

平成 27 年度 共同研究報告書

|                            |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----------------------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 研究区分                       |       | 一般共同研究                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 研究課題                       |       | 多能性幹細胞からの免疫細胞の分化誘導                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 新規・継続の別                    |       | 新規                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 研究代表者                      | 所属    | 京都大学再生医科学研究所                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|                            | 職名・氏名 | 教授・河本宏                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 研究分担者<br>(適宜行を追加し<br>て下さい) | 所属    | 京都大学・医学研究科・標的治療腫瘍学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|                            | 職名・氏名 | 特定講師・祝迫恵子                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                            | 所属    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                            | 職名・氏名 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 受け入れ教員                     | 職名・氏名 | 教授・清野研一郎                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 研究目的<br>(300 字程度)          |       | 近年、iPS 細胞が樹立され、それを用いた再生医療の実現が期待されている。我々はこの分野に専門とする免疫学を応用するべく、iPS 細胞からのリンパ球の分化誘導に取り組んで来た。2013 年、抗原特異的な T 細胞から iPS 細胞を樹立し、これを再度 T 細胞に分化誘導することで、大量の抗原特異的 T 細胞を誘導することに成功した。本研究では、腫瘍免疫を専門とする清野博士らとこれらの細胞の分化誘導に関して再検討する。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 研究内容・成果<br>(1000 字程度)      |       | <p>清野研究室において、ヒト iPS 細胞からミエロイド系細胞の誘導を行った。iPS 細胞から樹状細胞を分化誘導する過程を 3 つのステップ [Step 1：中胚葉系細胞の誘導]、[Step 2：hemoangiogenic progenitors の誘導]、[Step 3：樹状細胞への誘導] に分け、各ステップにおける細胞表面タンパク質の発現や転写因子の発現を評価し、誘導条件の検討を行った。また、フィーダー細胞を用いずに樹状細胞を誘導するために Step 1、2 では胚様体 (Embryoid body；EB) 形成を行い、Step 3 において EB をカルチャーディッシュに接着させて、分化誘導を行った。</p> <p>Step 1 の中胚葉系細胞の誘導では、各誘導条件における KDR<sup>+</sup>SSEA3<sup>-</sup> の細胞の割合を評価した。KDR は未熟な中胚葉系細胞に発現しており、SSEA3 は未分化な細胞に発現している分子である。諸条件を検討した結果、GSK3β 阻害剤 CHIR99021 の添加により Wnt シグナルを活性化することで、iPS 細胞からほぼ全ての細胞を中胚葉系の細胞に誘導することができた。中胚葉系の細胞から血液細胞や血管内皮細胞に分化する細胞は、CD34 を発現する。そのため Step 2 の hemoangiogenic progenitors の誘導においては、中胚葉系の細胞に占めるの CD34<sup>+</sup> の細胞の割合を評価した。条件検討の結果、誘導 2 日目から TGFβ 受容体選択的阻害剤 SB431542 の添加することにより CD34<sup>+</sup> の細胞の割合が増加した。さらに、SB431542 を添加し誘導した EB は転写因子 Sox17 の遺伝子発</p> |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | <p>現が日増しに高くなった。また、この EB の一部の細胞が CD133 を発現していたことから、この条件により誘導された EB は造血幹細胞を産生する能力を持つ血管内皮細胞 (hemogenic endothelium ; HE) に似た表現型を有しており、この EB からは血液細胞が誘導されることが期待された。続いて Step 3 において EB を接着培養すると、EB の中心付近から浮遊細胞が現れた。この浮遊細胞は血液細胞の細胞膜表面タンパク質である CD45 を発現していた。また GM-SCF、SCF、IL-4 及び TNF<math>\alpha</math> を添加した誘導培地において分化誘導を行った。すると誘導 27 日目に樹状細胞に見られる細胞膜表面タンパク質 CD11c、CD1c、CD1a、DC-SIGN、HLA-DR の発現をフローサイトメトリーにて確認した。</p> <p>これらの結果から、フィーダー細胞を用いることなく、樹状細胞の表面マーカーを発現している細胞を誘導することができた。今後は樹状細胞の誘導効率をさらに上げるための検討や、機能面の評価としてこの細胞を LPS や polyI:C など刺激をした場合における IL-12 や TNF<math>\alpha</math> を始めとするサイトカインの産生能、抗原提示能の評価としてリンパ球混合試験などを実施する必要がある。</p> |
| 成果 | <p>【学会報告】</p> <p>臼居優、阿部紘丈、ムハンマド・バグダディ、和田はるか、清野研一郎. T 細胞依存的に腫瘍ワクチン効果をもたらす乳がん細胞株の新規取得. 第 25 回 KTCC、京都、2015 年 5 月 15、16 日</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|    | <p>【論文発表】</p> <p>なし</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|    | <p>【新聞報道】</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |