

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15448

研究課題名(和文) RNAウイルスを用いたiPS細胞治療用の未分化細胞除去ワクチンの開発

研究課題名(英文) Establishment of RNA virus vaccine for removal of pluripotent cells in iPS cell-derivative

研究代表者

福田 恵一 (Fukuda, Keiichi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：20199227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、拒絶免疫の誘導による未分化細胞除去法のProof of Conceptとして、ES細胞自体をマウスにワクチンすることで大量の同種マウスiPS細胞に対して奇形腫形成を抑制することが可能であることを確認した。マウス細胞を用いた同種移植のin vivoの奇形腫形成の実験系を確立するとともに、既にワクチンによる免疫反応により奇形腫形成の抑制が可能であることのProof of Conceptを得た。1x10<sup>10</sup>オーダーの未分化細胞に対してはワクチンにより奇形腫形成が起こらなくなることを確認し、未分化細胞の除去をin vivoで行うことの可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：To establish of proof of concept of removal of pluripotent cells from induced pluripotent stem cell-derivatives, we tried to applied human embryonic stem cells to in vivo vaccination. In in vivo experiments of mouse assay, growth of teratoma which was derived from transplanted syngeneic mouse induced pluripotent stem cells were suppressed when mouse was vaccinated with irradiated human embryonic stem cells before transplantation. Additionally, vaccination with human embryonic stem cells completely inhibit teratoma formation when 1x10<sup>10</sup> syngeneic mouse induced pluripotent stem cells were transplanted. These results indicated that immune rejection against antigens which exists in pluripotent stem cells can be applicable to removal of pluripotent cells from induced pluripotent stem cell-derivatives in vivo.

研究分野：循環器内科

キーワード：再生医療 iPS細胞 免疫療法 がんワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、iPS細胞は再生医療の新たな細胞ソースとして大きな注目を集めている。iPS細胞由来の分化細胞を移植に用いる際に、未分化細胞の残存・混入により奇形腫形成が引き起こされることがマウスを用いた実験で報告されており、iPS細胞由来細胞の大量移植の際には残存幹細胞混入による腫瘍化を回避する技術を開発することが必須なものとなっている。例として心筋細胞移植の領域では $10^9$ オーダーの細胞移植が想定されており、より高精度の未分化細胞除去が求められる。

仮に万が一未分化なiPS細胞が移植細胞に混入したまま移植が行われた場合、腫瘍発生後に、外科的に切除を行うほか有効な手段は存在しない。しかし移植部位によっては再手術が患者にとって高リスクな手術となり得る可能性があり、手術以外の選択肢を確立することが安全性の担保のために重要である。

そこで我々は、移植後に混入した未分化細胞を体内で免疫反応により特異的に排除できれば、奇形腫形成の予防が可能となると考えた。奇形腫の原因となる未分化細胞の段階で、それらの発現する未分化マーカーを標的として特異的に排除する拒絶免疫を、ワクチンによって体内に誘導することができれば、iPS細胞由来の分化細胞移植に際して奇形腫形成を抑制することが可能となる。さらには、三胚葉分化能を持つ未分化細胞は奇形腫にとってはある種のがん幹細胞であるともいえ、これを抑制することで腫瘍形成後も腫瘍を縮小、または腫瘍の発育を抑制できる可能性があると考えられた。

## 2. 研究の目的

iPS細胞由来の未分化細胞を体内でいかに生着させずに除去するかに関しては、未分化細胞を特異的に拒絶する免疫環境を体内に意図的に作り出すことができれば、未分化細胞の混入による腫瘍形成の問題を解決できる。

当研究は、iPS細胞由来の未分化細胞をターゲットとしたワクチン治療の確立を目指すものであり、マウスを用いた同系移植の実験系で有効性を評価し、将来的なヒトでの応用に繋げる研究である。未分化細胞をターゲットとしたワクチン治療が確立されれば、最終的にはiPS細胞バンク構想で想定されている免疫抑制下でのHLA一致他家移植における適用まで含め、広い適用範囲をもつ臨床応用可能な腫瘍形成予防法、および治療法として応用可能である。

近年、エイズ治療の領域では、センダイウイルスを用いた予防ワクチンが期待を集めている。センダイウイルスベクターはマ

イナス鎖のRNAウイルス由来のベクターであり、これを用いることで感染細胞のゲノムに挿入されずに細胞質でRNAを介して目的の蛋白発現を得ることができる。既存のワクチン療法と異なり、センダイウイルスワクチンは鼻粘膜投与による局所の炎症により免疫反応を起こすことが可能であり、治療目的としてだけでなく予防目的としても侵襲性の低い方法で接種が可能であり、臨床応用しやすい接種形態をとることが可能である。

そこで我々は、iPS細胞特異的な表面蛋白のRNA配列を搭載したセンダイウイルスベクターワクチンを用い、iPS細胞治療における腫瘍化予防ワクチン療法、腫瘍化治療ワクチンを確立することを目的とし、研究を開始した。

## 3. 研究の方法

拒絶免疫の誘導による未分化細胞除去法のProof of Conceptとして、ヒトES細胞自体をマウスにワクチンすることで同種マウスiPS細胞に対して奇形腫形成を抑制することが可能であるかどうかを検討した。

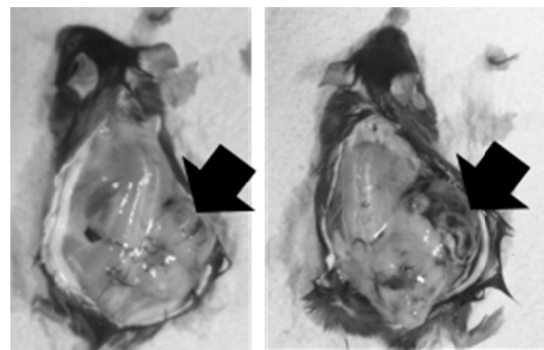
まず、iPS細胞由来の奇形腫形成抑制効果を定量的に評価可能な実験系を構築を試みた。具体的にはマウスiPS細胞を同種マウスに移植する系の構築を行った。

また、iPS細胞の未分化状態における表面蛋白の中から未分化特異的な免疫反応を誘導可能な抗原として確立するべく、RNAウイルスベクターに搭載する未分化特異的な抗原の検索を行った。

## 4. 研究成果

iPS細胞由来の奇形腫形成抑制効果を定量的に評価可能な実験系を構築するため、B6由来マウスiPS細胞を同種マウスに移植する系の構築を行い、 $1 \times 10^4$ 以上の細胞をマトリゲル使用下にマウスの背部皮下に移植することで、安定的にテラトーマを形成する実験系を確立した(図1)。

図1:同種条件下でのテラトーマ形成



我々は、ヒト ES 細胞自体をマウスにワクチンすることで  $1 \times 10^6$  オーダーの大量の同種マウス iPS 細胞に対して奇形腫形成を抑制することが可能であることを確認した(図 2)。

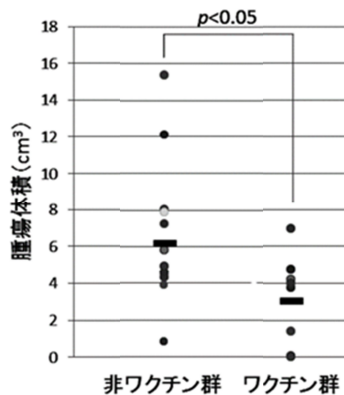


図 2: ヒト ES 細胞ワクチンによる奇形腫形成抑制効果の確認

マウス細胞を用いた同種移植の in vivo の奇形腫形成の実験系を確立するとともに、既にワクチンによる免疫反応により奇形腫形成の抑制が可能であることの Proof of Concept を得た。  $1 \times 10^5$  オーダーの未分化細胞に対してはワクチンにより奇形腫形成が起こらなくなることを確認し、未分化細胞の除去を in vivo で行うことの可能性が示された。

これら未分化細胞を特徴づける遺伝子マーカーであり、未分化状態に対する拒絶免疫のターゲットとなり得る遺伝子を、NIH の Stem cell database のマイクロアレイのデータを用いて、ヒト多能性幹細胞に高発現し、体細胞では発現が認められない未分化細胞特異的の発現を呈する遺伝子を抽出した(図 2)。今後同実験系を用いて未分化細胞特異的な発現を呈する遺伝子を導入したセンダイウイルスワクチンの効果の検討をさらに進めていく。

## 5. 主な発表論文等

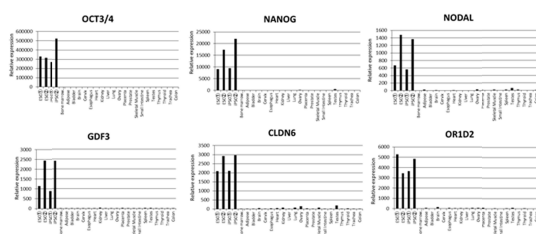


図 2: DNA マイクロアレイによる未分化細胞特異的遺伝子の同定

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. 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. 2016 Jun 14;6(6):825-33.

2. Tohyama S, Fujita J, Hishiki T, Matsuura T, Hattori F, Ohno R, Kanazawa H, Seki T, Nakajima K, Kishino Y, Okada M, Hirano A, Kuroda T, Yasuda S, Sato Y, Yuasa S, Sano M, Suematsu M, Fukuda K. Glutamine Oxidation Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. Cell Metab. 2016 Apr 12;23(4):663-74.

〔学会発表〕(計 6 件)

(国内)

1. 第 52 回日本移植学会 臓器横断的ワークショップ 3 再生医療(代替治療・臓器再生) 福田恵一 『iPS 細胞を用いた心筋再生医療実用化の現状』 平成 28 年 10 月 1 日 グランドプリンスホテル高輪 国際会館パミール

2. 第 37 回日本循環制御医学会 ランチョンセミナー 福田恵一 『iPS 細胞を用いた心筋再生医療実用化の現状と SGLT2 阻害薬の使用』 平成 28 年 7 月 7 日 東京ステーションカンファレンス

3. 第 64 回日本輸血細胞治療学会総会 細胞治療サイエンスフォーラム 共催セミナー 13 福田恵一 『企業と二人三脚で進める心筋再生医療への挑戦』 京都国際会議場 平成 28 年 4 月 30 日

4. 第 113 回日本内科学会総会・招請講演 福田恵一 『iPS 細胞を用いた遺伝性心筋疾患の病態解明』 平成 28 年 4 月 16 日 東京国際フォーラム A ホール

(海外)

1. The 9th International Conference on Cell Therapy. Generation of high quality iPS cell (Super iPS cell) using oocyte-specific linker histone H1foo. Keiichi Fukuda. September 29th, 2016 Seoul National University, Seoul, Korea.

2. The 5th Gwangju-Boston Cardiology Symposium. Keiichi Fukuda. May 20th, 2016. Gwangju, Korea

〔図書〕(計 1 件)

Seki T, Fukuda K. Induced Pluripotent Stem Cells for Clinical Use. Pluripotent Stem Cells - From the Bench to the Clinic 2016:Chapter 9:175-191 DOI: 10.5772/62505 [産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 未分化幹細胞除去剤及び未分化幹細胞

胞除去方法

発明者：福田恵一 / 中面哲也

権利者：福田恵一 / 中面哲也

種類：特許

番号：特願 2016 243755

出願年月日：2016/12/15

国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 恵一 (FUKUDA, Keiichi)

慶應義塾大学・循環器内科・教授

研究者番号： 20199227

(2) 研究分担者

関 倫久 (SEKI, Tomohisa)

慶應義塾大学・救急科・助教

研究者番号： 30528873

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )