

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月1日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650622

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞を用いた腫瘍抗原受容体認識薬物運搬システムの開発

研究課題名（英文）Novel drug delivery system using human iPS cell technology for recognition of cancer-related antigen

研究代表者 江藤 浩之（ETO KOJI）

京都大学 iPS細胞研究所・教授

研究者番号：50286986

研究成果の概要（和文）：

本萌芽研究では、オーダーメイド医療としての“血小板を用いた薬物運搬システム(DDS)”を実現化するために、安定的に血小板を産生可能なシステムの構築、がん抗原を認識する末梢血T細胞(細胞障害性CD8陽性細胞)からiPS細胞を樹立する技術、樹立したiPS細胞のT細胞受容体がん抗原認識のT細胞受容体情報(α , β 鎖のリアレンジメント情報)を完全に保持できる事の証明、この受容体情報を保持したまま、血小板産生前駆細胞である巨核球細胞に発現可能なシステムの開発を提案した。最終的には、(1)1のシステムに必要な不死化巨核球(すくなくとも6ヶ月以上増殖可能)をiPS細胞から樹立するための方法を確立した。(2)HIV患者由来CD8 Tリンパ球から、iPS細胞を樹立(T-iPS細胞)、本T-iPS細胞が、元のCD8細胞と同じT細胞受容体配列を保持できている事の証明を行った。(3)本T-iPS細胞から、サイトカインカクテルと抗原刺激に伴って誘導したナイーブ Tリンパ球ならびに、さらに分化誘導したCD8 リンパ球の誘導方法を開発し、作製されたリンパ球のin vitroでの機能確認までを終了した。(4)引き続き、iPS細胞由来の不死化巨核球細胞株を使用して、T細胞受容体発現系、薬物取り込み後の放出システムの操作方法等の開発を継続しており、最終的な目標までは到達していないものの重要な各ステップでの開発に目処をつけた。

研究成果の概要（英文）：Original aim of this study is to achieve the proof of concept for drug delivery system (DDS) using iPS cell technology. Idea is derived from the granule release in platelets (dense- or alpha-granule in platelets), whereby engineered megakaryocytes that express rearranged specific T cell receptor component to cancer-related antigen may be able to make unique type of DDS platelets.

In that context, we have established T lymphocyte generation, particularly CD8 cytotoxic cells in addition to naïve T cells from original antigen-specific CD8 T cells through iPS cells in human system (Cell Stem Cell, 2013). We also showed that iPS cell-derived megakaryocytes are capable of expressing TCR component, contributing to original concept in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学、

キーワード：iPS細胞、腫瘍がん抗原、血小板、Tリンパ球

1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍に対し外科的治療が優先されるものの、化学療法更に分子標的薬剤を用いた地固め治療の重要性は既に認知されている。一方、一定時間体内に貯留した上で、薬物が確実に標的のみを攻撃できる薬物運搬システム(DDS)は未だ開発途上にあり、ナノパーティクルによるDDSも上記の問題点は解決されていない。申請者らは、炎症・癌に対するT細胞を用いた新規の免疫細胞療法開発の目的から患者末梢血の抗原特異性を既にもつT細胞からiPS細胞を樹立した。加えて、iPS細胞から機能性血小板を誘導する技術開発にも成功したため、本研究では血小板をDDSの担体として使用し、安全かつ特異的に攻撃が実践できる方法を提案した。

2. 研究の目的

幹細胞生物学の最先端技術であるiPS細胞の特徴を利用した新規の薬物運搬システム(DDS)を提案する。癌免疫の主体となるのはT細胞であり、抗原およびMHC拘束性を認識できるT細胞受容体(TCR)の遺伝子配列は患者から得たT細胞では既に決定されている。本T細胞から作製するT-iPS細胞から更に血小板を作製することで、1) 遺伝子操作によって特異的TCRが発現する、2) 患者由来の血小板を作製し、3) 血小板顆粒に薬剤を取り込ませ、4) TCRと抗原が会合することで顆粒からの薬剤が放出される、システムを構築する。本研究は、iPS細胞技術や遺伝子工学的手法を使い、安全かつ腫瘍抗原特異的血小板を担体としたDDS技術の開発を行った。

3. 研究の方法

担癌患者の細胞障害性T細胞由来iPS細胞の樹立、抗原特異的TCR配列の決定(複数を選択)、TCR配列を組み込んだ巨核球特異的発現用ベクター、ウイルスの構築、TCR発現巨核球および血小板でのシグナル解析(TCR刺激下に顆粒放出できるかの検証)を行った。

4. 研究成果

安定的に血小板を産生可能なシステムの構築のシステムに必要な不死化巨核球(すくなくとも6ヶ月以上増殖可能)をiPS細胞から樹立するための方法を確立した。また、HIV患者由来CD8⁺Tリンパ球から、iPS細胞を樹立(T-iPS細胞)、本T-iPS細胞が、元のCD8細胞と同じT細胞受容体配列を保持できてい

る事の証明を行った。本T-iPS細胞から、サイトカインカクテルと抗原刺激に伴って誘導したnaïve Tリンパ球ならびに、さらに分化誘導したCD8⁺リンパ球の誘導方法を開発し、作製されたリンパ球のin vitroでの機能確認までを終了した。iPS細胞由来の不死化巨核球細胞株を使用して、T細胞受容体発現系、薬物取り込み→放出システムの操作方法、の開発を継続しており、最終的な目標までは到達していないものの、重要な各ステップでの開発に目処をつけた。

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21件)

1. Nishimura T, Kaneko S, Kawana-Tachikawa A, Tajima Y, Goto H, Zhu D, Nakayama-Hosoya K, Iriguchi S, Uemura Y, Shimizu T, Takayama N, Yamada D, Nishimura K, Ohtaka M, Watanabe N, Takahashi S, Iwamoto A, Koseki H, Nakanishi M, Eto K, Nakauchi H. Generation of Rejuvenated Antigen-Specific T Cells by Reprogramming to Pluripotency and Redifferentiation. *Cell Stem Cell*. January 3, 2013. 12(1): 114-26 doi: 10.1016/j.stem.2012.11.002. 査読有
2. Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Oshima M, Takagi H, Miyagi S, Endoh M, Endo TA, Takayama N, Eto K, Toyoda T, Koseki H, Nakauchi H, Iwama A. Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Blood*. 2013 Jan 17;121(3):447-58. doi: 10.1182/blood-2012-05-431403. Epub 2012 Nov 20. 査読有
3. Kajiwara M, Aoi T, Okita K, Takahashi R, Inoue H, Takayama N, Endo H, Eto K, Toguchida J, Uemoto S, Yamanaka S. Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul 31;109(31):12538-43. doi: 10.1073/pnas.1209979109. (Epub 2012

- Jul 16.) Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Sep 4;109(36):14716.
 査読有
4. Eto K. [Novel therapeutic strategy for hematological diseases using iPS cell-banking]. *Rinsho Ketsueki*. 2012 Jul;53(7):658-63. 査読無
 Kumano K, Arai S, Hosoi M, Taoka K, Takayama N, Otsu M, Nagae G, Ueda K, Nakazaki K, Kamikubo Y, Eto K., Aburatani H, Nakauchi H, Kurokawa M. Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood*. 2012 Jun 28;119(26):6234-42. doi: 10.1182/blood-2011-07-367441. Epub 2012 May 16. 査読有
 5. Eto K. Guest editorial: the contribution of pluripotent stem cells to blood cells. *Int J Hematol*. 2012 Jun;95(6):599-600. (Epub 2012 May 26.) Review 査読無
 6. Takayama N, Eto K. Pluripotent stem cells reveal the developmental biology of human megakaryocytes and provide a source of platelets for clinical application. *Cell Mol Life Sci*. 2012 Oct;69(20):3419-28. doi: 10.1007/s00018-012-0995-4. Epub 2012 Apr 24. Review. ***corresponding author** 査読有
 7. Takayama N, ***Eto K.** In vitro generation of megakaryocytes and platelets from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol*. 2012;788:205-17. ***corresponding author** 査読有
 8. Takayama N, Eto K., Nakauchi H. Potential usefulness of human iPS cells on the generation of platelets. *Nihon Rinsho*. 2011 Dec;69(12):2161-5. Japanese. 査読無
 9. Umemoto T, Yamato M, Ishihara J, Shiratsuchi Y, Utsumi M, Morita Y, Tsukui H, Terasawa M, Shibata T, Nishida K, Kobayashi Y, Petrich BG, Nakauchi H, ***Eto K.**, Okano T. Integrin $\alpha v \beta 3$ regulates thrombopoietin-mediated maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*. 119(1):83-94. 2012 Jan. 5. (Epub 2011 Nov 16.) ***corresponding author** 査読有
 10. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, Ooehara J, Otsu M, Kamiya A, Petrich B, Urano T, Kadono T, Sato S, Aiba A, Yamashita H, Sugiura S, Kadowaki T, Nakauchi H, ***Eto K.**, Nagai R. In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. *Blood*. 119(8):e45-56. 2012 Feb. 23. doi: 10.1182/blood-2011-09-381400. (Epub 2011 Nov 16.) ***corresponding author** 査読有
 11. Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, Takayama N, Eto K., Onodera M, Miyajima Y, Takamatsu Y, Suzumiya J, Matsubara K, Tomiyama Y, Saito H. Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing constitutive activation of the $\{\alpha\}IIb\{\beta\}3$ receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood*. 117:5479-84, 2011 May. (Epub 2011 Mar 31.) 査読有
 12. 江藤浩之、堂田丈明 iPS細胞の誕生と血小板作製の意義 *血液フロンティア* 23(3):35-41 2013 Mar 査読無
 13. Koji Eto Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells *日本炎症・再生医学会学会誌「Inflammation and Regeneration」* Vol. 32 No. 4 : 144-45 September 2012 査読無
 14. 江藤浩之 iPSバンク有効利用した血液疾患治療法の開発 *臨床血液* 53(7):658-63, 2012 July 査読無
 15. 江藤浩之、遠藤大 iPS細胞の目指す方向性；血小板産生系を例に *Pharma Medica* 30(5):59-64, 2012 May. メディカルレビュー社 査読無
 16. 中村壮、高山直也、江藤浩之 ヒト多能性幹細胞を用いた血小板再生人工血液 vol.19, No.3. :99-102, 2012. Apr 日本血液代替物学会会誌 査読無

17. 江藤浩之. ヒト iPS 細胞からつくる血小板. *Annual Review 血液* 2012. Jan 214-219, 中外医学社 査読無
18. 高山直也, 江藤浩之. ヒト多能性幹細胞を用いた巨核球/血小板造血研究. *医学のあゆみ*. 239(14):1385-89, 2011. Dec 医歯薬出版 査読無
19. 遠藤大, 江藤浩之. iPS 細胞樹立法の標準化を目指した分化能による評価. *細胞*. 43(10):367-70, 2011. Sep ニューサイエンス社 査読無
20. 江藤浩之, 遠藤大. 血小板と再生医学. 脈管学. 51(3):339-45, 2011. Sep 日本脈管学会機関誌 査読無

[学会発表] (計 25 件)

1. 江藤浩之 “血小板前駆細胞、巨核球の不思議と iPS 細胞” 第 12 回日本再生医療学会総会 平成 25 年 3 月 21 日 (パシフィコ横浜)
2. 江藤浩之、“細胞接着と iPS 細胞” 第 35 回日本分子生物学会年会、平成 24 年 12 月 12-14 日 (福岡) 指定演者
3. Nishimura Toshinobu, Kenko Shin, Tachikawa-Kawana Ai, Eto Koji, Nakauchi Hiromitsu, “Rejuvenation of antigen-specific T cells through reprogramming and differentiation” “第 41 回日本免疫学会学術集会 平成 24 年 12 月 5-7 日 (神戸) ポスター発表
4. 江藤浩之、“iPS 細胞ストック” を利用した輸血製剤のオンデマンド供給システム 第 40 回日本救急医学会総会、平成 24 年 11 月 15 日 (京都) 特別講演
5. Yuko Tadokoro, Atsushi Hirao, Takayuki Hoshii, Kazuhito Naka, Koji Eto, Hideo Ema, Satoshi Yamazaki, Akihiko Yoshimura, Hiromitsu Nakauchi. “A competitive advantage of hematopoietic stem cells in the bone marrow controlled by Spred-1” 第 74 回日本血液学会学術集会、平成 24 年 10 月 19-21 日 (京都) ポスター発表
6. Masataka Hosoi, Keiki Kumano, Kazuki Taoka, Shunya Arai, Koki Ueda, Yasuhiko Kamikubo, Naoya Takayama, Makoto Otsu, Koji Eto, Hiromitsu Nakauchi, Mineo Kurokawa. “Generation and analysis of induced pluripotent stem derived from secondary myelofibrosis cells” 第 74 回日本血液学会学術集会、平成 24 年 10 月 19-21 日 (京都) 一般口演
7. 江藤浩之、iPS 細胞を用いた血液事業戦略の方向性、第 36 回日本血液事業学会総会 平成 24 年 10 月 18 日 (仙台国際センター) 招待講演
8. 江藤浩之、iPS 細胞研究の血栓止血領域における現状と展望 第 34 回日本血栓止血学会、平成 24 年 6 月 7-9 日 (東京) 特別講演
9. Hiroshi Endo, Naoya Takayama, Tomo Koike, Hiromitsu Nakauchi, Koji Eto. “Stepwise Analysis of in vitro Hematopoiesis from Human Pluripotent Stem Cells Revealed that Early MYC Inhibition Potentiated Mesodermal Progenitor Cells towards Hematopoietic Differentiation” The ISSCR 10th Annual Meeting. Jun 13-16, 2012. (Yokohama) Poster Session
10. Toshinobu Nishimura, Shin Kaneko, Ai Tachikawa-kawana, Koji Eto, Hiromitsu Nakauchi. “ANTIGEN-SPECIFIC CELL INDUCTION FROM HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS” The ISSCR 10th Annual Meeting. Jun 13-16, 2012. (Yokohama) oral Session
11. Shoichi Hirose, Naoya Takayama, Sou Nakamura, Takashi Kato, Kazumichi Nagasawa, Tadashi Sameshima, Hiromitsu Nakauchi, Koji Eto. “POTENTIAL APPLICATION OF AN IMMORTALIZED ERYTHROCYTE-PRODUCING CELL LINE DERIVED FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS” The ISSCR 10th Annual Meeting. Jun 13-16, 2012. (Yokohama) oral Session
12. Takafumi Hiramoto, Yasuhiro Ebihara, Yoko Mizoguchi, Kazuhiro Nakamura, Shinji Mochizuki, Shohei Yamamoto, Emiko Matsuzaka, Sachiyo Hanada, Ryoko Ohnishi, Kenzaburo Tani, Koji Eto, Hiromitsu Nakauchi, Masao Kobayashi, and Kohichiro Tsuji. “Suppressed Neutrophil Development in Hematopoiesis of Induced

- Pluripotent Stem Cells Derived From a Severe Congenital Neutropenia Patient with ELA2 Mutation” 53rd ASH Annual Meeting and Exposition. December 10-13, 2011. (San Diego, USA) Oral Session
13. Hiroshi Endo, Naoya Takayama, Tomo Koike, Hiromitsu Nakauchi, and Koji Eto, “Stepwise Signaling and Low Oxygen Promote Hematopoietic Progenitor Emergence From Human Pluripotent Stem Cells” 53rd ASH Annual Meeting and Exposition. December 10-13, 2011. (San Diego, USA) Poster Session
 14. Toshinobu Nishimura, Shin Kaneko, Yoko Tajima, Naoya Takayama, Ai Tachikawa-Kawana, Koji Eto, and Hiromitsu Nakauchi. “In Vitro Generation of Mature T Lymphocytes From Human Ips Cells and Genetic Analysis of TCR Gene Rearrangements” 53rd ASH Annual Meeting and Exposition. December 10-13, 2011. (San Diego, USA) Poster Session
 15. Jun Ishihara, Terumasa Umamoto, Masayuki Yamato, Yoshiko Shiratsuchi, Brian G. Petrich, Hiromitsu Nakauchi, Koji Eto, Toshio Kitamura, and Teruo Okano “Nov/CCN3 Enhances Long-Term Repopulating Activity of Mouse Hematopoietic Stem Cells Via Intergin β 3 Signaling Collaborating with Thrombopoietin” 53rd ASH Annual Meeting and Exposition. December 10-13, 2011. (San Diego, USA) oral Session
 16. Shinji Hirata, Ryoko Jono-Ohnishi, Satoshi Nishimura, Naoya Takayama, Sou Nakamura, Hiromitsu Nakauchi, Takahiko Murata, and Koji Eto. “Direct and Continuous Inhibition of ADAM17 Using a Novel Selective Inhibitor Restores Functional Platelet Yield From Human Pluripotent Stem Cells” 53rd ASH Annual Meeting and Exposition. December 10-13, 2011. (San Diego, USA) Poster Session
 17. Naoya Takayama, Shinji Hirata, Ryoko Jono-Ohnishi, Sou Nakamura, Sho-ichi Hirose, Hiroshi Endo, Masanori Nishi, Yuhei Hamazaki, Shin Kaneko, Eiichi Ishii, Hiromitsu Nakauchi, Shinji Kunishima, and Koji Eto. “Modeling Congenital Amegakaryocytic Thrombocytopenia Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells” 53rd ASH Annual Meeting and Exposition. December 10-13, 2011. (San Diego, USA) Oral Session
 18. Sou Nakamura, Naoya Takayama, Hiromitsu Nakauchi and Koji Eto. “Platelet Production System Using an Immortalized Megakaryocyte Cell Line Derived From Human Pluripotent Stem Cells” 53rd ASH Annual Meeting and Exposition. December 10 - 13, 2011. (San Diego, USA) Invited
 19. Sou Nakamura, Naoya Takayama, Hiromitsu Nakauchi and Koji Eto. “Platelet Production System Using an Immortalized Megakaryocyte Cell Line Derived From Human Pluripotent Stem Cells” 53rd ASH Annual Meeting and Exposition. December 10 - 13, 2011. (San Diego, USA) Plenary Session
 20. Eto K. “ PRODUCTION OF PLATELETS FROM STEM CELLS” The XXIInd Regional Congress of the ISBT. November 20 - 23, 2011. (Taipei, Taiwan) Invited Speaker
 21. Eto K. “ Potential application of human iPS cell-derived blood cells and evaluation system in mouse xenogeneic transplantation models” The Third International Workshop on Humanized Mice. October 28-31, 2011. (Pittsburgh, USA) Invited Speaker
 22. Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, Yamaguchi T, Otsu M, Nishimura K, Nakanishi M, Sawaguchi A, Nagai R, Takahashi K, Yamanaka S, Nakauchi H, Eto K. “TRANSIENT ACTIVATION OF C-MYC EXPRESSION IS CRITICAL FOR EFFICIENT PLATELET GENERATION FROM HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS” XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH2011). July 23-28, 2011. (Kyoto, Japan.) Poster Session (高山先生)

23. Eto K. “Potential application of human iPS cell-derived hematopoietic cells for disease treatment” 7th IABS Symposium on Advances in Transfusion Safety. July 15-17, 2011. (Singapore.) Invited Speaker
24. Takayama N, Sano S, Shimizu T, Kawahata R, Endo H, Nakamura S, Ogawa S, Nakauchi H, Eto K. “SUSPECTED INCOMPLETE REPROGRAMMING IN BLOOD DERIVED HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS IS ADVANTAGEOUS FOR ADULT-TYPE ERYTHROCYTE GENERATION WITH GLOBIN SWITCHING” International Society for Stem Cell Research 9th Annual Meeting (ISSCR). June 15-18, 2011. (Toronto, Canada.) Poster Session
25. Eto K. “Blood generation from iPS cells toward clinical applications” (第32回日本炎症・再生医学会 1st Meeting of Asian-Pacific Federation of Inflammation and Regeneration 合同開催) Jun 2-3, 2011. (Kyoto, JAPAN.) Invited Speaker

[産業財産権]

○出願状況 (計4件)

1. 名称：巨核球及び血小板の製造方法
出願番号：特願 2013-023013
出願日：2013/2/8
発明者：江藤浩之
出願人：京都大学
2. 名称：多能性幹細胞からの巨核球及び/又は血小板の製造方法
東大知財部管理番号：25B115005-1
発明者(敬称略)：西野泰斗、中村隆典、岩本俊介、江藤浩之、中内啓光、辻嘉代子、泉名謙治
出願人：国立大学法人東京大学
出願日：2012/10/3
出願番号：PCT/JP2012/075705
出願国：世界知的所有権機関 (WIPO)
3. 名称：血小板産生方法及び血小板産生装置
東大知財部管理番号：25B111002-1
発明者(敬称略)：江藤浩之、中内啓光、福田敏男、高松遼、新井史人
出願人：国立大学法人東京大学 国立大学法人名古屋大学
出願日：2012/5/26
出願番号：特願 2012-120322
出願国：日本 (国内優先権主張出願)

4. 名称：多核化巨核球細胞、及び血小板の製造方法

東大知財部管理番号：25B112002-1

発明者(敬称略)：江藤浩之、中内啓光、高山直也、中村壯、稲葉良幸

出願人：国立大学法人東京大学

出願日：2012/5/11

出願番号：PCT/JP2012/062217

出願国：世界知的所有権機関 (WIPO)

[その他]

ホームページ等

江藤研究室ホームページ

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/eto/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 江藤 浩之

(ETO KOJI)

京都大学 iPS 細胞研究所・教授

研究者番号：50286986