

「人工多能生幹細胞(iPS 細胞)作製・制御等の医療基盤技術」
平成 20 年度採択研究代表者

千住 覚

熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野 准教授

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

1. 研究実施の概要

本年度の研究は、以下の3項目の研究課題についての研究を行った。

研究課題 1 ヒト iPS 細胞からの免疫細胞作製

がん化の可能性の低い新規のヒト iPS 細胞作製技術を開発した。さらに、ヒト iPS 細胞よりヒトの T 細胞を刺激する活性を有する樹状細胞、およびマクロファージを作製する手法を開発した。

研究課題 2 マウス iPS 細胞からの免疫細胞作製

マウス iPS 細胞から樹状細胞およびマクロファージを作製し、様々な機能解析を行った。

研究課題 3 マウス iPS 細胞由来の樹状細胞による抗腫瘍細胞ワクチン

マウス iPS 細胞に抗原遺伝子を導入し、この遺伝子導入 iPS 細胞を分化させることにより、抗原たんぱくを恒常的に発現する樹状細胞を作製した。この樹状細胞をマウス個体に投与することにより、抗原特異的な T 細胞を活性化し、さらに、同じ抗原を発現する腫瘍細胞に対する拒絶効果を誘導する細胞ワクチン効果が得られることを確認した。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

本年度の研究は、以下の3項目の研究課題を目標として行った。

研究課題 1

ヒト iPS 細胞からの樹状細胞(iPS-DC)およびマクロファージ(iPS-MP)分化誘導技術の開発

研究課題 2

マウス iPS 細胞からの樹状細胞およびマクロファージの作製、ならびにその機能解析

研究課題 3

マウスの腫瘍モデルを用いた、iPS 細胞由来樹状細胞による抗腫瘍免疫誘導の検討

研究課題毎の実施内容は以下のとおりである。

研究課題 1

本研究においては、ヒト iPS 細胞から免疫細胞 (iPS-DC および iPS-MP) への分化誘導技術を開発し、さらにこれらを用いて、ヒト T 細胞の機能制御を行う手法を開発することをひとつの目的としている。そのために、iPS 細胞と T 細胞を同一のドナーから調整して検討を行う必要がある。そこで、まず、機関内倫理委員会の承認を得たうえで、本研究で用いるためのヒト iPS 細胞の作製を行った。リプログラミング因子としては、(Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4)の4つを、また、リプログラミング因子を導入するためのベクターシステムとしては、レンチウイルスベクターを用いた。さらに、ヒト iPS 細胞由来の免疫細胞を人体に投与するという将来の臨床応用を見据えて、ヒト iPS 細胞に由来する分化細胞のがん化の可能性を低くするべく、新しいヒト iPS 細胞の作製技術を確立した(熊本大学より特許出願済み)。また、OP9 細胞との共培養による血液細胞への分化誘導法に基づき、ヒト iPS 細胞を樹状細胞およびマクロファージへ分化させることに成功した。ヒト iPS 細胞由来の樹状細胞は、生理的な樹状細胞と同様に、ヒトの T 細胞を刺激し増殖応答を誘導する能力を有していた。さらに、フィーダー細胞である OP9 細胞を使用しない分化誘導法の開発を試みており、現時点で、樹状細胞およびマクロファージに類似した形態を有する細胞への分化が可能であることまでを確認している。

研究課題 2

京都大学の山中教授のグループとの共同研究を行い、同グループにより樹立されたマウス iPS 細胞を用いて、樹状細胞およびマクロファージへの分化誘導の検討を行った。これまでに我々がマウス ES 細胞を用いて確立していた分化誘導法とほぼ同じ方法により、樹状細胞およびマクロファージへの分化誘導が可能であった。図1にマウス iPS 細胞からの樹状細胞及びマクロファージ分化誘導法の概要を示す。また、図2にマウス iPS 細胞に由来する樹状細胞の形態を示す。

iPS 細胞由来の樹状細胞については、樹状細胞としての特性を確認するために、フローサイトメトリー解析による細胞表面分子の解析、ELISA による IL-12 等のサイトカイン産生、アロ系統のドナーマウスに由来する T 細胞の刺激 (MLR 反応)、抗原特異的ヘルパー T 細胞クローンに対するタンパク質抗原のプロセスおよび提示、マウス個体に移入した場合の所属リンパ節への移行等について機能解析を行った。

また、iPS 由来のマクロファージ (iPS-MP) については、フローサイトメトリー解析による細胞表面分子の解析、ELISA によるサイトカイン産生量の測定、貪食能、NO 産生能などの機能解析を行なった。

以上の解析結果より、マウスの iPS 細胞からの分化誘導により作製した樹状細胞およびマクロファージ (miPS-DC および miPS-MP) が、生理的な樹状細胞およびマクロファージと同様の機能的特性を有していることが明らかとなった。

研究課題 3

MHC クラス I 分子の細胞表面への発現に関連する $\beta 2$ ミクログロブリンあるいは TAP1 の遺伝子を標的破壊することにより、ES 細胞由来の分化細胞の細胞表面上に発現する MHC を任意のアリルのものに置換する技術をマウスの実験系において確立した¹⁾。また、マウスの ES 細胞に由来する樹状細胞(ES-DC)による抗腫瘍免疫応答の研究に関連して、異なる抗原を発現する複数の ES-DC を同時にマウス個体に投与することにより、より強力な腫瘍免疫効果の誘導が可能であることを見出した²⁾。

さらに、マウスの移植性腫瘍モデルを用いて、iPS 細胞に由来し、モデル腫瘍抗原を発現する樹状細胞(miPS-DC)を用いた抗腫瘍免疫誘導実験を行った。その結果、iPS-DC が、過去の研究において観察している ES-DC による抗腫瘍免疫効果と同等あるいはそれ以上の効果を発揮できるという結果が得られた。

図1 マウス iPS 細胞からの樹状細胞およびマクロファージ分化誘導法

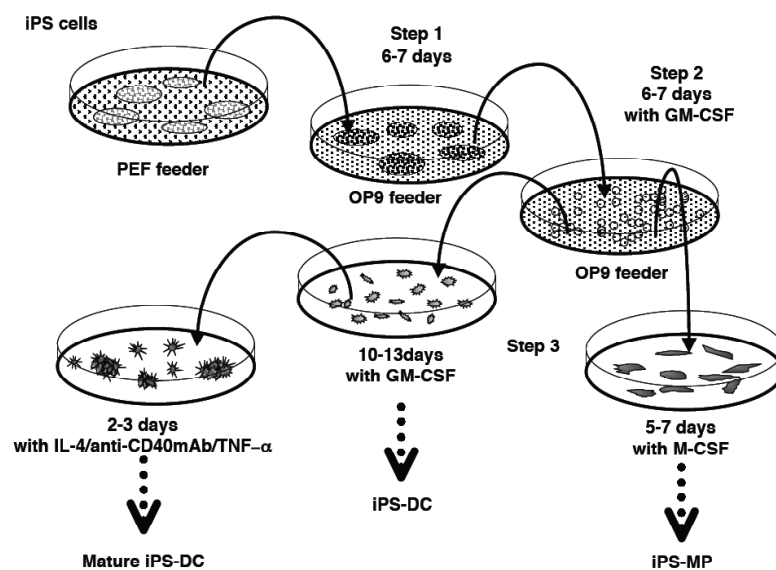
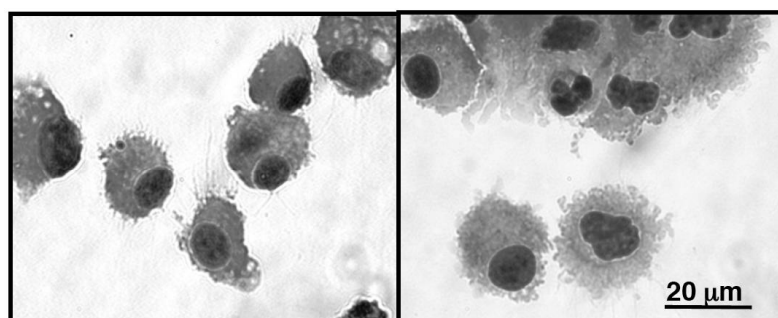


図2 マウス iPS 細胞由来の樹状細胞の形態



3. 研究実施体制

(1)「千住」グループ

①研究分担グループ長:千住 覚(熊本大学、准教授)

②研究項目

- ・ iPS 細胞作製、分化誘導法開発
- ・ iPS 細胞作製用ベクター作製
- ・ 樹状細胞による抗腫瘍免疫研究
- ・ ES 細胞および iPS 細胞の遺伝子改変技術の研究
- ・ ヒト化マウスを用いた iPS 由来樹状細胞の機能解析

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

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.
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* on line publication Feb.24 2009
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* in press

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 1 件 (CREST 研究期間累積件数 : 1 件)