

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「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」

研究終了報告書

研究期間 平成20年6月～平成25年3月

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 免疫器官形成研究
グループ グループディレクター)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究では、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、それに基づいて iPS 細胞の形質を反映しうる分子マーカーの探索を試みる。この大きな目標に向けて、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とエピゲノム状態のプロファイリング、②iPS 細胞からの造血系細胞への分化誘導、③マウス及びヒト iPS 細胞からの NKT 細胞の誘導系の標準化という3項目の小目標を設定して、研究を遂行した。

- 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。驚いたことに、ポリコム群をノックダウンするとリプログラミングは促進され、逆に、過剰に発現させると、抑制された。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。一方、ヒト末梢血リンパ球のリプログラミングの至適化も終了し、現在、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行っている。
- ② ヒト T 細胞由来 iPS 細胞 (T-iPS 細胞) 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 細胞を用いて、培養にはよく用いられている 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、TCR への再刺激により、IFN- γ 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ている。
- 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 細胞受容体を発現しうるヒト iPS 細胞の樹立を試みている。

(2) 顕著な成果

1. 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 (論文・特許)

概要: 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、iPS 細胞を用いた免疫細胞療法が原理的に可能であることを示した。

2. ヒト T-iPS 細胞からの機能的 T 細胞の誘導 (論文投稿中)

概要: 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、抗原刺激依存的に IFN- γ を産生する T 細胞を誘導することに成功した。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ている。

3. リンパ球由来 iPS 細胞を用いたリプログラミングを不安定化させる因子の同定

概要: マウスとヒトで、成熟リンパ球から iPS 細胞を安定に樹立する技術を確立した。ここで確立した iPS 細胞を用いて、リプログラミングは前期の内因性コアサーキットが樹立する過程と、それらが安定する過程から構成されることを示し、ポリコム群は後期におこる安定化に寄与することを示した。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

iPS細胞を臨床応用していくためには、それを用いた細胞療法の有効性と安全性を予め示す必要がある。しかしながら、様々な要因から生じるiPS細胞の機能的な多様性は、有効性と安全性を保証していく上で、大きな障壁となると考えられる。したがって、患者からiPS細胞を作製し使用するにあたって、有効かつ安全なiPS細胞ラインを選択するための基準を構築していくことが必要となっていこう。本研究では、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、それに基づいてiPS細胞の形質を反映しうる分子マーカーの探索を試みる。そのために、第1には、様々な背景を有する複数のヒトiPS細胞から誘導した造血・免疫細胞を用いたヒト化マウスによる疾患治療モデルの樹立を試みる。第2には、同じヒトiPS細胞ラインのグループを用いて遺伝子発現およびエピゲノム状況をグローバルに明らかにする。これらのデータを相関付けることにより、iPS細胞の有効性と安全性を反映するようなマーカー遺伝子群の抽出し、これらを指標としたiPS細胞治療における有効性・安全性評価システムの確立を目指す(図1)。

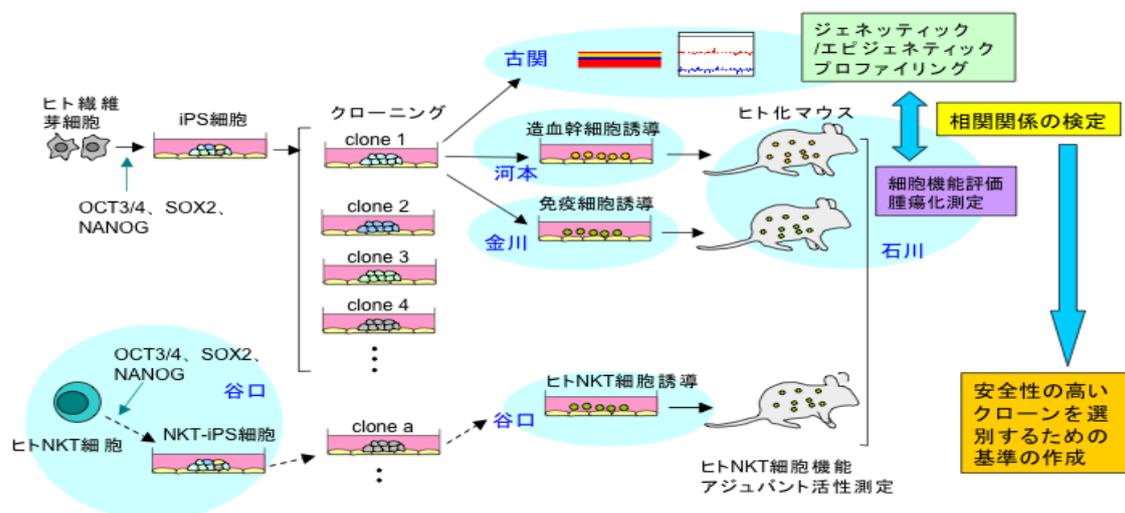


図1 iPS由来細胞の安全性評価基準の確立へ向けての研究戦略

(2)新たに追加・修正など変更した研究構想
大きな修正はなかった。

§ 3 研究実施体制

(1)「古関」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
古関 明彦	理研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	H20.6～H25.3
河本 宏	同上	チームリーダー	H20.6～H25.3
渡会 浩志	同上	上級研究員	H20.6～H25.3
石川 文彦	同上	グループディレクター	H20.6～H25.3
小原 収	同上	グループディレクター	H20.6～H24.9
谷口 克	同上	グループディレクター	H20.6～H25.3
斉藤 頼子	同上	研究員	H20.6～H25.3

富澤 麻利子	同上	技術員	H20.6～H25.3
山田 大輔	同上	研究員	H21.4～H25.3
伊川 友活	同上	研究員	H20.6～H25.3
Jafar Sharif	同上	訪問研究員	H21.4～H25.3
磯野 協一	同上	上級研究員	H21.4～H25.3
迫田 ラウール	同上	特別研究員	H20.6～H25.3
小林 美登里	同上	技術員	H20.10～H21.5
増田 喬子	同上	特別研究員	H21.1～H22.3
増田 喬子	同上	研究員	H22.4～H25.3
Ruken Yaman-Devevi	同上	研究員	H20.11～H21.3
大越 桃子	同上	技術員	H20.10～H25.3
渡辺貴志	同上	研究員	H24.10～H25.3
山本 絵里	理研免疫アレルギー科学 総合研究センター(派遣先 かずさDNA研究所)	技術員	H20.8～H22.3
内海 紀子	同上	技術員	H22.4～H25.3
杉山 麻衣	理研免疫アレルギー科学 総合研究センター	技術員	H20.11～H21.3
野口 弓子	同上	技術員	H20.7～H21.3
北原 玄太	同上	技術員	H21.4～H25.3
藤田 雅子	同上	技術員	H21.6～H25.3
手塚 知栄子	同上	技術員	H20.12～H25.3
河内美登里	同上	技術員	H24.4～H25.3

②研究項目

- ・造血・免疫系細胞からの iPS 細胞の誘導と遺伝子発現とエピゲノム状態のプロファイリング
- ・iPS細胞からの造血幹細胞への分化誘導と白血病化傾向の評価
- ・ヒトNKT細胞から誘導したiPS細胞を用いた成熟NKT細胞の分化誘導および機能解析

§ 4 研究実施内容及び成果

(1)研究実施内容及び成果

1) 造血・免疫系細胞からの iPS 細胞の誘導と遺伝子発現とエピゲノム状態のプロファイリング

① 内因性コアサーキットの樹立状態をモニターする目的のために、Nanog, Oct4, Sox2, Lin28 の4遺伝子の各蛋白質翻訳部分のC末端部分に EGFP を融合させた融合蛋白質を発現させるノックインマウスの作成をした。Sox2-GFP だけで、ホモ個体が得られ、ES 細胞での GFP 蛍光が観察出来た。(図 1-1)この Sox2-GFP ノックインマウス由来 Bリンパ球や胎児繊維芽細胞(MEF)から iPS 誘導を行った結果、それぞれ誘導 13 日後あるいは 11 日後から ES 細胞と同等の GFP の蛍光が観察された。また Bリンパ球では MEF に比べてリプログラミングが2日間遅いことから、免疫系細胞のような最終分化した細胞で内因性コアサーキットを樹立するには、持続的な外来性 OSKM 発現を要求する事を示した。(図 1-2)

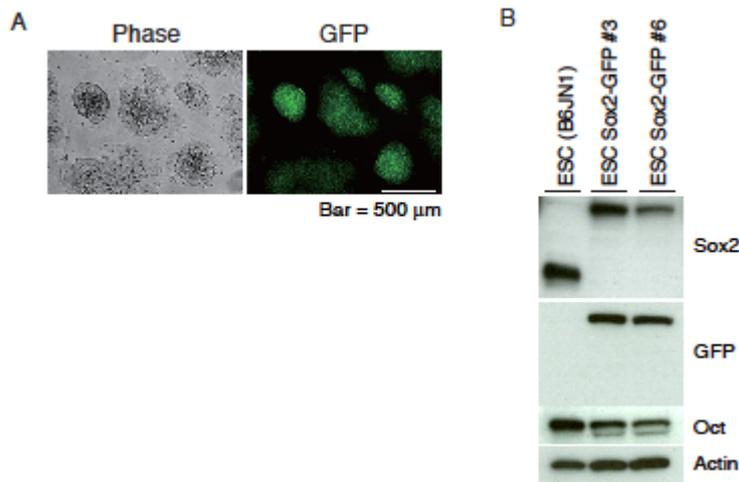


図 1-1 Sox2-GFP ノックインマウス由来 ES 細胞の樹立

(A) Sox2-GFP ES 細胞の形態と GFP 発現。ES 細胞様コロニーを形成し、かつ蛍光観察により GFP の発現が検出された。(B) Sox2-GFP 融合タンパク質の発現解析。抗 Sox2 および抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロッティングによりノックインマウス由来の ES 細胞では Sox2-GFP 融合タンパク質の発現が検出された。

