

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) 再生医療実用化研究事業
(英語) Research Project for Practical Applications of Regenerative Medicine

研究開発課題名：

(日本語) iPS 細胞を用いた再生医療における組織不適合の解決

(英語) Resolution of histoincompatibility in regenerative medicine with iPS cells

研究開発担当者

所属 役職 氏名：

(日本語)

国立大学法人熊本大学 大学院生命科学研究部 免疫識別学分野

准教授 千住 覚

(英語)

Department of Immunogenetics, Graduate School of Medical Sciences,

Kumamoto University

Associate Professor Satoru Senju

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) HLA 欠損 iPS 細胞由来免疫細胞の作成と再生医療製品としての治験実施へ向けた準備

(英語) Generation of HLA-deficient iPS cell-derived immune cells and preparation for the clinical trial

研究開発分担者

所属 役職 氏名：

(日本語)

国立大学法人熊本大学 大学院生命科学研究部 免疫識別学分野
准教授 千住 覚

(英語)

Department of Immunogenetics, Graduate School of Medical Sciences,
Kumamoto University
Associate Professor, Satoru Senju

分担研究

開発課題名：

(日本語) TAP 欠損多能性幹細胞由来の分化細胞による組織不適合回避に関する研究及び再生医療の安全性確保のための抗腫瘍免疫誘導法の開発

(英語) Prevention of histoincompatibility by TAP-deficient iPS cells and anti-tumor immunotherapy for safety of regenerative medicine

研究開発分担者

所属 役職 氏名：

(日本語)

慶應義塾大学医学部循環器内科 教授 福田恵一

(英語)

Department of Cardiology, Keio University School of Medicine
Professor, Keiichi Fukuda

分担研究

開発課題名：

(日本語) 再生医療の安全性確保のための抗腫瘍免疫誘導法の開発

(英語) Development of anti-tumor immunotherapy for safety of regenerative medicine

研究開発分担者

所属 役職 氏名：

(日本語)

国立がん研究センター 先端医療開発センター 免疫療法開発分野
分野長 中面哲也

(英語)

Division of Cancer Immunotherapy, Exploratory Oncology Research & Clinical Trial Center,
National Cancer Center
Division Chief, Tetsuya Nakatsura

II. 成果の概要（総括研究報告）

同種（他家）iPS細胞を用いる再生医療においては、移植した細胞や組織がレシピエントの免疫系により異物として認識され拒絶される、すなわち組織不適合が大きな問題となる。免疫機序に起因する拒絶を回避するために、通常、免疫抑制剤の使用が必要となるが、免疫抑制剤の使用は、場合によっては致命的ともなる免疫不全状態をもたらすこともありうる。本研究では、iPS細胞の医療応用に伴う組織不適合に関連する問題を解決し、iPS細胞による再生医療を実用化することを目的としている。本研究グループでは、この問題に対処する目的で、HLAあるいはHLA関連遺伝子を改変することにより、iPS細胞ストックを補完するiPS細胞を作成するという解決法を検討している。

ZFN、TALEN、あるいはCRISPRなどのゲノム編集技術は、現在、様々な哺乳動物細胞において遺伝子改変に利用されている。本研究グループでは、以前に、ZFN技術を利用してTAP (Transporter associated with Antigen Presentation) を欠損するヒトiPS細胞の作成を行っている。TAPは、TAP 1とTAP 2分子から構成され、MHCクラスIに結合して提示されるペプチドを供給するペプチドトランスポーターである。TAPを欠損した細胞では、細胞表面上のMHCクラスIの発現レベルが低下し、さらに、提示されるペプチドの多様性が非常に小さくなる。この結果として、アロMHCクラスIを認識し移植細胞の拒絶に関与するCD8陽性T細胞の数が非常に少なくなり、拒絶反応を減弱させられると予想される。多能性幹細胞におけるMHCクラスIの拒絶免疫誘導機能を低下させるモデルとして、TAP欠損ES細胞をアロ系統のマウスへ移植する実験系の構築を行っている。本年度の研究においては、TAP欠損ES細胞株を用いた心筋細胞の移植拒絶反応回避による細胞生着の評価系を構築するべく、129系マウスより作製されたTAP欠損ES細胞およびコントロールとなるWTのES細胞を用いて心筋分化誘導の条件検討を行った。hanging drop法を経て接着系へと条件を変えることでES細胞から心筋細胞を作成する誘導法を開発していたが、さらに、心筋細胞移植に必要な大量の細胞を作成する分化誘導系を確立するため、新たな接着培養系を用いた心筋細胞誘導系を確立した。また、129系マウスより作製されたTAP欠損ES細胞およびコントロールとなるWTのES細胞へレンチウイルスを用いた遺伝子導入およびクローニングを行い、ルシフェラーゼおよびGFP発現株を作製している。

本研究においては、ヒトiPS細胞に対して、CRISPR方を用いたゲノム編集により、HLAそのものの遺伝子改変を行う手法の開発も行っている。移植細胞上からMHCクラスIを欠損させることにより、アロMHCに特異性を有するCD8陽性T細胞による反応を減弱させ、拒絶を回避できる。

iPS細胞を用いる再生医療における重要課題として、さらに、造腫瘍性の問題がある。移植される最終製品に未分化な細胞が混入した場合に、がん化の原因になりうると考えられる。本研究グループでは、本年度の研究において、未分化細胞に特異的なT細胞による免疫応答を惹起するための標的抗原の同定を行った。この抗原を用いることにより、ワクチン法あるいはT細胞移入による養子免疫法により、再生医療に伴う造腫瘍性の課題を解決できる可能性がある。

A major hurdle in regenerative medicine with allogenic iPS cells is rejection of transplanted iPS cell-derived cells or tissues by immune system of the recipients, i. e. the issue of histoincompatibility. To avoid rejection, use of immune-suppressive drugs may be necessary and this can cause immunosuppression sometimes fatal for the patients. This project is aiming at resolution of the issue of histo-incompatibility in iPS cell-based regenerative medicine, and intends to provide critical technical basis for application of iPS cells to clinical medicine. We have been approaching this issue by modification of HLA or HLA-associated genes.

Genome-editing technologies, such as ZFN, TALEN, and CRISPR, have been widely applied for modification of genes of mammalian cells. We have previously established TAP-deficient human iPS cell clones by using ZFN technology. TAP (Transporter associated with Antigen Presentation), responsible for supply of antigenic peptides (T cell epitopes) to be presented by MHC class I, is a heterodimer composed of TAP1 and TAP2. In TAP-deficient cells, level of cell surface expression of MHC class I is decreased and the diversity of the presented peptides is tremendously reduced. Reduction of diversity of antigenic peptides results in decrease of number of CD8⁺ T cells reactive to allogeneic MHC class I that participate in attack of transplanted cells. In this project, we are trying to evaluate the feasibility to avoid rejection of transplanted tissues by TAP-deficiency. For this purpose, we established a novel experimental system for induction of differentiation of mouse and human pluripotent stem cells into cardiomyocytes.

We have also developed a method to generate HLA class I-deficient human iPS cells by using CRISPR technology. Deficiency of MHC class I of transplanted cells or tissues dramatically decrease the responsiveness of CD8⁺ cytotoxic T cells against allogeneic MHC class I.

Another critical issue related to iPS cell-based regenerative medicine is development of cancer from transplanted cells. Contamination of undifferentiated cells in the final products is one of the causes of this problem. In order to solve this problem, we have developed a method to exclude contaminated undifferentiated cells by applying technology of cancer immunotherapy. We have been trying to identify candidate of target antigens that is specifically expressed in undifferentiated cells and immunogenicity to induce response of T cells. As a result, we have identified one protein expectedly very useful for vaccination therapy or adoptive T cell therapy.

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 2 件、国際誌 6 件）

1. Sakisaka M, Haruta M, Komohara Y, Umemoto S, Matsumura K, Ikeda T, Takeya M, Inomata Y, Nishimura Y, Senju S. Therapy of primary and metastatic liver cancer by human iPS cell-derived myeloid cells producing interferon- β . **J Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences**. doi: 10.1002/jhbp.422, 2017
2. Miyashita A, Fukushima S, Nakahara S, Kubo Y, Tokuzumi A, Yamashita J, Aoi J, Haruta M, Senju S, Nishimura Y, Jinnin M, Ihn H. Immunotherapy against Metastatic Melanoma with Human iPS Cell-Derived Myeloid Cell Lines Producing Type I Interferons. **Cancer Immunol Res**. 3: 248-258, 2016.
3. Suenaga G, Ikeda T, Komohara Y, Takamatsu K, Kakuma T, Tasaki M, Misumi Y, Ueda M, Ito T, Senju S, Ando Y. Involvement of Macrophages in the Pathogenesis of Familial Amyloid Polyneuropathy and Efficacy of Human iPS Cell-Derived Macrophages in Its Treatment. **PLoS one** 11(10) e0163944 2016
4. Hosoi A, Su Y, Torikai M, Jono H, Ishikawa D, Soejima K, Higuchi H, Guo J, Ueda M, Suenaga G, Motokawa H, Ikeda T, Senju S, Nakashima T, Ando Y. Novel Antibody for the Treatment of Transthyretin Amyloidosis. **J. Bio. Chem.** 291, 25096-25105, 2016
5. Imamura Y, Haruta M, Tomita Y, Matsumura K, Ikeda T, Hirayama M, Nakayama H, Mizuta H, Nishimura Y, Senju S. Generation of large numbers of antigen-expressing human dendritic cells using CD14-ML technology. **PLoS One**;11(4):e0152384. doi: 10.1371/journal.pone.0152384, 2016.
6. 千住 覚 iPS 細胞由来ミエロイド細胞の疾患治療への応用 **医学のあゆみ** 257(3)226-232, 2016.
7. 千住 覚 iPS 細胞由来の樹状細胞およびマクロファージのがん治療への応用 **臨床血液** 57(8)1074-1079, 2016.
8. Kunitomi A, Yuasa S, Sugiyama F, Saito Y, Seki T, Kusumoto D, Kashimura S, Takei M, Tohyama S, Hashimoto H, Egashira T, Tanimoto Y, Mizuno S, Tanaka S, Okuno H, Yamazawa K, Watanabe H, Oda M, Kaneda R, Matsuzaki Y, Nagai T, Okano H, Yagami K, Tanaka M, Fukuda K. H1foo Has a Pivotal Role in Qualifying Induced Pluripotent Stem Cells. **Stem Cell Reports**, 14 (6) 825-33, 2016

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Cancer therapy with iPS cell-derived myeloid cells 口頭 Senju Satoru、マクロファージ分子生物学国際シンポジウム (MMCB2016 ソラシティカンファレンスセンター)、2016年6月5日、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

中面哲也 がん免疫療法について がんと共に健やかに生きる講演会 2016年6月4日

(4) 特許出願

該当なし