

研究報告書

「細胞リプログラミング技術を用いた新しい免疫細胞再生医療の開発」

研究期間：平成 20 年 6 月～平成 24 年 3 月

研究者：清野 研一郎

1, 研究のねらい

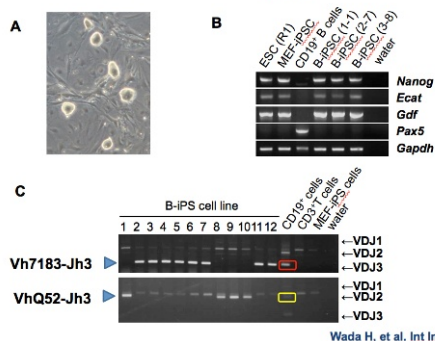
本研究を始めた当時、皮膚等の体細胞由来の iPS 細胞から様々な系統の細胞を分化誘導することで、ES 細胞の問題点を克服した新しい再生医療が可能であることが盛んに論じられていた。一方、我々が専門として来たリンパ球や抗体を用いた治療では抗原特異性が問題とされる。この抗原特異性はリンパ球においては抗原受容体の種類によって規定されるのであるが、上記のような皮膚細胞由来の iPS 細胞からは思い通りの細胞（抗原特異性を持ったリンパ球）を大量に入手することは困難であると思われた。そこで、iPS 細胞の由来細胞を免疫細胞に代えるとどうなるか？ iPS 細胞からリンパ球は分化誘導できるか？できた場合抗原特異性はどうなるか？等の疑問を持つようになった。これらに答えるには、広く免疫系細胞と iPS 細胞との関わりについて明らかにする必要があると考え、まず免疫細胞からの iPS 細胞誘導と iPS 細胞からの免疫細胞の分化について検討を行うこととした。究極的には iPS 細胞から特定の遺伝子再構成したリンパ球を分化誘導する、あるいはリンパ球サブセットの分化を制御する方法を見出し、癌や感染症、そして同種異系の移植に対して有用な細胞を得る方法論を確立することを一つの目標として研究を開始した。

2, 研究成果

2・1 末梢 B 細胞からの iPS 細胞の誘導

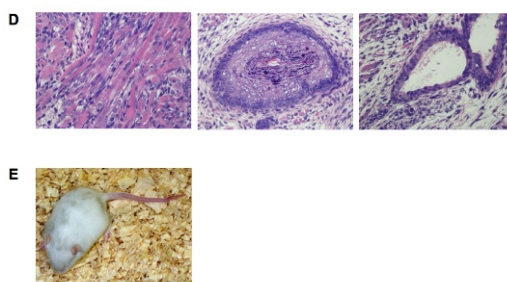
マウス脾臓の B 細胞、T 細胞を用い、これらに山中 4 因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を遺伝子導入し iPS 細胞誘導を試みた。当初は遺伝子導入そのものに難渋し、レトロウイルス法、レンチウイルス法、タンパク質導入法など様々な遺伝子導入法を検討したが、最終的にレトロウイルス法により脾臓 B 細胞から iPS 細胞様のコロニーを得ることができた。同コロニーをクローニングし、遺伝子発現を検討したところ、B 細胞特異的な Pax5 の発現は失われ、ES 細胞マーカーである Nannog, Ecat などの発現が確認できた。また、VDJ 組み換えを検討したところ、これらのコロニーは皮膚細胞などと異なり B 細胞抗原受容体部分が遺伝子再構成していることが示され、真に B 細胞由来の iPS 細胞であることが判明した。この B 細胞由来 iPS 細胞を同系マウスに移植するとテラトーマを形成し、またキメラマウスの作製が可能であった。

末梢B細胞からのiPS細胞の誘導



Wada H, et al. *Int Immunol* 2011

末梢B細胞からのiPS細胞の誘導



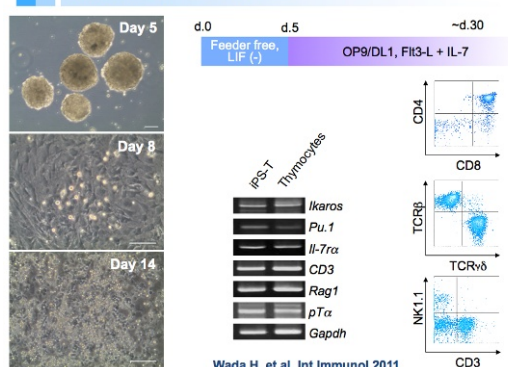
Wada H, et al. *Int Immunol* 2011

これより以前、山中4因子にC/EBPaなどを加えることでマウスB細胞からiPS細胞誘導が可能であることは米国の研究グループから報告があったが、山中4因子のみで誘導できることを報告したのは初めてであった。一方、T細胞からはiPS細胞の誘導は我々の手では困難であった。同時期、p53を欠失したT細胞からはiPS細胞は誘導できたが正常T細胞からはできないとする報告があった。

2・2 iPS細胞（皮膚由来又はB細胞由来）からのリンパ球分化誘導

次に、OP9フィーダー細胞を用い、iPS細胞からリンパ球系細胞への分化誘導を試みた。OP9にNotchリガンドdelta-like1を発現させたフィーダー上でFlt3L、IL-7を用いて培養すると、T細胞の特徴を持った（遺伝子発現、細胞表面分子発現）細胞の分化誘導が可能であった。これは、iPS細胞の由来細胞（皮膚またはB細胞）に関わらず可能であった。生成されたT細胞の抗原受容体ベータ鎖の発現を見ると偏りはなく、多様なT細胞が生成されているようであった。

iPS細胞からのT細胞分化誘導



Wada H, et al. *Int Immunol* 2011

一方、OP9をフィーダーとして用いたB細胞の分化誘導の条件では、ES細胞からのB細胞の誘導は可能であったが、iPS細胞からのそれは非常に困難であった。それは、iPS細胞の由来がB細胞である場合でも同様であった。遺伝子発現を検討すると、分化初期からB細胞の分化誘導に必須のPax5の発現が見られなかった。このことは、現在確立されている試験管内のB細胞分化誘導系はマウスiPS細胞に取っては不十分であること

を示している。

2・3 iPS 細胞または ES 細胞由来 T 細胞の機能解析

iPS 細胞または ES 細胞から上記のように試験管内で誘導した T 細胞を IL-2 で増殖させた後 PMA/ionomycin で刺激し、IFN-g を産生することを見出した。また、TGF- β で刺激し、Foxp3 陽性の細胞が得られることを見出した。この Foxp3 陽性細胞を含む分画は他に調製した T 細胞の増殖を抑制した。さらに、iPS 細胞から誘導した T 細胞をマウス生体に移入し機能するかどうか検討した。ヒトにおける donor lymphocyte infusion を想定し、マウスで白血病再発モデルを作製した。ここにドナーと同系の iPS 細胞から誘導した T 細胞を移入したところ、生存期間の延長が見られた。即ち、iPS 細胞由来リンパ球を治療目的に応用する可能性が示された。

3、今後の展開

再生医療において、患者自身の iPS 細胞を用いない限りアロの移植拒絶反応の問題が発生することが予想される。そこで、これらの問題点を解決するべく、ES 細胞や iPS 細胞から効果的な免疫抑制細胞を誘導する方法について検討を行う。この点については移植免疫学の拠点研究室の一つである Oxford 大学の Fairchild 博士も同様の主張をされており、早期に小動物を用いてコンセプトを示して行く。

また、免疫細胞以外の細胞種においては iPS 細胞の段階を経ないでも直接目的の細胞を誘導する方法 (direct reprogramming) の開発が進んでいる。同様のコンセプトで有用な免疫細胞、特に professional antigen-presenting cell である樹状細胞への直接誘導が可能であるか検討している。