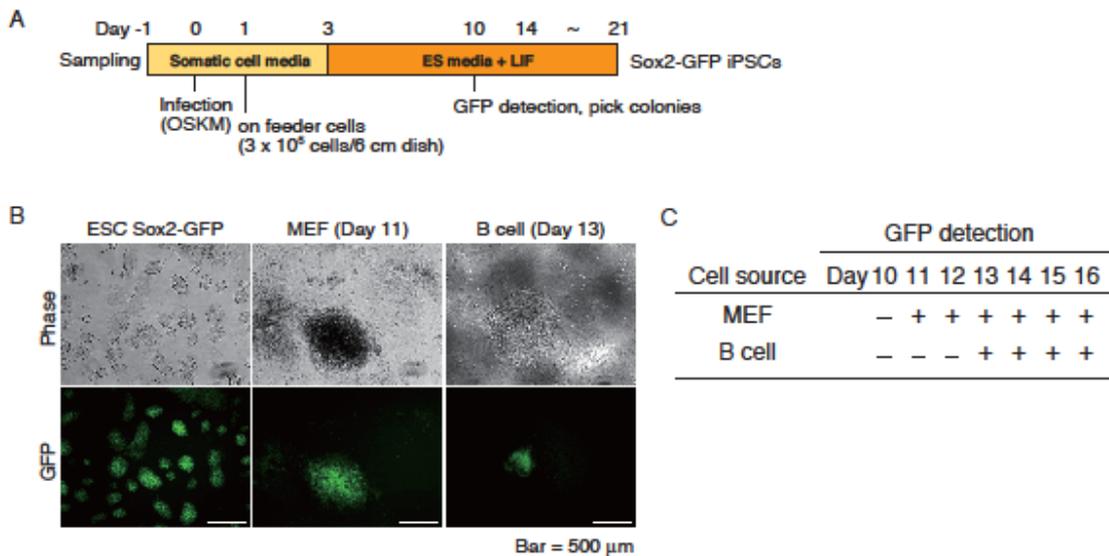


図 1-2 Sox2-GFP ノックインマウス由来体細胞からの iPS 細胞の誘導

(A) Sox2-GFP ノックインマウス由来体細胞からの iPS 細胞誘導と GFP 発現解析プロトコール。(B) MEF または B 細胞をレトロウイルスにより導入した山中因子によりリプログラムする過程で GFP が発現する時期を観察しつつ iPS 細胞を樹立した。(C)リプログラム開始から MEF では 11 日後、B 細胞では 13 日後から Sox2-GFP ES 細胞と同等の GFP の発現が観察された。

② マウス B 細胞由来 iPS 細胞をモデルとして、リプログラミングが十分に起こらない遺伝子群の探索を試みた結果、エピジェネティック制御因子の一つであるポリコム群タンパク質の標的遺伝子群が十分にはリプログラミングされないことが示唆された。ポリコム群の触媒サブユニットであり、その機能発現に必須である Ring1 ファミリータンパクをコンディショナルにノックアウトできる B-iPS 細胞

を作製し、そこから Ring1 ファミリーをノックアウトすると、ES 細胞に比較して有意に細胞死が誘導されることが示された。(図 1-3)これらの事実は、B 細胞から iPS 細胞へのリプログラミングを誘導する時、一見 ES 型のポリコム群の再構築は起こっているものの、機能的に完全に再構築されていないことが示された。

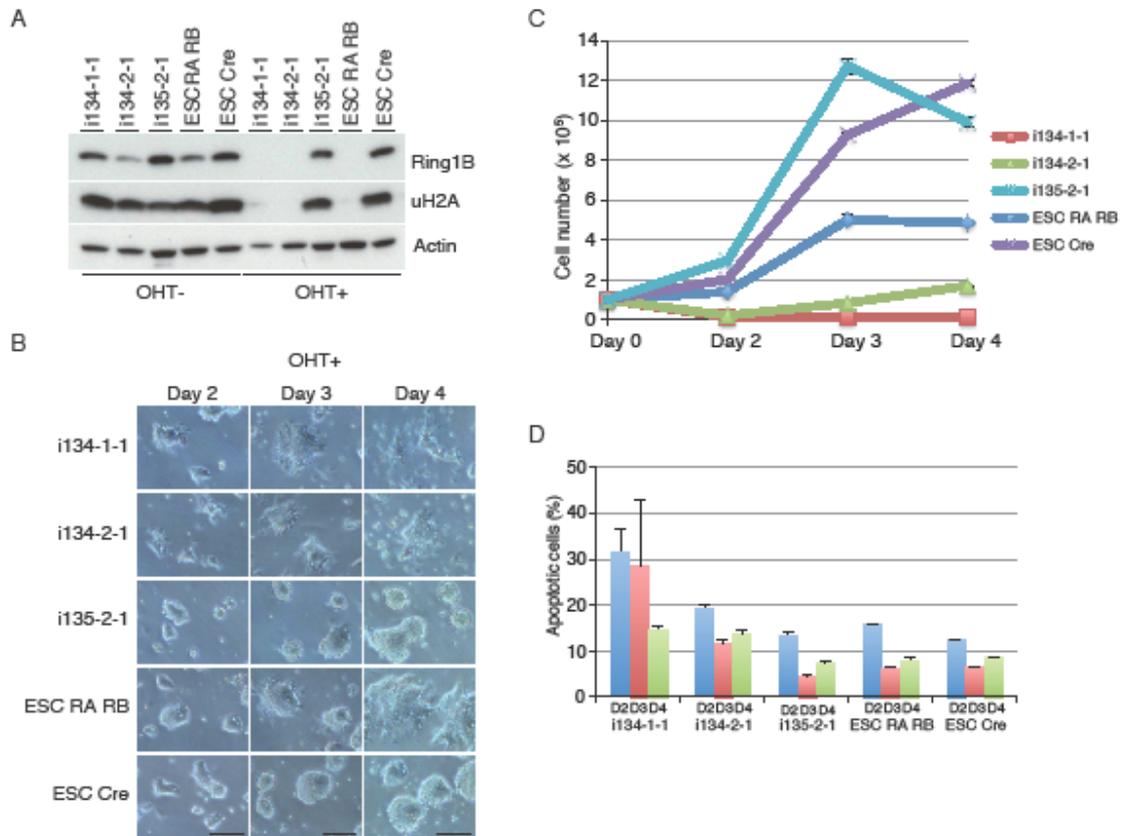


図 1-3 Ring1 ファミリーコンディショナルノックアウト B-iPS 細胞の樹立、表現系解析

(A)ウエスタンブロッティングによる Ring1 ファミリーノックアウト解析。Ring1 ファミリーコンディショナルノックアウト B-iPS 細胞 (i134-1-1, i134-2-1) にタモキシフェン添加後 (48 時間) Ring1 ファミリーがノックアウトされ、その結果ヒストン H2A のユビキチン化も検出されなくなった。コントロールとしてコンディショナルノックアウト ES 細胞 (ESC RARB) またはノックアウトされない ES もしくは iPS (ESC CRE, i135-2-1) 細胞を用いた。(B) タモキシフェン添加後 (2, 3, 4 日後) の細胞形態。コンディショナルノックアウト B-iPS 細胞では ES 細胞に比べて細胞数が少なく、コロニー形態も異なることが観察された。(C) タモキシフェン添加後 (2, 3, 4 日後) の細胞数の計測。コンディショナルノックアウト B-iPS 細胞では ES 細胞に比べて細胞増殖が著しく減少した。(D) タモキシフェン添加後 (2, 3, 4 日後) のアポトーシスによる細胞死。コンディショナルノックアウト B-iPS 細胞では ES 細胞に比べてアポトーシスが增加していることが観察された。

③ リプログラミングのどの過程に問題があるのかを解析した。最初に、内因性コアサーキットが樹立し、ES 様コロニー形成へのポリコム群のインパクトを解析した。ポリコム群 (Ring1B) と Cdkn2a のダブルノックアウト (dKO) と Cdkn2a シングルノックアウト (sKO) を用いて、B リンパ球からの iPS 細胞誘導効率を解析した結果、dKO 細胞では sKO 細胞に比べて誘導効率が約 2 倍上昇するだけでなく、多能性マーカーの発現も有意に増えていた。しかしながら、ES 細胞様コロニーをピック

アップ後、5回継代したところ iPS 細胞として樹立されるクローン数は dKO では有意に減少していた。(図 1-4)このことからポリコム群は、リプログラミング過程初期には抑制的に作用し、後期には促進的に働くことが示された。したがって、おそらく、後期のポリコム群が成立する過程にリプログラミングの異常が起こり易いことが示唆された。現在、このメカニズムを解明するべく、山中・山田によって開発されたリプログラマブルマウスを用いた初期過程におけるポリコム群の動態の解析を試みる。

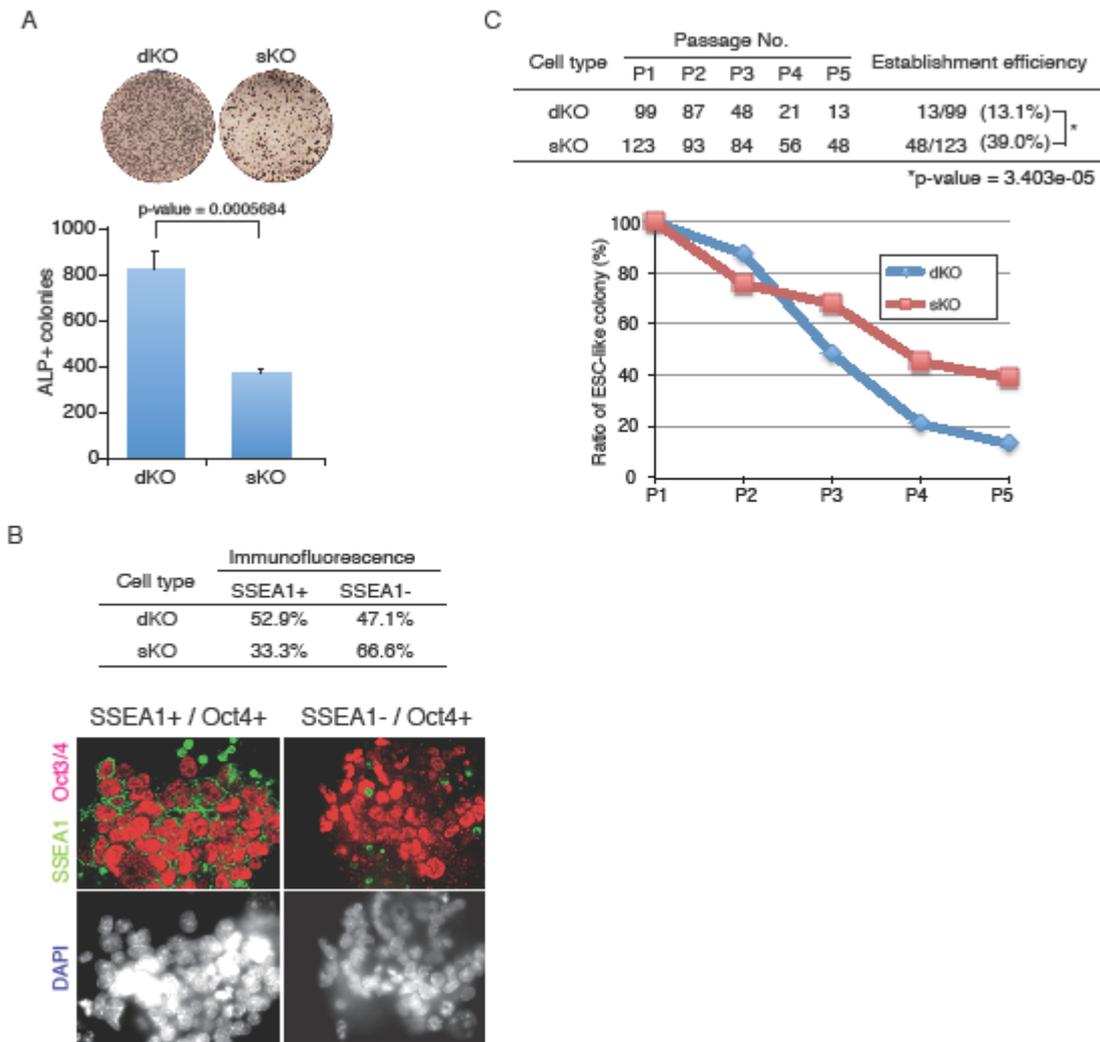


図 1-4 ポリコム群 (Ring1B) ノックアウト B 細胞からの iPS 細胞樹立効率解析

(A) ポリコム群 (Ring1B) と Cdkn2a のダブルノックアウト (dKO) および Cdkn2a シングルノックアウト (sKO) からの B-iPS 細胞誘導効率の解析。ES 細胞様コロニーをアルカリフォスファターゼ活性の有無で染色し、陽性コロニー数を計測した。(B) 免疫染色によるリプログラミング初期の ES 細胞様コロニーにおける SSEA1 発現解析。ダブルノックアウト (dKO) およびシングルノックアウト (sKO) 由来 B 細胞をリプログラミングし、ES 細胞様コロニーを SSEA1 抗体で免疫染色により検出した。(C) B-iPS 細胞樹立効率アッセイによる解析。ダブルノックアウト (dKO) およびシングルノックアウト (sKO) 由来 ES 細胞様コロニーをピックアップ後 5 回継代し、ES 細胞様コロニーとして維持できるクローン数を計測した。

④ ヒト末梢血リンパ球のリプログラミングについては、センダイウイルスベクターを用いた山中 4 因

子の導入により、再現性よくリプログラミングが可能であることや外来遺伝子のゲノムへの挿入がない iPS 細胞を樹立出来ることを明らかにした。また SV40T 抗原を山中 4 因子と共発現することで、T 細胞からの樹立効率を約 10 倍に高められることが明らかになった。さらに抗原特異性 T 細胞クローン (Mart1) から山中 4 因子だけでは iPS 化が困難であったが、SV40T 抗原の共発現により iPS 化することが可能となった。(図 1-5)この結果は SV40T 抗原による細胞増殖の活性化によることが示唆された。

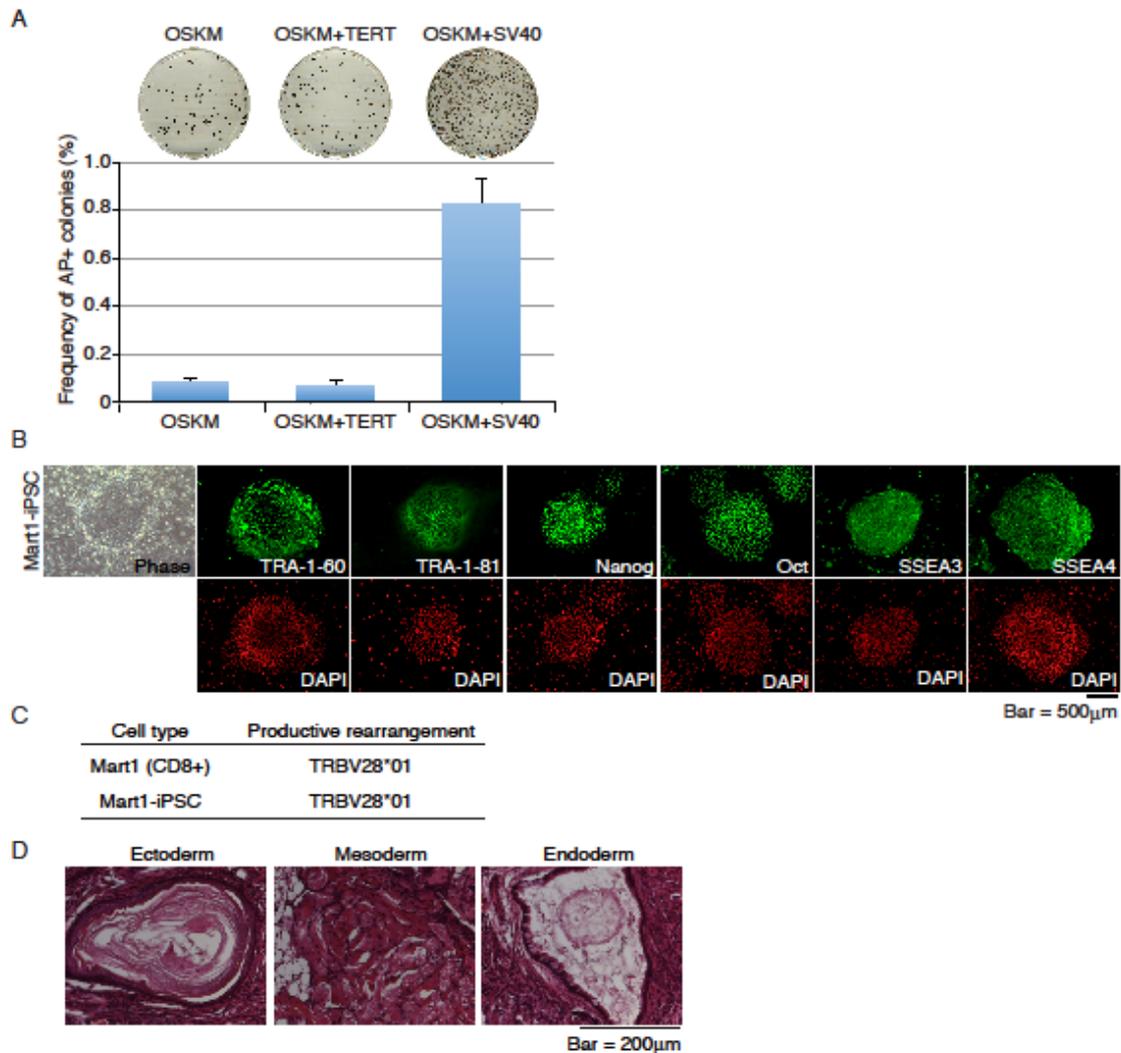


図 1-5 SV40T 抗原によるヒト T-iPS 細胞の高効率誘導

(A) SV40T 抗原 (SV40) による高効率ヒト T-iPS 細胞の誘導。ヒト T 細胞から 4 因子 (OSKM)、5 因子 (OSKM+TERT もしくは OSKM+SV40) により iPS 細胞を誘導しアルカリフォスファターゼ陽性コロニー数を計測した。(B) Mart1 由来 iPS 細胞の樹立。5 因子 (OSKM+SV40) により Mart1 陽性 T 細胞由来 iPS 細胞を誘導し、コロニー形態および免疫染色によりヒト ES 細胞マーカー (TRA-1-60, TRA-1-81, NANOG, OCT3/4, SSEA3 および SSEA4) を確認した。(C) T 細胞抗原受容体 (TCR) 鎖ゲノム DNA 配列の解析。Mart1 陽性 T 細胞 (Mart1) および Mart1-iPS 細胞 (Mart1-iPSC) のゲノム DNA を抽出し、TCR 鎖領域を PCR により増幅、サブクローニングを行ってそれぞれの塩基配列を決定した。(D) テラトーマ形成による Mart1-iPS 細胞の多能性解析。Mart1-iPS 細胞を免疫不全マウスへ移植しテラトーマ形成能を解析した結果、三胚葉 (内胚葉、中胚葉、外胚葉) への分化が確認された。

2) iPS 細胞からの造血系細胞への分化誘導と白血病化傾向の評価

in vitro でヒト T 細胞由来 iPS 細胞 (T-iPS 細胞) 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 細胞を用いた。培養にはよく用いられている OP9-DL1 細胞との共培養系に、独自の改良を加えた。

培養開始後 40 日目には CD4CD8 共陽性 (DP) 細胞の出現が認められた。(図 2-1) ES 細胞あるいは通常の iPS 細胞を用いた培養に比べて、DP 細胞分画中の T 細胞レセプター発現細胞の割合は 20 倍以上であった。さらに培養 60 日後には、通常の iPS 細胞を用いた培養に比べて 10 倍以上の数の CD8 陽性成熟 T 細胞がみられた。すなわち、T 細胞レセプターの再構成を引き継いだ iPS 細胞から T 細胞を作製した場合は、効率よく T 細胞レセプターが発現し、より高率に in vitro の条件でも成熟 T 細胞を分化誘導できると思われた。(図 2-2)

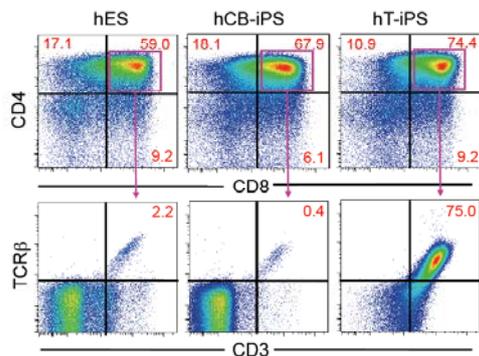


図 2-1 T-iPS 細胞からは T 細胞レセプター (TCR) 発現細胞が高率に出現する

成人末梢血中の CD8T 細胞から作製した iPS 細胞 (T-iPS) および ES 細胞、通常の iPS 細胞 (hCB-iPS) を、OP9-DL1 細胞と 40 日間共培養した。

