

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390119

研究課題名(和文)アスベスト中皮腫の発症予防対策

研究課題名(英文)Protection against Asbestosis.

研究代表者

藤田 博美(Fujita, Hiroyoshi)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60142931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：NKT細胞はマウスでは抗腫瘍効果を持つが、ヒトには殆ど存在しないため効果はない。そこで、NKT細胞近縁でヒトに多い粘膜関連インバリアントT(MAIT)細胞に着目した。しかし、本細胞は試験管で増殖せずin vitro研究が難しく、マウスに希少なためin vivo解析も困難である。我々はゲノム修飾しないセンダイウイルス由来のベクターを用い理論的にガン化しないヒトiPS細胞を作製、本細胞へと誘導した。

研究成果の概要(英文)：Although NKT cells have anticancer activity in mice, the effect has not been evidenced in human due to their cell number. Thus we focused MAIT cells whose characteristics resemble to NKT cells. We succeeded to induce human MAIT cells from carcinogenesis free iPS cells established with Sendai virus.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：MAIT細胞 iPS化 センダイ・ウイルス

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞治療を考える

悪性腫瘍の発症予防法としては、マウスにおいて NKT 細胞を用いた例がよく知られており、我々も成功例を報告している (FASEB J, 22: 2223-2231, 2008)。このような成果を、社会医学が **21 世紀に持ち越した最大の負の遺産**であるアスベスト中皮腫への対処法 = 発症予防法の可能性として考えてみた。

(2) ヒトでは NKT 細胞を標的とした治療法は無効である

ヒトにおいても NKT 細胞の抗腫瘍効果を用いた悪性腫瘍の発症予防が考えられ、国内の製薬企業においても薬剤の開発が精力的に勧められた。実際に、マウスにおいて極めて有効な薬剤が開発されている。しかしながら、この薬剤はヒトには全く効果がない。

なぜこのような薬効の乖離が生じたのであろうか？ 答えは簡単である。マウスには豊富に存在し、薬剤の標的となっていた NKT 細胞は、ヒトには極めて少数しか存在しない。従って、**希少な NKT 細胞を用いたヒト悪性腫瘍の発症予防には殆ど乗り越えられないハードルが存在する。**

(3) 粘膜関連インバリアント T 細胞 (MAIT 細胞) とは

そこで、我々は NKT 細胞と共通する性格を有し、ヒトに抱負に存在する自然免疫系細胞である MAIT 細胞に着目した。20 年あまり前に発見された本細胞は、例えば肝臓内の T 細胞の 50% に達することもあるほどヒトでは豊富に存在する。しかしながら、試験管内での増殖が不可能なため *in vitro* での解析が遅れてきた。同時に、マウスには殆ど存在しないので *in vivo* での研究も極めて困難である。

そこで、我々はヒト幹細胞あるいは iPS 細胞からの MAIT 細胞誘導を検討することとした。iPS 細胞の利点は個々人の細胞から作製することが可能であり、拒絶反応を考慮する必要がないことである。一方で、ガン遺伝子を含む山中因子の導入により作製される iPS 細胞は、**ガン化の可能性を完全に否定することが出来ない。**

(4) 理論的にガン化の可能性を否定できる iPS 細胞とは

この iPS 細胞の短所を避けるために、我々は産総研筑波中西研究室からセンダイウイルス由来ベクターの提供を受け実験に用いることとした。

センダイウイルスは核に移行しないためゲノムを修飾せず、従って原理的にガン化の恐れは否定できるので、このベクターを利用した iPS 細胞が樹立できれば優位性を持つことは、云うまでもない。

2. 研究の目的

(1) アスベスト問題とは

断熱材等に広く用いられてきたアスベストであるが、先進諸国では中皮腫や肺がんなどの疾患を引き起こすことを懸念して、1980 年代には使用が禁止された。しかしながら、我が国では禁止が遅れ、世界有数のアスベスト使用国となっていた。

アスベストによる代表的災害である中皮腫は、発症までに 20 年以上の時間を要することが多い。従って、我が国においては 2020 年頃からの発症の激増が憂慮されている。さらに、東北や神戸の震災では建材として用いられたアスベストを知らずに吸引したボランティアが多数いると考えられ、何らかの対策が必要である。

(2) 社会医学はアスベスト問題をどのように予防するか；既に暴露が終わってしまった有害物質汚染にどのように立ち向かうか

そこで我々は、マウス NKT 細胞によく似た性質を持ち、ヒトに多く存在する MAIT 細胞を利用した発症の予防を考えた。本研究の目的は、安全に利用できるヒト MAIT 細胞を開発することである。

3. 研究の方法

まず、**ガン化しない安全な iPS 細胞の開発**が必要である。

次に iPS 細胞からの MAIT 細胞への誘導を行う (reMAIT 細胞)。

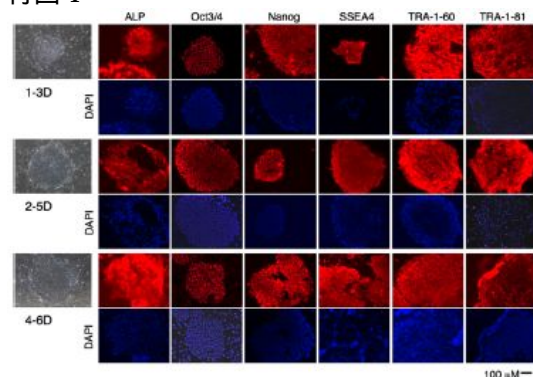
reMAIT 細胞の諸性質を検討した上での、動物実験系の樹立が必要である。

4. 研究成果

(1) ガン化しない iPS 細胞樹立の試み

3 種類のヒト臍帯血から MAIT 細胞を精製し、この細胞にセンダイウイルス由来で原理的に発がん性が否定されるベクター KOSM を用いて山中因子を導入し iPS 化を試みたところ、極めて効率の良い iPS 化が観察され、処理後 22 日にはヒト幹細胞と極めて類似したコロニーが出現した。

付図 1



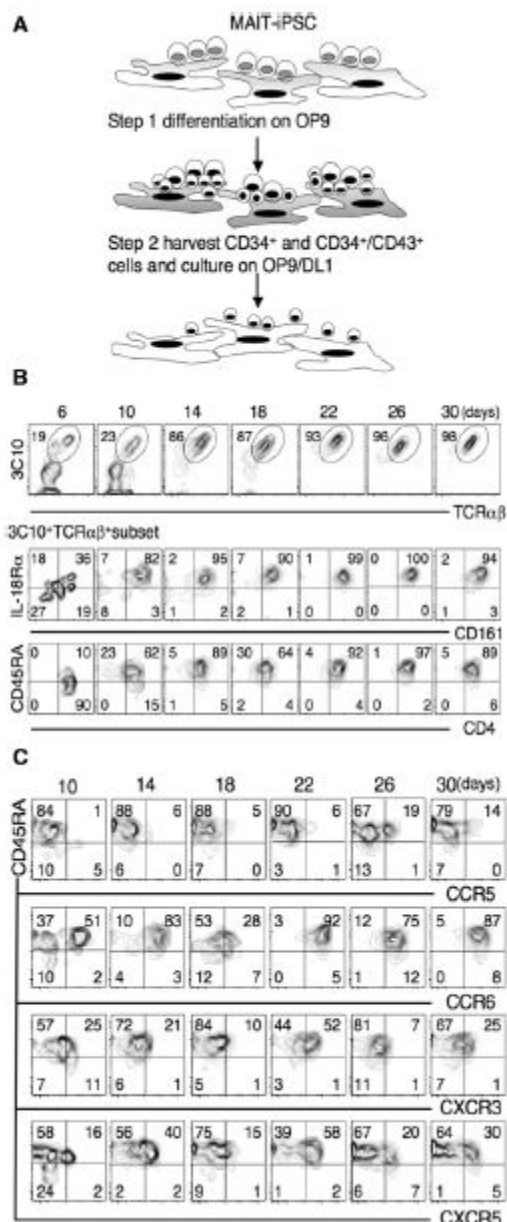
本 iPS 細胞が初期化に成功していることは幹細胞マーカーの発現 (付図 1)、OCT3/4 および NANOG 遺伝子プロモーターの脱メチ

ル化、試験管内における誘導による三胚葉それぞれへの分化、免疫不全マウス体内での奇形腫への誘導等により確認した。さらに、遺伝子発現パターンを解析したところ得られた iPS 細胞は、材料として用いた末梢 MAIT 細胞よりも幹細胞あるいは皮膚線維芽細胞より誘導した iPS 細胞に極めて近似していることが証明された。

(2) iPS 細胞から reMAIT 細胞経の分化誘導の試み

この iPS 細胞からリンパ球前駆細胞への分化誘導を経由し、OP9/DL1 上で培養することにより、30 日で 98% が reMAIT 細胞へと分化した。分化に伴う表面抗原の変化を FACS 解析した結果、多くは末梢型 MAIT 細胞と類似する発現パターンを示したが、一部は全く異なりナイーブ型の性格を示した (付図 2)。

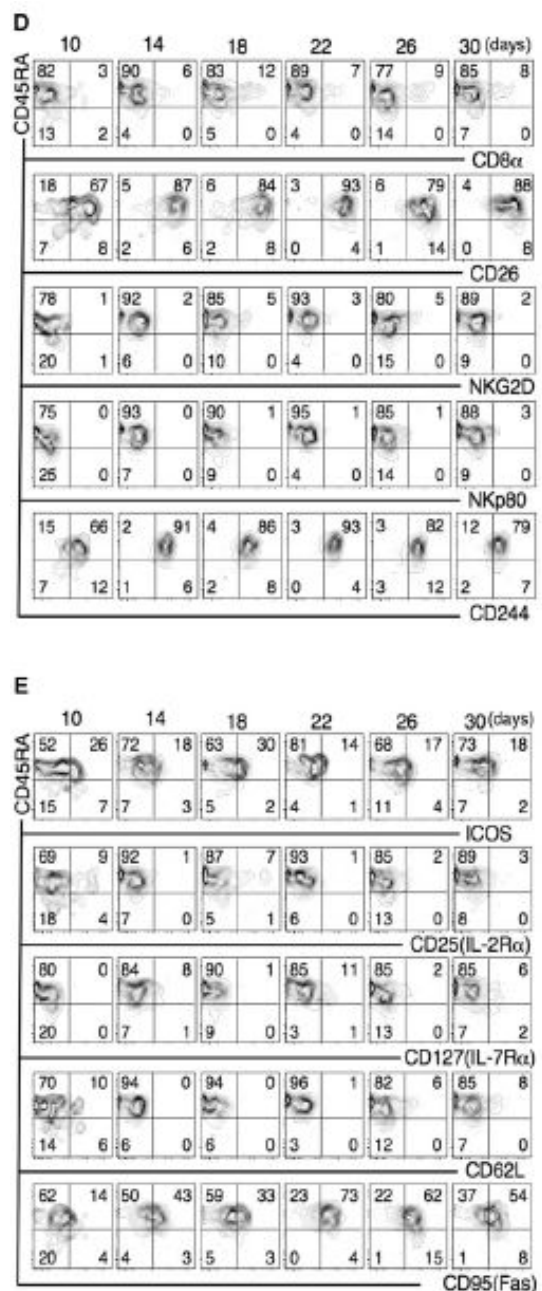
付図 2



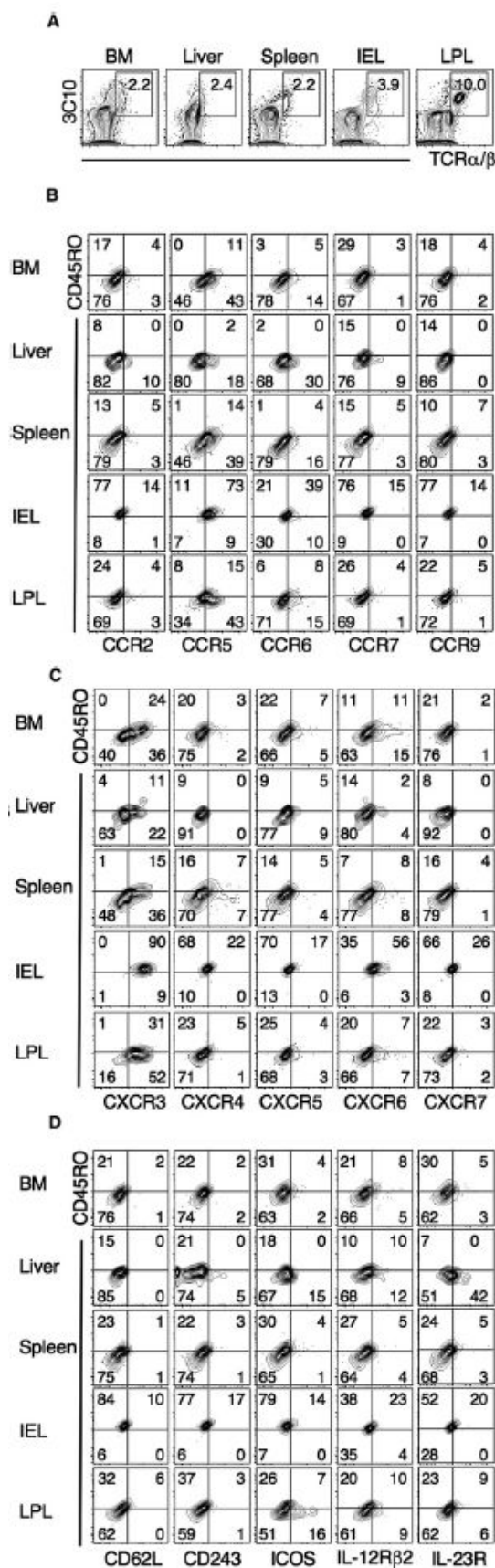
また、reMAIT 細胞の分化に伴う遺伝子発現パターンの解析を進めたところ、末梢 MAIT 細胞との相関係数が 0 日目の 0.807 から 30 日目の 0.918 へと、明確に類似していることが示された。こうした分化に伴ってサイトカイン類の分泌能力が亢進した。これらのことから、reMAIT 細胞は試験管内で生体内とほぼ同じ分化をすることが確認された。

(3) 生体内に移入された reMAIT 細胞の動態

reMAIT 細胞を細胞治療に応用するためには、生体内で正常な分布と分化を示すことを確認する必要がある。そこで、免疫不全マウスへの reMAIT 細胞移入実験を行った。その結果、肝臓や脾臓など予測された臓器への移行と分化が示された (付図 3)。



付図3



5. 主な発表論文等

(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 3件)

H Wakao, K Yoshikiyo, U Koshimizu, T Furukawa, K Enomoto, T Matsunaga, T Tanaka, Y Yasutomi, T Yamada, H Minakami, J Tanaka, A Oda, T Sasaki, R Wakao, O Lantz, T Udagawa, Y Sekiya, K Higuchi, N Harada, K Nishimura, M Ohtaka, M Nakanishi and H Fujita:

Expansion of functional human Mucosal-Associated Invariant T Cells via reprogramming to pluripotency and redifferentiation.