4、自己評価

当初の目標である抗原特異的 T 細胞の iPS 細胞化は他のグループがいち早く論文で発表したこと、また我々が主に用いていたマウス細胞では困難であることが判明し、方針を変更せざるをえなくなったことは非常に残念でありまた反省点も多い。そんな中、マウス iPS 細胞を用いリンパ球分化等に関する上記成果を上げることができたのは幸いであった。また、これらの研究を進める中でリンパ球のリプログラミングの再現性や分化効率の低さ等を実感することができ、真に腫瘍免疫等の効果を高めるために別の方向でリプログラミング技術を生かすという新しい発想を持つことができたのは収穫であった。また、なんと言っても西川研究総括はじめ多くの指導者の先生方、同年代の優れた多くの研究者と協力関係が築けたことは大きい。今後研究を進めて行く上で、貴重な財産となることは間違いなく、このさきがけに参加させていただき心から感謝している。

5、研究総括の見解

iPS を用いたがん治療を構想し、その実証をマウスモデルで得るという研究であり、当初計画の 7・8 合目までは到達したのではと評価する。ただ、これまでの研究は他に追従を許さない研究者独自のものかという点では、まだまだその領域には達し得てないと言える。今後は本成果の上に、iPS と彼なくしては不可能であるという分野を見だし、発展させる事を期待

する。

6, 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Kobayashi Y, <u>Seino K</u> , Hosonuma S, Ohara T, Itamochi H, Isonishi S, Kita T, Wada H, Kojo S, Kiguchi K. Side population is increased in paclitaxel-resistant ovarian cancer cell lines regardless of resistance to cisplatin. Gynecol Oncol 121:390-394, 2011.
2. Hosonuma S, Kobayashi Y, Kojo S, Wada H, <u>Seino K</u> , Kiguchi K, Ishizuka B. Clinical significance of side population in ovarian cancer cells. Human Cell 24:9-12, 2011.
3. Wada H, Kojo S, Kusama C, Okamoto N, Sato Y, Ishizuka B, <u>Seino K</u> . Successful differentiation to T cells, but unsuccessful B-cell generation, from B-cell-derived induced pluripotent stem cells. Int Immunol . 23:65-74, 2011.

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

出願番号: 12/845,178 (米国)

発明者: 清野研一郎、和田はるか

発明の名称: PRODUCTION METHOD OF IMMUNE CELLS

出願日: 2010 年 7 月 28 日

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

<招待>

1. 清野研一郎. 移植免疫、免疫寛容の現状と展望、第 9 回北関東移植研究会、東京、2010 年 3 月 27 日
2. 清野研一郎. 膵島移植の基礎研究と将来展望・iPS 細胞、幹細胞と再生医療・、藤田保健衛生大学医学部 臓器移植再生医学講座、2010 年 5 月 7 日
3. 清野研一郎.NKT 細胞と iPS 細胞.炎症・再生学会シンポジウム、2010 年 8 月 5 日、東京
4. Ken-chiro Seino. Approach to new immune cell therapy in the age of regenerative medicine. Luncheon Seminar, 14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug. 2010.
5. 清野研一郎. 免疫寛容のメカニズムと臨床応用の一例. 日本免疫治療学研究会、東京、2011 年 2 月
6. 清野研一郎. 再生医学時代における新しい免疫制御法の考え方. 第 91 回北海道医学大会病理分科会(第 44 回北海道病理談話会) 旭川、2011 年 9 月 10 日
7. 清野研一郎. 再生医学の最前線ーiPS 細胞から癌の最新治療までー 日経懇話会、札幌ホテルオークラ、2011 年 10 月 11 日

< その他 >

1. Wada H, Kojo S and Seino K. In vitro T, B or NK cell lineage differentiation from mouse splenic B cell-derived induced pluripotent stem cells. 12th Meeting of the Society for Natural Immunity & NK2010. Croatia. September, 2010
2. Wada H and Seino K. Generation of T cells from iPS cells and their anti-tumor effect in vivo. The Second Workshop of Synthetic Immunology, Kyoto, Dec. 2010
3. 和田はるか、細井亮宏、垣見和宏、清野研一郎. iPS テクノロジーを導入した新しいがん免疫細胞療法の確立に向けた取り組みと現状. 第 40 回日本免疫学会、幕張、2011 年 11 月
4. 工藤浩也、和田はるか、香城諭、力石辰也、清野研一郎. 多能性幹細胞を用いた新しい免疫制御法に関する研究. 第 40 回日本免疫学会、幕張、2011 年 11 月