

奨励賞受賞者論文

ヒト末梢血由来単球を用いた新規 iPS 細胞の作出

—免疫制御系細胞を用いたトランスレーショナルリサーチをめざして—

平松 範子^{1,2}・山本 直樹²・磯谷 澄都³・近藤 征史³
今泉 和良³

(¹藤田医科大学大学院・医学研究科)

(²藤田医科大学研究支援推進センター・再生医療支援推進施設)

(³藤田医科大学医学部・呼吸器内科学 I 教室)

はじめに

喘息を含むアレルギー疾患は根治できず、薬剤や対症療法により制御できない病態がまだ多く存在する¹。そこで、アレルギーに対する薬剤や現行療法による効果を補足・増強させる新たな治療法として、がん治療でも臨床応用されている免疫細胞療法に期待が集まっており、制御性 T 細胞などを用いて病態を制御しようとするさまざまな研究が行われている²。しかし、免疫細胞療法の課題の 1 つとして、成分採血が複数回必要な場合が多く、患者の体に負担がかかる。そこで、すでにがん治療を目指した研究で報告があるように、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells : iPS 細胞) を治療用細胞の供給源とすることで、治療に必要な細胞を繰り返し分化誘導して利用できるのではないかと考えられている。

本稿では、低侵襲かつ複数の免疫系が関与するアレルギー疾患に対するオーダーメイド免疫細胞療法の開発や研究に応用できる新たなツールとして、筆者らが作出した単球由来 iPS 細胞について解説する。

1. iPS 細胞作出における由来細胞の選択

iPS 細胞は、高橋、山中らによって 2006 年にマウス線維芽細胞⁴、2007 年にヒト線維芽細胞⁵を由来細胞として初めて作製され、細胞移植による臨床をめざした再生医療、病態解明、創薬など幅広い研究領域におけるツールとして注目を集めている。最近、ヒト iPS 細胞は皮膚線維芽細胞⁶以外に、血液単核球細胞^{7,8}などの由来細胞から作製され研究に用いられている。iPS 細胞の特性として、外胚葉、中胚葉、内胚葉の細胞に分化できる多分化能を有することが前提であるが、Kim らは iPS 細胞がリプログラミングの過程において、由来細胞のエピジェネティックな記憶の影響を受けるため、

由来細胞の種類により iPS 細胞の三胚葉への分化能力に差が出ることを報告した⁹。一方、Nishizawa らはクローンによる iPS 細胞の多分化能の違いは由来細胞の種類に依存するものではなく、リプログラミングの過程における DNA メチル化の違いであり、由来細胞に関係なく異常な DNA メチル化を阻止して良質な iPS 細胞をクローニングすることで、優れた多分化能を有する iPS 細胞が作製できると提唱している¹⁰。しかし Nishizawa らの実験結果においても、血液細胞由来 iPS 細胞は血液細胞を由来細胞としない iPS 細胞と比べて、血液細胞への分化能が高いクローンが多かったと報告している¹⁰。

一方で、細胞移植治療などへの臨床応用を考えた場合、分化誘導時における iPS 細胞の残存による癌化のリスクを回避すること、由来細胞を採取する際の患者に対する侵襲がより低いこと、ゲノム情報の損傷や組換えによる変異が可能な限り低い由来細胞を採取することが望ましいとされる。わずかな侵襲で iPS 細胞を作製するための由来細胞を採取する方法として、末梢血液を採血するのは有用な方法の 1 つである。通常の臨床における採血量で、比較的低侵襲に採取することができる末梢血単核球細胞の中で最も多いリンパ球は、我々の体内においてすでに免疫反応の影響を受けており、細胞受容体遺伝子や抗体遺伝子に不可逆な組換えがおこっている。しかし、リンパ球から作製した iPS 細胞は限られた抗原に反応する免疫細胞への分化誘導に特化して^{11,12}、がん治療に向けた研究などへの応用が報告されている¹³。また、単核球のうち幹/前駆細胞は末梢血中に含まれる数が 0.01% 以下と非常に少ないため、少ない血液量で iPS 細胞を誘導する場合、前段階として増殖を促すような複数のサイトカインを添加した培地を用いて *in vitro* で増殖培養を行う必要がある。

末梢血液の有核細胞の中で、単球のゲノムは不可逆な組換え、変異、欠損などがおこっていないことから、筆者らは単球に注目した。単球は末梢血液中中に3~8%ほど含まれるため、iPS細胞を作製する由来細胞としては単核球の幹/前駆細胞よりも多い。さらに、単球は末梢血液において未熟な貪食細胞の1つであり、脾臓や血管の中にいる時は単球として存在するが、血管の外に出ると強力な貪食能をもつマクロファージ、さらに抗原提示を行う免疫の司令塔である樹状細胞に分化する¹⁵。そこで、筆者らはiPS細胞から免疫細胞を誘導し、限られた抗原だけではなく多様な抗原と免疫反応がおこるアレルギーの制御に応用することを目的とした場合のiPS細胞の由来細胞として、単球が適していると考えた。

2. 単球由来 iPS 細胞

iPS細胞作製のリプログラミング過程において、由来細胞を一時的に維持培養しなければならないが、単球は*in vitro*でほとんど増殖しないため、iPS細胞を作製することは容易ではない。これまで唯一、Nakanishiらが開発した特殊な持続発現型センダイウイルスベクター (SeVdp)^{16,17}を用いることで単球由来iPS細胞を作製することに成功したと報告されている¹⁸。

筆者らは、細胞増殖に関わるサイトカインを使用せず、細胞活性を維持したシンプルな単球の培養方法を探索し、さらに培養した単球細胞の染色体を傷つけずに遺伝毒性がないとされる市販ベクターを用いて、適切な時期にリプログラミングを行い、フィーダーフリーのヒト単球由来iPS細胞 (human monocyte-derived iPS cells : hM-iPSC) の新しい作製培養法を確立した。詳細な実験方法については、既に論文報告している¹⁹のでここでは概要を記述する。健康人ボランティアのヒト末梢血10mLを密度勾配遠心溶液のOptiPrep™ (Alere Technologies AS, Oslo, Norway)の上に重層して800G、20℃で20分間遠心して単核球を分離した。Phosphate-buffered saline (PBS)にて2回洗浄後、単核球にanti-human CD14-FITC labeled antibodyとanti-human CD19-PE labeled antibody (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA)を4℃

で20分間反応させ、洗浄後にFACSVantage SE (BD Bioscience, San Jose, CA)を用いてCD14⁺/CD19⁻ cellをソーティングして単球を分離した。分離した単球は、細胞の付着を抑制する24 multi-well plate (CellSeed Inc., Tokyo, Japan)に播種し、1mLの単球維持培地で浮遊培養した。培養2日目に市販のセンダイウイルスベクターのCytoTune®-iPS 2.0 (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Aichi, Japan)を単球に感染させて遺伝子導入した。遺伝子導入3日目、浮遊培養していた単球をcell adherent 24 multi-well plate (BD Bioscience)を用いて、予め培養しておいたフィーダー細胞のMouse embryonic fibroblast : MEF (Oriental Yeast Co., ltd., Tokyo, Japan)の上に播種し、1mLの単球維持培地にて培養した。遺伝子導入後6日目までは、毎日、単球維持培地を交換した。遺伝子導入後7日目、培養液を5 ng/mL bFGF (ReproCELL Inc., Kanagawa, Japan)を添加したPrimate ES Cell Medium (ReproCELL Inc.)に交換した。その後、毎日培地を交換して、遺伝子導入後3週間後にはiPS細胞様コロニーが観察されたので、酵素を用いて細胞をプレートから剥離し、PBSにて洗浄後、新しい処理済みMEFの上に継代培養した。2回目の継代以降は、フィーダーフリー培養用基材のCorning® Matrigel® hESC-qualified matrix (Corning Incorporated, Corning, NY)に変更し、培地は毎日交換して継代維持を行った。培養方法の概要を図1に示す。クローニングは96 well cellBIND plate (Corning Incorporated)を用いて限界希釈法を行い、クローニングした遺伝子導入細胞について、iPS細胞としての検証を行った。検証方法としては、Red-Color™ AP Staining Kit (System Biosciences, Inc., Palo Alto, CA)を用いたアルカリホスファターゼ (ALP) 染色、TaqMan® real-time PCR assaysのプロトコルにもとづいたiPS細胞マーカー遺伝子 : SOX2 (Hs00415716_m1), OCT3/4 (Hs00742896_s1), NANOG (Hs04260366_g1) 発現の相対定量解析、免疫蛍光染色による細胞核内のiPS細胞マーカー蛋白質であるanti-human SOX2 rat monoclonal antibody (1 : 100, Thermo Fisher Scientific Inc.), anti-human OCT3/4 rabbit polyclonal antibody (1 : 500, Medical

