

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10902

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来角膜内皮細胞を用いたT細胞免疫特権機構の解析

研究課題名(英文) Immunological properties of corneal endothelial cells derived from human induced pluripotent stem cells

研究代表者

羽藤 晋 (Shin, Hatou)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任講師

研究者番号：70327542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：角膜内皮細胞(CECs)は神経堤細胞(NCCs)から分化し、眼前房内の免疫寛容に重要と思われるが、その免疫学的機能についてはよく知られていない。今回の研究では、誘導効率にすぐれたiPS細胞由来NCCs(iPS-NCCs)を用いての免疫特性解析を中心に進めた。iPS-NCCsはin vitro実験系で免疫原性が低く、免疫抑制能があることがわかった。iPS-NCCsはT細胞の増殖と炎症性サイトカインの分泌を抑制した。iPS-NCCsはTGF- β を発現しており、TGF- β がT細胞活性の抑制に深くかかわっていた。細胞治療実用化を想定した場合に、NCCsの低い免疫原性と、免疫抑制能は有利と思われる。

研究成果の概要(英文)：Corneal endothelial cells (CECs) are developed from neural crest cells (NCCs) and may play a role in anterior chamber associated immune deviation, but exact mechanism is yet to be known. In this study, we focused on immunological properties of iPS-cell-derived-NCCs (iPSC-NCCs), because of its high efficiency of induction. iPSC-NCCs were hypoimmunogenic and had immunosuppressive properties in vitro. iPSC-NCCs greatly inhibited T-cell activation (cell proliferation, production of inflammatory cytokines). iPSC-NCCs constitutively expressed TGF- β , and TGF- β produced by iPSC-NCCs played a critical role in T cell suppression. Hypoimmunogenic and immunosuppressive properties of NCCs may contribute to the realization of using stem cell-derived NCCs in cell-based medicine.

研究分野：眼科学

キーワード：iPS細胞 神経堤細胞 角膜内皮細胞 免疫寛容 T細胞 TGF-

1. 研究開始当初の背景

ヒト角膜は上皮、実質、内皮の三層で構成されている。角膜内皮細胞はポンプ機能を持ち、角膜の透明性の維持に重要な役割を果たしているが、ヒト角膜内皮細胞は基本的に増殖できない。ヒト角膜内皮細胞は、加齢、内眼手術、ぶどう膜炎、感染等の様々な要因により減少する。500 個/mm² 以下まで減少すると、角膜は透明性を維持できず、水疱性角膜症という不可逆的な視力障害を来す。現在まで水疱性角膜症に対する根本的な治療としては、献眼から得られたヒト角膜を移植する方法しかない。角膜移植は有効な治療法であるが、慢性的にドナーが不足しており、治療を受けられない患者が多くいることが問題になっている。

2006 年に京都大学の山中らが人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を発表した。iPS 細胞は、多分化能を持っているため、再生医療への応用が期待され、国内外の多くの研究室で研究されている。

当研究室では、ヒト iPS 細胞から中間段階の神経堤細胞の誘導を経て、角膜内皮細胞を誘導する方法により、水疱性角膜症の新規治療法の開発に取り組んでいる。ドナー角膜と同程度のポンプ機能を有する誘導角膜内皮細胞を iPS 細胞から大量に製造出来れば、ドナー不足の解消につながる可能性がある。

発生学的に角膜内皮細胞は神経堤由来とされている。神経堤は脊椎動物に特有の組織であり、胎生期に神経管と表皮の間から出現し、全身に遊走し、平滑筋細胞や脂肪細胞など様々な細胞に分化する。また、ヒトへの移植を前提とした角膜内皮細胞の誘導は完成していないが、神経堤細胞の誘導方法はすでに報告されている。誘導神経堤細胞は、動物実験で創傷治療能を持つことが知られており、さらに近年では神経堤の発生異常を持つモデル動物の治療にも有効であることが報告されている。

誘導角膜内皮細胞と誘導神経堤細胞は、新規治療法の開発に役立つ可能性がある。ヒトへの臨床応用を行う前に、その免疫学的特性を評価することは重要である。

2. 研究の目的

当初はヒト iPS 細胞から誘導した角膜内皮細胞を使っての免疫特性解析を試みたが、再現性に課題があったため、発生学的に角膜内皮細胞の前段階の iPS 細胞由来神経堤細胞を用いての免疫特性解析を中心に進めた。

本研究の目的は、In vitro の系で、誘導神経堤細胞の免疫学的特性 (免疫原性、T 細胞抑制能) を評価することである。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞 (253G1、201B7) から既報のプロトコルを改変したものを利用して、神経堤細胞を誘導した。

誘導神経堤細胞の免疫原性を調べるため

に、ヒト iPS 細胞と誘導神経堤細胞の HLA class I、HLA class II、共刺激分子の発現をフローサイトメトリーで比較した。

次に、誘導神経堤細胞と末梢血単核球 (PBMC) を共培養し、T 細胞の増殖が抑制されるかを調べた。まず、健康成人ボランティアから末梢血を採取し、密度勾配遠心法により、PBMC を分離した。PBMC 単独培養、PBMC とヒト iPS 細胞の共培養、PBMC と誘導神経堤細胞の共培養の 3 群で、T 細胞の増殖を比較した。いずれも、インターロイキン 2 含有培地で培養し、T 細胞の増殖を促すために抗 CD3 刺激抗体と抗 CD28 刺激抗体を添加した。72 時間の培養の後に、PBMC を回収した。PBMC を、細胞増殖のマーカーである Ki67 の抗体と T 細胞のマーカーである CD3 の抗体で二重染色を行い、T 細胞の増殖をフローサイトメトリーで解析した。

続いて、誘導神経堤細胞が持つ T 細胞抑制能の原因分子を特定するために、ヒト iPS 細胞と誘導神経堤細胞の遺伝子発現パターンの比較を目的として、DNA マイクロアレイの受託解析を行った。誘導神経堤細胞において、TGF- β の発現上昇があったため、その発現をフローサイトメトリーと免疫組織染色で確認した。

最後に、上記と同様の誘導神経堤細胞と PBMC の共培養に、TGF- β シグナルを阻害する SB431542 を添加して、誘導神経堤細胞が保持する T 細胞抑制能が解除されるかを確認した。

4. 研究成果

(1) iPS 細胞から神経堤細胞の誘導

既報のプロトコルを改変することで、再現性よく神経堤細胞を誘導することができた。誘導神経堤細胞は多分可能を維持しており、軟骨細胞、脂肪細胞、骨細胞に分化可能であることを確認した。

(2) 誘導神経堤細胞の免疫原性

誘導神経堤細胞は iPS 細胞よりも HLA class I とその構成タンパク質である 2-microglobulin の発現が低かった (図 1)。HLA class II と共刺激分子 (CD80、CD86、PD-L1、PD-L2) については両者とも発現がなかった。

(3) 誘導神経堤細胞の T 細胞抑制能

PBMC の単独培養群では、細胞がクラスターを形成し、T 細胞の増殖は活発であった。PBMC と iPS 細胞の共培養群でも、単独培養群と同様に T 細胞の増殖は活発であった。しかし、PBMC と誘導神経堤細胞の共培養群では、細胞のクラスター形成は不良であり、T 細胞の増殖は有意に抑制された。T 細胞の分画で調べたところ、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞のいずれ分画でも増殖が抑制されていた (図 2)。

これら 3 群の培地中に含まれる、炎症性サイトカインの一種であるインターフェロンの濃度を調べたところ、PBMC と誘導神経堤

細胞の共培養群で有意にその濃度の低下が見られた。

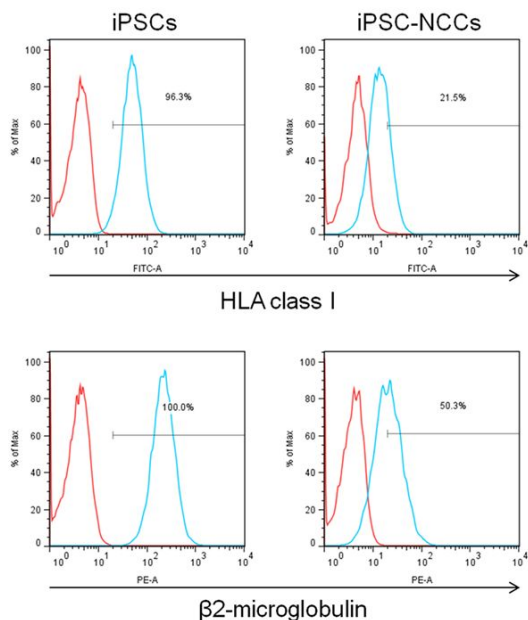


図 1 HLA class I 及び β 2-microglobulin 発現率の比較 (Flow cytometry)

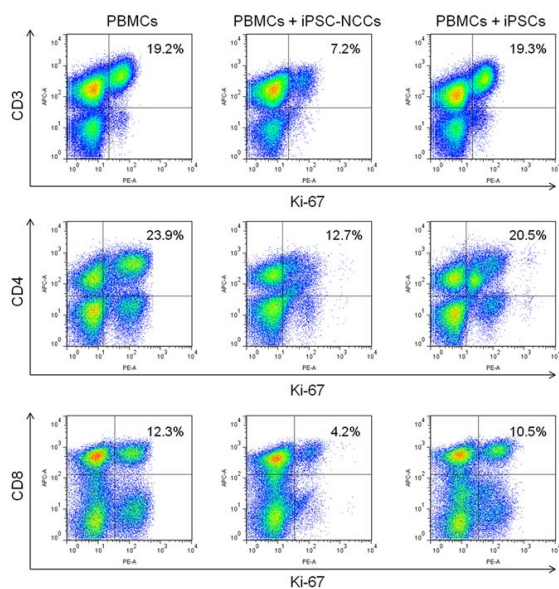


図 2 Ki-67 陽性率による増殖率比較 (Flow cytometry)

(4) T 細胞抑制能に関する原因分子

DNA マイクロアレイで iPS 細胞と誘導神経堤細胞の遺伝子発現パターンの比較を行った。T 細胞抑制能に関する既知の分子を中心に比較したところ、誘導神経堤細胞において TGF- β 1 と TGF- β 2 で遺伝子発現の上昇が見られた (図 3)。定量 PCR でも同様の結果が得られた。免疫組織染色では、誘導神経堤細胞の表面に membrane-bound TGF- β 2 が発現している、フローサイトメトリーでも細胞表面に TGF- β 2 が発現していることを確認した。

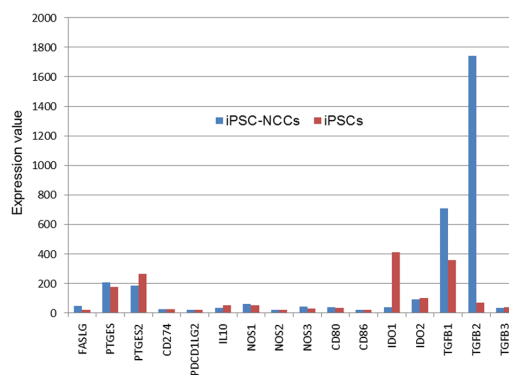


図 3 T 細胞抑制関連遺伝子発現の比較 (DNA microarray analysis)

(5) TGF- β シグナルの阻害による T 細胞抑制の解除

PBMC と誘導神経堤細胞の共培養に、SB431542 10 μ M 添加すると、誘導神経堤細胞が持つ T 細胞抑制能が解除され、T 細胞の増殖が確認された (図 4)。SB431542 を添加することで、培地中のインターフェロンの濃度も有意に上昇した。

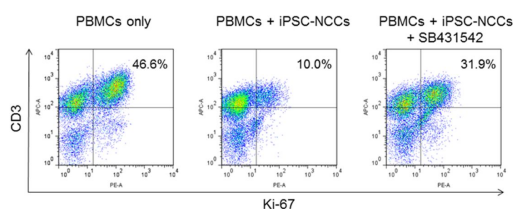


図 4 TGF- β シグナル阻害剤による T 細胞増殖率の変化 (Flow cytometry)

以上より、誘導神経堤細胞は免疫原性が低く、T 細胞抑制能を持ち、そこには TGF- β が深く関与していることが示唆された。これは、ヒトへの移植を想定した場合に、炎症反応や拒絶反応を起こしにくいと予想され、移植細胞としては有利な結果である。

以上の内容を第 121 回日本眼科学会総会でポスター発表 (筆頭演者は大学院生の藤井祥太) を行い、学術展示優秀賞を受賞した。その受賞講演として、藤井祥太が、第 71 回日本臨床眼科学会で口頭発表を行った。今後は誌面での発表を予定している。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

藤井祥太、杉田直、羽藤晋、榛村重人、

高橋政代、他. ヒト iPS 細胞由来神経堤細胞の免疫学的特性、第 121 回日本眼科学会総会、2017 年
藤井祥太、杉田直、羽藤晋、榛村重人、高橋政代、他. ヒト iPS 細胞由来神経堤細胞の免疫学的特性、第 71 回日本臨床眼科学会、2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽藤 晋 (Hatou, Shin)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・特任講師

研究者番号 : 70327542

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

榛村 重人 (Shimmura, Shigeto)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・准教授

藤井 祥太 (Shota, Fujii)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・博士課程 4 年

吉田 悟 (Yoshida, Satoru)

医薬基盤健康栄養研究所・難治性疾患研究開発支援センター・プロジェクトマネージャー

杉田 直 (Sugita, Sunao)

理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・副プロジェクトリーダー

高橋 政代 (Takahashi, Masayo)

理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・プロジェクトリーダー