

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム  
疾患・組織別実用化研究拠点 (拠点B)  
(英語) Centers for Clinical Application Research on Specific Disease/Organ  
(Type B), Research Center Network for Realization of Regenerative  
Medicine
- 研究開発課題名： (日本語) NKT 細胞再生によるがん免疫治療技術開発拠点  
(英語) Center for development of cancer immunotherapy technology by  
regenerating natural killer T-cells (NKT cells)
- 研究開発担当者  
所属 役職 氏名： (日本語) 理化学研究所 統合生命医科学研究センター 免疫器官形成研究グループ  
グループディレクター 古関 明彦  
(英語) Haruhiko Koseki, Group Director, Laboratory for Developmental  
Genetics, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究  
開発課題名： (日本語) 再生医療用 iPS-NKT 細胞の純度、抗腫瘍活性、造腫瘍性に関する非臨床試  
験など  
(英語) Non-clinical studies on purity, antitumor activity, and tumorigenicity  
of iPS-NKT cells for regenerative medicine
- 研究開発分担者  
所属 役職 氏名： (日本語) 理化学研究所 統合生命医科学研究センター 免疫細胞治療研究チーム  
チームリーダー 藤井眞一郎  
(英語) Shin-ichiro Fujii, Group Leader, Laboratory for Immunotherapy,  
RIKEN Center for Integrative Medical Sciences
- 分担研究  
開発課題名： (日本語) ヒト (同種) iPS (様) 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関す  
る指針に準拠した品質確保、実施のための体制整備と、再生医療用 NKT-iPS  
細胞と iPS-NKT 細胞ストックの構築など

(英 語) Development of a system for ensuring quality and implementation in compliance with guidelines on securing quality and safety of human (iPS) cell processing pharmaceutical products, and establishment of NKT-iPS cells and iPS-NKT cell stock for regenerative medicine

研究開発分担者 (日本語) 理化学研究所 統合生命医科学研究センター 免疫制御戦略研究グループ  
所属 役職 氏名 : グループディレクター 谷口克

(英 語) Masaru Taniguchi, Group Director, Laboratory for Immune Regulation, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences

分担研究 (日本語) 再生医療用 iPS-NKT 細胞の純度、抗腫瘍活性、造腫瘍性に関する非臨床試験  
開発課題名 : 験など

(英 語) Non-clinical studies on purity, antitumor activity, and tumorigenicity of iPS-NKT cells for regenerative medicine

研究開発分担者 (日本語) 理化学研究所 統合生命医科学研究センター  
所属 役職 氏名 : ヒト疾患モデル研究グループ グループディレクター 石川文彦

(英 語) Fumihiko Ishikawa, Group Director, Laboratory for Human Disease Models, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### 1 : 再生医療用 NKT-iPS 細胞と iPS-NKT 細胞製造体制整備とストックの構築

理研内に設置した細胞調製室 (CPC) において、GMP に適合した CPC 運用組織体制を構築することにより再生医療用 NKT-iPS 細胞と iPS-NKT 細胞の製造準備を進めている。それぞれの細胞の製造に使用する原材料については、生物由来原料基準に適合した材料を調達できる目途が立った。また製造の段階ごとに、実施する規格試験を設定し、それぞれの試験項目および仮の基準値についても設定した。これらの項目と設定値の妥当性については、今後見直し最適化を行う。

最初に作製した NKT-iPS 細胞株に関しては各種ウイルス検査を行い、ウイルス安全性を確認した。また、新規に数株の NKT-iPS 細胞を樹立した結果、日本人に対するハプロタイプ頻度は 16% まで上昇した。

