

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 5 月 31 日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659040

研究課題名（和文）iPS細胞由来形質細胞様樹状細胞を用いたワクチンへの応用

研究課題名（英文）Differentiation of plasmacytoid dendritic cells from iPS cells and its application for Vaccine development

研究代表者 川端 健二 (KAWABATA KENJI)

独立行政法人医薬基盤研究所・幹細胞制御プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：50356234

研究成果の概要（和文）：本研究では、ES/iPS細胞から樹状細胞、特に形質細胞様樹状細胞（pDC）への分化誘導法の確立を行い、それを用いた新たな細胞ワクチン療法に向けた基盤技術の開発を目標としている。骨髓ストロマ細胞株である OP9 細胞などの支持細胞を用いることにより、マウス iPS 細胞から全ての血液細胞の元となる血液前駆細胞を誘導可能であることを明らかにした。また、血液前駆細胞から GM-CSF や Flt3L 等のサイトカインを作用させることにより、樹状細胞を分化誘導することが可能であった。ヒト iPS 細胞から血液・免疫細胞を誘導するには、ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞へ分化誘導する必要がある。ヒト ES 細胞あるいは iPS 細胞から血液前駆細胞を得る方法として、骨髓ストロマ細胞株である OP9 細胞などの支持細胞との共培養法や胚葉体形成法などが汎用されている。そこでまず、VEGF 存在下でヒト iPS 細胞と支持細胞とを共培養することで血液前駆細胞への分化誘導を試みた。その結果、ヒト iPS 細胞由来のコロニーが隆起してできた嚢状構造の内部に血球様の球状細胞が出現するのが確認された。この血球様細胞は、血液前駆細胞のマーカーである CD34 や CD43 を発現する細胞であることがフローサイトメトリー解析により確認され、この血液前駆細胞を利用することにより、ヒト樹状細胞も iPS 細胞から分化誘導できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to develop the differentiation protocols for plasmacytoid dendritic cells from induced pluripotent stem (iPS) cells. Cytokines, such as GM-CSF and Flt3L, could efficiently promote the differentiation into plasmacytoid dendritic cells from iPS cell-derived hematopoietic progenitor cells. Also, human hematopoietic progenitor cells were induced from human iPS cells by co-culture with OP9 feeder cells. These cells could express CD34 and CD43 as hematopoietic markers, suggesting that our protocols could apply to the differentiation into human plasmacytoid dendritic cells.

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	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：免疫学

1. 研究開始当初の背景

旺盛な増殖能力と多様な細胞への分化能力をあわせもつ ES 細胞、あるいは iPS 細胞は、再生医療や創薬研究への応用に期待され

ているが故に、その実用化に向けて多くの研究がなされている。実際、これまでに ES/iPS 細胞から血小板、造血幹細胞、心筋等をはじめ種々の細胞への分化誘導法が確立されて

いる。ES/iPS 細胞から目的の細胞へ高効率に分化誘導する技術の開発が、ES/iPS 細胞を用いた医療応用の実現の鍵となる。したがって、申請者らは、アデノウイルスベクターを用いて種々の遺伝子を導入することにより ES/iPS 細胞から骨芽細胞、脂肪細胞、肝細胞、血液前駆細胞への高効率分化誘導法の確立を行っており (Stem Cells, 8, 1802-1811, 2009, Mol Ther., 2, 400-407, 2011, PLoS One, 7, e21780, 2011)、遺伝子導入法を用いることは幹細胞から目的細胞への効率の良い分化誘導の基盤技術として有用である事を明らかにしてきた。形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell; pDC) は、大量のインターフェロンを産生することから、ES/iPS 細胞から pDC への分化誘導法が確立されれば、感染症や癌に対する細胞ワクチンとしての応用が期待できるため、本研究では未だ ES/iPS 細胞からの分化誘導法が確立されていない pDC に着目した。しかしながら、pDC は通常状態では生体内に存在する数が少ないため、生体から pDC を得るのは容易ではない。したがって、pDC を用いたこれまでの研究の多くは、骨髄細胞から Flt3L とよばれるサイトカインを作用させ分化誘導した樹状細胞を利用したものである。しかし、Flt3L を用いて骨髄細胞から樹状細胞を誘導した場合、pDC だけでなく古典的樹状細胞 (conventional dendritic cell; cDC) を含むヘテロな細胞集団が得られることが明らかとなっている。したがって、pDC のみを利用する場合、細胞分離を行う必要性があり、ES/iPS 細胞から pDC への分化誘導法の確立が望まれていた。

2. 研究の目的

近年、古典的樹状細胞 cDC だけでなく形質細胞様樹状細胞 pDC も抗原提示能を有していることが報告された。したがって、pDC を用いた細胞ワクチン療法への応用が期待される。そのためには、高純度に精製された大量の pDC が必要となる。しかし、pDC は生体内に存在する数が少ないため、*in vitro* で増幅する技術が必要となる。そこで、優れた増殖力、分化能を有する事から、再生医療用あるいは医薬品の毒性スクリーニング用の細胞ソースとして注目されている胚性幹 (ES) 細胞、あるいは人工多能性幹 (iPS) 細胞に着目した。マウス、ヒトのいずれも ES/iPS 細胞から pDC への分化誘導法は未だ確立されていない。本研究では、①マウス ES/iPS 細胞から pDC への分化誘導を試み、②ワクチンへの応用に向けた基盤的研究を行う。

2. 研究の方法

I. マウス iPS 細胞から pDC の作製

マウス iPS 細胞株 38C2 (京都大学、山中伸弥教授から供与) は mES Complete Medium (Millipore 社) を用いてマイトマイシン C 処理したマウス胎児線維芽細胞 (MEF) 上で培養した。

マウス iPS 細胞から形質細胞様樹状細胞への分化誘導は以下の方法で行った。骨髄ストロマ細胞株である OP9 細胞を培養皿に播種し、フィーダー細胞として用いた。マウス iPS 細胞を 0.25% trypsin-EDTA (invitrogen 社) を用いて単一に分離し、37°C で 30 分間静置した後、上清を回収し iPS 細胞と MEF を分離した。その後、iPS 細胞のみを 1×10^5 個/10 cm 培養皿となるようにフィーダー細胞上に播種した。培養 7 日目までは播きなおしをせず、培地を 24 時間後と 4 日後に全量交換した。培養 7 日目に 0.05% trypsin-EDTA で細胞を回収し、37°C で 30 分間静置した後、上清を回収することで iPS 細胞由来中胚葉系細胞と OP9 細胞を分離した。中胚葉系細胞を回収し、5 ng/ml Flt3L を含む α -MEM 培地 (Sigma 社) に懸濁後、OP9 細胞上に播種したのち、4 日間培養した。その後、浮遊細胞のみを回収し、100 ng/ml Flt3L を含む α -MEM 培地に懸濁後、新しく播きなおした OP9 細胞上で培養した。培養 21 日目の細胞を回収し、細胞表面マーカーおよび CpG-DNA に対する IFN 産生量を測定した。

II. ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株 201B7 (京都大学、山中伸弥教授から供与) は 5 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) を含む霊長類 ES 細胞用培地「ReproStem」 (ReproCell 社) を用いて、マイトマイシン C 処理済みの MEF 上で培養した。ヒト iPS 細胞株 Tic (JCRB Cellbank から供与; JCRB Number: JCRB1331)、Toe (国立成育医療センター、梅澤明弘先生から供与) は 10ng/ml bFGF を含む「ReproStem」を用いて、マイトマイシン C 処理済みの MEF 上で培養した。5 から 7 日ごとに 0.1 mg/ml ディスパーゼ (Roche 社) を用いてヒト iPS 細胞のコロニーを回収後、単細胞にしないように懸濁して継代を行った。

III. ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞の分化誘導

分化誘導開始の前日に 50 Gy 放射線照射し増殖を止めた C3H10T1/2 細胞株をゼラチンコートした 10 cm 培養皿に 7×10^5 個で播種し、フィーダー細胞として用いた。iPS 細胞は、 $5-10 \times 10^4$ 個/10 cm 培養皿となるようにフィーダー細胞上に播種した。細胞の播き直しをば行わず、50 ng/ml vascular endothelial growth factor (VEGF) (Peprotech 社) 含有培地を 9 日目までは 3

日毎、9日目から15日目までは2日毎に交換することにより血液前駆細胞の誘導を行った。

3. 研究成果

骨髄細胞から形質細胞様樹状細胞を誘導するには、Flt3Lが必須である。そこで本研究では、iPS細胞由来中胚葉系細胞をFlt3L存在下で骨髄ストロマ細胞株であるOP9細胞と共培養することで、マウスiPS細胞から形質細胞様樹状細胞への分化誘導を試みた。フローサイトメーターにて解析した結果、得られた細胞はCD11c陽性B220陽性細胞であった。また、PDCA-1を発現していたことから、本手法によりiPS細胞から形質細胞様樹状細胞を分化誘導可能であることが示された。形質細胞様樹状細胞は、CpG-DNAに反応して、IFN- γ を産生することが知られている。そこで、得られた細胞にCpG-DNAを作用させ、24時間後の培養上清を用いてELISAにてIFN産生量の測定を行った。その結果、CpG-DNAを作用させた群でのみIFN- γ の産生が観察された。以上の結果から、iPS細胞から機能的な形質細胞様樹状細胞が得られることが示された。

ヒトiPS細胞からpDCなどの免疫細胞を誘導するには、ヒトiPS細胞から血液前駆細胞へ分化誘導する必要がある。ヒトES細胞あるいはiPS細胞から血液前駆細胞を得る方法として、骨髄ストロマ細胞株であるOP9細胞などの支持細胞との共培養法や胚葉体(embryoid body: EB)形成法などが汎用されている。そこで、VEGF存在下でヒトiPS細胞と放射線照射したC3H10T1/2細胞(支持細胞)とを共培養することで血液前駆細胞への分化誘導を試みた。その結果、共培養15日頃からヒトiPS細胞株201B7由来のコロニーが隆起してできた嚢状構造の内部に血球様の球状細胞が出てくるのが確認された。この血球様細胞は、血液前駆細胞のマーカーであるCD34やCD43を発現するような細胞であることがフローサイトメトリ解析により確認された。そこで、CD34陽性CD43陰性細胞、CD34陽性CD43陽性細胞をそれぞれセルソーターにて回収後、コロニーアッセイを行った。その結果、CD34陽性CD43陰性細胞からはコロニーが得られなかったが、CD34陽性CD43陽性細胞からはCFU-Mixを含む血液前駆細胞の多くのコロニーが得られた。以上の結果から、ヒトiPS細胞から血液前駆細胞を分化誘導可能であることが明らかとなり、本法を応用することでヒトpDCも誘導できる可能性が示された。

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)

Yamaguchi T, Tashiro K, Tanaka S, Katayama S, Ishida W, Fukuda K, Fukushima A, Araki R, Abe M, Mizuguchi H, Kawabata K. Two-step differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.*, 22, 726-734 (2013)

Tashiro K, Omori M, Kawabata K, Hirata N, Yamaguchi T, Sakurai F, Takaki S, Mizuguchi H. Inhibition of Lnk in mouse induced pluripotent stem cells promotes hematopoietic cell generation. *Stem Cells Dev.*, 21, 3381-3390 (2012)

[雑誌論文] (計12件)

[学会発表] (計28件)

[図書] (計3件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○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
<http://www.nibio.go.jp/Proj3HP/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川端 健二 (KAWABATA KENJI)

研究者番号: 50356234

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

山口 朋子 (YAMAGUCHI TOMOKO)

研究者番号：50580130