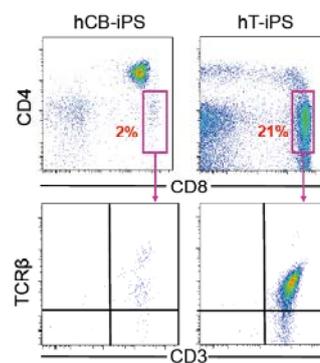


図 2-2 T-iPS 細胞からは成熟 T 細胞が高率に生成する

成人末梢血中の CD8T 細胞から作製した iPS 細胞 (T-iPS) と通常の iPS 細胞 (hCB-iPS) を OP9-DL1 細胞と 60 日間共培養した。

この知見を踏まえ、メラノーマ抗原 MART1 特異的な T 細胞から作製したヒト T-iPS 細胞を用いて、抗原特異的なキラー T 細胞の誘導を試みた。MART1 特異的な T 細胞はメラノーマ患者から採取した NIH の S. A. Rosenberg の研究室から提供された細胞にセンダイウイルスベクターを用いて山中 4 因子を導入し、iPS 細胞 2 クローンを得た (MART1-iPS)。そのうち 1 クローンについて、OP9 細胞と共培養により中胚葉系細胞から始原的血液細胞を誘導し、それらを OP9-DL1 細胞との共培養に移し替えるという方法により、MART1-iPS 細胞から効率よく CD4 陽性 CD8 陽性 DP 細胞を誘導した。

DP 細胞は TCR を発現しているが、成熟の一手手前の細胞である。この段階で TCR 発現細胞全体の中で抗原特異的な TCR を発現している細胞の率を測定すると、約 70% であった。(図 2-3) この DP 細胞から、さらに成熟 T 細胞への分化誘導法を新たに開発した。DP 細胞が共培養中に

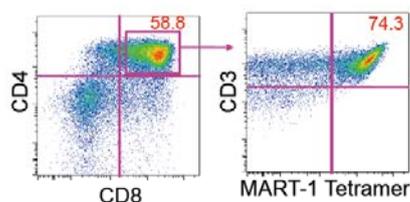


図 2-3 MART1-iPS 細胞からは MART1 特異的な TCR を発現した T 細胞が高率に出現する

メラノーマ患者から分離されたメラノーマ抗原 MART1 特異的な T 細胞から作製した iPS 細胞 (MART1-iPS) を OP9-DL1 細胞と 40 日間共培養した。

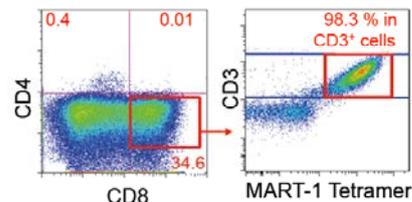


図 2-4 MART1-iPS 細胞からは MART1 特異的な TCR を発現した成熟 T 細胞が高率に生成する

メラノーマ抗原 MART1 特異的な T 細胞から作製した iPS 細胞 (MART1-iPS) を OP9-DL1 細胞と 40 日間共培養した後、抗 CD3 抗体で刺激を加え、さらに 6 日間培養した。

現して間もなくのタイミングで、抗 CD3 抗体の添加により、TCR を介した刺激を入れた。すると、2、3 日で DP 細胞は著減し、6 日後には代わりに CD8 陽性 T 細胞が多数生成した。(図 2-4)これらの CD8 陽性 T 細胞の中で、TCR 発現細胞中の MART1 特異的 T 細胞の割合をみると、常に 95%以上であった。またこれらの CD8 陽性 T 細胞を抗 CD3 抗体で再刺激すると、IFN γ 産生が認められた。すなわち、機能的に成熟していると考えられた。これらの結果は、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ている。

一方、ヒト iPS から HSC/HPC の誘導について、サイトカイン添加とストロマ細胞を用いたふたつの培養系で、評価を行った。iPS に直接、SCF, TPO, FL, VEGF を加えたのみでは、CD34+細胞の出現は認めなかった。ストロマ細胞として OP9, OP9-DLL1 を用いた培養系により、ヒト iPS 由来 CD34+CD38-細胞は出現頻度のばらつきはあるものの、確実に分化誘導した。これらの細胞は、メチルセルロース培養系において、顆粒球系、単球系、赤芽球系に分化することが確認された。(図 2-5)

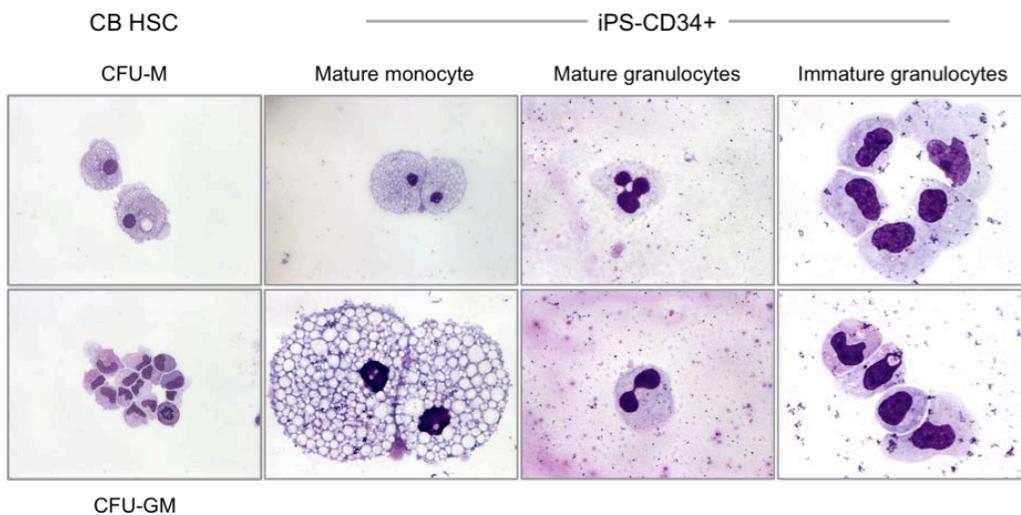


図 2-5 iPS 細胞由来血球系細胞の形態

さらに、iPS 由来 CD34+CD38-細胞について、ヒト SCF, TPO, Flt3 リガンド存在下での誘導条件を検討した。この培養条件においては、培養開始14日目 (d14) にソートした iPS 由来 CD34+CD38-細胞のほうが d7 にソートした同じ分画の細胞より明確なクラスター形成したことから、d7 から d14 に至る過程で、造血前駆細胞同様なクラスター形成能を獲得すると考えられた。ここで変化する転写因子について検討したところ、iPS で高発現で、d7 iPS-CD34+細胞でも発現が維持されていた SALL1, SALL4, ETV4 が、d14 iPS-CD34+細胞で造血幹細胞に近いレベルにまで低下することが明らかになった。リンパ球系への分化能について in vitro で同定に至っていないことから、ミエロイド系・赤芽球系・リンパ球系の転写因子の変化を、iPS 細胞、iPS 由来 CD34+CD38-細胞、骨髄・臍帯血由来造血幹細胞において解析した。(図 2-6)

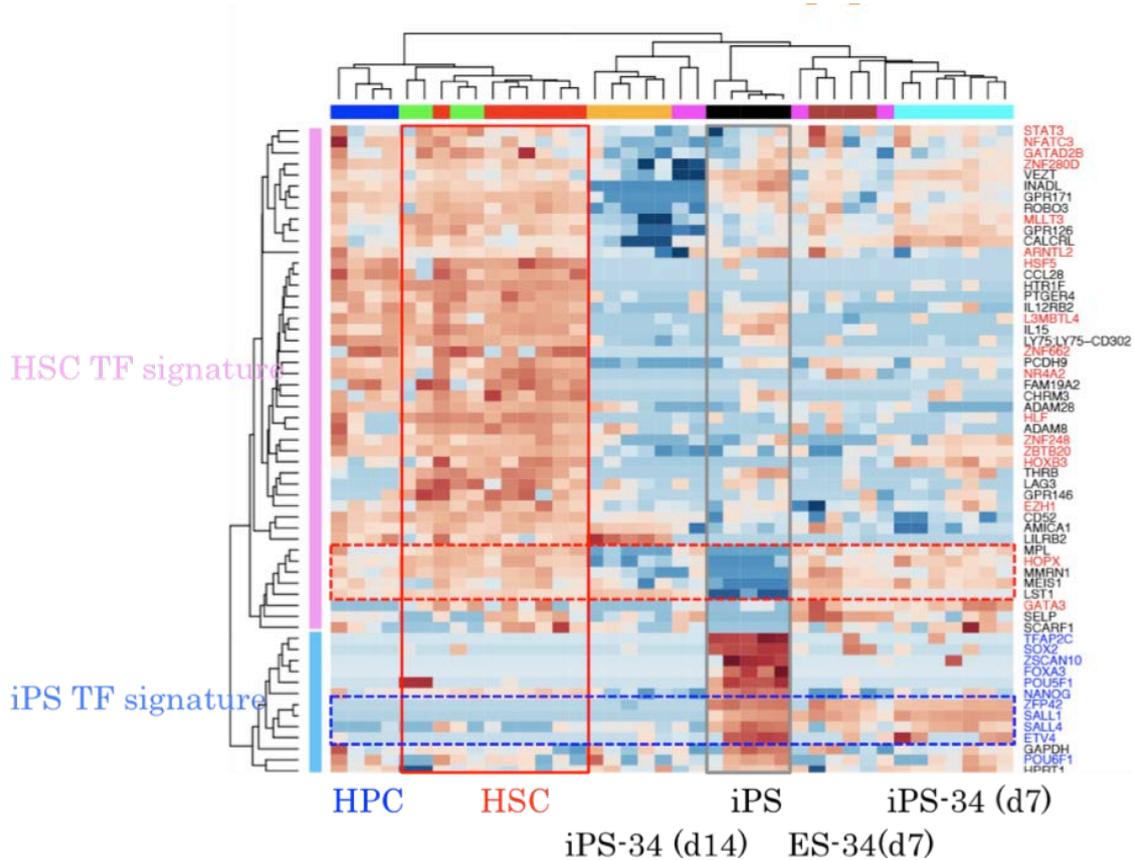


図 2-6 iPS 細胞由来 CD34+CD38-細胞における遺伝子発現プロファイル

その結果、GATA1, GATA2 については、iPS 由来 CD34+CD38-細胞において、ヒト造血幹細胞レベルまで発現があがっているものの、GATA3 については、day7 でのみ、発現が上昇し、day14 になると発現が iPS に近いレベルまで低下する。ヒト造血幹細胞において、特に発現が強いと報告されている HOXA9 については、iPS 由来 CD34+CD38-細胞で発現にばらつきを認めるものの、day7 で day14 より高い発現を認めた。これらの結果をもとに、現在、in vitro で、day7~day14 の間で、iPS 由来 CD34+CD38-細胞を回収し、T, NK, B 細胞などリンパ球系への分化能を決定している。