### 2 : 非臨床試験

iPS-NKT 細胞の *in vitro* 抗腫瘍活性を実施した結果、iPS-NKT 細胞はこれまでの NKT 細胞標的療法に必須であった樹状細胞による刺激を行わない場合においても、*in vitro* 抗腫瘍試験によく用いられる K562 細胞に加え、NCI-H460、A549、HT-29、COLO 205 および Detroit 562 等の多種の細胞に抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。この iPS-NKT 細胞に特徴的な抗腫瘍活性のメカニズムは Granule exocytosis pathway (PRF/GZMB) に依存すると考えている。

マウス体内ではヒト NKT 細胞を維持するためのサイトカインが供給されないため、*in vivo* 抗腫瘍

活性試験は、サイトカインポンプをマウスに埋め込み実施した。その結果、*in vivo*においても抗腫瘍効果を確認する事が出来たが、更に長期の試験を実施するためにヒトサイトカインを産生するヒト化マウスを作製し、ヒト iPS-NKT 細胞をマウス体内で維持させることに成功した。今後はヒト化マウスによる抗腫瘍試験を実施する。

造腫瘍性に関連する遺伝子変異の検査に関しては、全ゲノムシーケンスにより評価項目を設定し、得られた知見を実際の品質管理におけるスクリーニングに落とし込むべく研究を行っている。

体内において iPS-NKT 細胞の検出を行うため、非侵襲イメージングモダリティについて検討を行った結果、MRI 法が iPS-NKT 細胞の治療効果を測定するのに適当であることが明らかとなった。

### 3：安全性と有効性を確認する臨床試験

医薬品として認可されている添加物を用いて数種類の製剤を試作し、48 時間まで活性を維持できる製剤を開発した。最終製剤の規格試験項目を設定し、治験を実施する千葉大学への試験方法移管および輸送試験を開始した。これまで生細胞数の低下は認められていないため、長時間の輸送試験を実施し製剤の有効期限の限界を見極める。

治験プロトコールはこれまでに実施されている NKT 細胞標的治療を参考に作製する予定であるが、予備的な動物試験においては予想される投与量の 20 倍までの用量では異常が観察されなかった。また、他家投与では素早く拒絶される懸念があるが、これまで実施した非臨床試験では投与数日後においても iPS-NKT 細胞は十分に残存しており、問題なく治療が行える見込みである。

#### 1: Organization of the regenerative medicine grade NKT-iPS and iPS-NKT cell production system and establishment of their new stocks

We have developed a Cell Processing Center (CPC) in RIKEN and been organizing a GMP adapted operation system to produce the regenerative medicine grade NKT-iPS and iPS-NKT cells. For raw materials used to produce these cells, it has been expected to procure the materials that meet the Japanese Standards for Biological Ingredients. For each phase of the production, we have set up a standard examination, test items in it to be carried out and temporary standard values. These temporary standard values will be validated and optimized in the future.

We performed various virus tests were on the initially prepared NKT-iPS cell line to confirm virus safety. In addition, establishment of several new strains of NKT-iPS cells has increased the haplotype frequency for Japanese to 16%.

#### 2: Nonclinical studies

We conducted an *in vitro* antitumor test using iPS-NKT cells, and the iPS-NKT cells without a stimulation by dendritic cells showed potent antitumor activity on various tumor cell lines such as K562, NCI-H460, A549, HT-29, COLO 205 and Detroit 562. We estimate the mechanism of this antitumor activity depends on Granule exocytosis pathway (PRF / GZMB).

Since cytokines for maintaining human NKT cells are not supplied in mouse, *in vivo* antitumor tests were conducted with implanted cytokine pumps. As a result, we confirmed the short term *in vivo* antitumor efficacy, so we developed a humanized mouse that provide human cytokines to

conduct a long-term test.

To examine the genetic mutation related to tumorigenicity, we are setting up the evaluation items in the quality control tests using the result from the whole genome sequencing.

In order to detect iPS-NKT cells in the body, noninvasive imaging modalities were examined. As a result, it became clear that the MRI method is suitable for measuring the therapeutic effect of iPS-NKT cells.