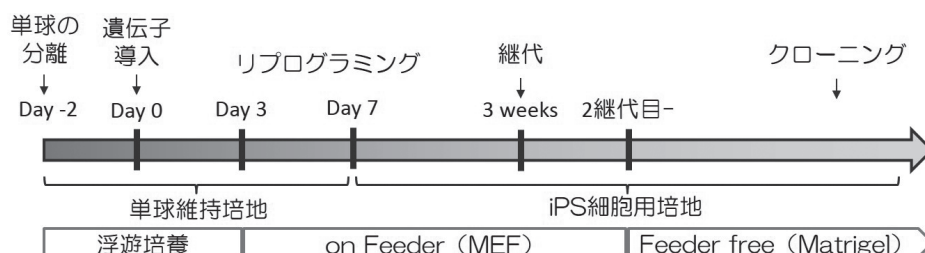


図1 単球からiPS細胞作製までの培養フローチャート

& Biological Laboratories), anti-human NANOG mouse monoclonal antibody (1 : 100, Thermo Fisher Scientific Inc.) の発現検証, FACS Can (Becton Dickinson) を使用したフローサイトメトリー分析による iPS 細胞膜蛋白質マーカーである anti-human SSEA-4 mouse monoclonal antibody, anti-human TRA-1-60 mouse monoclonal (IgM) antibody (1 : 100, Abcam plc., Cambridge, UK) の発現検証を実施した。また, 遺伝子導入後の細胞の多分化能を確認するために, クローニング後の細胞 1×10^6 cells を 24 well 浮遊細胞用マルチプレートに播種し, 1 mL の EB 培地にて培養し胚様体 embryoid body (EB) の作成を試みた。浮遊培養 10 日目の EB を回収し, 10% 中性緩衝ホルマリンで室温にて一晚固定した後, パラフィンブロックを作製した。この EB のパラフィンブロックから $3 \mu\text{m}$ のパラフィン切片連続標本を作製し, 発色基質として Liquid 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) + Substrate Chromogen System (Dako, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) を用いた免疫組織学的染色法により, 外胚葉マーカーの蛋白質である anti-human tubulin- β 3 mouse monoclonal antibody (1 : 100, Biogen, Inc., San Diego, CA), 中胚葉マーカーの蛋白質である anti-human alpha smooth muscle actin (α -SMA) rabbit polyclonal antibody (1 : 100, Abcam), 内胚葉マーカーの蛋白質である anti-human α -Fetoprotein (AFP) rabbit polyclonal antibody (Proteintech Group, Inc., Rosemont, IL) の発現を検証した。なお, 本研究で実施した iPS 細胞の作製に関する遺伝子組換え実験については, 藤田医科大学組換え DNA 実験安全委員会の審査を受け, 承認を得ている (承認番号: DP16051)。

結果として, ヒト末梢血から単核球を遠心比重法にて分離し, さらに $\text{CD14}^+/\text{CD19}^-$ cell をソーティングして単球のみを分離した (図 2 A)。単球を浮遊培養したところ, 細胞同士が接着した細胞凝集体が形成された (図 2 B)。MEF 上に播種した遺伝子導入後の細胞は, 導入後 2 週間ほどで小さい細胞が凝集したコロニーを複数形成し始め, 導入後 3 週間ほどで境界が明瞭で扁平な iPS 細胞様のコロニーが観察された (図 2 C)。3 継代目以降はフィーダーフリーで細胞を継代維持することが可能となり, 継代後も同様に iPS 細胞様のコロニーが形成された (図 2 D)。クローニング後の細胞は, ALP が陽性であった (図 2 E)。Real-time PCR による解析では, *SOX2* は遺伝子導入前の単球では検出感度以下であったが, 導入後の細胞では *SOX2* 遺伝子が検出された。また, 遺伝子導入前の単球に比べて導入後の細胞では *NANOG* 遺伝子は 26.4 ± 0.3 倍, *OCT3/4* 遺伝子は 13.4 ± 0.2 倍に発現が増加していた。

免疫染色では, 細胞の核内に *SOX2*, *OCT3/4*, *NANOG* 蛋白質の発現が観察された (図 3)。フローサイトメトリーによる解析では, 全ての細胞において *SSEA-4* と *TRA-1-60* が発現していた。EB では, tubulin- β 3, α -SMA, AFP のいずれのマーカーも発現しており, EB パラフィンブロックの連続標本において, 異なる部位に各マーカーが発現していた (図 4)。

本研究の最も重要なポイントは, 採血後に単球の生存率を高く保ちながら, 分化させずに維持し, かつ適切なタイミングでリプログラミングを開始することである。分離直後の単球の細胞周期は, ほぼ G0/G1 期であるが, 単球維持培地で 3 日間培養すると細胞は死滅せず, わずかに細胞周期が動き始めた状態となった (data not shown)。また, シャーレの中で添加因子を増やして単球を培養すると分化してしまうため, 生体の血管の中にいる時と比べて貪食能が高くなる。つまり, 必要最低限の培地組成と適切なタイミングで遺伝子導入してリプログラミングを行うことで, iPS 細胞で検出される遺伝子や蛋白質を発現し, 三胚葉への多

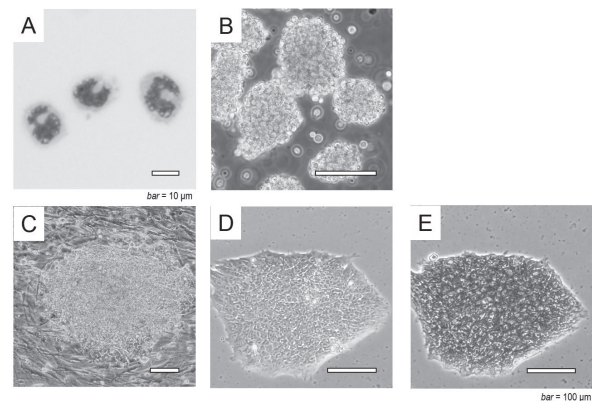


図 2 末梢血単球の遺伝子導入前後の細胞形態

末梢血単核球細胞から $\text{CD14}^+/\text{CD19}^-$ cell を sort して単球を分離した。(A) 分離した $\text{CD14}^+/\text{CD19}^-$ cell は, $10 \mu\text{m}$ 以上の大きさで核形不整, 空胞を有する単球であった ($\text{bar} = 10 \mu\text{m}$)。 (B) 3 日間浮遊培養したところ, ごくわずかに死細胞が観察されたが, ほとんどは生細胞であり細胞凝集体を形成していた。(C) 遺伝子導入後 3 週間ほどで境界が明瞭で扁平な iPS 細胞様のコロニーがフィーダー細胞の上で観察された。(D) 継代してフィーダーフリー培養とクローニングを行ったコロニーの形態。(E) コロニーを形成した全ての細胞は ALP 陽性の細胞であった ($\text{B-E} : \text{bar} = 100 \mu\text{m}$)。

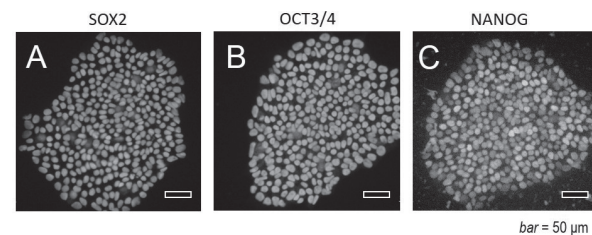


図 3 クローニング後の細胞の免疫染色

(A) 遺伝子導入後の細胞を *SOX2* 抗体で染色, (B) *OCT3/4* 抗体で染色, (C) *NANOG* 抗体で染色した。いずれの抗体でも細胞核が陽性に染まっていた ($\text{bar} = 50 \mu\text{m}$)。

分化能を有する単球由来 iPS 細胞 (hM-iPSC) を作製することに成功した。

3. 展望と課題

iPS 細胞を臨床応用する際の課題は、分化誘導時における iPS 細胞の残存による癌化の可能性と移植した細胞の生着などであろう。iPS 細胞の残存を回避するためには、(1) 移植時において iPS 細胞が残留してい

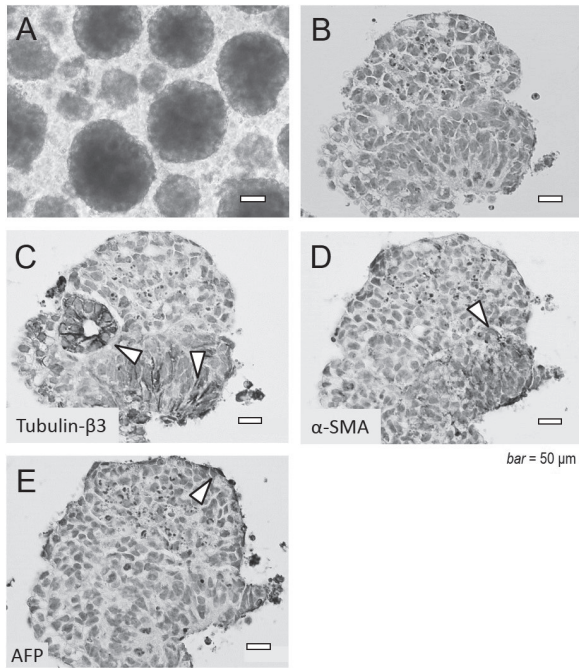


図4 EB形成と三胚葉マーカーの発現 (A) 浮遊培養プレートにEB培地で培養したところ、約200 μ mの大きさのEBが形成された。(B) EBのパラフィン切片を作製し、H.E.染色して形態を観察したところ、EB中心部まで細胞が充実に配置されており、EB中心部の細胞形態も維持されていた。EBを外胚葉マーカーのtubulin- β 3 (C)、中胚葉マーカーの α -SMA (D)、内胚葉マーカーのAFP (E)で染色したところ、異なる部位で各マーカー陽性細胞が観察された (bar = 50 μ m)。

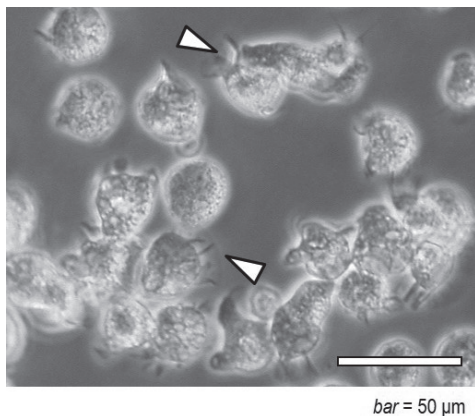


図5 単球由来 iPS 細胞から分化誘導した樹状細胞 ヒト単球由来 iPS 細胞を用いて、樹状細胞への分化誘導実験を実施したところ、樹状細胞のような突起を伸ばす形態の細胞が観察された。

