

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591172

研究課題名（和文） ES 細胞由来の樹状細胞を用いた免疫制御法の開発

研究課題名（英文） Immune-regulation therapy with ES cell-derived dendritic cells

研究代表者

千住 覚（SENJU SATORU）

熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授

研究者番号：50274709

研究成果の概要：

我々は、ES 細胞由来の樹状細胞(ES-DC)を用いた細胞ワクチン技術の開発を行っている。ES 細胞に由来する細胞を用いた医療において問題となる、HLA のミスマッチを解決する方法を検討すべく研究を行った。未分化なマウス ES 細胞に遺伝的改変を行い、2-microglobulin(2m) 遺伝子、あるいは TAP1 遺伝子の標的破壊を行ったものに、さらに、高濃度薬剤選択により、これらの遺伝子をホモ接合として欠損したマウス ES 細胞を作製した。そして、これらの ES 細胞に由来する ES-DC をアロのレシピエントに移入し機能解析を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・臨床免疫学

キーワード：樹状細胞、ES 細胞、免疫制御、MHC、細胞治療、T 細胞、悪性腫瘍、抗原提示

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、ヒトおよびマウスの ES 細胞から免疫制御細胞である樹状細胞を作成する技術を開発しており、この樹状細胞の細胞ワクチンとしての有用性について検討を行っている。

## 2. 研究の目的

ES 細胞に由来する細胞を使用する医療技術に関連する最大の技術的課題である組織適合性の問題を解決する手段を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

A. 2-microglobulin (2m) 遺伝子の標的破壊

2m は、MHC クラス I 分子重鎖と会合している分子であり、この遺伝子を破壊すると全ての MHC クラス I の細胞表面への発現が消失する。ここで用いているマウス ES 細胞(J1 株)は、本来 H-2b の MHC タイプなので、これに、2m を MHC クラス I (H-2Kd) 分子と共有結合したものを発現するベクターを導入した。

## B. TAP1 遺伝子の標的破壊 ES 細胞を用いる研究

本来 H-2b の MHC タイプを有する ES 細胞 (E14) において、TAP1 遺伝子を欠損させ、遺伝子導入により H-2Kd 分子を発現させ、これを樹状細胞 (ES-DC) へと分化誘導した。

### 4. 研究成果

以上のような ES-DC に、H-2Kd 分子と結合親和性を有する RSV (Respiratory Syncytial Virus) 由来のエピトープ (合成ペプチド) を細胞外から加えることにより、H-2Kd 分子上に RSV エピトープを提示する ES-DC を作製し、これを BALB/c マウス (H-2d) に投与し、RSV 抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞誘導活性を検討した。

さらに、このような ES-DC を用いて細胞ワクチンを行った後、RSV 抗原を人為的に発現させた腫瘍細胞を移植し、この腫瘍細胞に対する拒絶効果も検討した。

以上の検討により 2-microglobulin (2m) あるいは TAP 遺伝子の標的破壊という手法が、ES 細胞を用いる医療技術における組織適合性の問題を解決する手段として有用であることを示した。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件、全て査読「有」)

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* in press.
2. Fukushima, S., Hirata, S., Motomura, Y., Fukuma, D., Matsunaga, Y., Ikuta, Y., Ikeda, T., Kageshita, T., Ihn, H., Nishimura, Y. and Senju, S. Multiple antigen-targeted immunotherapy with alpha-galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells. *J. Immunotherapy* in press.
3. Ikuta, Y.\* , Hayashida, Y\*, Hirata, S., Irie, A., Senju, S., Kubo, T., Nakatsura, T., Monji, M., Sasaki, Y., Baba, H., and Nishimura, Y. (\*these two authors contributed equally.)

Identification of the H2-K<sup>d</sup>-restricted cytotoxic T lymphocytes epitopes of a tumor-associated antigen, SPARC, which can stimulate antitumor immunity without causing autoimmune disease in mice. *Cancer Science* 100, 132-137, 2009.

4. Imai, K., Hirata, S., Irie, A., Senju, S., Ikuta, Y., Yokomine, K., Harao, M., Inoue, M., Tsunoda, T., Nakatsuru, S., Nakagawa, H., Nakamura, Y., Baba, H., and Nishimura, Y. Identification of a novel tumor-associated antigen, Cadherin 3/P-cadherin, as a possible target for immunotherapy of pancreatic, gastric and colorectal cancers. *Clin. Cancer Res* 14, 6487-6495, 2008.
5. Matsunaga, Y., Fukuma, D., Hirata, H., Fukushima, S., Haruta, M., Ikeda, T., Negishi, I., Nishimura, Y. and Senju, S. Activation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by 2-microglobulin or TAP1 gene disruption and the introduction of recipient-matched MHC class I gene in allogeneic embryonic stem cell-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 181, 6635-6643, 2008.
6. Tsukamoto, H., Irie, A., Senju, S., Hatzopoulos, A.K., Wojnowski, L. and Nishimura, Y. B-Raf-mediated signaling pathway regulates T cell development. *Eur. J. Immunol.* 38, 518-527, 2008.
7. Harao, M., Hirata, S., Irie, A., Senju, S., Nakatsura, T., Komori, H., Ikuta, Y., Yokomine, K., Imai, K., Inoue, M., Harada, K., Mori, T., Tsunoda, T., Nakatsuru, S., Daigo, Y., Nomori, H., Nakamura, Y., Baba, H., Nishimura, Y. HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel lung cancer-associated cancer testis antigen, cell division cycle associated 1, can induce tumor-reactive CTL. *Int. J. Cancer* 123, 2616-2625, 2008.
8. Senju, S., Suemori, H., Zembutsu, H., Uemura, Y., Hirata, S., Fukuma, D., Matsuyoshi, H., Shimomura, M., Haruta, M., Fukushima, S., Matsunaga, Y., Katagiri, T., Nakamura, Y., Furuya, M., Nakatsuji, N., and Nishimura, Y.

Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. Stem cells. 25, 2720-2729, 2007.

9. Yokomine, K., Nakatsura, T., Senju, S., Nakagata, N., Minohara, M., Kira, J., Motomura, Y., Kubo, T., Sasaki, Y., and Nishimura, Y.: Regression of intestinal adenomas by vaccination with heat shock protein 105-pulsed bone marrow-derived dendritic cells in ApcMin/+ mice. Cancer Science. 98, 1930-1935, 2007.
10. Hirata, S., Matsuyoshi, H., Fukuma, D., Kurisaki, A., Uemura, Y., Nishimura, Y.\* and Senju, S.\* (\*equal contribution) Involvement of regulatory T cells in the experimental autoimmune encephalomyelitis-preventive effect of dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein plus TRAIL. J. Immunol. 178, 918-925, 2007.

[学会発表](計 24 件)

1. 千住 覚, Effective immunotherapy with  $\alpha$ -GalCer-loaded embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing antigens against B16 melanoma. International Investigative Dermatology, 2008 年 5 月 14 日~17 日、京都
2. 千住 覚, ES 細胞および iPS 細胞由来の免疫細胞を用いた医療技術の開発。第 32 回阿蘇シンポジウム、2008 年 8 月 1 日~2 日、熊本
3. 千住 覚, 免疫細胞療法への応用を目指したマウス iPS 細胞からの樹状細胞の作製技術の開発。第 17 回日本組織適合性学会大会、2008 年 9 月 19 日~21 日、大阪
4. 千住 覚, 免疫細胞療法への応用を目指したマウス iPS 細胞からの樹状細胞の分化誘導。人類遺伝学会第 53 回大会、2008 年 9 月 27 日~30 日、横浜
5. 千住 覚, Immunotherapy with multiple antigen-targeted  $\alpha$ -galactosylceramide-loaded dendritic cells derived from

embryonic stem cells. 第 10 回国際樹状細胞シンポジウム、2008 年 10 月 1 日~5 日、神戸

6. 千住 覚, Genetic modifications of ES cell-derived DC to modify cell surface MHC class. 第 10 回国際樹状細胞シンポジウム、2008 年 10 月 1 日~5 日、神戸
7. 千住 覚, 進行性幹細胞がん患者に対する Glypican-3 ペプチドワクチンの臨床第 1 相試験での安全性と有効性。第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日~30 日、名古屋
8. 千住 覚, 肺癌に高発現する新規癌精巢抗原 CDCA1 を標的とした癌免疫療法の開発。第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日~30 日、名古屋
9. 千住 覚, 膵癌の免疫療法に有用な新規癌関連抗原 CDH3 の同定。第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日~30 日、名古屋
10. 千住 覚, 免疫抑制性分子を遺伝子導入したマウス ES 細胞由来の樹状細胞の同異種系 (アロ) 移植への応用。第 36 回日本臨床免疫学会、2008 年 10 月 17 日~18 日、東京
11. 千住 覚, 複数抗原を標的とし、 $\alpha$ -GalCer を負荷した遺伝子導入 ES 細胞由来樹状細胞を用いた癌免疫療法。第 36 回日本臨床免疫学会、2008 年 10 月 17 日~18 日、東京
12. 千住 覚, 複数抗原を標的とした  $\alpha$ -GalCer 負荷 ES 細胞由来樹状細胞による癌免疫療法。第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日~3 日、京都
13. 千住 覚, Activation of antigen-specific CTL by 2-microglobulin or TAP1 gene-disrupted and recipient-matched MHC class I gene-introduced allogeneic ES cell-derived dendritic cells. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日~3 日、京都
14. 千住 覚, TRAIL を発現するアロ ES-DC の投与によるアロ膵島に対する拒絶反応の抑制。第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日~3 日、京都