### 3: Clinical trial for evaluation of safety and feasibility

We prepared several kinds of prototyped formulations using pharmaceutical grade additives, and we found a formulation that can maintain the activity up to 48 hours. We have set up standard test items of the final formulation and transferred them to Chiba University which will conduct the clinical trial. Also, we began to transport study of the formulation. Since there has been no decrease in the number of viable cells so far, we are planning to carry out a long-term transport test to determine the limit of the expiration period of the formulation.

The clinical trial protocol will be prepared based on the NKT cell targeted therapy that has been carried out so far, but no abnormality was observed in the preliminary animal test at doses up to 20 times the anticipated dose. Although there was concern that it would be quickly rejected by allogeneic administration, iPS-NKT cells was sufficiently remaining even after several days of administration to animals, and we expect the treatment will be successful.

## III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 1 件）

1. Daisuke Yamada, Tomonori Iyoda, Raul Vizcardo, Kanako Shimizu, Yusuke Sato, Takaho A. Endo, Genta Kitahara, Momoko Okoshi, Midori Kobayashi, Maki Sakurai, Osamu Ohara, Masaru Taniguchi, Haruhiko Koseki and Shin-ichiro Fujii. Efficient regeneration of Human Vα24+ invariant NKT cells and their anti-tumor activity in vivo. *Stem Cells*. 2016, 34, 2852-60.
2. 山田大輔, 古関明彦. iPS細胞技術によるNKT細胞を標的としたがん免疫治療の開発. *医学のあゆみ*. 2016, 257, 233-38.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. iPS細胞技術によるNKT細胞再生とがん免疫治療, 口頭, 古関明彦, 第25回日本癌病態治療研究会, 2016/6/8, 国内.
2. iPS由来NKT細胞によるがん治療技術の開発, 口頭, 古関明彦, 第7回細胞治療研究会, 2016/8/27, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. iPS でがん治療, 古関 明彦, 理研シンポジウム 第3回創薬ワークショップ, 2016/3/3, 国内.
2. iPS でがん治療, 古関 明彦, 理研イブニングセミナー, 2016/8/24, 国内.
3. NKT 細胞再生によるがん免疫治療技術開発拠点, 古関 明彦, 平成 28 年度 AMED 再生医療公開シンポジウム, 2017/2/2, 国内.

(4) 特許出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 疾患・組織別実用化研究拠点 (拠点 B)  
(英語) Center for Clinical Application Research on Specific Disease/Organ (Type B),  
Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine

研究開発課題名 : (日本語) NKT 細胞再生によるがん免疫治療技術開発拠点  
(英語) Center for development of cancer immunotherapy technology by  
regenerating natural killer T-cells (NKT cells)

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院 教授 中山 俊憲  
所属 役職 氏名 : (英語) Toshinori Nakayama, Professor, Graduate School of Medicine, Chiba  
University

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) NKT 細胞によるがん免疫治療研究開発  
開発課題名 : (英語) Development of cancer immunotherapy using NKT cells

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院 教授 中山 俊憲  
所属 役職 氏名 : (英語) Toshinori Nakayama, Professor, Graduate School of Medicine, Chiba  
University

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院 教授 岡本 美孝  
所属 役職 氏名 : (英語) Yoshitaka Okamoto, Professor, Graduate School of Medicine, Chiba  
University

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院 教授 本橋 新一郎  
所属 役職 氏名 : (英語) Shinichiro Motohashi, Professor, Graduate School of Medicine, Chiba  
University

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院 教授 花岡 英紀  
所属 役職 氏名 : (英語) Hideki Hanaoka, Professor, Graduate School of Medicine, Chiba  
University

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院 特任准教授 八木 良二  
所属 役職 氏名 : (英語) Ryoji Yagi, Associate Professor, Graduate School of Medicine, Chiba  
University

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院 助教 國井 直樹  
所属 役職 氏名 : (英語) Naoki Kunii, Assistant Professor, Graduate School of Medicine, Chiba  
University

## II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合
- ・ 研究開発分担者による報告の場合  
研究開発代表者：国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・古関明彦  
総括研究報告を参照。

## III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌0件、国際誌0件）

該当無し

- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. NKT細胞免疫系をターゲットにしたがんの細胞治療，口頭，中山俊憲，第2回免疫治療 Expert Seminar, 2016年11月2日，国内.
2. 能動免疫療法におけるNKT細胞の果たす役割，口頭，本橋新一郎，第57回日本肺癌学会学術集会, 2016年12月21日，国内.

- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当無し

- (4) 特許出願

該当無し



平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 疾患・組織別実用化研究拠点  
(拠点 B)

(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative medicine

研究開発課題名： (日本語) NKT 細胞再生によるがん免疫治療技術開発拠点

(英語) Development base of cancer immunotherapy technology based on NKT cell regeneration

研究開発担当者 (日本語) 慶應義塾大学医学部 教授 岡野 栄之

所属 役職 氏名： (英語) Department of Physiology, Keio University School of Medicine Prof. Hideyuki Okano

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語) MRI を用いた移植細胞の体内動態の解析

開発課題名： (英語) Analysis of in vivo dynamics of transplanted cells using MRI

研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学医学部 教授 岡野 栄之

所属 役職 氏名： (英語) Department of Physiology, Keio University School of Medicine Prof. Hideyuki Okano

## II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合
- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・古関明彦 総括研究報告を参照。

## III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

1. Fox RG, Lytle NK, Park FD, Bajaj J, Koechlein CS, Yano M, Ito T, Kopp J, Kritzik M, Sicklick J, Sander M, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, Shibata S, Pizzo D, Valasek M, Sasik R, Scadeng M, Okano H, Kim Y, MacLeod AR, Lowy AM and Reya T: Image based identification and targeting of cancer stem cells in pancreatic adenocarcinoma. Nature 534(7607):407-11, 2016.
2. Yoshida K, Mimura Y, Ishihara R, Nishida H, Komaki Y, Minakuchi T, Tsurugizawa T, Mimura M, Okano H, Tanaka KF, Takata N. Physiological effects of a habituation procedure for functional MRI in awake mice using a cryogenic radiofrequency probe. J Neurosci Methods. 274:38-48, 2016.
3. Komaki Y, Hikishima K, Shibata S, Konomi T, Seki F, Yamada M, Miyasaka N, Fujiyoshi K, Okano HJ, Nakamura M, Okano H.: Functional brain mapping using specific sensory-circuit stimulation and a theoretical graph network analysis in mice with neuropathic allodynia. Sci Rep, 6:37802, 2016.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. A. Uematsu, J. Hata, Y. Komaki, F. Seki, C.Yamada, E.Sasaki, H. Okano: Anatomical Development of Hippocampus in Common Marmoset; ISMRM Workshop on Breaking the Barriers of Diffusion MRI, Lisbon, Portugal, 2016.9.11-16、ポスター発表
2. H.Okano, J.Hata, T.Kaneko: MRI-based structural and functional mapping of marmoset brains: Society for Neuroscience 46th annual meeting, San Diego, the United States of America, November.14, 2016、口頭発表
3. Junichi Hata, Akiko Uematsu, Takaaki Kaneko, Makoto Fukushima, Fumiko Seki, Yuji Komaki, Yawara Haga, Yukiko Nagawa, Erika Sasaki, and Hideyuki Okano: Understanding Marmoset Neural Architecture using Ultra High Field MRI; International Society of Magnetic

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 前臨床研究におけるイメージングの世界、畑 純一、第 80 回北海道 MRI 研究会、  
2016.7.1、札幌市
2. MRI 研究を中心とした前臨床イメージング、畑 純一、東葛放射線画像セミナー、  
2017.1.14、我孫子市

(4) 特許出願