ないように確実に取り除くこと、または(2)分化誘導条件を検討して、iPS細胞から目的とする細胞に全て確実に分化誘導できる条件を確立することである。

本研究の最終目的は、iPS細胞から分化誘導した免疫細胞を用いて、喘息などを含む根治が難しいアレルギー疾患の病態を抗原特異的に制御する新規免疫細胞療を開発することである。具体的には、患者由来のiPS細胞から免疫細胞として未感作リンパ球(Naïve-T cell)と樹状細胞を分化誘導^{21,22}し、病態に応じた抗原への免疫感作とサイトカイン(IL-35など)²³を添加して共培養し、抗原特異的な制御性T細胞を作製することを予定している。現在、作出したヒト単球由来iPS細胞を用いて、免疫の司令塔である樹状細胞への分化誘導実験を実施したところ、樹状細胞のような突起を伸ばす形態が観察され(図5)、CD209、CD83、HLA-DR蛋白質を発現し、抗原の添加によりMHCクラスII抗原であるHLA-DRを高発現する細胞が増加したという結果を得ている (data not shown)。

今後、単球由来iPS細胞から分化誘導した樹状細胞を用いて、ナイーブT細胞との共培養による活性化と多様な抗原蛋白質に対する免疫反応性の確認を行う。さらに、免疫制御系細胞(樹状細胞や制御性T細胞)への高効率で再現性の高い分化誘導プロトコルの確立が課題であり、疾患モデルマウスを用いた*in vivo*免疫抑制実験なども視野に入れている。また、由来細胞の異なるiPS細胞株や、同じ単球由来iPS細胞の中でも複数のクローンを用いた比較実験を実施し、単球由来iPS細胞の有用性を詳細に検索していく。

謝 辞

本研究は、科学研究費助成事業 科学研究費補助金若手研究18K15935(平成30~32年度)、基盤研究(C)JP17K09677, JP17K11495(平成29~31年度)の補助を受けて実施した。

文 献

- 1) 土屋 智: 気管支喘息—最近の話題—. 日臨内科医学会誌. 2017; 32: 517-520.
- 2) Pellerin L, Jenks JA, Bégin P, Bacchetta R, and Nadeau KC: Regulatory T cells and their roles in immune dysregulation and allergy. *Immunol. Res.* 2014; 58: 358-368.
- 3) Yamada D, Iyoda T, Vizcardo R, Shimizu K, Sato Y, Endo T, Kitahara G, Okoshi M, Kobayashi M, Sakurai M, Ohara O, Taniguchi M, Koseki H, and Fujii S: Efficient regeneration of human $V\alpha 24^+$ invariant natural killer T cells and their anti-tu-

- mor activity in vivo. *Stem Cells*. 2016 ; 34 : 2852 – 2860.
- 4) Takahashi K and Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 ; 126 : 663 – 676.
 - 5) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, and Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 ; 131 : 861 – 872.
 - 6) Jaenisch R and Young R : Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 2008 ; 132 : 567 – 582.
 - 7) Churko JM, BurrIDGE PW, and JC Wu : Generation of human iPSCs from human peripheral blood mononuclear cells using non-integrative Sendai virus in chemically defined conditions. *Methods. Mol. Biol.* 2013 ; 1036 : 81 – 88.
 - 8) Chen IP, Fukuda K, Fusaki N, Iida A, Hasegawa M, Lichtler A, and Reichenberger EJ : Induced pluripotent stem cell reprogramming by integration-free Sendai virus vectors from peripheral blood of patients with craniometaphyseal dysplasia. *Cell. Reprogram.* 2013 ; 15 : 503 – 513.
 - 9) Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LI, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff KC, Hongguang H, McKinney FS, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, and Daley GQ : Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2010 ; 467 : 285 – 290.
 - 10) Nishizawa M, Chonabayashi K, Nomura M, Tanaka A, Nakamura M, Inagaki A, Nishikawa M, Takei I, Oishi A, Tanabe K, Ohnuki M, Yokota H, Koyanagi-Aoi M, Okita K, Watanabe A, Takaori-Kondo A, Yamanaka S, and Yoshida Y : Epigenetic variation between human induced pluripotent stem cell lines is an indicator of differentiation capacity. *Cell Stem Cell*. 2016 ; 19 : 341 – 354.
 - 11) Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya H, Fusaki N, Hasegawa M, and Fukuda K : Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*. 2010 ; 7 : 11 – 14.
 - 12) Loh YH, Hartung O, Li H, Guo C, Sahalie JM, Manos PD, Urbach A, Heffner GC, Grskovic M, Vigneault F, Lensch MW, Park IH, Agarwal S, Church GM, Collins JJ, Irion S, and Daley GQ : Reprogramming of T cells from human peripheral blood. *Cell Stem Cell*. 2010 ; 7 : 15 – 19.
 - 13) Maeda T, Nagano S, Ichise H, Kataoka K, Yamada D, Ogawa S, Koseki H, Kitawaki T, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Masuda K, and Kawamoto H : Regeneration of CD8 $\alpha\beta$ T Cells from T-cell-Derived iPSC Imparts Potent Tumor Antigen-Specific Cytotoxicity. *Cancer Research*. 2016 ; 76 : 6839 – 6850.
 - 14) Nakanishi M and Otsu M : Development of Sendai virus vectors and their potential applications in gene therapy and regenerative medicine. *Curr. Gene. Ther.* 2012 ; 12 : 410 – 416.
 - 15) Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, and Pittet MJ : Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009 ; 325 : 612 – 616.
 - 16) Nishimura K, Segawa H, Goto T, Morishita M, Masago A, Takahashi H, Ohmiya Y, Sakaguchi T, Asada M, Imamura T, Shimotono K, Takayama K, Yoshida T, and Nakanishi M : Persistent and stable gene expression by a cytoplasmic RNA replicon based on a noncytopathic variant Sendai virus. *J. Biol. Chem.* 2007 ; 282 : 27383 – 27391.
 - 17) Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta B, Umemura Y, Nakajima Y, Ikehara Y, Kobayashi T, Segawa H, Takayasu S, Sato H, Motomura K, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Asashima M, Nakauchi H, Yamaguchi T, and Nakanishi M : Development of defective and persistent Sendai virus vector : a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J. Biol. Chem.* 2011 ; 286 : 4760 – 4771.
 - 18) Iizuka-Koga M, Asashima H, Ando M, Lai CY, Mochizuki S, Nakanishi M, Nishimura T, Tsuboi H, Hirota T, Takahashi H, Matsumoto I, Otsu M, and Sumida T : Functional analysis of dendritic cells generated from T-iPSCs from CD4⁺ T cell

- clones of Sjögren's Syndrome. *Stem Cell Reports*. 2017 ; 8 : 1155 – 1163.
- 19) Isogai S, Yamamoto N, Hiramatsu N, Goto Y, Hayashi M, Kondo M, and Imaizumi K : Preparation of induced pluripotent stem cells using human peripheral blood monocytes. *Cell. Reprogram*. 2018 [in press].
- 20) Kanai T, S Makita, T Kawamura, Y Nemoto, D Kubota, K Nagayama, T Totsuka and M Watanabe : Extracorporeal elimination of TNF- α -producing CD14 (dull) CD16 (+) monocytes in leukocytapheresis therapy for ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis*. 2007 ; 13 : 284 – 290.
- 21) Senju S, Haruta M, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takahashi K, Okita K, Yamanaka S, and Nishimura Y : Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2009 ; 27 : 1021 – 1031.
- 22) Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Honda-
Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, and Saito MK : Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell-free conditions. *PLoS One*. 2013 ; 8 : e59243.
- 23) Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, Finkelstein D, Forbes K, Workman CJ, Brown SA, Rehg JE, Jones ML, Ni HT, Artis D, Turk MJ, and Vignali DA : IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat. Immunol*. 2010 ; 11 : 1093 – 1101.
- 24) Suzuki M, Yokota M, Nakamura Y, Ozaki S, and Murakami S : Intranasal administration of IL-35 inhibits allergic responses and symptoms in mice with allergic rhinitis. *Allergol. Int*. 2017 ; 66 : 351 – 356.