これらの細胞について、NSG マウスを用いて生着能と分化能について検討した。50匹以上の移植を実施したが、有意なヒト細胞の生着を認めなかった。ヒト Kit リガンドノックインマウス、成熟 NSG マウスへの大腿骨髄への注射法などを併用した移植においては、hCD71+細胞が認められるが、その頻度は僅かであり、生体内での分化を確認するため、ヒト赤芽球系転写因子の発現が確かにこの細胞に認められるかについて解析中である。

3) マウス及びヒト iPS 細胞からの NKT 細胞の誘導系の標準化

従来の皮膚などから iPS 細胞を作製する手法では、治療に必要なリンパ球だけを作るのは難しいとされてきた。これは、リンパ球には細胞分化の過程で遺伝子を再構成してしまう性質があるため、いろいろな抗原に反応するリンパ球ができてしまうことが原因である(図 3-1)。この問題を解決し、目的のリンパ球だけを得るために、我々は、すでに遺伝子の再構成を終えた成熟したリンパ球から iPS 細胞を作製することを計画した。NKT 細胞から iPS 細胞を作ることができると、その iPS 細胞は NKT 細胞から受け継いだ遺伝子再構成を伝達し、NKT 細胞だけに分化誘導されると予想できる。

我々は、マウスの脾臓に存在するNKT細胞を分離し、国立大学法人京都大学の山中伸弥教授らが開発したiPS細胞誘導技術を活用して、NKT細胞由来のiPS細胞を作製することに世界で初めて成功した(図3-2)。さらにNKT細胞から作ったiPS細胞を試験管内で分化誘導する手法を開発し、すべてNKT細胞に分化させることにも成功した(図3-3)。

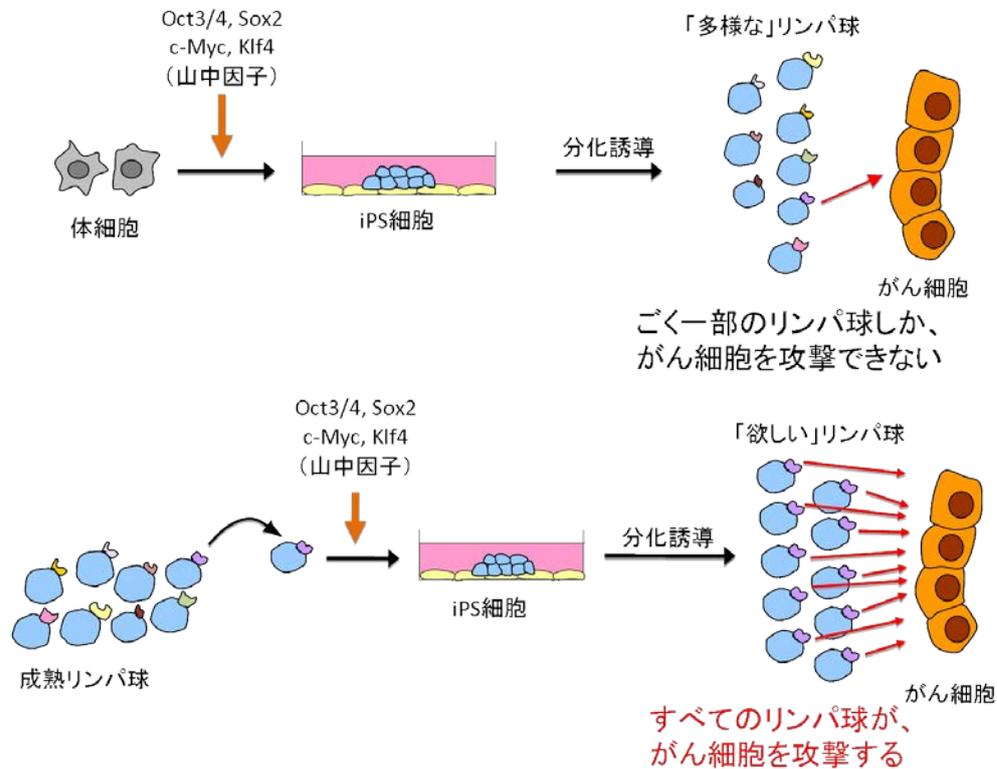


図 3-1 役立つリンパ球だけを作り出す新しい技術

通常、体細胞から山中因子で誘導した iPS 細胞を用いて分化誘導を行うと、「多様な」リンパ球へと分化する。がん細胞を標的として攻撃できるのは、ごく一部のリンパ球に限られる。成熟リンパ球から「目的の」リンパ球を取り出し、iPS 細胞を作って分化誘導を行うと、「欲しい」リンパ球だけに分化させることができる。がん細胞を攻撃できるリンパ球から iPS 細胞を作ると、分化誘導されたリンパ球はすべてがん細胞を攻撃できる。

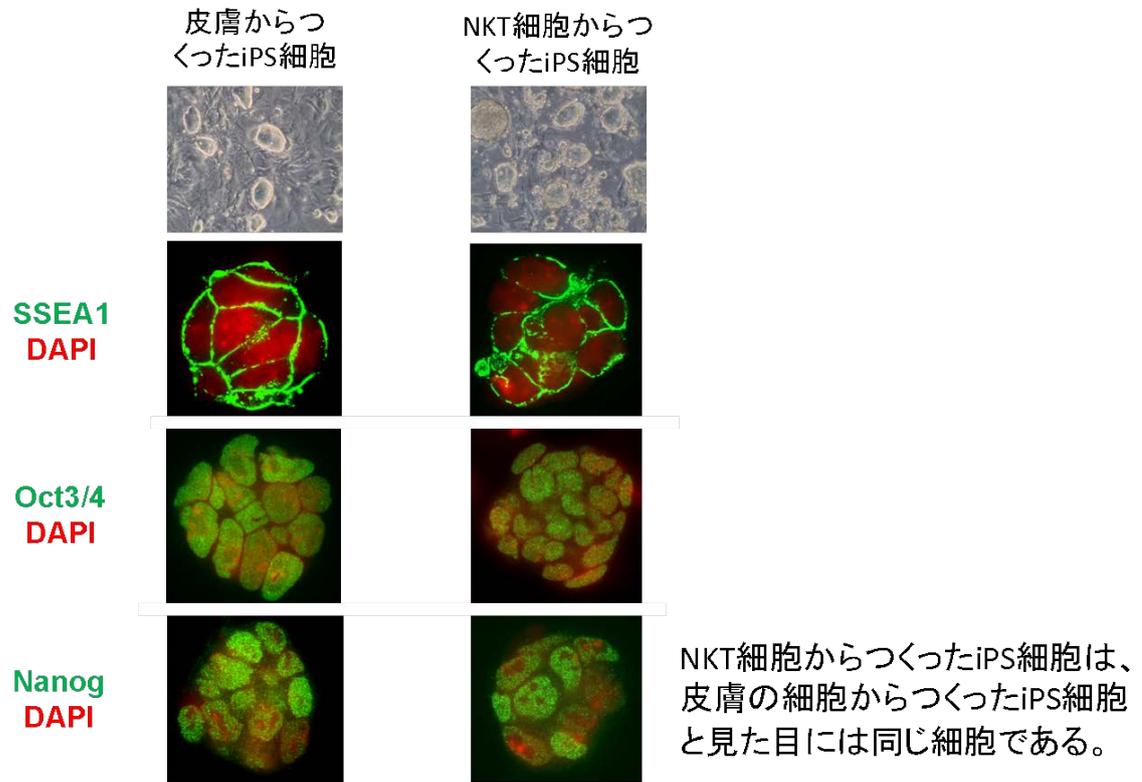
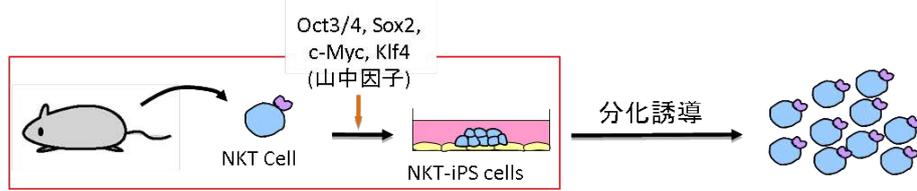
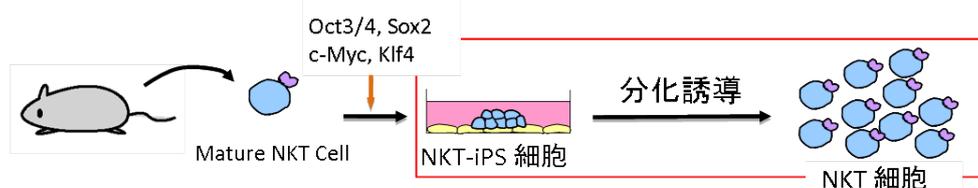
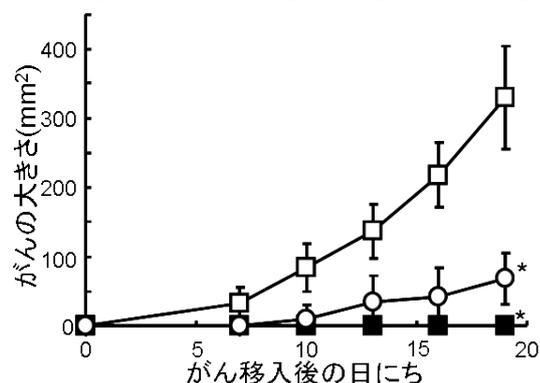
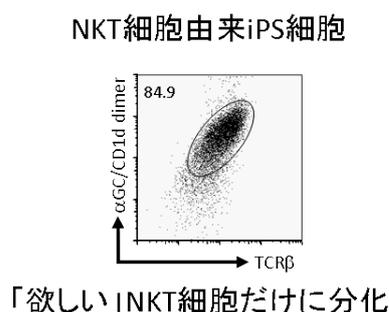


図3-2 NKT 細胞から作った iPS 細胞の様子

NKT 細胞から作った iPS 細胞は、皮膚から作った iPS 細胞と同じ形態を取っている。



- 野生型マウス、NKT細胞非活性化 (N=10)
- 野生型マウス、NKT細胞活性化(N=6)
- NKT細胞欠損マウス、iPS由来NKT細胞移入、NKT細胞活性化 (N=7)



iPS細胞からつくったNKT細胞は、抗がん効果を発揮し、がんを排除できる

図3-3 iPS細胞から作ったNKT細胞は抗がん効果を発揮する

NKT細胞から作ったiPS細胞から、リンパ球分化を行うと、すべてNKT細胞に分化できる。NKT細胞を欠損したマウスにiPS細胞から分化させたNKT細胞を移入して、 α -GalCerで活性化すると、移入したサイモーマがん細胞を排除できた。

マウスにサイモーマというマウスのがん細胞を注射すると1週間で肝臓に無数のがんが転移する。この時点で、 α -GalCerを取り込ませた樹状細胞を投与する治療実験を実施すると、NKT細胞が活性化し、転移したがんが完全に消失する。NKT細胞がないマウスにiPS細胞から作製したNKT細胞を戻し、 α -GalCerを取り込ませた樹状細胞を投与すると、同様に移植したがんの転移や再発を抑えることが分かった。このようなメラノーマの抑制効果は、iPS細胞から作ったNKT細胞を戻さなかったマウスでは見られなかった。これにより、iPS細胞から作ったNKT細胞は、生体内に存在するNKT細胞と同等の抗がん作用を有していることが証明できた(図3-3)。

しかしながらこのような従来のプロトコールにより、iPSより誘導されたNKT細胞は、CD24陽性、CD44弱陽性、CD62L弱陽性、CD69弱陽性NK1.1陰性で、胸腺内に存在するCD4陽性CD8陽性DP細胞と表現型が酷似しており、CD4とCD8の発現についても両陽性であった。サイトカイン産生についてはIFN- γ 、IL-4、IL-9、IL-10、IL-13、IL-17A、IL-22の産生能を有するものの、胸腺NKT細胞のそれと比して1/2~1/5の産生能しか有していなかった。そのため、より強いアジュバント活性を有するNKT細胞を誘導するプロトコールの開発が求められた。

IL-15欠損マウスにおいてはIFN- γ 産生性のNKT細胞の数は1/10程度に減っており、IL-12シグナルカスケードに位置するIL-12受容体 β 2、Stat4、T-betの発現が著しく減っていたことにヒントを得て、iPS細胞共培養20日から25日までIL-7、IL-15、可溶化型IL-15受容体 α 鎖を加えたところ、著しい細胞増殖が認められ、従来法の20倍のNKT細胞を誘導することが可能となった。しかしながらこの細胞はIFN- γ 産生能の減弱が認められた。そこで、さらに共培養20日から25日までIL-7、IL-15、可溶化型IL-15受容体 α 鎖に加えてIL-12存在下培養したところ、細胞

増殖阻害を伴うことなく従来の 10 倍以上の IFN- γ を産生し得る NKT 細胞を誘導することに成功した。(図 3-4)

この新しい培養法で誘導した NKT 細胞は、強力な抗腫瘍活性を有することも確認できた。EL4/EG7 腫瘍モデルにおいて、従来の 1/40 の移入量(10^5 個/マウス)で生着および腫瘍の縮退を認めた。

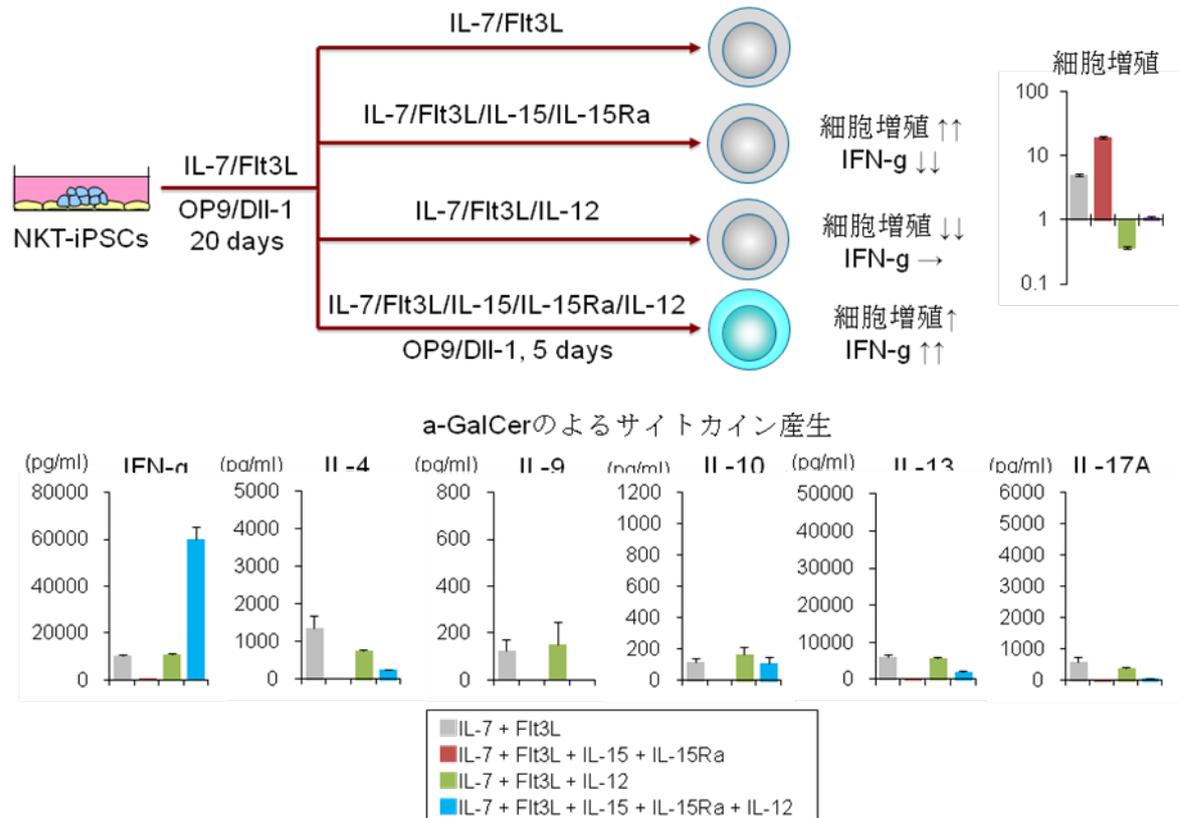


図3-4 iPS 細胞から強力な抗がん効果を発揮する NKT 細胞の培養方法

NKT 細胞から作った iPS 細胞から、リンパ球分化を行う際に、IL-15 および可溶化型 IL-15 受容体 α 鎖、IL-12 を加えることで、細胞増殖が盛んで IFN- γ 産生能を有する NKT 細胞を誘導することが可能である。

一方、ヒト NKT 細胞の iPS 化は絶対的な細胞数が少ないことや誘導効率の低さもあって樹立困難であることが示唆された。現在、NKT 細胞の培養条件改善および、T 細胞を使つての iPS 細胞の誘導効率改善を試み、現在 10^{-3} 程度まで誘導効率を改善することに成功した。一方、末梢血 CD8 陽性 T 細胞から樹立した iPS 細胞の T 細胞受容体 (TCR) の DNA 配列を ZFN もしくは TALEN システムを用いてターゲッティングし、NKT 様の TCR 配列に改変することで、NKT 様 TCR を保持する iPS 細胞を作製することを現在並行して試みている。T-iPS (hi76-2) のゲノム DNA から再構成された TCR 配列を決定しターゲッティングベクター、およびドナーベクターの作成が終了した。また、ZFN による遺伝子欠損の誘導プロトコールについても樹立に成功した。

(2)研究成果の今後期待される展開

エピジェネティック因子であるポリコム群の再構築過程が iPS 細胞樹立のひとつのボトルネックであることを示したことは、iPS 細胞の品質管理に新しい基準をもたらしたことになる。また、ポリコム群は、細胞分化に重要な役割を果たす因子であることから、その正常なリプログラミングは iPS 細胞が正常な分化能を保持する上でも必須であり、本研究の成果は iPS 細胞の品質管理という観点で、

大きく貢献すると考えられる。

一方、ヒト T-iPS 細胞の誘導と再分化技術の確立は、今後の免疫細胞療法に新たな選択肢の可能性をもたらしたと言える。今後、より効率的なヒトリンパ球のリプログラミング技術が確立され、バンク化が現実のものとなれば、がんなどの治療に iPS 技術を効果的に利用することが可能になるはずである。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国際 (欧文) 誌 24 件)

1. Ku M, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, Endoh M, Mikkelsen TS, Presser A, Nusbaum C, Xie X, Chi AS, Adli M, Kasif S, Ptaszek LM, Cowan CA, Lander ES, Koseki H, Bernstein BE. Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet.* **4**:e1000242. (2008) (DOI: 10.1371/journal.pgen.1000242)
2. Schwermann J, Rathinam C, Schubert M, Schumacher S, Noyan F, Koseki H, Kotlyarov A, Klein C, Gaestel M. MAPKAP kinase MK2 maintains self-renewal capacity of haematopoietic stem cells. *EMBO J.* **28**:1392-1406. (2009) (DOI:10.1038/emboj.2009.100)
3. Román-Trufero M, Méndez-Gómez HR, Pérez C, Hijikata A, Fujimura Y, Endo T, Koseki H, Vicario-Abejón C, Vidal M. Maintenance of undifferentiated state and self-renewal of embryonic neural stem cells by Polycomb protein Ring1B. *Stem Cells.* **27**:1559-1570. (2009) (DOI:10.1002/stem.82)
4. Watarai H, Rybouchkin A, Hongo N, Nagata Y, Sakata S, Sekine E, Dashtsoodol N, Tashiro T, Fujii SI, Shimizu K, Mori K, Masuda K, Kawamoto H, Koseki H, and Taniguchi M. Generation of functional NKT cells in vitro from embryonic stem cells bearing rearranged invariant Va14-Ja18 TCR α gene. *Blood.* **14**:230-237. (2009) (DOI: 10.1182/blood-2009-04-217729) (DOI:10.1038/nbt.1607)
5. Saito Y, Uchida N, Tanaka S, Suzuki N, Tomizawa-Murasawa M, Sone A, Najima Y, Takagi S, Aoki Y, Wake A, Taniguchi S, Shultz L.D, Ishikawa F. Cell cycle entry potentiates elimination of quiescent chemotherapy-resistant human AML stem cells. *Nature Biotechnology.* **28**, 275-280. (2010)
6. Watarai H, Fujii S, Yamada D, Rybouchkin A, Sakata S, Nagata Y, Iida-Kobayashi M, Sekine-Kondo E, Shimizu K, Shozaki Y, Sharif J, Matsuda M, Mochiduki S, Hasegawa T, Kitahara G, Endo TA, Toyoda T, Ohara O, Harigaya K, Koseki H, Taniguchi M. Murine induced pluripotent stem cells can be derived from and differentiate into natural killer T cells. *J Clin Invest.* **120**:2610-2618. (2010) (DOI:10.1172/JCI42027)
7. Pereira CF, Piccolo FM, Tsubouchi T, Sauer S, Ryan NK, Bruno L, Landeira D, Santos J, Banito A, Gil J, Koseki H, Merckenschlager M, Fisher AG. ESCs require PRC2 to direct the successful reprogramming of differentiated cells toward pluripotency. *Cell Stem Cell.* **6**:547-556. (2010) (DOI:10.1016/j.stem.2010.04.013)
8. Negishi M, Saraya A, Mochizuki S, Helin K, Koseki H, Iwama A. A novel zinc finger protein Zfp277 mediates transcriptional repression of the Ink4a/arf locus through polycomb repressive complex 1. *PLoS One.* **5**:e12373. (2010) (DOI:10.1371/journal.pone.0012373)
9. Li X, Isono KI, Yamada D, Endo TA, Endoh M, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Otte AP, Casanova M, Kitamura H, Kamijo T, Sharif J, Ohara O, Toyoda T, Bernstein BE, Brockdorff N, Koseki H. Mammalian Polycomblike Pcl2/Mtf2 is a novel regulatory component of PRC2 that can differentially modulate Polycomb activity at both the Hox gene cluster and at Cdkn2a genes. *Mol Cell Biol.* **31**, 351-364. (2011) (DOI: 10.1128/MCB.00259-10)

10. Casanova M, Preissner T, Cerase A, Poot R, Yamada D, Li X, Appanah R, Bezstarosti K, Demmers J, Koseki H, Brockdorff N. Polycomblike 2 facilitates the recruitment of PRC2 Polycomb group complexes to the inactive X chromosome and to target loci in embryonic stem cells. *Development*. **138**(8):1471-82. (2011) (DOI: 10.1242/dev.053652)
11. Watarai H, Sekine-Kondo E, Shigeura T, Motomura Y, Yasuda T, Satoh R, Yoshida H, Kubo M, Kawamoto H, Koseki H, Taniguchi M. Development and function of invariant natural killer T cells producing t(h)2- and t(h)17-cytokines. *PLoS Biol*. **10**:e1001255. (2012) (DOI:10.1371/journal.pbio.1001255)
12. Takagi S, Saito Y, Hijikata A, Tanaka S, Watanabe T, Hasegawa T, Mochizuki S, Kunisawa J, Kiyono H, Koseki H, Ohara O, Saito T, Taniguchi S, Shultz LD, Ishikawa F. Membrane-bound human SCF/KL promotes in vivo human hematopoietic engraftment and myeloid differentiation. *Blood*. **119**:2768-2777. (2012) (DOI:10.1182/blood-2011-05-353201)
13. Hisada K, Sánchez C, Endo T, Endoh M, Román-Trufero M, Sharif J, Koseki H, Vidal M. RYBP represses endogenous retroviruses, preimplantation- and germline-specific genes in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. **32**(6): 1139-1149. (2012) (DOI:10.1128/MCB.06441-11)
14. Mochizuki-Kashio M, Mishima Y, Miyagi S, Negishi M, Saraya A, Konuma T, Shinga J, Koseki H, Iwama A. Dependency on the polycomb gene *Ezh2* distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells. *Blood*. **118**:6553-61. (2011) (DOI:10.1182/blood-2011-03-340554)
15. Oshima M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Nakajima-Takagi Y, Sugiyama F, Koseki H, Kyba M, Iwama A, Osawa M. Genome-wide analysis of target genes regulated by HoxB4 in hematopoietic stem and progenitor cells developing from embryonic stem cells. *Blood*. **117**:e142-50. (2011) (DOI:10.1182/blood-2010-12-323212)
16. Tan J, Jones M, Koseki H, Nakayama M, Muntean AG, Maillard I, Hess JL. CBX8, a polycomb group protein, is essential for MLL-AF9-induced leukemogenesis. *Cancer Cell*. **20**:563-75. (2011) (DOI:10.1016/j.ccr.2011.09.008)
17. Suzuki S, Iwamoto M, Saito Y, Fuchimoto D, Sembon S, Suzuki M, Mikawa S, Hashimoto M, Aoki Y, Najima Y, Takagi S, Suzuki N, Suzuki E, Kubo M, Mimuro J, Kashiwakura Y, Madoiwa S, Sakata Y, Perry AC, Ishikawa F, Onishi A. Il2rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs. *Cell Stem Cell* **10**:753-758. (2012) (DOI:10.1016/j.stem.2012.04.021)
18. Watarai H, Yamada D, Fujii S, Taniguchi M, Koseki H. Induced pluripotency as a potential path towards iNKT cell-mediated cancer immunotherapy. *Int J Hematol*. **95**:624-31. (2012) (DOI: 10.1007/s12185-012-1091-0)
19. Laphthanasupkul P, Feng J, Mantesso A, Takada-Horisawa Y, Vidal M, Koseki H, Wang L, An Z, Miletich I, Sharpe PT. Ring1a/b polycomb proteins regulate the mesenchymal stem cell niche in continuously growing incisors. *Dev Biol*. **367**(2): 140-53. (2012) (DOI:10.1016/j.ydbio.2012.04.029)
20. Nakamura S, Oshima M, Yuan J, Saraya A, Miyagi S, Konuma T, Yamazaki S, Osawa M, Nakauchi H, Koseki H, Iwama A. Bmi1 confers resistance to oxidative stress on hematopoietic stem cells. *PLoS One*. **7**(5):e36209. (2012) (DOI:10.1371/journal.pone.0036209)
21. Tanaka S, Miyagi S, Sashida G, Chiba T, Yuan J, Mochizuki-Kashio M, Suzuki Y, Sugano S, Nakaseko C, Yokote K, Koseki H, Iwama A. *Ezh2* augments leukemogenicity by reinforcing differentiation blockage in acute myeloid leukemia. *Blood*. **120**(5):1107-1117. (2012) (DOI:10.1182/blood-2011-11-394932)
22. Endoh M, Endo TA, Endoh T, Isono K, Sharif J, Ohara O, Toyoda T, Ito T,

- Eskeland R, Bickmore WA, Vidal M, Bernstein BE, Koseki H. Histone H2A Mono-Ubiquitination Is a Crucial Step to Mediate PRC1-Dependent Repression of Developmental Genes to Maintain ES Cell Identity. *PLoS Genet.* **8**(7):e1002774. (2012) (DOI: 10.1371/journal.pgen.1002774)
23. Vizcardo R, Masuda K, Yamada D, Ikawa T, Shimizu K, Fujii S-I, Koseki H, Kawamoto H. Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPS cells derived from mature CD8+ T cells. *Cell Stem Cell.* **12**: 31-36. (2013) (DOI: 10.1016/j.stem.2012.12.006)
24. Nishimura T, Kaneko S, Kawana-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**(1):114-26. (2013) (DOI: 10.1016/j.stem.2012.11.002)

(2)その他の著作物（総説、書籍など）

1. Saito Y. and Ishikawa F. The origins of Blood: Induction of hematopoietic stem cells from different sources. *Cell Stem Cells.* **3**:8-10. (2008)
2. 石川文彦 「ヒト化マウスの臨床応用の可能性」炎症と免疫 17-5, 2009
3. 石川文彦 「がん幹細胞と新規治療」感染・炎症・免疫 39-4, 2010
4. 石川文彦 「急性骨髄性白血病の幹細胞の正常と治療戦略」血液フロンティア 20-1, 2010
5. Yamada D, Koseki H. Application of iPS cell technology for NKT cell-targeted adjuvant therapy in mice. *Rinsho Ketsueki.* **51**(11):1661-7. (2010)
6. Sharif J, Koseki H. Recruitment of Dnmt1 roles of the SRA protein Np95 (Uhrfl) and other factors. *Prog Mol Biol Transl Sci.* **101**:289-310. (2011) Review.

(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 8件、国際会議 4件）

1. 石川文彦 「急性骨髄性白血病幹細胞のニッチとその役割」第27回日本骨代謝学会学術集会、ミニシンポジウム(7/2009)大阪
2. 古関明彦 「Application of iPS technology for NKT cell-mediated adjuvant therapy in mice」第71回日本血液学会総会・学術集会（10/2009）京都
3. 石川文彦 「ヒト化マウスによる病態解析」第37回日本臨床免疫学会シンポジウム(11/2009)東京
4. 石川文彦 「ヒト化動物モデル」平成21年度かずさ・千葉エリア産学官連携交流会(11/2009)木更津市・千葉
5. 石川文彦 「Translational medicine using humanized mouse」第39回日本免疫学会総会・学術集会 シンポジウム（11/2009）大阪
6. 石川文彦 “Reconstitution of Human Immune system in mice” The 5th International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2009(6/2009)京都
7. 石川文彦 「Humanized mouse for biomedical research」The 3rd Chiba University Global COE symposium “Molecule Dynamics of Immune System”(11/2009)千葉
8. 石川文彦 「Humanized mouse for biomedical research」The First CSI/KAI Joint Symposium on Immunology(11/2009)上海
9. 渡会浩志. Therapeutic potential of natural killer T cells derived from iPS cells, 第15回神経芽腫研究会、国立がんセンター、8月28日
10. 渡会浩志. Therapeutic potential of natural killer T cells derived from iPS cells, 第2回 Meet the Expert、広島大学、9月15日
11. 古関明彦, Application of iPS Cell Technology for NKT Cell-targeted Adjuvant Therapy for Tumors in Mice, 第14回日米科学技術会議、2月24日、ベセスダ

12. Masuda K, Vizcardo R, Yamada D, Fujii S-I, Shimizu K, Hanada K-I, Ishikawa F, Koseki H, Kawamoto H. Generation of CD8 single positive cells in vitro from iPS cells derived from human mature T cells. The Third Workshop of Synthetic Immunology, May 18-19, 2012, Kyoto.