Cell Stem Cell, 12:546–558, 2013. (査読有)

[学会発表](計 5件)

H Wakao, K Yoshikiyo, U Koshimizu, K Enomoto, T Tanaka, Y Yasutomi, H Fujita: The advent of mucosal-associated invariant T (WAIT) cells from iPSCs opens a novel avenue for immunology.

15th International Congress of Immunology, Milan, Italy, Aug. 22-27, 2013.

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 2件)

名称: MAIT 様細胞およびその作成方法
発明者: 若尾宏, 小清水右一, 吉清和則, 藤田博美

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2012-239195

出願年月日: 2012年10月30日

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

北大プレスリリース

http://www.hokudai.ac.jp/news/130322_pr_med.pdf

ガン化のおそれの無いヒト iPS 細胞作製と、これら細胞から抗菌活性を有する白血球の開発に初めて成功—細胞予防医学へ—

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 博美 (FUJITA, Hiroyoshi)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60142931

(2) 研究分担者

小田 淳 (ODA, Atsushi)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：50255436

若尾 宏 (WAKAO, Hiroshi)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：30360671

齋藤 健 (SAITO, Takeshi)
北海道大学・大学院保健科学研究所・教授
研究者番号：40153811

大槻 剛巳 (OHTSUKI, Takemi)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：40160551

(3) 連携研究者

()

研究者番号：