15. 千住 覚、マウス iPS 細胞からの樹状細胞の作製。第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日～3 日、京都
16. 千住 覚、Establishment of hu-SCID mouse system to analyze priming in vivo of antigen-specific human CTLs by DC. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日～3 日、京都
17. 千住 覚、SARS-Cov slike protein-derived HLA-A2-restricted CTL epitope identified by using HLA-A2/Db-transgenic mice. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日～3 日、京都
18. 松永雄亮、Disruption of the TAP1 or  $\beta$ 2-microglobulin gene in ES cells to overcome the histoincompatibility between ES-DC and the recipients. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会、2007 年 11 月 20 日～22 日、東京
19. 平田真哉、MOG ペプチドと TRAIL を共発現する樹状細胞による制御性 T 細胞を介した EAE の発症抑制。第 35 回日本臨床免疫学会総会、2007 年 10 月 19 日～20 日、大阪
20. 千住 覚、遺伝子導入ヒト ES 細胞から分化誘導した樹状細胞による免疫調節能の発現。日本人類遺伝学会第 52 回大会、2007 年 9 月 12 日～15 日、東京
21. 千住 覚、抗原提示機能を有するヒト ES 細胞由来の樹状細胞 (ヒト ES-DC) の確立。第 16 回日本組織適合性学会大会、2007 年 9 月 9 日～11 日、京都
22. 千住 覚、Genetic engineering of human embryonic stem cell-derived dendritic cells. 13<sup>th</sup> International Congress of Immunology、2007 年 8 月 21 日～25 日、ブラジル・リオデジャネイロ
23. 塚本博文、Important roles of B-Raf in T cell development and TCR-ligand avidity-sensitive T cell activation. 13<sup>th</sup> International Congress of Immunology、2007 年 8 月 21 日～25 日、ブラジル・リオデジャネイロ
24. 千住 覚、抗原提示機能を有するヒト ES 細胞由来の樹状細胞。Kyoto T Cell

Conference、2007 年 6 月 15 日～16 日、京都

〔図書〕(計 9 件)

1. 千住 覚：MHC (日本組織適合性学会)「HLA 分子による癌特異抗原の提示を利用した癌免疫療法の開発」2008 年 518-527
2. 千住 覚：腫瘍内科(科学評論社)「ES 細胞由来の樹状細胞による抗腫瘍免疫応答の誘導」2008 年 164-170
3. 千住 覚：再生医療(メディカルレビュー社)「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」2008年43-45
4. 西村泰治、千住 覚：Jpn. J. Clin. Immunol. (小宮山印刷工業株式会社)「新規癌胎児性抗原 Glypican-3 の肝細胞癌の診断と免疫療法への応用」2008年383-391
5. 千住 覚：医学のあゆみ(医歯薬出版)「ES 細胞および iPS 細胞を用いた免疫療法」2008 年 413-418
6. 千住 覚：実験医学(羊土社)「免疫療法への応用を目指した ES 細胞からの樹状細胞の作製」2008 年 212-217
7. 平田真哉、千住 覚、西村泰治：炎症と免疫(先端医学社)「医学用語解説 ES-DC」2008 年 133-135
8. 千住 覚、西村泰治：免疫応答と免疫病態の統合的分子理解(南山堂)「第 12 章 T 細胞応答の抑制性制御」2007 年 116-122
9. 千住 覚、西村泰治：アニテックス(研成社)19(2)特集 動物 MHC「MHC とはなにか」2007 年 3-8

6. 研究組織

(1)研究代表者

千住 覚 (SENJU SATORU)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授

研究者番号：50274709

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし