**

ヒト iPS 細胞から作成したミエロイド細胞に、レンチウイルスベクターを用いて cMYC と BMI1 などを導入することにより、GM-CSF と M-CSF の存在下で長期間にわたって増殖する細胞 iPS-ML を作成できた。iPS-ML は、IL-4 を添加すると樹状細胞へ分化する。この技術により、樹状細胞およびマクロファージを安定的に大量生産することが可能となった。

**2) iPS 細胞由来の樹状細胞およびマクロファージによる悪性腫瘍治療法の開発**

抗腫瘍効果を有する各種の分子を発現させた iPS-ML をエフェクター細胞とした癌治療法の開発を目的として研究を行った。iPS−ML を、ヒトの胃癌あるいは膵臓癌細胞を腹腔内に生着させた SCID マウスに腹腔内投与すると、腫瘍局所に集積し、腫瘍組織内へ浸潤することを観察した。さらに、インターフェロンβを発現させた iPS-ML の投与により、ヒトの胃癌および膵臓癌の腹膜播種および肝転移に対する治療効果が認められた。

**3) 多能性幹細胞由来の樹状細胞による免疫応答の抑制的制御に関する研究**

多能性幹細胞由来の樹状細胞を、自己免疫･炎症性疾患の治療、あるいは、臓器移植における拒絶反応を制御するための特異的免疫制御技術として将来的に応用するための基礎的検討を行った。マウスの自己免疫性糖尿病モデル（NOD マウス）および脳脊髄炎モデル（EAE）を用いて、ES 細胞由来の樹状細胞（ES-DC）を用いた自己免疫抑制についての解析を行った。

**4) iPS 細胞由来の遺伝子改変マクロファージによるアルツハイマー病治療法の開発**

アルツハイマー病の原因物質である β アミロイドタンパクを分解するプロテアーゼである Neprilysin2を発現する iPS-ML を作成した。iPS-ML が、培養系においてβアミロイドタンパクを分解することを確認した。さらに、モデルマウス脳内へこの iPS-ML を移入することにより、マウス脳間質液中の可溶性βアミロイドタンパクを分解できることを観察した。

**5)再生医療における組織不適合性の問題の解決を目指した iPS 細胞における HLA 関連遺伝子の改変**

再生医療を目的とした患者毎の個別の iPS 細胞作製は、医療経済的に成立しないとする見方がある。この問題を解決する手段として、HLA ハプロタイプ iPS 細胞ストックを設立することが計画されているが、頻度の低い HLA ハプロタイプは、カバーできないと考えられる。そこで、ヒト iPS 細胞において HLA クラス I の発現に関わる TAP の遺伝子改変を行うことによりこの問題を解決する手法を検討した。

**6) 末梢血単球の増殖誘導法とこれを用いた樹状細胞の大量生産技術**

cMYCとBMI1を導入することにより、末梢血単球の増殖誘導も可能であることを見いだした。単球由来の増殖細胞（CD14-ML）は、M-CSFとGM-CSFの存在化で、樹状細胞への分化能力を保持しつつ1-2ヶ月間増殖する。この手法により、ヒトの末梢血単球からの樹状細胞作成効率が飛躍的に改善した。

**7) マウス多能性幹細胞由来樹状細胞によるがん抗原特異的 T 細胞の活性化の検討**

マウスの ES 細胞に由来するミエロイド系細胞に cMYC を導入して作成したミエロイド細胞ライン（ES-ML）を用いた細胞ワクチンの効果に関して研究を行った。マウスにメラノーマ細胞を移植した担癌モデルにおいて、腫瘍抗原を負荷した ES-ML に由来する樹状細胞をマウス個体に投与することにより、腫瘍抗原特異的 T 細胞を誘導し、腫瘍拒絶が可能であることを観察した。

(2)顕著な成果

＜優れた基礎研究としての成果＞

**1. ヒト末梢血単球に cMYC と BMI1 を導入することによる増殖誘導の発見**

ヒトiPS細胞から作成したミエロイド細胞から増殖能力と樹状細胞への分化能力を有するiPS-MLを作成できるという知見に基づき、末梢血単球で同様の検討を行った。その

結果、cMYCとBMI1を導入することにより、末梢血単球の増殖誘導も可能であることを見いだした。この成果は、ヒトの末梢血白血球に含まれるの細胞分画が特定の遺伝子の導入により増殖誘導できることを示した初めての例である。(Haruta et al. Hum. Immunol 2013)

＜科学技術イノベーションに大きく寄与する成果＞

1. iPS 細胞を用いることによりマクロファージおよび樹状細胞を大量生産する技術の開発

ヒト iPS 細胞由来のミエロイド細胞に、cMYC と BMI1 などを導入することにより、GM-CSF と M-CSF の存在下で長期間にわたって増殖する細胞 iPS-ML を作成できることを見いだした。iPS-ML は、IL-4 を添加すると数日で樹状細胞(iPS-ML-DC)へ分化する。この技術により、樹状細胞およびマクロファージを安定的に大量生産することが可能となった。この成果は、後述する組織不適合性の解決技術と合わせ、免疫細胞治療用の樹状細胞およびマクロファージの工業的大量生産への道を開くものである。(国内出願:2010-221809、米国出願: 13/825,883)

2. iPS-ML による腹膜播種悪性腫瘍治療法の開発

iPS-ML 技術を活用し、代表的な難治性癌である胃癌腹膜播種および膵臓癌の細胞治療技術を開発する研究を行った。xeno-graft マウスモデルを用いた治療効果の検討を行った結果、ヒトの iPS−ML は、ヒトの胃癌細胞株を腹腔内に生着させた SCID マウスに投与すると、腫瘍局所に集積し組織内へ浸潤することを観察した。さらに、インターフェロン β を発現させた iPS-ML の投与により、ヒトの胃癌および膵臓癌の腹膜播種と肝転移に対する治療効果が認められた。(Koba et al. PloS One 2013)

3. HLA 関連遺伝子の標的改変により iPS 細胞の医療応用における組織不適合性を解決する手法の開発

再生医療を目的とした患者毎の個別の iPS 細胞作製は、医療経済的に成立しないとする見方がある。また、癌治療の場合等、診断後に患者個別の iPS 細胞の樹立と治療用細胞作成のための分化誘導培養を行うような時間的な余裕はない。このような問題を解決する手段として、集団中で頻度の高い HLA を網羅した HLA ハプロタイプ iPS 細胞ストックの設立が開始されている。しかしながら、iPS 細胞ストックでは、頻度の低い HLA ハプロタイプ(日本人集団の10%程度)をカバーできないと考えられる。本研究では、ヒト iPS 細胞における HLA 関連遺伝子の改変により、HLA クラス I の発現を制御する手法を開発した。(Haruta et. al. Gene Ther 2013)

## §2. 研究実施体制

(1)研究チームの体制について

① 「千住」グループ

研究参加者

| 氏名 | 所属 | 役職 | 参加時期 |
|---|---|---|---|
| 千住　覚 | 熊本大学大学院生命科学研究部免疫識別学分野 | 准教授 | H20.6～ |
| 入江　厚 | 同上 | 講師 | H20.6～H22.3 |
| 松村　桂子 | 同上 | 技術補佐員 | H20.6～H20.7<br>H21.4～ |
| 春田　美和 | 同上 | 教務助手 | H20.8～H25.8 |
| 福島　聡 | 同上 | D4 | H20.6～H21.3 |
| 今井　克憲 | 同上 | D4 | H20.6～H21.3 |
| 松永　雄亮 | 同上 | D4 | H20.6～H21.3 |
| 井上　光弘 | 同上 | D4 | H20.6～H22.3 |
| 池田　徳典 | 同上 | 非常勤研究員 | H20.6～H25.8 |
| 林田　裕希 | 同上 | D4 | H20.6～H23.3 |
| 冨田　雄介 | 同上 | D3 | H20.6～H23.3 |
| 高松　孝太郎 | 同上 | D3 | H22.4～H25.3 |
| 木庭　千尋 | 同上 | M2 | H23.4～H24.3 |

研究項目

・ヒト iPS 細胞からの無血清・無フィーダー分化誘導培養による樹状細胞ならびにマクロファージの大量産生技術の開発
・iPS 細胞由来の樹状細胞およびマクロファージによる悪性腫瘍治療法の開発
・多能性幹細胞由来の樹状細胞による免疫応答の抑制的制御に関する研究
・iPS 細胞由来の遺伝子改変マクロファージによるアルツハイマー病治療法の開発
・再生医療における組織不適合性の問題の解決を目指した iPS 細胞における HLA 関連遺伝子の改変
・末梢血単球の増殖誘導法とこれを用いた樹状細胞の大量生産技術

② 「植村」グループ

研究参加者

| 氏名 | 所属 | 役職 | 参加時期 |
|---|---|---|---|
| 植村　靖史 | 愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部 | 主任研究員 | H23.4～ |

研究項目

・マウス多能性幹細胞由来樹状細胞によるがん抗原特異的T細胞の活性化の検討

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

・iPS-MLを用いた悪性腫瘍治療に関しては、熊本大学大学院生命科学研究部皮膚科学分野に対して細胞の譲渡と技術提供を行ない、ゼノグラフトモデルを用いた悪性黒色腫の治療法の研究を遂行中であり、現在までに非常に有望な結果が得られている。
・同消化器外科分野と共同で、胃癌臨床検体に由来する初代培養胃癌細胞を用いて治療法の有効性の検討を行なっている。この結果を踏まえ、数年後には、化学療法に反応性の

無腹膜播種胃癌患者を対象とした第1相臨床試験を実施するべく、協議を行なっている。
・第2相以降に関しては、国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センターとも共同で研究を実施することを念頭に情報交換等を行なっている。

## §3. 研究実施内容及び成果

### (1) ヒトiPS細胞からの無血清・無フィーダー分化誘導培養による樹状細胞ならびにマクロファージの大量産生技術の開発

（熊本大学　千住グループ）

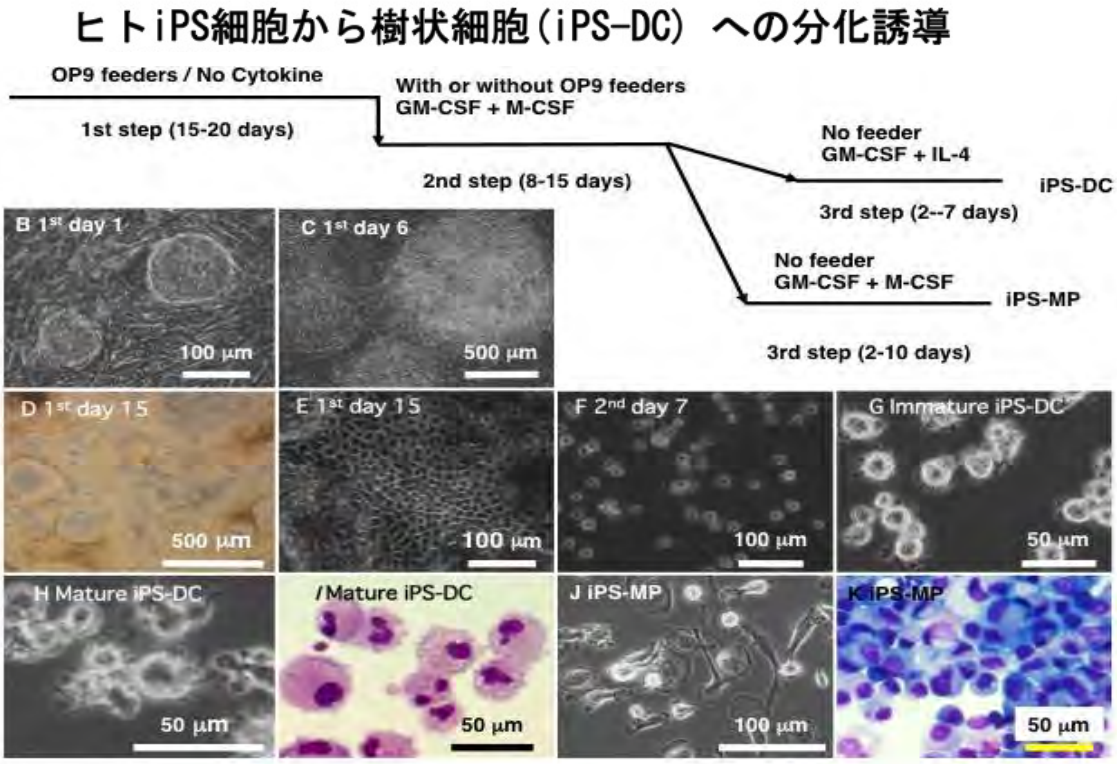
**研究の目的**

樹状細胞およびマクロファージを用いた細胞治療には、がんやアルツハイマー病の治療等、様々な用途が考えられる。ヒトの樹状細胞およびマクロファージは、末梢血中の単球（モノサイト）から分化させることにより作製することが可能である。しかしながら、単球は、体外ではほとんど増殖させることができないため、細胞治療を行うのに十分な数の樹状細胞を調整するためには大量の単球を必要とする。

iPS細胞は、必用に応じて生体外で増殖させることが可能であり、細胞ドナーの負担を伴わず大量の細胞を得ることができる。また、iPS細胞を用いることによって、治療の目的に応じて遺伝子改変を行い、機能を修飾した樹状細胞やマクロファージを作製することも可能と考えられた。他の項目で述べるような、iPS細胞由来の樹状細胞およびマクロファージを用いた細胞治療を実現するために、iPS細胞からこれらの細胞を、安定して、大量に産生する方法の開発を目指した。また、医療応用に向けて、ゼノ（異種）由来の成分を含有しない培養液で細胞を培養することを試みた。

**研究の方法および結果**

まず、ヒトES細胞を用いて以前に開発した分化誘導法を用いて、下の図に示す通り、ヒトiPS細胞から樹状細胞（iPS-DC）およびマクロファージ(iPS-MC)を作成できることを確認した。次に、この分化誘導培養法を改変し、分化誘導の効率を改善した。さらに、マウス由来のフィーダー細胞であるOP9細胞と牛血清を用いること無く、分化誘導する方法を開発した。

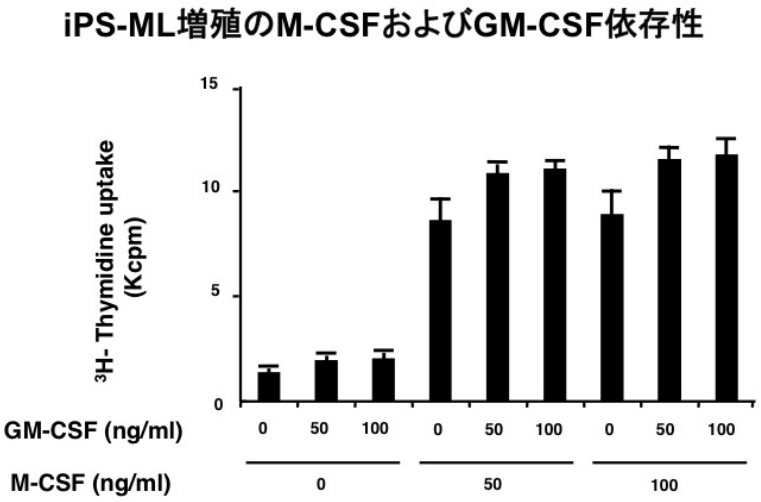


しかしながら、ここで開発した分化誘導培養法には、以下のような問題点があった。

1. 未分化状態のiPS細胞から治療用細胞を作製するまでに、30～40日を必要とする。
2. 得られる分化細胞の数は、使用したiPS細胞の10～20倍程度。
3. 安定した分化誘導培養には、手技の熟練が必要。

以上のような問題点のために、大量の分化細胞を作成するためには、大規模な設備と人手が必要であり、非常にコストが高くなることが予想された。そのため、細胞治療法としての実用化は困難であると考えられた。

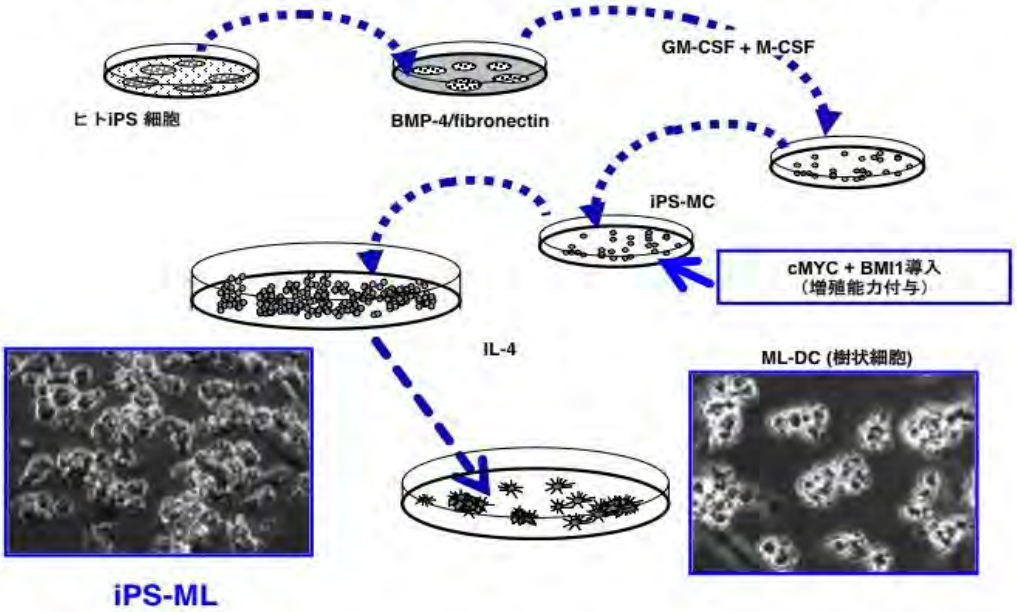
そこで、分化誘導の効率を改善することをめざしてさまざまに試行錯誤を行なった。その結果、分化誘導の途中の過程のミエロイド細胞に、レンチウイルスベクターを用いてcMYCとBMI1,MDM2,EZH2などを導入することにより、GM-CSFとM-CSFの存在下で長期間にわたって増殖する細胞iPS-MLを作成できることを見いだした。iPS-MLは、倍加時間２－３日で増殖するため、単純に培養のスケールを拡大するだけで浮遊培養による大量生産が可能である。iPS-MLは、貪食活性やin vivoでの腫瘍組織への輸送活性等、マクロファージ様の性質を有している。また、iPS-MLは、一ヶ月以上培養し、増殖した後も、IL-4(20 ng/ml)を添加すると数日で増殖を停止し樹状細胞(iPS-ML-DC)へ分化する。さらに、GMP(Good manufacturing Practice)グレードでの供給が可能な市販の無血清培養液を使用することにより長期に培養することが可能である。以上により、ヒトiPS由来の増殖性ミエロイド系細胞であるiPS-MLの特性を生かして、樹状細胞およびマクロファージを安定的に大量生産できる方法を開発した（次ページ図)。




**考察および今後の展望**

本研究の成果を臨床的に有効な細胞医療技術として実用化するためには、$10^{9\sim10}$個の樹状細胞あるいはマクロファージを最小限の労力と費用で作成するシステムを開発する必要がある。今後は、培養液や培養器材等の検討もふくめて培養法のさらなる改良を行い、臨床試験へ向けた準備を進める。具体的には、本学生命科学研究部のGMP準拠型細胞培養室に設置予定の閉鎖式自動培養システムを用いて、GMP準拠培養によるヒトiPS-MLの大量培養を行なう。

## ヒトiPS細胞からミエロイド系免疫細胞を大量生産する技術



(2) iPS細胞由来の樹状細胞およびマクロファージによる悪性腫瘍治療法の開発
（熊本大学　千住グループ）

研究の目的

難治性癌と治療法開発の現状

今日、医療サイドが有効な治療を提供できない、いわゆる「癌難民」が、国内に50万人以上存在すると言われている。例えば、腹膜播種を伴う胃癌の場合、５年生存率が約１０％と極めて予後不良である。また、固形癌中最も予後不良とされる膵臓癌では、外科的に切除できない場合、平均生存期間は半年程度であり、手術適応となった場合でも５年生存率は約２０％である。国立癌研究センター癌対策情報センターの集計によれば、国内における胃癌と膵臓癌の年間罹患数(2007年)と死亡数(2011年)の概数は、以下の通りである。

胃癌　　年間罹患数：１１７，０００人　　死亡数：５０，０００人
膵臓癌　　年間罹患数：　２９，０００人　　死亡数：２９，０００人

発癌あるいは癌進展のメカニズムの解明等、癌の基礎研究は、近年、長足の進歩を遂げている。しかしながら、例えば腹膜播種胃癌や膵臓癌に関しては、そのような基礎研究の成果が治療成績の改善にはほとんど貢献できていないのが現状である。今後は、その成果をより直接的に国民に還元できるように、具体的な治療法の開発に重点をおいた研究への取組みも重要である。

悪性腫瘍とマクロファージおよび樹状細胞の関わり

癌組織中にはマクロファージや樹状細胞の浸潤が高い頻度で認められ、これらの腫瘍浸潤免疫細胞の動向は癌の進展に多大な影響を及ぼす。樹状細胞は、癌細胞由来の抗原を提示し、抗原特異的キラーT細胞およびヘルパーT細胞を活性化する役割を有している。腫瘍抗原特異的なT細胞の活性化は、獲得免疫系による腫瘍細胞攻撃の起点となるものである。

マクロファージの抗腫瘍効果に関しては古くから報告がある一方（*J Exp Med 160: 55, J Immunol 130: 2011, J Immunol 167: 5077*）、近年は、腫瘍局所のマクロファージが癌の局所浸潤や転移を助長することを示す報告が相次いでいる（*Cancer Res 66: 605, Cancer Metastasis Rev 25: 315*）。これまでの報告をもとに考察すると、マクロファージは、元来、癌細胞に対する攻撃能力を有しており、生体内で高頻度に出現している腫瘍細胞を発生初期の段階で死滅させるという役割を担っているものと考えられる。しかしながら、がんが増殖し臨床的に診断可能なサイズまで進展している場合は、体内サイトカイン環境の変化等により、マクロファージが抗腫瘍効果を失い、逆に、マクロファージによる組織リモデリング活性や血管新生誘導活性等が腫瘍の浸潤や転移を促進するものと考えられる。

癌に対する樹状細胞療法およびマクロファージ療法の現状

樹状細胞を用いた癌に対するワクチン療法は、国内外において広く実施されており、近年、その有効性が大規模な臨床試験において実証されている。そして、2010年には、米国のFDAにより前立腺癌に対する樹状細胞療法であるPROVENGEが承認されている。治療に用いられる樹状細胞は、通常、患者自身の末梢血単球から作製される。しかしながら、例えば化学療法を受けている癌患者等では、末梢血単球の数や質に問題が有り、十分な数の樹状細胞を調整できない場合がある。個々の患者から単球を採取し、樹状細胞へ分化させるための培養操作を個別に行う必要があり、治療費が高額になることもまた、問題である。

マクロファージの抗腫瘍活性に着目した臨床試験が、海外においては複数実施されている（*Cancer Res 50: 7450, J Leukoc Biol 64: 419, Chest 121: 1921*等）。これらの臨床試験においては、アフェレーシス操作を用いて患者血液を大量に処理して末梢血単球を分離し、これを数日間培養して作製したマクロファージを患者体内に戻す、という治療が試みられている。しかしながら、これまでに報告されているいずれの臨床試験においても、明らかな治療効果は認められていない。その理由としては、投与されたマクロファージの数が治療効果を発揮するには不十分であり、また、がん患者の単球由来のマクロファージ

は本来の抗腫瘍効果を失っていたものと考えられる。

樹状細胞療法とマクロファージ療法のいずれにおいても、治療効果の改善やその普及には、細胞ソースの問題を解決する必要がある。すなわち、治療効果の高い細胞を、必要な数だけ、かつ、一般医療として実現可能なコストで供給する方法を開発することが求められる。本研究グループは、世界に先駆けてヒトiPS細胞からマクロファージおよび樹状細胞を作製する方法を開発し、さらに、前述したように、M-CSFに依存して長期に亘り増殖できるミエロイド系細胞（iPS-ML）を作製する方法を開発している。生理的な機能を有するヒトのマクロファージを人工的に大量に作製する技術は、他に類のないものである。また、iPS細胞由来のマクロファージを抗腫瘍エフェクター細胞として用いる研究は、本グループ以外には国内外を通じて皆無である。

## 研究の方法および結果

### iPS-MLによるin vitroにおける抗腫瘍効果の検討

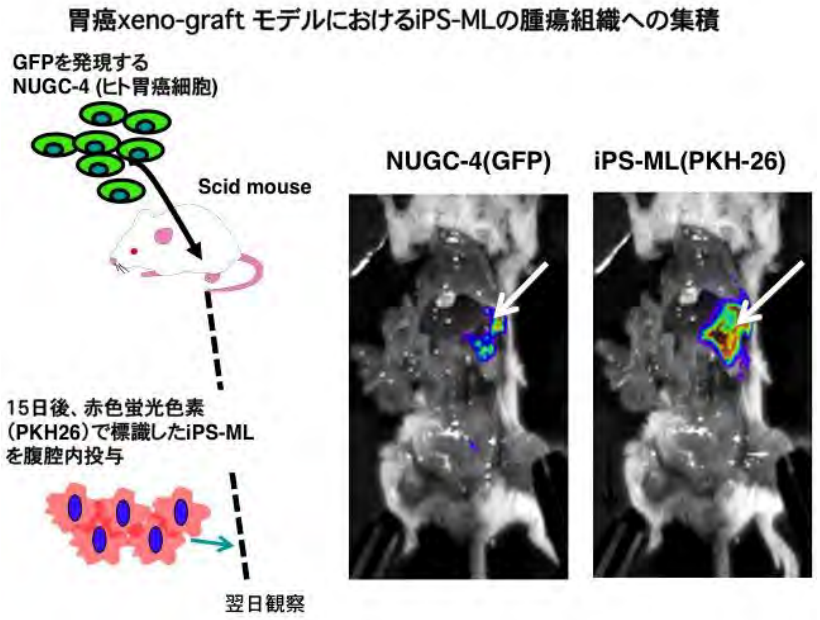
各種腫瘍細胞にルシフェラーゼを導入し、安定発現体を作製した。ルシフェーラーゼ発現腫瘍細胞とiPS-MLを24-72時間共培養した後に、基質であるルシフェリンを添加し発光を計測することにより、生存している腫瘍細胞の数を定量する実験系を樹立した。この実験系を用いることにより、iPS-MLによる腫瘍細胞に対する、増殖抑制効果を解析することができることを確認した。

免疫細胞による抗腫瘍効果を担う分子として、IFNs TNFα Fas TRAIL 等が知られている。これらの分子を人為的に発現させたiPS-MLの抗腫瘍効果の検討を、in vitroの実験系において行った。in vitroの実験にて高い効果が認められたものをin vivoの実験によりさらに評価し、より強い抗腫瘍活性のあるiPS-MLを作製する、という方針で研究を進めた。各種の抗腫瘍作用のある分子を発現させたiPS-MLとヒトの胃癌あるいは膵臓癌細胞株を共培養し、腫瘍増殖に対する抑制活性を検討した。

前ページの図に示す実験では、ルシフェラーゼを発現させた胃癌細胞株NUGC-4と各種の抗腫瘍因子を発現させたiPS-MLを３日間共培養し、培養終了後にルシフェリンを添加して発光計測を行ない、生存しているNUGC-4細胞の数を調べた。図に示されるように、この実験の結果では、抗HER2抗体（Fcレセプターに融合した単鎖抗体）とインターフェロンβを同時に発現するiPS-MLにより、最も強い抗腫瘍効果が認められた。

### GFP発現腫瘍細胞株を用いたiPS-MLの腫瘍組織への浸潤の解析

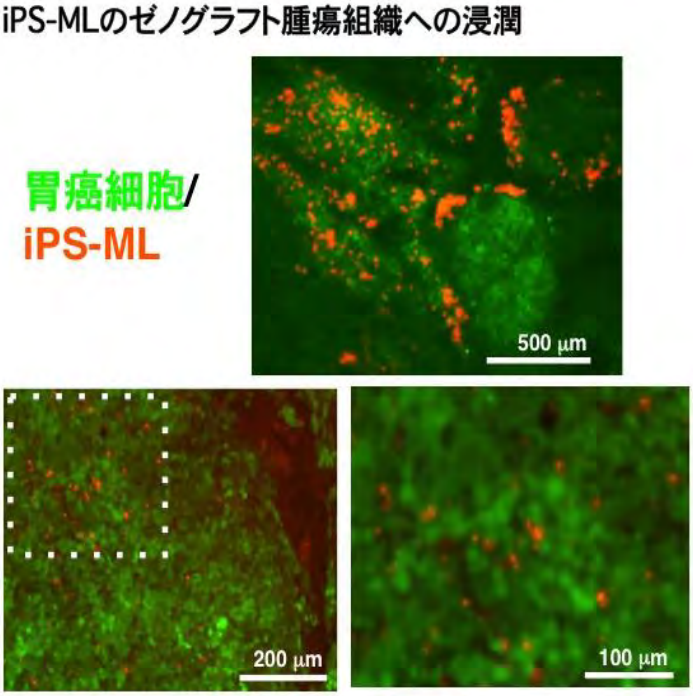
前述したように、固形癌の組織中にはマクロファージの浸潤が高頻度に認められる。そこで、iPS-MLをヒト由来の腫瘍細胞を生着させたマウス個体に投与した場合に、癌組織に浸潤するかどうかを検討した。GFPを発現させたヒト胃癌細胞（NUGC-4）を免疫不全（SCID）マウスの 腹腔へ投与し2週間経過した後、蛍光色素PKH-26を用いて染色したiPS-MLを投与した。その翌日、マウス



を解剖し腹腔内を露出させた状態で蛍光撮影を行った。形成されているNUGC-4腫瘍は、GFP検出条件（Ex/Em:475/520 nm)、投与したiPS-MLは、PKH-26検出条件（Ex/Em:550/600 nm）にて撮影した（前ページ図)。腫瘍は、主に大網部に形成されている。一方、iPS-ML投与から約20時間後の時点で、投与したiPS-MLの大部分が腫瘍局所へ集積していることがわかる。

さらに、腫瘍組織を摘出し、凍結切片を作成して、蛍光顕微鏡による観察を行った。癌細胞は緑色蛍光、iPS-MLは赤色蛍光で検出されている。iPS-MLが、腫瘍塊の周辺部あるいは腫瘍内部へ浸潤しており、浸潤が著明な部分では腫瘍組織の破壊が生じていることがわかる（下図)。

**iPS-MLによる抗腫瘍効果の検討（in vivo解析）**




ゼノグラフトモデルを用いて、このiPS-MLによる in vivoにおける抗腫瘍活性の検討を行った。ルシフェラーゼを発現させたヒトの癌細胞株をSCIDマウスの腹腔内に投与することにより、腹膜播種モデルを作製し、ルシフェリン発光によるバイオイメージングにより腹膜播種の進展を経時的に評価する実験系を樹立した。この実験系を用いてiPS-MLのin vivoにおける抗腫瘍効果の検討を行った。

この実験では、ルシフェラーゼを発現させたヒト胃癌細胞株NUGC-4あるいは膵臓癌細胞株MIAPaCa-2をSCIDマウスの腹腔内に移植し、腫瘍の生着を確認した後、抗HER2単鎖抗体とIFN-βを発現するiPS-MLを用いて治療を行った。この結果、IFN-βを発現するiPS-MLが、これらの癌細胞の腹膜播種に対し顕著な治療効果を有することを観察した。

次ページの図には、MIAPaCa2を用いて行なった実験の結果を示す。腫瘍細胞をSCIDマウスの腹腔内に移植して３日後にバイオイメージングアッセイを行ない、腹腔内への腫瘍細胞の生着を確認した。この時点でマウスを治療群と対照群（非治療群）に分け、治療群に対してのみIFN-βを発現するiPS-MLによる治療を行なった。そして、腫瘍移植１０日後と１７日後に腫瘍の進展を調べた。

無治療対照群の場合、腫瘍の進展を示すルシフェラーゼ発光の総量が観察期間中に徐々に増大している。一方、iPS-MLによる治療を行った場合は、腫瘍が縮小傾向を示している。マウス個体によってはiPS-ML治療により腫瘍がほぼ完全に退縮することが観察された。

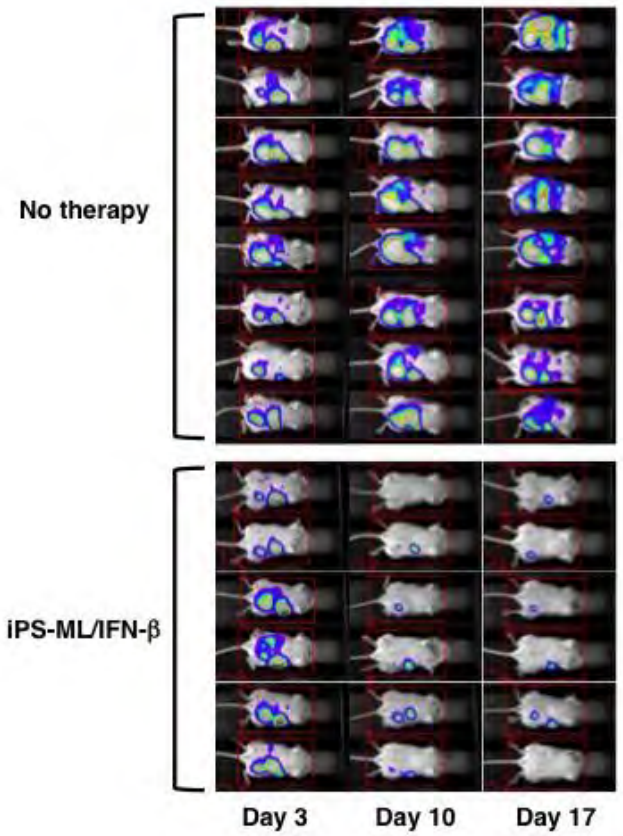
**iPS細胞から樹状細胞作成とT細胞活性化に関する機能解析**

ヒトES細胞を用いて以前に開発した分化誘導法を用いて、ヒトiPS細胞から樹状細胞を作成できることを確認した。次に、この分化誘導培養法を改変し、分化誘導の効率を改善した。さらに、マウス由来のフィーダー細胞であるOP9細胞や動物血清を用いること無く、分化誘導する方法を開発した。このようなヒトiPS細胞由来の樹状細胞（iPS-DC）は、樹状細胞としての基本的性質である強力なアロT細胞刺激能力、タンパク質抗原をプロセスし提示する

能力、および、IL-12等のサイトカインを産生する能力を有していた。

さらに、前項で述べたように、分化細胞の収量を飛躍的増大させる方法として、増殖ミエロイド細胞iPS-MLを作した。そして、大量の樹状細を作成するために、iPS-MLを状細胞へ分化させることをみた。その結果、iPS-MLは、ILを添加すると数日で増殖停し、樹状細胞（iPS-ML-DC）と分化することを観察したiPS-ML-DCは、iPS-DCと同等るいはそれ以上に強力なT細刺激活性を有していた。また遺伝子改変を行なっiPS-ML-DCにより、腫瘍抗MART1に特異的なT細胞を活化することが可能であった。

IFN-β発現iPS-ML投与による膵癌癌(MIAPaCa2)増殖抑制効果




**考察**

以上の結果から、投与したiPS-MLは腫瘍組織へ集積し、腫瘍局所においてiPS-MLから抗腫瘍分子が産生され、腫瘍を治療することが可能と考えられる。iPS-MLは、単純な浮遊細胞培養により増殖させることができるため、培養スケールを拡大し、癌治療法として実用化するために必要な数のiPS-MLを作成することが可能であると考えられた。さらに、京都大学iPS細胞研究所を中心として設立が進められているHLAハプロタイプiPS細胞ストックに由来するiPS細胞、あるいは、別項（５）に記載しているHLA関連遺伝子の標的改変技術により、アロのiPS-MLを使用することにより、製造コストの問題とiPS-ML投与後の悪性腫瘍化の問題も解決できる。また、iPS-ML-DC作成法により、癌に対する樹状細胞ワクチン療法を、現在の水準より、高い効果で、細胞ドナーへの身体的侵襲無く、さらに、低コストで実施するための技術的な基盤を開発できた。

今後、iPS-MLを用いた悪性腫瘍治療に関して、実用化を目指して臨床試験を実施することを計画している。熊本大学大学院生命科学研究部皮膚科学分野に所属する研究者に細胞の譲渡と技術提供を行ない、ゼノグラフトモデルを用いた悪性黒色腫の治療法の研究を共同で遂行中である。これまでに、メラノーマに対する治療効果においても非常に有望な結果が得られている。また、同消化器外科分野と共同で、胃癌臨床検体に由来する初代培養胃癌細胞を用いて治療法の有効性の検討を行なっている。この結果を踏まえ、数年後には、化学療法に反応性の無腹膜播種胃癌患者を対象とした第1相臨床試験を実施するべく、協議を行なっている。さらに、第2相以降に関しては、国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センターとも共同で研究を実施する。

(3) **多能性幹細胞由来の樹状細胞による免疫応答の抑制的制御に関する研究**
（熊本大学　千住グループ）

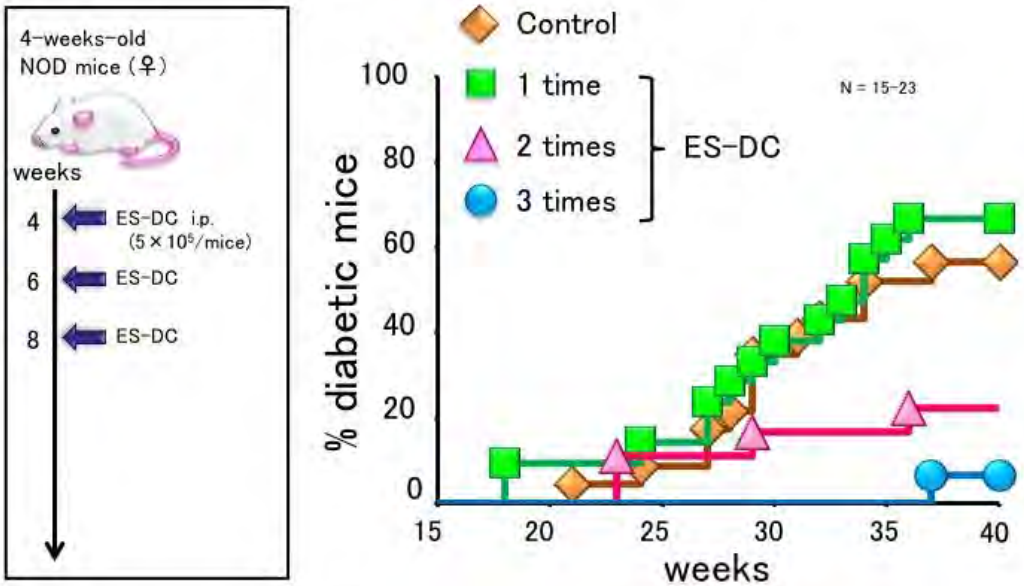
**研究の目的**
樹状細胞は、T細胞の活性化において必須の役割を果たしている抗原提示細胞であるが、自己免疫反応や過剰な免疫応答を抑制する上でも、重要な役割を担っている。そこで、生体外で培養し、遺伝的改変等により機能を修飾した樹状細胞を生体に移入することにより、免疫応答を任意に制御することができると考えられる。今日、自己免疫疾患の治療には、ステロイドホルモン剤を含む免疫抑制剤が使用されているが、免疫抑制剤の使用には、免疫応答能力の低下に伴う日和見感染あるいは癌発症のリスクを伴う。移植医療における移植片拒絶やGVHDの問題を解決するためにも、免疫抑制機能を有する樹状細胞を用いたアロ（同種異系）抗原特異的な免疫制御技術が有用であると期待される。
　本研究では、多能性幹細胞由来の樹状細胞に関する研究の成果を、自己免疫･炎症性疾患の治療、あるいは、臓器移植における拒絶反応を制御するための特異的免疫制御技術として応用するための基礎的検討を行った。具体的には、マウスの自己免疫疾患モデルを用いてES細胞由来の樹状細胞（ES-DC）を用いた自己免疫抑制現象についての解析を行うことを目的とした。

**研究の方法**
マウスES-DC作成は、以前に報告した方法(Senju, Blood, 2003)により行った。自己免疫現象に起因して糖尿病を自然発症するNOD（Non Obese Diabetic）マウスに由来するES細胞は、九州大学の永淵博士により樹立されたものを分与いただいた。NODマウスに対し、生後4週令から12週令間での間、２週間に１度、NOD-ES細胞由来の樹状細胞（NOD-ES-DC）を１-3回投与した。その後、定期的に血糖値を測定し、糖尿病発症の有無を検討した。血中グルコース300mg/dL以上となった時点で、糖尿病発症と判断した。さらに、膵島の組織学的解析、自己抗体の出現、T細胞分画の解析などの検討を行い、治療効果と免疫学的な制御の関連について研究を行った。
　実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の誘導は、6週から8週齢のC57BL/6 マウスにMOG（Myelin Oligodendrocyte Protein）に由来する自己抗原ペプチドを免疫することにより行い、誘導後の臨床症状の評価を行った。臨床症状は以下のようにスコアリングした。 0, 正常；1, 尾部の軽度の麻痺；2, 尾部の完全麻痺や歩行不安定；3, 後脚弱化；4, 後脚完全麻痺；5, 四肢麻痺；6,　死亡の0～6のスケールで評点した。そして、EAE誘導後10日目にES-DCを経静脈的に投与し、臨床症状に与える影響、脊髄組織への炎症細胞浸潤の程度、および、投与したES-DCの体内分布を検討した。

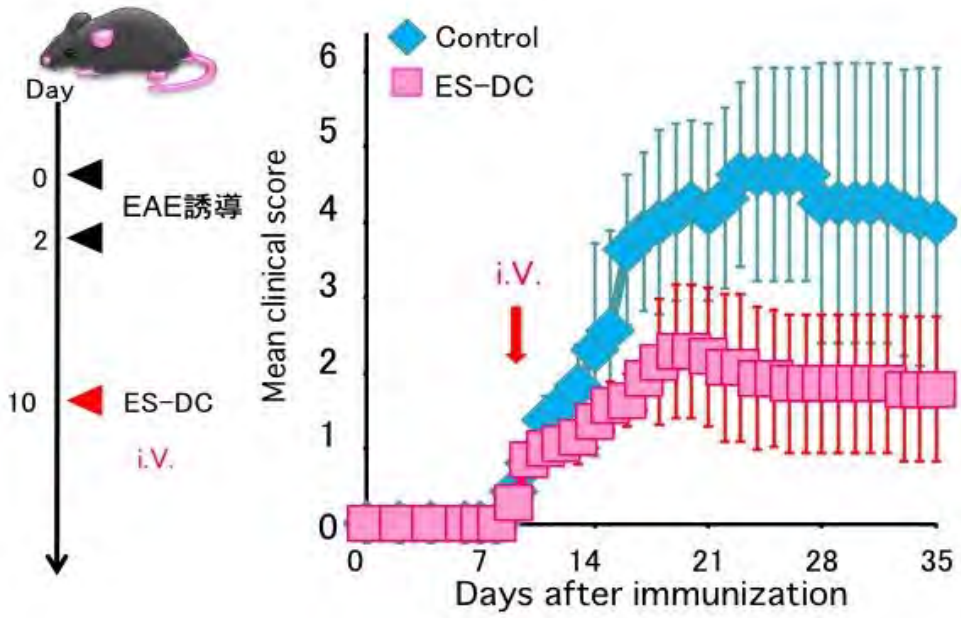
**研究の結果**
**NODマウスを用いた検討**
ES-DCによる治療を行なったマウスと対照群のマウスにおける、週令毎の糖尿病発症率の変化を次ページのグラフに示している。ES-DC投与を行わない対照群のNODマウスの場合は、生後４０週までに６０％以上の個体が糖尿病を発症した。一方、生後12週令までの間にES-DCを3回投与することにより、生後５０週まで、糖尿病の発症をほぼ完全に抑制することが可能であった。NODマウスにおける糖尿病発症に伴って観察される膵島抗原GADに対する自己抗体の産生、および、膵島への炎症細胞の浸潤と組織破壊も、ES-DCの投与によって顕著に抑制されていた。また、無治療対照群と比較し、ES-DC治療群では、Th1、Th17細胞の相対的減少と制御性T細胞の相対的増加が認められた。

一方、過去には、未分化なES細胞による免疫応答の抑制的制御に関する研究結果も報告されていた。しかしながら、本研究においては、未分化なNOD-ES細胞を同じスケジュールで投与しても糖尿病発症に対する抑制効果は見られなかった。

ES-DC投与による自己免疫性糖尿病発症抑制




ES-DC投与による自己免疫性脊髄炎の臨床症状の改善




**EAEモデルを用いた検討**

C57BL/6 マウスにおいてEAE誘導後、10日目に同系のES-DCを投与することにより、臨床症状を有意に軽減することができた。非治療対照群の平均スコアが４を超えていたのに対し、治療群では、平均スコアが２程度であった（上図）。

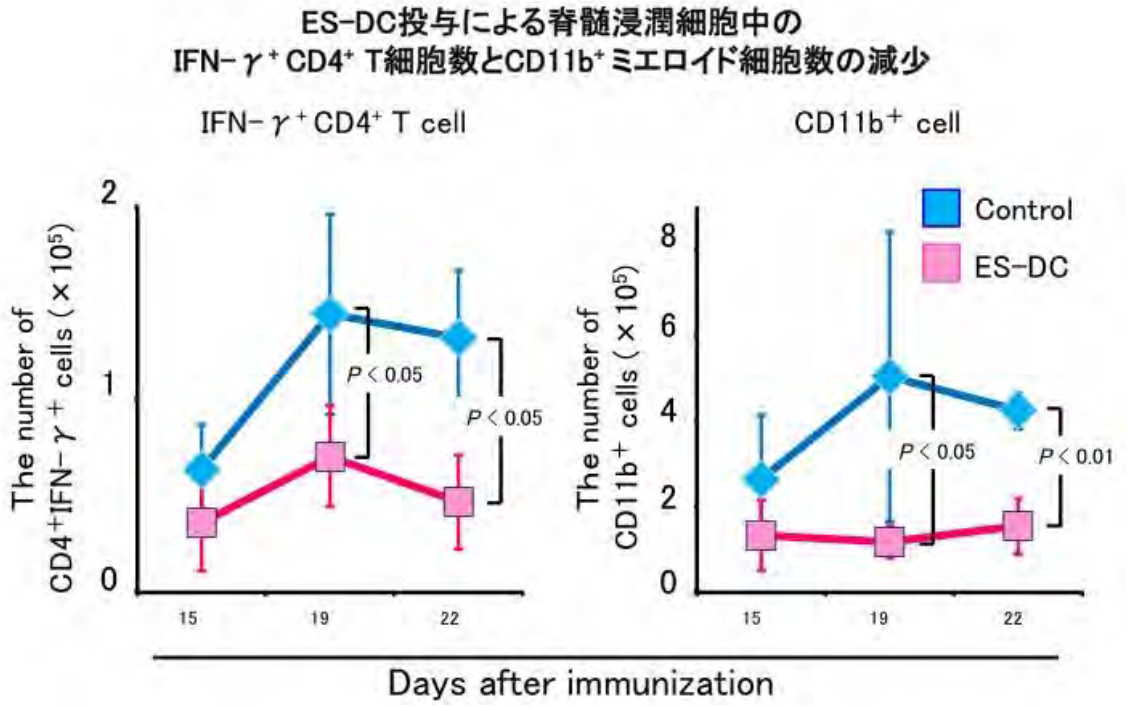
組織中の細胞を抽出してフローサイトメーターによる解析を行ったところ、経静脈的に投与したES-DCのうち一部は脊髄組織へ移行しており、投与細胞の中でCD11b発現の高いものが脊髄組織へ移行しているという結果であった。

また、ES-DCの投与により、脊髄組織へ浸潤する白血球（その殆どは内在性の細胞）、インターフェロンγ（IFN-γ）を産生するTh1細胞、およびCD11b陽性細胞の数が有意に減少していた（下図）。免疫学的な解析の結果、ES-DCの投与により、Th1細胞の分化および増殖が抑制されたことにより治療効果が得られたものと考えられた。一方、脊髄組織における免疫制御性T細胞の数は、対照群と同レベルであった。結果的に、ES-DC治療を行なうことによって、病巣局所である脊髄組織において、Th1細胞と制御性T細胞のバランスが変化し、病変局所の炎症が軽減したものと考えられる。

一方、ES-DCによる治療を行なったマウスにおいて、外来抗原に対する免疫応答は通常のレベルに保たれていることが確認できた。この結果は、ES-DC投与により、感染防御の為に必要な免疫応答能力が損なわれること無く、病的な免疫応答を是正されたことを示す。

**考察**

マウスの自己免疫モデルを用いた検討により、多能性幹細胞由来の樹状細胞が自己免疫を抑制することが明らかとなった。将来、ヒトiPS細胞由来の樹状細胞の医療応用を実現することができれば、免疫抑制剤の使用に伴う免疫不全を惹起すること無く自己免疫疾患等の治療を行なえるようになるものと期待される。



## (4) iPS 細胞由来の遺伝子改変マクロファージによるアルツハイマー病治療法の開発
（熊本大学　千住グループ）

### 研究の目的

アルツハイマー病は、認知症の主要な原因疾患であり、脳内神経細胞に進行性の機能的障害と脱落が生じる疾患である。また、加齢に伴って発症リスクが上昇する疾患であり、急速に高齢化が進む日本の社会において、社会的・経済的にも、非常に深刻な問題である。

アルツハイマー病の剖検例において認められる脳組織中の老人斑は、アミロイド前駆タンパク(APP)の限定分解によって生じたβアミロイドタンパク（Aβ1-42）の重合物を主な成分としている。これまでに得られている知見から、βアミロイドタンパクが蓄積し、局所的にβアミロイドの濃度が上昇することが、疾患発症の最初の引き金であると考えられる。加齢に伴って疾患発症のリスクが上昇する理由としては、加齢と共にβアミロイドの分解を担っているNeprilysin等のプロテアーゼの発現量が低下し、産生と分解のバランスが崩れた結果、βアミロイドが蓄積することが考えられる。このような疾患発症の機序を考えると、何らかの方法により局所に蓄積したβアミロイドタンパクを分解あるいは除去できれば、有力な治療法になるものと期待される。

βアミロイドタンパクを分解する薬剤の開発を目指し、製薬企業などを中心に全世界的に多くの試みがなされているものの、現時点では効果が明らかな薬剤はない。また、免疫学的な手法によりβアミロイドタンパクを除去する治療法として、βアミロイドタンパクをワクチンとして投与しすることにより特異的抗体の産生を誘導する、あるいは、βアミロイドタンパクに対するモノクローナル抗体を投与することが検討された。これらの方法は、マウスモデルを用いた実験で有効性が報告されたが、これまでのところ、臨床試験で有効性が示されるにはいたっていない。

この疾患のマウスモデルである変異型ヒトアミロイド前駆タンパク(APP)のトランスジェニックマウスを用いた研究により、神経組織に存在する食細胞であるミクログリア、あるいは血液中の単球に由来するマクロファージがβアミロイドの蓄積を抑制し疾患の進行を遅延させる働きをすることが示されている。一方で、ミクログリアは局所の炎症を惹起し、この疾患を悪化させている、とする報告もある。マクロファージなどの貪色細胞は、一般には、生体内各所において異物あるいは不要物を炎症を起こすことなく処理し、組織の恒常性を保つという役割を有している。

研究代表者は、iPS-MLを応用して、βアミロイドを特異的に貪食し炎症を起こすことなく処理するマクロファージ(iPS-MCあるいはiPS-ML)を作製し、局所で作用させるという治療法を着想するに至った。本研究は、アルツハイマー病の原因物質であるβアミロイドを特異的に分解する貪食細胞（マクロファージ）を作成することを目的とした。本研究の特色は、治療効果を有するマクロファージをiPS細胞から作製する点にある。患者本人由来のiPS細胞をソースとすれば、患者の負担なくマクロファージを大量に作製できる。

本研究では、アミロイドβを処理する能力の高いマクロファージを作成し、まず、in vitroの検討によりその能力を検討することを目的とした。さらに、ヒトのアミロイドβを脳内に蓄積するアルツハイマー病モデルマウスの脳内にこのマクロファージを投与し、マウス脳内においてアミロイドβを減少させられるかどうか検討し、アルツハイマー病治療のための細胞医薬として有用であるかどうか評価することを目的とした。

### 研究の方法

#### アミロイドβタンパクに対する単鎖抗体発現ベクターの作製

本研究では、βアミロイドタンパクに対する抗体をiPS-MPの細胞表面に発現させることにより、βアミロイドを特異的に貪食する活性の高いマクロファージ（iPS-MC）を作製した。抗βアミロイド抗体は、単鎖抗体（scFv)、すなわち、抗体（イムノグロブリン）の重鎖と軽鎖をリンカー配列を介して結合させた。ベクター作製に際しては、公開されているβアミロイドタンパクに対するモノクローナル抗体の可変領域の塩基配列の情報に基づいて単

鎖抗体の可変領域をコードするDNA配列（約900塩基）を設計し、人工的に合成した。さらに、これをFcレセプター（FcγRI）に連結したキメラ分子（scFv-FcRI）として発現するベクターを作製し、iPS細胞に導入した。

**iPS細胞からの遺伝的改変マクロファージ作成**

ヒトのiPS細胞から、OP9共培養法により血液細胞への分化を誘導した。さらに、培養系へM-CSFとGM-CSFを加えて培養することによりマクロファージ(iPS-MC)を作成した。さらに、研究の過程において、前項（１）で述べた方法によって、マクロファージを大量生産できるiPS-ML法に切り替えて研究を実施した。そして、レンチウイルスベクターを用いて、抗βアミロイドscFv、および、βアミロイドを分解するネプリライジン２（Neprilysin 2, NEP2）を発現するiPS-MLを作成した。

**iPS細胞由来のマクロファージによるβアミロイドタンパク処理能力のin vitroにおける検討**

マクロファージによるβアミロイドタンパク処理能力をin vitro の実験により比較検討した。βアミロイドタンパクの貪食能力については、蛍光色素で標識されたマイクロビーズにβアミロイドをコートし、これを培養系へ添加する実験を行った。貪食の経過を蛍光顕微鏡観察でリアルタイムに観察する、さらに、フローサイトメトリーを用いて定量的に解析することにより評価した。

　また、iPS細胞由来のマクロファージ培養系へβアミロイドを添加し、一定時間培養の培養液中のβアミロイド濃度を定量することにより、マクロファージによるβアミロイドの分解あるいは取り込みの能力を評価した。

**SCID/アルツハイマー病モデルマウス（scid-5XFAD）マウスの作成**

若年性にアルツハイマー病を発症する家系の遺伝子解析から、この疾患の発症を促進する遺伝的因子として、βアミロイドタンパクの前駆タンパク質（APP）のアミノ酸置換変異、および、前駆タンパク質をプロセスしβアミロイドを産生するプロテアーゼであるPresenilinの変異が同定されている。変異型ヒトAPPとPresenilin遺伝子の合わせて５箇所の変異を同時に有するトランスジェニックマウス（5X-FADマウス）では、生後3か月目から脳内のβアミロイドタンパクの蓄積が認められる。

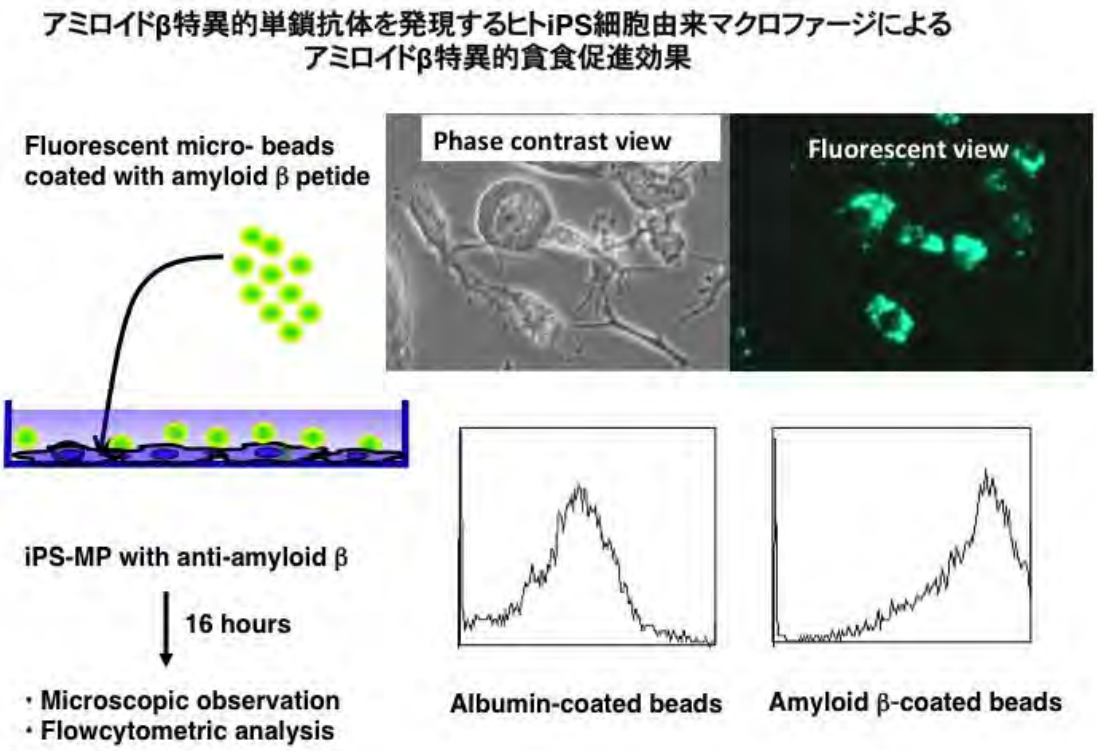
　scidマウスは、Tリンパ球、Bリンパ球ともに欠損しており、ヒト由来の細胞を移植して機能解析を行うことが可能である。前述した5XFADマウスをscidマウスと交配させ、scid-5XFADマウスを作製した。このマウスにiPS-MLを移植することにより、in vivoにおけるヒトのiPS-MLによるβアミロイド蓄積抑制効果の検討を行うことが可能となった。

**モデルマウス脳内へのマクロファージ注入による脳間質液中のアミロイドβ減少効果の検討**

iPS-MLを、上記のように作成したトランスジェニックマウスの脳内に留置したカテーテルから注入することにより、βアミロイドタンパクの蓄積を抑制することができるかどうか、検討した。脳内に留置した微小透析カテーテルにより、脳間質液を連続的に採取した。細胞治療の効果は、ELISAおよびWestern blotによる脳間質中のβアミロイドタンパクの定量により評価した。

**研究結果**

蛍光色素標識マイクロビーズにβアミロイドをコートし、このビーズの貪食を蛍光顕微鏡による観察、および、フローサイトメータ用いて定量化した実験では、抗βアミロイドscFvの発現によりiPS-MCによるアミロイドβ貪食能力を増強できるという結果が得られた（下図）。




一方、iPS-ML培養系へ可溶性にβアミロイドを添加する実験においては、抗βアミロイドscFvの発現には効果が無かった。しかしながら、NEP2を高発現させることにより、マクロファージによるβアミロイド処理能力が向上した。また、株化神経細胞SH-SY5Yを用いたβアミロイドによる神経細胞傷害試験において、iPS-MLの共培養により、細胞傷害が緩和される効果を認めた。この効果は、iPS-MLにNEP2を発現させることにより増強した。

NEP2を発現するiPS-MLをアルツハイマー病モデルマウスの脳内に投与し、微小透析法により脳間質液を連続的に採取し、脳間質中のアミロイドβの濃度測定することにより、細胞投与の効果を検討した（下図）。脳実質内へiPS-MLが適正に移植されていることは、組織学的解析により、留置したチューブ先端から脳実質内へiPS-MLが移動していることにより確認した。そして、モデルマウス脳内へNEP2を高発現するマクロファージを注入することにより、脳間質液中のアミロイドβを減少させることができた。

**考察**

以上のように、ヒトのiPS細胞から、アミロイドβを処理する能力を有するマクロファージを作成することができた。In vitroの検討においては、NEP2を発現するIPS-MLによる、アミロイドβ分解と神経細胞保護作用を認めたが、in vivoの検討では、一時的にアミロイドβレベル低下させることが可能であるという結果に留まり、認知機能の改善にはいたらなかった。今後、iPS-MLを用いたアルツハイマー病の治療を実現するための課題として、静脈内投与などにより、iPS-MLを脳内へ効率よく移行させる方法を開発する必要がある。そのためには、マクロファージの組織移行に関与する分子の同定と解析等の研究を行う必要がある。

## (5) 再生医療における組織不適合性の問題の解決を目指したiPS細胞におけるHLA関連遺伝子の改変

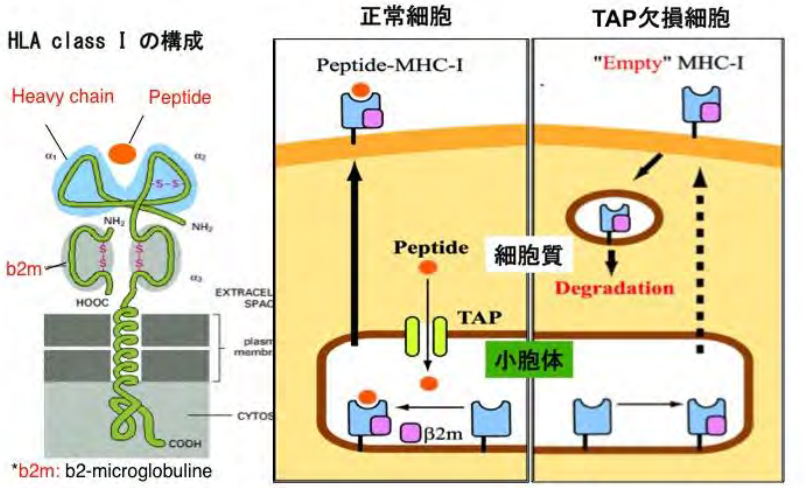
（熊本大学　千住グループ）

### 研究の目的

再生医療等の用途での患者個別のiPS細胞の樹立には、コストがかさむこと、また、iPS細胞を樹立し、さらに治療用の細胞を作成するまでにかなりの時間を要するという問題がある。これらの問題の解決法として、HLAハプロタイプについてホモ接合であるドナーからiPS細胞を樹立して様々なアリルのHLAを網羅したiPS細胞のバンク（HLAハプロタイプiPS細胞ストック）を設立することが計画されている。すなわち、集団中で頻度の高いHLAハプロタイプホモ接合ドナー由来のiPS細胞のバンクを設立するものである。しかしながら、頻度の低いHLAハプロタイプでは、ホモ接合のドナーを得ることが難しいため、日本人集団中の１０％程度は、このバンクではカバーできないと予測される。そこで、ヒトiPS細胞においてHLAクラスIの発現に関わる遺伝子の改変を行ってこの問題を解決するべく研究を行った。

### 研究の方法および結果

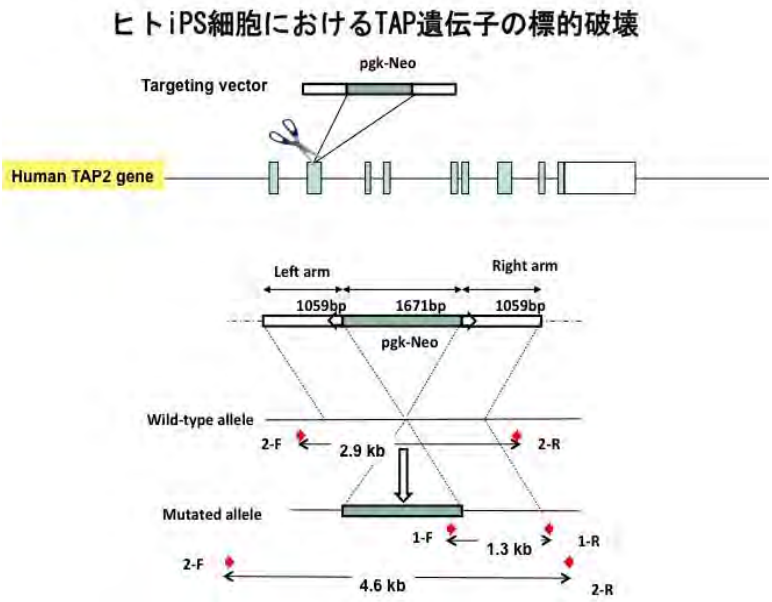
iPS細胞を用いる再生医療における組織不適合性の問題の解決法としてHLA遺伝子の標的改変という方法も考えられるが、HLA遺伝子群は、全長4,000kbに及ぶ領域に存在する多重遺伝子であり、技術的な困難が予想された。そこで、HLA分子の細胞表面への発現に関与する分子の遺伝子を破壊する方がより現実的と考えた。



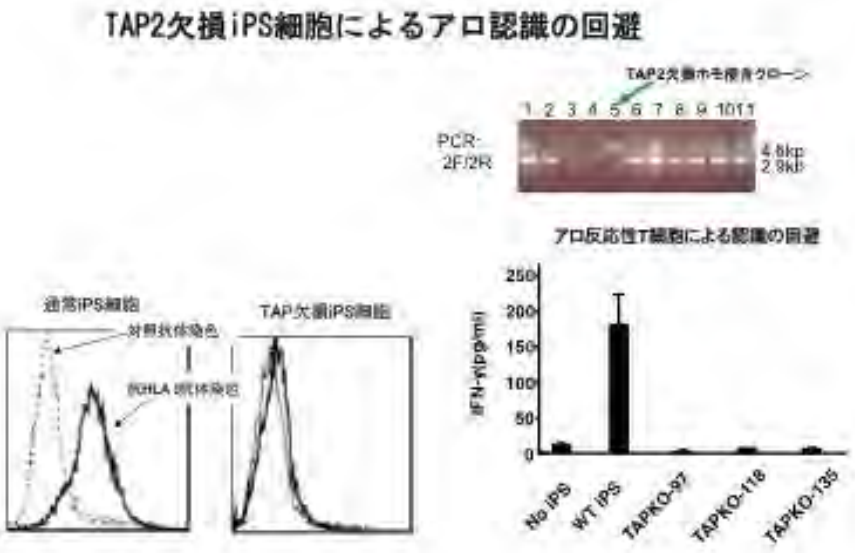

一般に、同種異系（アロ）のドナーに由来する細胞を移植した場合、移植細胞に発現するドナー由来のMHC（ヒトにおいてはHLA）クラスI分子を宿主のアロ反応性CTL（細胞障害性T細胞）が認識し、拒絶反応が起こる。従って、拒絶反応を回避する手段として、拒絶反応の標的となる移植細胞上のMHCクラスⅠ分子の発現を抑制するという方法が有効である。MHCクラスI分子が細胞表面で安定発現するためには、β2ミクログロブリン（β2M）とペプチドを含む三量体の形成が必要である。このペプチドは、細胞質内でタンパク質が分解された産物であり、TAP(transporter associated with antigen processing)分子を経由して、細胞質から小胞体内へ輸送される。TAP分子を欠損した細胞では、小胞体内へペプチドが供給されないため、MHCクラスI分子の細胞表面における発現が抑制され、拒絶反応を回避できると予想された（上図)。

近年、Zinc-Finger Nuclease あるいはTALEN を組み込んだ任意の塩基配列に特異的DNA切断酵素の作製法が開発され、これを用いることにより、ヒトの多能性幹細胞における遺伝子標的破壊および標的導入も可能となっている。本研究においては、ヒトのiPS細胞において遺伝子標的破壊によりTAP2の遺伝子を欠損させた。遺伝子標的破壊は、相同組換えベクターとTAP遺伝子の第２エクソンの配列を切断するZFNの発現ベクターを同時に導入することにより行った（次ページ図)。

この操作により、非常に高い効率（47/153クローン中）で遺伝子の標的破壊株が分離され、そのうちの３クローンは、TAP2欠損のホモ接合体であった。TAP2欠損ホモ接合のiPS細胞は、HLAクラスIの細胞表面への発現が極端に低下しており、また、アロ反応性のCD8T細胞による認識を回避することができた(下図)。TAP欠損iPS細胞由来のiPS-MLにおいても、アロ免疫応答を回避にできることを確認した。



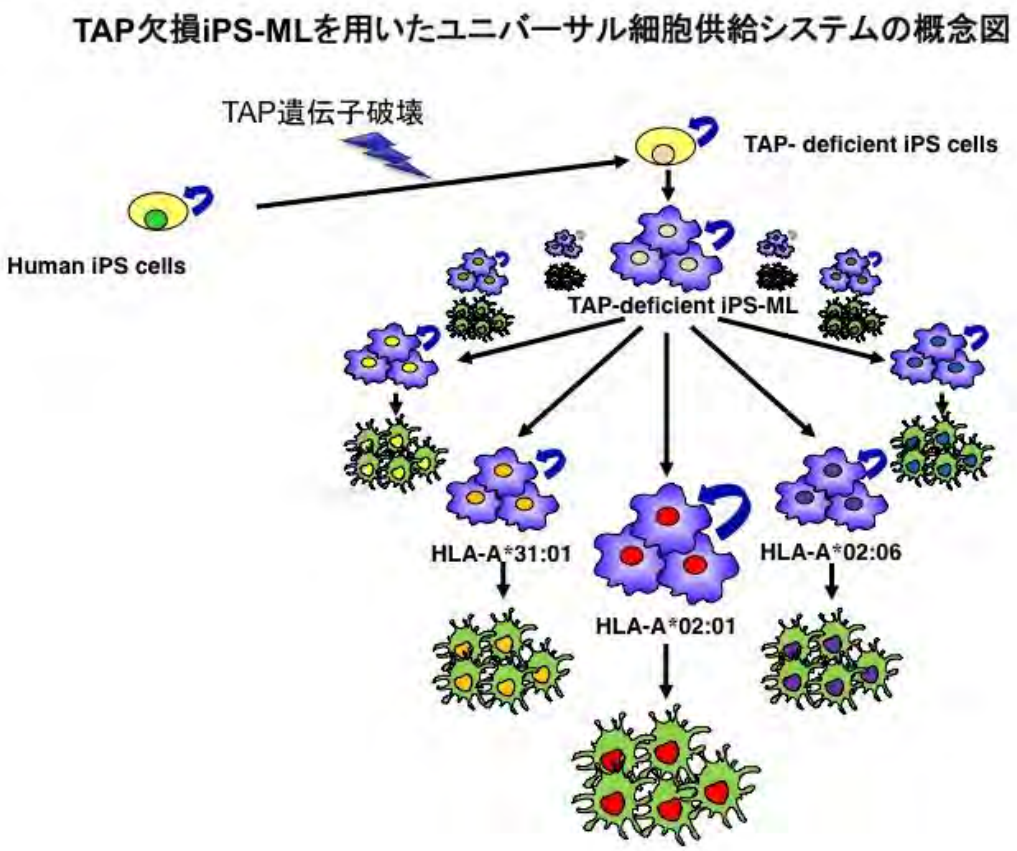

さらに、このシステムの樹状細胞ワクチンとしての汎用性を評価するために、in vitroにおける抗原特異的T細胞誘導実験を行なった。本来HLA-A*02:01を有しない(HLA-A*02:01-negativeのドナーに由来する)iPS細胞においてTAP2を欠損させ、iPS-MLを作成後にHLA-A*02:01を導入し、この細胞からiPS-ML-DCを作成した。このiPS-ML-DCに腫瘍抗原MART1/Melan2に由来しHLA-A*02:01に結合するペプチドを負荷し、これを刺激細胞としてHLA-A*02:01を有するアロのドナーに由来する末梢血CD8T細胞を培養した。この結果、HLA-A*02:01-MART1に特異的に反応するT細胞ラインを作成することができた。すなわち、アロのiPS細胞由来のTAP欠損樹状細胞を用いることにより、アロ反応を回避して、特定の抗原に特異的なT細胞を刺激できることが示された。




**考察**

以上より、TAPを欠損するiPS-MLを用いることにより、任意のHLA型を有するレシピエントに対し、HLAクラスI拘束性の抗原特異的T細胞を活性化するための樹状細胞作成のための細

胞生産システムを構築できると考えられる（下図)。
　HLA関連遺伝子の標的破壊により、アロ反応性を一定程度回避できることを証明した。この手法を用いることにより、細胞バンクでのカバーが困難な低頻度HLAアリルにも対応できると考えられる。ただし、HLAハプロタイプを完全にマッチさせた場合もTAPを欠損させた場合も、いずれにせよアロ免疫反応の誘導を完全に回避することは不可能である。したがって、再生医療の場合に移植した細胞を長期間に渡って生着させるためには、免疫抑制剤の投与による拒絶反応の抑制が必要であると考えられる。



## (6)末梢血単球の増殖誘導法とこれを用いた樹状細胞の大量生産技術

（熊本大学　千住グループ）

### 研究の目的

樹状細胞は、最も強力なTリンパ球刺激能力を有する抗原提示細胞である。動物実験の結果から腫瘍抗原を負荷した樹状細胞を用いる免疫療法には、腫瘍抗原をアジュバンドと混和して投与するワクチン法よりも、より高い抗腫瘍効果が期待される。今日、樹状細胞を用いた癌に対する免疫療法は、世界中で実施されている。最近、米国において、前立腺癌に対する自己樹状細胞を用いた免疫療法の大規模な臨床試験が行われた結果、生存期間を延長するという効果が確認された。

樹状細胞療法のさらなる普及とその効果の検討を進める上では、治療に用いるための樹状細胞の安定供給が大きな課題である。通常実施されているプロトコールで樹状細胞療法を行うためには、１クールあたり$2〜5x10^8$個の樹状細胞を必要とする。樹状細胞は、末梢血中の単球をサイトカイン存在下で培養することにより得られるが、ヒトの末梢血単球を体外で増殖させせることことは不可能であり、大量の単球を必要とする。ヒトの末梢血単球（モノサイト）に増殖性を付与する既存技術は存在しないため、現在、樹状細胞療法を行うためには、成分採血装置（アフェレーシス）を用いて大量の血液を処理し白血球の分離が行われている。一般的には、その後、CD14の発現を指標として単球の分離が行われ、樹状細胞への分化誘導培養が行われている。

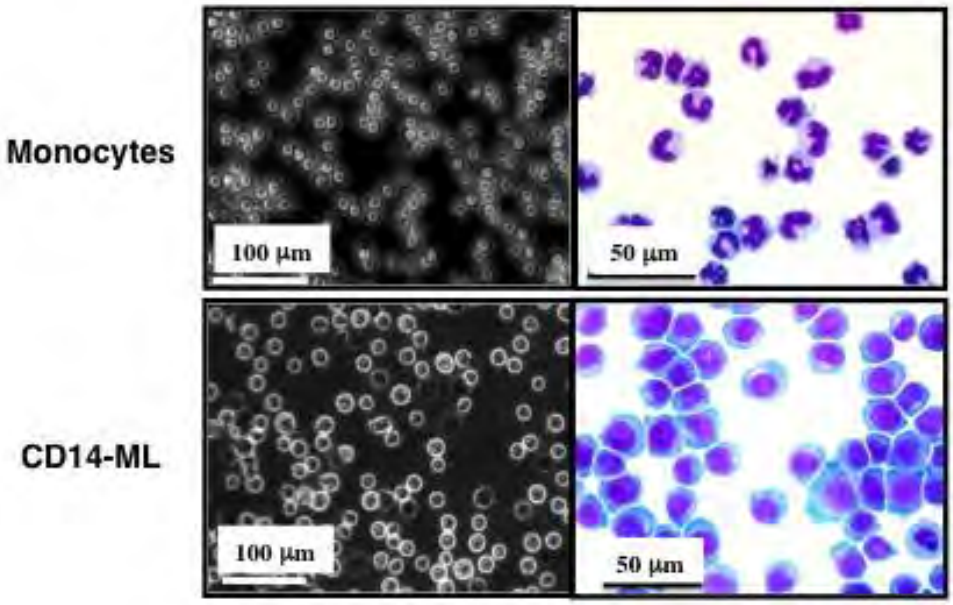
樹状細胞療法時のアフェレーシスでは大量の血液を処理する必要があり、がん患者にとっては侵襲的である。さらに、末梢血単球の数や採取後の生存率には、細胞ドナーにより大きな違いがあるため、アフェレーシスを行っても十分な細胞数を確保できない場合もある。特に、化学療法を受けている癌患者等において末梢血単球数の減少があり、しばしば樹状細胞療法を実施することが不可能である。

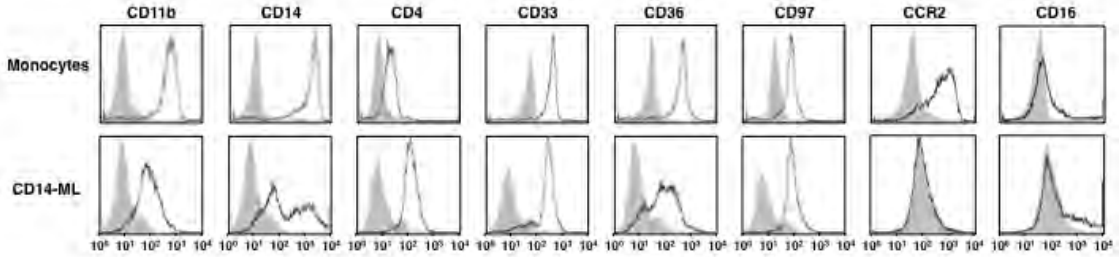
本研究グループでは、前述したように、ヒトiPS細胞から作製したミエロイド系前駆細胞に対して細胞増殖･不死化因子を導入することにより、長期間に渡り増殖し続けるミエロイド系細胞ライン(iPS-ML)を作製する方法を開発した。そして、ヒト末梢血単球でも同様に増殖誘導が可能であるかどうか検討を行った結果、末梢血単球の増殖誘導も可能であることを見いだし、この単球由来の増殖細胞をCD14-MLと名付けた。本研究では、CD14-MLを用いた樹状細胞作成とその機能解析を行った。

### 研究方法および結果

本研究グループでは、単球に対してレンチウイルスベクターを用いてcMYCとBMI1を同時に導入し強制発現させせることにより、細胞ドナーによっては1,000倍以上に細胞を増幅できることを発見した。そして、この増殖するCD14陽性細胞を、CD14-MLと命名した（次ページ図)。CD14MLは、M-CSFとGM-CSFの両方の存在する場合に増殖する。また、前述のiPS-MLとは異なり、増殖因子遺伝子導入後２ヶ月程度で増殖を停止するという特性がある。

CD14-MLを作成するには、まず、末梢血単核細胞中から、抗CD14抗体磁気ビーズを用いて、CD14陽性細胞を分離する。これをGM-CSFとM-CSFの存在化において培養しつつ、cMYCとBMI1を発現するレンチウイルスベクターを感染させる。レンチウイルス感染後、２−３週後より、細胞増殖が観察される。




CD14-MLは、通常の末梢血単球と同様にIL-4存在下で培養することにより、２－３日で樹状細胞（CD14ML-DC）へと分化した。次ページの図には、CD14ML-DCの形態（OK432による刺激後）を示した。CD14ML-DCは、強力なT細胞刺激活性を有し、また、OK432刺激により大量のIL-12を産生した。さらに、CD14ML-DCを用いて、in vitroで腫瘍抗原特異的なCTLラインを樹立することも可能であった。すなわち、CD14ML-DCは、T細胞刺激細胞として、通常の単球由来樹状細胞と同等かあるいはそれ以上の能力を有するものであった。

これまでに、12名の健常人ドナーに由来する単球にcMYCとBMI1を導入し、増殖誘導を試みている。そのうち、３名のドナー由来の単球については、非常に顕著な増殖が認められ、倍加時間２－３日程度にて、一ヶ月以上の増殖が可能であり、1,000倍以上の細胞数への増殖が可能であった。また、9 名のドナーについては、20-100倍程度への増殖を認めた。一方、残りの３名については、遺伝子導入を行っていない対照サンプルと比較して、有意な細胞数の増加を認めなかった。

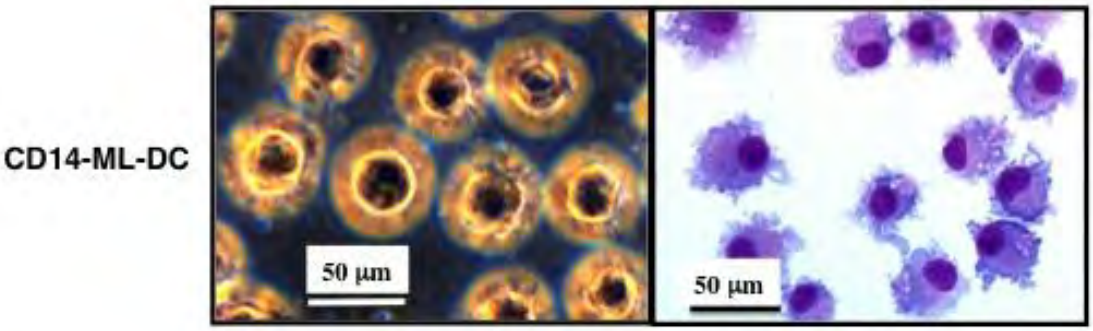
**考察**

一般に、HLAクラスI結合性を有する合成ペプチドを負荷した場合、半減期12～24時間程度で、細胞表面上のHLAクラスI上から消失すると言われている。一方、遺伝子導入により樹状細胞自身に腫瘍抗原を発現させた場合、持続的な抗原タンパクの産生とエピトープ提示がなされるため、ワクチンとして投与した場合のT細胞刺激効果が高くなる。また、この方

法では、合成ペプチドの場合と異なり、低頻度HLAクラスI（HLA-A2やA24以外）やHLA-Bによって提示されるエピトープなど、未同定の腫瘍抗原エピトープも提示されるため、より強い抗腫瘍免疫を誘導できることが期待される。

今後の研究においては、複数の腫瘍抗原について、抗原遺伝子導入CD14-MLを作製する。ワクチン標的として有用な腫瘍抗原には、細胞癌化に関与するもの少なくない。そこで、このような腫瘍抗原を遺伝子導入により発現させる場合は、腫瘍化遺伝子としての機能を発揮することのないよう、腫瘍化を誘導しない変異体を作製する、あるいはコードする遺伝子の一部をベクターに挿入し発現させる等の工夫をする。

本研究の成果を実用化できれば、比較的少量の末梢血から樹状細胞を安定して大量生産することが可能になり、樹状細胞療法の普及に大きな貢献をなすものと期待される。ヒトの末梢血単球を、腫瘍化させることなく、また、樹状細胞への分化能力を保持したまま増殖させるという本技術は、これまでの常識を覆すものである。



（７）マウス多能性幹細胞由来樹状細胞によるがん抗原特異的T細胞の活性化の検討
（愛知県がんセンター研究所　植村グループ）

研究の目的

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。最近、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。

本研究グループでは、マウスES細胞の遺伝子改変を行い、これを*in vitro*においてDCに分化させることにより、その機能を人為的に修飾したDCを作製し、これを生体内に投与して生体の免疫応答を抗原特異的に制御する技術を報告してきた。例えば、ES細胞由来のDC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、がんを抗原特異的に排除することに成功した。多能性幹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を得ることが可能と考えられていた。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ことが明らかになってきた。したがって、簡便かつ大量にDCを作製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と考えた。

研究の方法および結果

本研究では、多能性幹細胞からDCへの分化誘導過程に自己増殖因子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DC様細胞を作製し、これの機能を解析して細胞ワクチンとしての有用性を明らかにした。マウス由来の胚性幹細胞（ES細胞）から中胚葉分化段階を経てミエロイド系分化させた細胞に、c-Myc遺伝子を導入することでGM-CSF依存性に増殖する細胞を構築した。この細胞は、MHC-I, MHC-II, CD80, CD86, CD11b, CD11c陽性であり、LPSやCD40L刺激に対して、MHC-II発現上昇を示すとともに、アロMLR（mixed lymphocyte reaction）誘導活性を示すことから、DC様の細胞であることが明らかとなった。また、この細胞に抗原ペプチドを負荷して、マウスに投与すると抗原特異的T細胞のプライミングが誘導された。さらに、モデル抗原を発現するメラノーマを移植したマウスにおいて、抗原特異的な抗腫瘍効果を得ることができた。

本研究で構築した多能性幹細胞由来DC様細胞は、容易に増殖させることができる為、大量生産が可能となる。これによりDC前駆細胞採取における採血や経済的負担など患者の負担を軽減させることのできる新たなDCワクチン法として応用が可能になると考えられる。

## §4. 成果発表等

(1)原著論文発表　(国内(和文)誌　0 件、国際（欧文）誌　10 件)

1. Matsunaga Y, Fukuma D, Hirata H, Fukushima S, Haruta M, Ikeda T, Negishi I, Nishimura Y and Senju S. Activation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by b2-microglobulin or TAP1 gene disruption and the introduction of recipient-matched MHC class I gene in allogeneic ES cell-derived dendritic cells. *J.Immunol.* **181**: 6635-6643, 2008. (DOI:10.4049/jimmunol.181.9.6635)
2. Fukushima S, Hirata S, Motomura Y, Fukuma D, Matsunaga Y, Ikuta Y.,Ikeda T, Kageshita T, Ihn H, Nishimura Y and Senju S. Multiple antigen-targeted immunotherapy with a-galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells. *J.Immunotherapy* **32**: 219-232, 2009 (DOI: 10.1097/CJI.0b013e318194b63b)
3. Senju S, Haruta M, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takahashi K, Okita K, Yamanaka S and Nishimura Y. Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, **27**:1021-1031, 2009. (DOI:10.1002/stem.33)
4. Inoue M, Senju S, Hirata S, Irie A, Baba H and Nishimura Y. An in vivo model of priming of antigen-specific human CTL by Mo-DC in NOD/Shi-scid IL2r□(null) (NOG) mice. *Immunol. Lts.* **126**: 67-72, 2009. (DOI:10.1016/j.imlet.2009.08.001)
5. Ikeda T, Hirata S, Fukushima S, Matsunaga Y, Ito T, Uchino M, Nishimura Y and Senju S. Dual effects of TRAIL in suppression of autoimmunity: the inhibition of Th1 cells and the promotion of regulatory T cells. *J. Immunol* **185**, .5259-5267, 2010 (DOI:10.4049/jimmunol.0902797)
6. Senju S, Haruta M, Matsumura K, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takamatsu K, Irie A and Nishimura Y. Generation of dendritic cells and macrophages from human induced pluripotent stem cells aiming at cell therapy. *Gene Ther.*, **18**,874-883, 2011 (DOI:10.1038/gt.2011.22)
7. Nishimura T, Kaneko S, Kawanaka-Tachikawa A, Tajima Y, Goto H, Zhu D, Nakayama-Hosoya K, Iriguchi S, Uemura Y, Shimizu T, Takayama N, Yamada D, Nishimura K, Ohtaka M, Watanabe N, Takahashi S, Iwamoto A, Koseki H, Nakanishi M, Eto K, Nakauchi H. Generation of Rejuvenated Antigen-Specific T Cells by Reprogramming to Pluripotency and Redifferentiation. *Cell Stem Cell* **12** 114-126., 2013 (DOI:10.1016/j.stem.2012.11.002)
8. Haruta M, Tomita,Y, Yuno A, Matsumura K, Ikeda T, Takamatsu K, Haga E, Koba C, Nishimura Y, Senju S. TAP-deficient human iPS cell-derived myeloid cell lines as unlimited cell source for dendritic cell-like antigen presenting cells. *Gene Ther* **20**:504-13., 2013 (DOI:10.1038/gt.2012.59)
9. Koba C, Haruta M, Matsunaga Y, Matsumura K, Haga E, Sasaki Y, Ikeda T, Takamatsu K, Nishimura Y, Senju S. Therapeutic effect of human iPS-cell–derived myeloid cells expressing IFN-β against peritoneally disseminated cancer in xenograft models. *PLOS ONE* **8**: e67567, 2013 (DOI:10.1371/journal.pone.0067567)
10. Haruta M, Tomita Y, Imamura Y, Matsumura K, Ikeda T, Takamatsu K,, NishimuraY, Senju S. Generation of a large number of functional dendritic cells from human monocytes expanded by forced expression of cMYC plus BMI1. *Human Immunol* **74**:1400-8, 2013 (DOI:10.1016/j.humimm.2013.05.017)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 千住覚，西村泰治，HLA 分子による癌特異抗原の提示を利用した癌免疫療法の開発，日本組織適合性学会誌，15(1)： 51-60，2008 年
2. 千住覚,西村泰治,ES 細胞由来の樹状細胞による抗腫瘍免疫応答の誘導,腫瘍内科 2(2)：

164-170, 2008 年
3. 千住覚, iPS 細胞由来の樹状細胞とマクロファージを用いた医療技術の開発, 再生医療, メディカルレビュー社, 7(3): 43-45, 2008 年
4. 西村泰治, 中面哲也, 千住覚, 新規癌胎児性抗原 Glypican-3 の肝細胞癌の診断と免疫療法への応用, 特集「特異抗原をターゲットとした Immunotherapy」, Jpn. J. Clin. Immunol., 31(5): 383-391, 2008 年
5. 千住覚, ES 細胞および iPS 細胞を用いた免疫療法, 医学のあゆみ, 医歯薬出版(東京), 227(5): 413-418, 2008 年
6. 千住覚, 免疫療法への応用を目指した ES 細胞からの樹状細胞の作製, 実験医学, 羊土社 (東京), 26(20): 212-217, 2008 年
7. 千住覚 「iPS 細胞から樹状細胞への分化誘導技術と将来の臨床応用」再生医療, メディカルレビュー社 8(3) 34-37, 2009 年
8. 福島聡、西村泰治、千住覚 「ES 細胞、iPS 細胞由来の樹状細胞を利用したワクチン」臨床免疫・アレルギー科 52(3): 331-338, 2009 年
9. 千住覚 「多能性細胞由来の樹状細胞を用いた免疫療法」血液フロンティア 19(11):1685-1692, 2009 年
10. Senju S, Matsunaga Y, Fukushima S, Hirata S, Matsuyoshi H, Nishimura Y. Pluripotent stem cells-derived dendritic cells for immunotherapy. Front Biosci. 2: 1520-1527, 2010.
11. Senju S, Hirata S, Motomura Y, Fukuma D, Matsunaga Y, Fukushima S, Matsuyoshi H, Nishimura Y. Pluripotent stem cells as source of dendritic cells for immune therapy. Int. J. Hematol. 91(3): 392-400, 2010.
12. 千住覚 「多能性細胞由来の樹状細胞を用いたがんの免疫療法」Biotherapy, 癌と化学療法社, 24 (2) : 87-94, 2010 年
13. Senju S, Matsunaga Y, Fukushima S, Hirata S, Motomura Y, Fukuma D, Matsuyoshi H, Nishimura Y. Immunotherapy with pluripotent stem cell-derived dendritic cell. Ｓｅｍｉｎａｒｓ in Immunopathology 33: 603-612, 2011
(DOI: 10.1007/s00281-011-0263-y)
14. 福島聡, 尹浩信, 西村泰治, 千住覚 多能性幹細胞から誘導した樹状細胞によるがん免疫療法 日本臨床免疫学会会誌 34: 113-120 2011
15. 千住覚 医療応用を目指した多能性幹細胞からの樹状細胞の作成 臨床血液 51: 1668-1673, 2011
16. 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 医学のあゆみ 244 (9) 824- 830, 2013
17. 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, 羊土社(東京), 31(12): 170-173, 2013 年増刊
18. 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

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表
① 招待講演 (国内会議 12 件、国際会議 1 件)
1. 千住覚:「ES 細胞および iPS 細胞由来の免疫細胞を用いた医療技術の開発」、第 32 回阿蘇シンポジウム (主催 財団法人 化学及血清療法研究所, 平成 20 年 8 月 2 日)
2. 千住覚:「幹細胞:再生医療はどう変わる?」、熊本大学医学部・第１５回本九祭 (熊本大学、平成 20 年 11 月 2 日)
3. 千住覚:「iPS 細胞由来の細胞を用いた免疫細胞療法」、熊本県医師会医学講座(主催 熊本県医師会、平成 21 年 3 月 11 日)

4. 千住覚：「細胞医薬への応用を目指した多能性幹細胞からの樹状細胞の作製」、第４回DDS 熊本シンポジウム（平成 21 年 3 月 16 日）
5. 千住覚:「多能性幹細胞技術を用いた免疫細胞医薬の開発」(英訳:Development of Immune Cell Drug Based on Pluripotent Stem Cell Technology.）第 44 回熊本大学大学院医学薬学研究部・化血研ジョイントセミナー、2009 年 7 月 2 日
6. 千住覚:「ES/iPS 細胞を利用した医療と組織適合性」第 18 回日本組織適合性学会　認定制度講習会教育講演、名古屋国際会議場、2009 年 9 月 26 日～27 日（講演日 9/26）
7. Senju S.：Pluripotent stem cell-derived dendritic cells. The 71st Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Symposium 7, iPS Cell-Presidential Symposium, Kyoto International Conference Center, Oct.23-24, 2009, Kyoto
8. 千住覚:「iPS 細胞由来の細胞を用いた免疫細胞療法の開発」　熊本県医師会講演　2009 年 11 月 6 日、人吉市医師会館
9. 千住覚、春田美和、松村桂子、松永雄亮、福島聡、入江厚、西村泰治、iPS 細胞を用いた免疫細胞療法、第１４回日本がん免疫学会総会シンポジウム、熊本、7 月２２-２３日
10. 千住覚、平田真哉、松吉秀武、松永雄亮、福島聡、池田徳典、入江厚、西村泰治、iPS 細胞を用いた免疫細胞療法の開発、第１９回日本組織適合性学会大会シンポジウム、東京、９月 17-19 日
11. 千住覚、iPS 細胞を用いた免疫細胞療法の開発、京都大学再生医科学研究所「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」平成２２年度学術講演会、京都、12 月 17 日
12. 千住覚、iPS 細胞を用いたがんに対する免疫細胞療法、日本バイオセラピィ学会、和歌山市、12 月 1 日
13. 千住覚、iPS 細胞を基盤とする樹状細胞の大量生産技術、2013 年度 SICT 研究会、東京、６月８日

② 口頭発表（国内会議 22 件、国際会議 7 件）

1. Fukushima S, Hirata S, Ihn H, Nishimura Y, Senju S, Immunotherapy with multiple antigen-targeted and α-galactosylceramide-loaded dendritic cells derived from embryonic stem cells,第 10 回国際樹状細胞シンポジウム（神戸），平成 20 年 10 月 1 日～5 日
2. Matsunaga Y, Fukuma D, Hirata S, Fukushima S, Haruta M, Ikeda T, Negishi I, Nishimura Y, Senju S, Genetic modification of ES cell-derived DC to modify cell surface MHC class I, 第 10 回国際樹状細胞シンポジウム（神戸），平成 20 年 10 月 1 日～5 日
3. 福島　聡，平田真哉，本村　裕，福間大喜，松永雄亮，生田義明，尹　浩信，西村泰治，千住　覚，Multiple antigen-targeted immunotherapy with α-galactosylceramide -loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells against metastatic mouse melanoma, 第 12 回基盤的癌免疫研究会（大宮），平成 20 年 7 月 2～3 日
4. 千住　覚，春田美和，福島　聡，松永雄亮，平田真哉，池田徳典，高橋和利，沖田圭介，山中伸弥，西村泰治，免疫細胞療法への応用をめざしたマウス iPS 細胞からの樹状細胞の作製技術の確立，第 17 回日本組織適合性学会大会（大阪），平成 20 年 9 月 19～21 日
5. 千住　覚，春田美和，福島　聡，松永雄亮，平田真哉，池田徳典，高橋和利，沖田圭介，山中伸弥，西村泰治，免疫細胞療法への応用をめざしたマウス iPS 細胞からの樹状細胞の分化誘導，人類遺伝学会第 53 回大会（横浜），平成 20 年 9 月 27～30 日
6. 平田真哉，福島　聡，池田徳典，松永雄亮，千住　覚，西村泰治，免疫抑制性分子を遺伝子導入したマウス ES 細胞由来の樹状細胞の同種異系（アロ）移植への応用，第 36 回日本臨床免疫学会（東京），平成 20 年 10 月 17～18 日
7. 福島　聡，平田真哉，松永雄亮，尹　浩信，西村泰治，千住　覚，複数抗原を標的とし、

αGalCer を負荷した遺伝子導入 ES 細胞由来樹状細胞を用いた癌免疫療法，第 36 回日本臨床免疫学会（東京），平成 20 年 10 月 17～18 日

8. FUKUSHIMA S, HIRATA S, MATSUNAGA Y, IHN H, NISHIMURA Y, SENJU S,複数抗原を標的とした α-GalCer 負荷 ES 細胞由来樹状細胞による癌免疫療法/ Cancer immunotherapy with multiple antigen-targeted and α-GalCer loaded dendritic cells derived from embryonic stem cells,第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 （京都）平成 20 年 12 月 1 日～3 日
9. MATSUNAGA Y, FUKUMA D, HIRATA S, FUKUSHIMA S, HARUTA M, IKEDA T, NEGISHI I, NISHIMURA Y, SENJU S, Activation of antigen-specific CTL by β2-microglobulin or TAP1 gene-disrupted and recipient-matched MHC class I gene-introduced allogeneic ES cell-derived dendritic cells,第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 （京都）平成 20 年 12 月 1 日～3 日
10. HIRATA S, FUKUSHIMA S, MATSUNAGA Y, IKEDA T, SENJU S, NISHIMURA Y, TRAIL を発現するアロ ES-DC の投与によるアロ膵島に対する拒絶反応の抑制/ The protection of islets allograft rejection by transfer of the allogeneic ES cell-derived dendritic cells expressing TRAIL,第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 （京都）平成 20 年 12 月 1 日～3 日
11. SENJU S, HARUTA M, MATSUNAGA Y, FUKUSHIMA S, HIRATA S, IKEDA T, TAKAHASHI K, OKITA K, YAMANAKA S, NISHIMURA Y, マウス iPS 細胞からの樹状細胞の作製/Generation of dendritic cells from mouse iPS cells,第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 （京都）平成 20 年 12 月 1 日～3 日
12. INOUE M, HIRATA S, SENJU S, NISHIMURA Y, Establishment of hu-SCID mouse system to analyze priming in vivo of antigen-specific human CTLs by DC, 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 （京都）平成 20 年 12 月 1 日～3 日
13. 井上光弘、千住覚、平田真哉、西村泰治「NOD/SCID γc null (NOG) マウスの in vivo における腫瘍抗原特異的ヒト CTL の誘導」 第 13 回日本がん免疫学会総会、2009 年 6 月 24 日～25 日
14. 千住覚：Immune therapy with pluripotent stem cell-derived dendritic cells. 平成 21 年度（戦略的創造研究推進事業）「JST-CIRM 研究交流　幹細胞利用技術への免疫学的アプローチ　ワークショップ」ホテルフジタ京都（京都市）、2009 年 8 月 31 日～9 月 1 日
15. 千住覚、松永雄亮、福島聡、池田徳典、高橋和利、沖田圭介、山中伸弥、西村泰治「マウス iPS 細胞由来の樹状細胞によるがん免疫の誘導。第 68 回日本癌学会学術総会」パシフィコ横浜、2009 年 10 月 1 日～3 日
16. Ikeda T, Senju S : Immune-therapy with pluripotent stem cell-derived dendritic cells. The Kumamoto University Global COE International Joint Symposium, November 26-27, 2009, Kumamoto
17. 千住覚、松永雄亮、福島聡、池田徳典、西村泰治「Anti-cancer cellular vaccination with dendritic cells derived from genetically engineered mouse iPS cells」第 68 回日本癌学会総会、パシフィコ横浜、2009 年 10 月 1 日～3 日（10/2 口演発表）
18. Ikeda T, Hirata S, Fukushima S, Matsunaga Y, Ito T, Uchino M, Nishimura Y, Senju S : Effect of TRAIL on regulatory T cell. 「制御性 T 細胞に対する TRAIL の作用」 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪国際会議場、2009 年 12 月 2 日～4 日
19. 千住覚、春田美和、松村桂子、池田徳典、松永雄亮、福島聡、入江厚、西村泰治「ヒト iPS 細胞からの樹状細胞の作製」第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪国際会議場、2009 年 12 月 2 日～4 日（12/4 口演発表）
20. Senju S, Haruta M, Matsumura K, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takamatsu K, Irie A, Nishimura Y Generation of dendritic cells and macrophages from human iPS cells aiming at application to cell therapy, 14th International

Congress of Immunology (ICI2010), Kobe, August 22-27, 2010

21. 西村泰治、中面哲也、冨田雄介、中村佑輔、千住覚：理想的な癌抗原と ES/iPS 細胞を利用した癌免疫療法の開発。第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、2011 年 10 月 3 日～5 日（口頭発表 10/3）
22. Senju S, Haruta M, Tomita Y, Matsumura K, Nishimura, Y TAP-deficient ips cell-derived myeloid cell lines as the unlimited cell source for human dendritic cells. 3rd Workshop of Synthetic Immunology, Kyoto, 18 - 19 May 2012
23. Senju S, Haruta M, Tomita Y, Nishimura, Y Targeted disruption of the TAP2 gene in human iPS cells and generation of an infinite dendritic cell source that is applicable to vaccination therapy irrespective of HLA types of the patients. The Joint 16th International HLA and Immunogenetics Conference, Liverpool, May 28-30, 2012
24. 千住　覚、春田美和、冨田雄介、西村泰治 TAP 欠損ヒト iPS 細胞を用いた樹状細胞大量生産システムの開発 日本人類遺伝学会第 57 回大会 2012 年 10 月 25-27 日 東京
25. Senju S, Haruta M, Matsumura K, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takamatsu K, Irie A, Nishimura Y Dendritic cells derived from TAP-deficient human iPS cells 日本免疫学会第４１回学術集会 2012 年 12 月 5-7 日神戸
26. Ikeda T, Tsukamoto H, Irie A, Nagafuchi S, Nishimura Y, Senju S. Therapeutic effects of ES cell-derived dendritic cells against autoimmune diseases. 第41回日本免疫学会学術総会、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸ポートピアホテル（神戸市）2012 年 12 月 5 日～7 日
27. Senju S, Nakatsura T, Tomita Y, Yuno A, Kuroda Y, Irie A, Tsunoda T, Yoshitake Y, Shinohara M, Nakamura Y, Nishimura Y. Cancer Immunotherapy Using Ideal Tumor-Associated Antigenic Peptides and Human iPS Cell-Derived Dendritic Cells. Centennial of Hashimoto Disease, Acros Fukuoka, Dec1-4, 2012
28. 千住覚、春田美和、冨田雄介、西村泰治：TAP 欠損ヒト iPS 細胞を用いた樹状細胞大量生産システムの開発、第 23 回日本樹状細胞研究会、2013 年 5 月 17 日、国立京都国際会館
29. 千住覚、春田美和、冨田雄介、湯野晃、西村泰治：ヒト iPS 細胞由来樹状細胞作成法の改善。第 17 回日本がん免疫学会総会、2013 年 7 月 3 日～5 日、ANA クラウンプラザホテル宇部

③ ポスター発表　（国内会議１件、国際会議１件）

1. Senju S, Haruta M, Tomita,Y, Yuno A, Matsumura K, Ikeda T, Takamatsu K, Haga E, Koba C, Nishimura Y,. TAP-deficient human iPS cell-derived myeloid cell lines as cell source for dendritic cells. The 10th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research. Yokohama, June 15, 2012
2. 池田徳典：多能性幹細胞由来樹状細胞、マクロファージを利用した神経疾患に対する細胞療法。第 54 回日本神経学会学術集会、2013 年 5 月 29 日～6 月 1 日、東京国際フォーラム

(4)知財出願

① 国内出願（3件）

1. 発明の名称:人工多能性幹細胞の製造方法
   発明者:千住覚、西村泰治
   出願人:国立大学法人熊本大学
   出願日:2009/1/14
   出願番号:特願 2009-005691
2. 発明の名称:細胞医薬の製造方法
   発明者:千住覚
   出願人:国立大学法人熊本大学

出願日:2009/4/24
出願番号:特願 2009-105894

3. 発明の名称:ミエロイド系血液細胞の製造方法
発明者:千住覚
出願人:国立大学法人熊本大学
出願日:2010/9/30
出願番号:特願 2010-221809

② 海外出願 (2 件)

1. 発明の名称: 細胞医薬の製造方法
Method for preparing cell pharmaceutical
発明者: 千住覚
出願人: 熊本大学
欧州特許登録番号：2423311　米国特許登録番号：8,551,472 B2

2. 発明の名称:ミエロイド系血液細胞の製造方法
(Production method for making myeloid blood cell)
発明者:千住覚
出願人:国立大学法人熊本大学
出願日:2011/9/28
出願番号:PCT/JP2011/072234　米国出願: 13/825,883(出願日)

(5)受賞・報道等

① マスコミ(新聞・TV等)報道(プレス発表をした場合にはその概要もお書き下さい。)

***【平成 20 年度】***

・ 熊本日日新聞：CREST 研究に採択された iPS 細胞由来の免疫細胞に由来する免疫細胞による医療技術開発研究についての紹介

***【平成 25 年度】***

・ 熊本日日新聞 :CREST 研究により実施した iPS 細胞由来のインターフェロンβを発現するマクロファージによる腹膜播種胃癌および膵臓癌の治療法開発に関する研究成果が紹介された。
・ NHK :インターフェロンβを発現する iPS-ML による腹膜播種胃癌および膵臓癌の治療法開発に関する研究成果および自動培養装置を用いた大量培養の取組みについて、熊本県内向けのニュース番組、および九州地方向けのニュース番組において紹介された。
・ 日本経済新聞：インターフェロンβを発現する iPS-ML による腹膜播種胃癌治療法について報道された。

## §5. 研究期間中の活動

(1) 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

| 年月日 | 名称 | 場所 | 参加人数 | 概要 |
|---|---|---|---|---|
| 2012.8.30 | 熊本大学大学院医学教育部 柴三郎プログラム | 熊本大学 | ２名 | 高校生を対象に研究内容の説明を行った。 |
| 2012.12.13 | 日本分子生物学会ランチョンセミナー | 福岡国際会議場 | 100 名 | ZFN によるヒト IPS 細胞における遺伝子標的破壊についての技術説明 |

## §6. 最後に

今日、医療サイドが有効な治療を提供することができない、いわゆる「がん難民」が、国内に 50 万人以上存在する。例えば、腹膜播種を伴う胃癌の場合、原発巣が切除可能であっても治癒切除の適応とはならない。胃癌腹膜播種に対して標準治療とされているものはなく、5年生存率は10％前後である。また、膵臓癌は固形癌中最も予後不良であり、外科的に切除できなかった場合、平均生存期間は半年程度である。手術適応となるのは 30%程度であり、その場合でも、5年生存率は20％以下である。

悪性腫瘍に対する治療法として、外科的治療、化学療法、放射線治療が三大療法とされる。しかしながら、癌の治癒には、これらの治療に加えて宿主の免疫監視機構の働きが不可欠である。すなわち、治療により体内の腫瘍細胞の大部分を除去あるいは死滅させることに加えて、宿主の免疫細胞が微細な転移病巣等に残存する腫瘍細胞を根絶、あるいは、一定数以下に抑制することで、臨床的な“治癒”にいたるものと考えられる。

樹状細胞を用いたがんに対するワクチン療法は、国内外において広く実施されている。近年、その有効性は大規模な臨床試験において実証されており、2010 年には、前立腺がんに対する樹状細胞療法である PROVENGE が FDA により承認されている。これらの治療に用いられる樹状細胞は、患者自身の末梢血単球から作製される。しかしながら、例えば化学療法を受けた患者等では、末梢血単球の数や質に問題が有り、十分な数の樹状細胞を確保できない場合がある。また、患者毎に個別に細胞の採取を行い、手作業で培養操作を行う必要が有り、費用が非常に高額になることも問題である。樹状細胞療法をさらに普及させ、有効性の評価を進めるには、樹状細胞の安定･大量供給システムの開発が必須である。

また海外においては、マクロファージの抗腫瘍活性に着目した細胞治療の臨床試験が実施されている。例えば、患者血液から末梢血単球を分離し、これを数日間培養して作製したマクロファージをインターフェロンγで刺激した後に患者体内に戻す、という治療が試みられている。しかし、これまでに報告されているマクロファージ療法の臨床試験において、明らかな治療効果は認められたものはない。その理由としては、投与されたマクロファージの数が治療効果を発揮するには不十分であり、また、がん患者の単球由来のマクロファージは本来の抗腫瘍効果を失っていたものと考えられる。

以上のように、樹状細胞療法とマクロファージ療法のいずれにおいても、治療効果の改善とその普及には、細胞ソースの問題を解決する必要がある。すなわち、効果の高い治療用細胞を、必要な数だけ、かつ、できるだけ低コストで供給する方法を開発しなければならない。

当初計画した iPS 細胞由来のミエロイド系免疫細胞の臨床応用として、iPS-ML を用いた腹膜播種癌および転移性肝癌の治療は、技術的には、数年以内に臨床試験を実施可能である。