② 口頭発表 (国内会議 7 件、国際会議 5 件)

1. 古関明彦, 「ES 細胞と iPS 細胞研究の最新動向」,平成20年度第1回かずさバイオテクノロジーセミナー, 平成20年8月7日(木), オークラアカデミアパークホテル平安の間
2. 古関明彦, 「リンパ球 iPS 細胞の樹立と機能」, 第 8 回 日本再生医療学会総会, 平成 21 年 3 月 5 日(木), 東京国際フォーラム
3. Masuda K. Heterogeneity among iPS clones with regard to B cell potential, Stem cell satellite Meeting (StemOz), Gladstone, Australia 2010 Mar.23
4. Masuda K, Yamada D, Koseki H, Kawamoto H. Heterogeneity among iPS clones with regard to B cell potential, International Congress of Immunology, Kobe, Japan 2010 Aug.23
5. Watarai H, Fujii S, Yamada D, Rybouchkin A, Sakata S, Nagata Y, Iida-Kobayashi M, Sekine-Kondo E, Shimizu K, Endo TA, Toyoda T, Ohara O, Koseki H and Taniguchi M. Reprogramming of natural killer T (NKT) cells to induced pluripotent stem cells and their development into functional NKT cells in vitro. 14th International Congress on Immunology, Kobe, Japan, Aug 23, 2010
6. Yamada D. et al. Insufficient reprogramming of polycomb target genes in iPSCs. Mouse Molecular Genetics 2011. Cambridge, UK, September 20-23 (2011)
7. 増田喬子, ヒト末梢 B 細胞からの iPS 細胞作製、第 40 回日本免疫学会学術集会、幕張、2011 年 11 月 28 日
8. Vizcardo R, Therapeutic potential of iPS cells derived from mature lymphocytes: Production of iPS cells from human T cells and regeneration of T cells in vitro or in vivo from these T-iPS cells、第 40 回日本免疫学会学術集会、幕張、2011 年 11 月 28 日
9. Tomizawa M, Yamada D, Saito Y, Hijikata A, Watanabe T, Najima Y, Masuda K, Ohkoshi M, Kawamoto H, Ohara O, Koseki H, Ishikawa F. Development of human CD34+ hematopoietic progenitors from human iPS cells. 第 40 回日本免疫学会学術集会、幕張、2011 年 11 月 28 日
10. Masuda K, Class switching in B cells generated from B-iPS cells, 第 41 回免疫学会学術集会、神戸、2012 年 12 月 7 日
11. Vizcardo R, Generation of Cancer Antigen Specific mature T cell from human iPS cells: Therapeutic potential of iPS cells derived from mature Lymphocytes、第 41 回免疫学会学術集会、神戸、2012 年 12 月 7 日
12. Vizcardo R, Masuda K, Yamada D, Ikawa T, Shimizu K, Fujii S, Koseki H, Kawamoto H, Generation of Melanoma Antigen Specific T Cells From Human Ips Cells Using a Feeder Free System, 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, 2012 Dec. 9

③ ポスター発表 (国内会議 3 件、国際会議 8 件)

1. 山田大輔, 古関明彦. 「Application of iPS technology for NKT Cell-Mediated adjuvant therapy in mice」Joint Cold Spring Harbor Laboratory/ Wellcome Trust Conference(9/2009) イギリス
2. Yamada D, Endo TA, Sato M, Fujita M, Tezuka C, Koseki H. Insufficient reprogramming of polycomb target genes in iPSCs derived from B Cell. Biochemistry and Molecular Biology 2010, Kobe, Dec.8, 2010
3. Watarai H, Fujii S, Yamada D, Rybouchkin A, Sakata S, Nagata Y, Iida-Kobayashi M, Sekine-Kondo E, Shimizu K, Endo TA, Toyoda T, Ohara O, Koseki H and Taniguchi M. Reprogramming of natural killer T (NKT) cells to induced pluripotent stem cells and their

- development into functional NKT cells in vitro. 14th International Congress on Immunology, Kobe, Japan, Aug 23, 2010
4. Watarai H, Fujii S, Koseki H and Taniguchi M. Murine induced pluripotent stem cells can be derived from and differentiate into natural killer T cells. 11th International Symposium on Dendritic Cells: Forum on Vaccine Science, Lugano, Switzerland, Sep 29, 2010.
 5. Watarai H, Fujii S, Yamada D, Rybouchkin A, Sakata S, Nagata Y, Iida-Kobayashi M, Sekine-Kondo E, Shimizu K, Endo TA, Toyoda T, Ohara O, Koseki H and Taniguchi M. Reprogramming of natural killer T (NKT) cells to induced pluripotent stem cells and their development into functional NKT cells in vitro. 16th International Conference of the International Society of Differentiation, Nara, Japan, Nov 16, 2010
 6. Yamada D. et al. Generation of iPSCs is promoted by Ring1B knockdown with defined factors induction. 第5回日本エピジェネティクス研究会、熊本、2011年5月19～20日
 7. Masuda K, Generation of iPS cells from human T cells: Therapeutic potential of iPS cells derived from mature lymphocytes, EUTHyme-Rolduc Meeting, Leeuvenhorst (The Netherlands), May 22, 2011
 8. Yamada, D. et al. Generation of iPSCs from antigen-specific mature B cells and re-differentiation into antibody producing cells. Stem Cell Engineering & Cell Based Therapies. Cold Spring Harbor, NY, USA, April 7-10 (2011)
 9. Vizcardo R, Masuda K, Yamada D, Fujii S-I, Shimizu K, Hanada K-I, Ishikawa F, Koseki H, Kawamoto H. Generation of iPS cells from human T cells : Therapeutic potential of iPS cells derived from mature lymphocytes. ISCR2012, June 13-16, Yokohama.
 10. Yamada D, Ikawa T, Endo TA, Fusaki N, Ohara O, Kawamoto H, Koseki H. Efficient induction of human T lymphocyte cell derived iPSCs using temperature sensitive Sendai virus vectors. ISCR2012, June 13-16, Yokohama.
 11. Yamada D, et al. Efficient induction of human T lymphocyte cell derived iPSCs using temperature sensitive Sendai virus vectors. 第35回日本分子生物学会、福岡、2012年12月11～14日

(4)知財出願

①国内出願 (1件)

1.

発明の名称: B細胞由来 iPSC細胞およびその用途

発明者: 渡会浩志、伊川友活、石川文彦、河本宏、古関明彦、谷口克

出願人: 独立行政法人理化学研究所

出願日: 2008/9/4

出願番号: 2008-227325

②海外出願 (3件)

1.

発明の名称: B細胞由来 iPSC細胞およびその用途

発明者: 谷口克、渡会浩志、伊川友活、石川文彦、河本宏、古関明彦

出願人: 独立行政法人理化学研究所

出願日: 2009/10/8

出願番号: PCT/JP2009/054698

2.

名称: NKT細胞由来 iPSC細胞およびそれ由来の NKT細胞

発明者: 谷口克、渡会浩志、古関明彦、藤井眞一郎

出願人: 独立行政法人理化学研究所

出願日: 2009/9/8

出願番号: WO2009/065695

3.

発明の名称:iPS 細胞由来アロ NKT 細胞を用いた免疫療法およびそのための NKT 細胞由来 iPS 細胞および該 iPS 由来 NKT 細胞のバンキング

発明者:谷口克、渡会浩志、古関明彦、藤井眞一郎

出願人:独立行政法人理化学研究所

出願日:2011/12/2

出願番号:US61/419064

(5)受賞・報道等

①受賞

・麒麟児賞(渡会浩志)

②マスコミ(新聞・TV等)報道

・日本経済新聞社 2009年3月6日 朝刊3面「iPS細胞 夢へ前進」

・2010年6月1日 理研・JSTにて、Journal of Clinical Investigationの論文内容について、「「多能性幹細胞」iPS細胞から免疫治療に「役に立つ」リンパ球を作製—抗がん効果を発揮するNKT細胞だけを作ることに世界で初めて成功—」と題してプレス発表。

・2010年6月2日 NHKニュース、朝日新聞、読売新聞、毎日新聞、日経新聞、産経新聞、東京新聞、日経産業新聞、日刊工業新聞、化学工業日報

・2010年6月19日 薬事日報

§ 6 研究期間中の活動(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
2010年 9月4日	第22回サイエンスカフェ	神奈川県立 川崎図書館	50人	講演(講師:河本宏)「リンパ球からiPS細胞をつくる!—免疫療法開発研究の最前線—」(YouTube“RIKEN Channel”にて公開中 2011年6月現在で再生回数1,045回)
2010年 10月2-3日	第2回蒼煌祭	横浜サイエンスフロンティア高等学校	4,492名	河本宏がポスター前で研究内容解説 タイトル「人工多能性幹細胞」iPS細胞から免疫治療に「役に立つ」リンパ球を作製

§7 結び

本制度によってリンパ球由来 iPS 細胞についての研究は大きく進んだと考えている。当初の研究の100%を達成したとは考えていないが、70～80%は達成したと考える。参加した研究者のそれぞれの専門性を生かしたユニークな研究を推進してきたと考える。今後は、遺伝子組み換えによってヒトリンパ球由来 iPS 細胞に抗原特異性を賦与する技術開発に注力することにより、iPS 細胞を介した免疫細胞療法の実現に向けた研究に焦点を絞っていく。

