

「人工多能性幹細胞 (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 大学院生命科学研究部 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

### ヒト iPS 細胞由来のマクロファージ (iPS-MP) によるアルツハイマー病とがんの新規治療技術開発 へ向けた研究

未分化な iPS 細胞段階で遺伝的改変を施すことによる、iPS 細胞由来マクロファージの (iPS-MP) 遺伝的改変法を確立した。そして、この手法を用いて、アルツハイマー病の原因物質である  $\beta$  アミロイドタンパクを特異的に認識する iPS-MP を作製した。この iPS-MP は、 $\beta$  アミロイド特異的単鎖抗体と Fc $\gamma$  レセプターの融合タンパクを細胞表面上に発現している。in vitro の解析においてこの iPS-MP が  $\beta$  アミロイドタンパクに特異的な強力な貪食能力を有していることを確認した。さらに、アルツハイマー病モデルマウスと scid マウスを交配させ、ヒトの iPS-MP を移入することが可能なモデルマウスを作成した。また、マウスの側脳室内にカテーテルを留置し細胞を持続注入することによるマウス脳内への細胞移入システムを確立した。

また、ヒトの CD20 分子に対する単鎖抗体を細胞膜タンパクとして発現する iPS-MP による、CD20 分子を発現するヒト B リンパ球性白血病細胞株 BALL-1 に対する効果を検討した。その結果、抗 CD20 単鎖抗体を発現する iPS-MP による抗腫瘍効果が、in vitro および in vivo の実験により示された。

### ヒト iPS 細胞から非ヒト動物成分を用いない培養法による樹状細胞およびマクロファージ作製法の 開発

医療応用可能な樹状細胞およびマクロファージ作製法の開発を目指して、xeno-free 培養による分化誘導法開発を試みた。様々な細胞の培養用として市販されている無血清培養液を用いて検討し、さらに、血液細胞の分化・増殖を促進することが知られている各種のサイトカインを添加し効果を検討した結果、3ステップの分化誘導方法による xeno-free 分化誘導系を確立した。

## § 2. 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 寛(熊本大学、准教授)

### ②研究項目

- ・iPS 細胞作製、分化誘導法開発
- ・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
- ・樹状細胞による自己免疫治療法の研究

## § 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

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

未分化な iPS 細胞段階で遺伝的改変を施すことによる、マクロファージ(iPS-MP)の遺伝的改変法を確立した。そして、この手法を用いて、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に特異的な抗体を発現する iPS-MP を作製した。この遺伝的改変 iPS-MP は、βアミロイド特異的単鎖抗体と Fcγレセプターの融合タンパクを細胞表面上に発現している。in vitro の解析においてこの iPS-MP がβアミロイドタンパクに特異的な強力な貪食能力を有していることを確認した。今後、この iPS-MP を用いて脳内におけるβアミロイドの処理が可能であるかどうかを検討する必要がある。その目的で、ヒトの家族性アルツハイマー病における家系において見いだされた遺伝子変異を複数あわせ持つアルツハイマー病モデルマウス(5XFAD マウス)と scid マウスを交配させ、ヒトの iPS-MP を移入することが可能なアルツハイマー病モデルマウスを作成した。また、マウスの側脳室内にカテーテルを留置し細胞を持続注入することによるマウス脳内への細胞移入システムを確立した。

### iPS-MP による悪性腫瘍治療法の開発

近年、がん細胞表面に発現する抗原分子に特異的な抗体を用いる受動免疫療法が実用化されているが、抗体療法の作用機序としてはマクロファージなどによる細胞性細胞障害(ADCC)が主であり、抗体療法の奏功の成否は、患者体内の免疫細胞の数的・質的な状態に大きく左右されるものと考えられる。したがって、さらに効果の高い受動免疫療法として、マクロファージ移入療法が考えられる。

本年度の研究においては、ヒトの CD20 分子に対する単鎖抗体を細胞膜タンパクとして発現す

るiPS-MPによる、CD20分子を発現するヒトBリンパ球性白血病細胞株BALL-1に対するin vitroでの効果を検討した。BALL-1とiPS-MPを各々別の蛍光色素でラベルし共培養を行う実験により、CD20分子に対する単鎖抗体を発現するiPS-MPが、in vitroにおいてBALL-1を貪食する活性を有していることが判明した。そして、3日間のiPS-MPとの共培養により、BALL-1細胞数が1/100以下に減少した。さらに、scidマウスの腹腔内にBALL-1細胞を移植する実験において、抗CD20抗体を発現するiPS-MPによりBALL-1細胞の生着を阻害することができた。以上より、腫瘍細胞表面抗原に対する単鎖抗体を発現するiPS-MPによる抗腫瘍効果が、in vitroおよびin vivoの実験により示された。

### ヒトiPS細胞から非ヒト動物成分を用いない培養法による樹状細胞(iPS-DC)およびマクロファージ(iPS-MP)作製法の開発

本研究プロジェクトの最終目標である医療応用可能な樹状細胞およびマクロファージ作製法の開発を目指して、xeno-free培養による分化誘導法開発を試みた。この目的で、様々な細胞の培養用として市販されている無血清培養液を用いて検討した。さらに、血液細胞の分化・増殖を促進することが知られている各種のサイトカインを添加し効果を検討した。その結果、以下のような3ステップの分化誘導方法を確立した。

第1ステップ: 未分化状態のiPS細胞をヒト血漿由来フィブロネクチンをコートした培養ディッシュへ播種し、未分化iPS細胞の維持培養に用いているものと同じ培養液を用いて、培養を行う。細胞が培養ディッシュの表面の80%程度を覆うまで増殖した時点(分化誘導開始から3-5日後)で、培養液をOptMizer (Gibco-Invitrogen社)とPeprogrow III (Peprotec社)を等量混合したものにBMP-4(5 ng/ml)を加えたものに置換する。さらに、7-10日後、Peprogrow III (Peprotec社)にBMP-4(5 ng/ml)を加えたものに置換する。培養開始10日目以降、嚢胞状の構造と球状の細胞集団を認める。培養開始から、25日目前後で、トリプシン+コラゲナーゼを含む解離液を用いて、細胞を回収する。

第2ステップ: 回収した細胞をOptMizerとMacrophage SFM (Gibco-Invitrogen社)を等量混合したものにGM-CSF(100 ng/ml)とM-CSF(50 ng/ml)を加えたものを用いて10-17日間培養する。この結果、浮遊性あるいは弱付着性の細胞が出現し、増殖する。

第3ステップ: 樹状細胞を作製する場合は、第2ステップの細胞をさらにGM-CSF(100 ng/ml)とIL-4(50 ng/ml)を加えて培養する。マクロファージを作製する場合は、第2ステップの培養を15日以上継続した後、細胞を回収する。

図1に、このxeno-free分化誘導培養の途中経過および分化した樹状細胞の形態を示す。

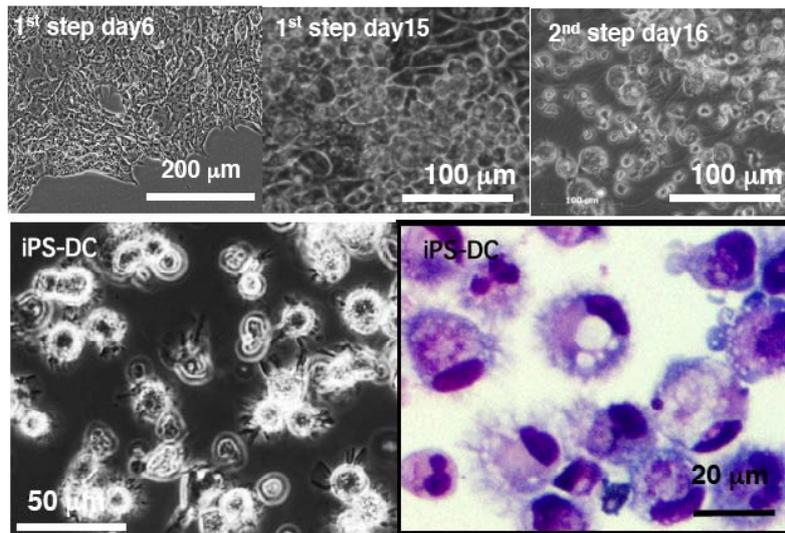


図1 xeno-free 培養によるヒト iPS 細胞の分化誘導

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ● 論文詳細情報

1. 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
2. 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  $\gamma^{null}$  (NOG) mice. *Immunol. Lts.* 126: 67-72, 2009. DOI: 10.1016/j.imlet.2009.08.001

### (4-2) 知財出願

- ① 平成21年度特許出願内訳(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)