

〈研究課題〉 高齢者化学療法への臨床応用に向けた

iPS 細胞由来顆粒球輸血療法の開発

代表研究者

東京大学医学部附属病院無菌治療部 助教 吉見昭秀

(現：東京大学大学院がんプロフェッショナル養成基盤推進プラン特任助教)

【まとめ】

iPS 細胞由来顆粒球輸血療法の確立は現状の顆粒球輸血の問題点であるドナー不足やドナーの負担を解消し、顆粒球輸血の普及を可能にするものである。本研究では iPS 細胞から、sac 法で造血幹細胞を誘導し、遺伝子導入、サイトカインの添加で、好中球分化の効率向上を試みた。複数のサイトカインの添加では好酸球への分化傾向を示したが、G-CSF のみの添加で好中球に誘導可能であることを確認した。

1. 研究の目的

好中球減少期の重篤な感染症に対する顆粒球輸血療法は、十分な細胞数を確保することが困難なため、臨床効果を得にくいという問題があった。無限の増幅が可能な人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の使用は、大量の顆粒球の安定供給を可能にする有力な手段である。本研究は、iPS 細胞を用いた顆粒球輸血療法の実現を目指し、課題を解決することを目的とした。

2. 研究方法と経過

iPS 細胞からの造血細胞への誘導には、10T1/2 細胞との共培養法を用いて、ヒト

iPS 細胞から多能性の血液前駆細胞を濃縮する嚢状の構造物 (iPS cell-derived sac) を誘導し、さらに内部の血液前駆細胞をソーティングにより回収し、好中球への分化誘導を試みた。iPS 細胞を用いた顆粒球輸血療法 (以下 iPS-GTX 療法) の臨床応用のためには下記の a)~d) の 5 つの技術開発が必要になるため、それぞれについて研究期間内に並行して検討を進めた。

2-1 iPS 細胞から顆粒球への再分化を効率的に行う技術開発

成人への GTX 療法を行う際に、循環血液量を 5L と仮定し、10 日間の連続輸注により毎日 $100/\mu\text{l}$ の好中球数上昇を目指す場合、計算上計 5.0×10^9 個の顆粒球が必要となる。臨床実用に向けては 10 倍の効率化が必要と考えられ、下記の方法での効率化を検討した。

1) 一過性の遺伝子導入：G-CSF 受容体活性化型変異である CSF3R_T617N 変異、造血幹細胞の増幅に関与する HOXB4、骨髓球系の分化に Pu. 1 のベクターを作成し、遺伝子導入により好中球への分化効率を検討する。2) サイトカインミックスの内容検討：SCF や TPO、FLT3、IL-3、IL-6、G-CSF などを添加した。3) 小分子化合物等の添加：(Wnt 活

性化剤、mTOR 阻害剤)、4) 骨髄球系以外の系統への分化ブロック：各種血球分化制御因子の活性化、あるいは抑制により骨髄球系への分化を促進可能かどうかについて検討する。

2-2 細胞死誘導システムの導入 (腫瘍化防止のための Fail-safe 装置の搭載)

遺伝子導入後には、既に養子細胞療法の安全スイッチとして有効性が示されている細胞死誘導システムである、1) ガンシクロビル (GCV) と単純ヘルペスウイルス 1 型チミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子発現を用いたシステム、または、2) FK 結合タンパクと Caspase 9 の融合タンパクを用いたシステムを搭載し、有効性を検討する。

2-3 iPS 細胞由来顆粒球の機能評価系の確立

iPS 細胞から再分化誘導した顆粒球の機能として、1) 好中球活性酸素産生能 (DHR assay)、2) 貪食能および NBT 還元能、3) 遊走能、4) 生体内における機能 (マウス菌血症モデルにおける iPS 細胞由来顆粒球有効性) を評価する。

2-4 輸注細胞のリンパ球、赤血球等顆粒球以外の細胞の混入に関する対応方法の確立

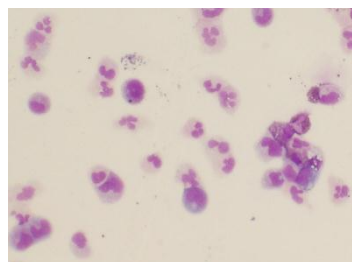
従来の GTX 療法の際には輸血後 GVHD を予防するために 15-50 Gy の放射線照射を行うため、同様の方法を採用し、照射後の顆粒球が照射前と比較して同等の機能を有するかどうかを検討する。

3. 研究の成果

3-1 iPS 細胞から顆粒球への再分化を効率的に行う技術開発

顆粒球への再分化のため、SCF、TPO、FLT3、IL-3、IL-6 を添加して 7 日間培養後、G-CSF

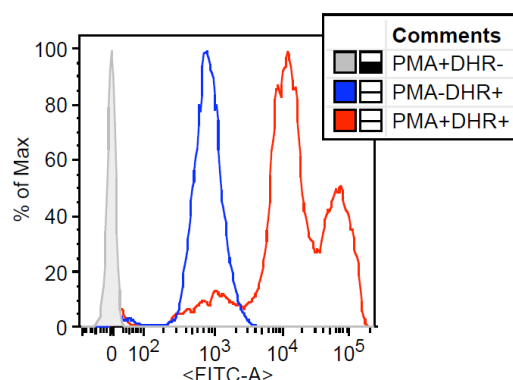
を添加して 7 日間培養した場合には、平均して好酸球 55.2%、好中球 19.7%と好酸球への分化傾向が強かったが、G-CSF のみを 9 日間添加した場合は、好中球 40%、好酸球 6.5%と主として好中球に分化しており、効率よく好中球へ分化させることが可能であ



った。

3-2 iPS 細胞由来顆粒球の機能評価系の確立

好中球活性酸素産生能を評価する系である DHR assay を健常成人の末梢血顆粒球を用いて確立した。



また、我々の誘導方法ではリンパ球や赤血球系への分化は形態学的にはほとんど認めなかった。

4. 今後の課題

iPS 細胞からの顆粒球への再分化法について、サイトカインや小分子化合物の組み合わせ、添加のタイミングの条件検討を行い、G-CSF 単独よりも効率向上が可能であるか検討する。また、一過性の遺伝子導入の効

果についても順次検討する予定である。
現状では OP9 細胞との共培養により血球分化を行っており、輸注細胞への混入が回避できないため、実用化に向けては表面マーカーでのソーティングもしくは feeder-free での培養のほか、血球の分化段階での細胞株化などが必要であると考えられる。

また、今後、DHR assay 以外の好中球機能評価系も確立し、iPS 細胞由来顆粒球の機能評価を多方面から実施予定である。

5. 研究成果の公表方法

本研究の成果は英文原著論文や国内外の学会で発表する。また、東京大学医学部附属病院パブリック・リレーションセンターを通じ、新聞、ウェブなどのメディアに発表し、広く国民に研究成果を発信する。東京大学医学部附属病院血液・腫瘍内科のホームページにも掲載し、周知に努める。時期は、基礎的研究の研究成果が得られることが期待される平成 27 年度内を目指す。

以上