

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19493

研究課題名(和文)ES細胞由来ミエロイド細胞(ES-ML)を用いた神経自己免疫疾患の細胞治療

研究課題名(英文)The therapy of autoimmune disease by ES cell-derived myeloid cells (ES-ML)

研究代表者

池田 徳典(Ikeda, Tokunori)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00613530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウス及びヒトのES、iPS細胞由来のミエロイド細胞(ES、iPS-ML)を利用して、自己免疫疾患モデルマウスの細胞治療について主に検討を行った。免疫抑制性分子TRAILを遺伝子導入したES-MLで自己免疫疾患モデルマウスの臨床症状の改善が見られたが、多くの投与細胞数が必要であった。一方、ES、iPS-MLはマクロファージに類似した細胞で、免疫抑制性マクロファージに属する細胞表面分子(CD206、CD163)を発現していた。ML細胞のヒトへの臨床応用として、自己免疫疾患よりは、マクロファージ機能が利用可能な疾患の方が適している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：I investigated whether or not ES or iPS cell derived myeloid cell (ES-, iPS-ML) had the immunoinhibitory function for experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). The administration of TRAIL, which function immunoinhibitory molecule, gene transferred ES-ML (ES-ML-TRAIL) improved the clinical symptoms of EAE. However, a lot of ES-ML-TRAIL were needed to ameliorate the state of EAE. On the other hand, ES- or iPS-ML functioned like a macrophage, and expressed immunoinhibitory macrophage's marker, CD163 and CD206. These results suggested the possibility that the application of ES- or iPS-ML was appropriate in the diseases that macrophage's function were available, but autoimmune diseases.

研究分野：Neurology

キーワード：ES細胞由来ミエロイド細胞 iPS細胞由来ミエロイド細胞 実験的自己免疫性脳脊髄炎 免疫抑制性マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は、様々な自己抗原に対して免疫寛容が破綻した結果、病原性 T 細胞の攻撃により組織障害を来す疾患である。これに対する現在の治療法として、免疫抑制剤や分子標的薬が使用されているが、これらの薬剤を使用することで、免疫応答能が全般性に低下し感染症誘発等の危険性が高まることが懸念される。そこで、全体的な免疫応答能を低下させずに、自己抗原に対する免疫応答のみを特異的に抑制する治療法の開発が期待される。

このような背景から我々は全身的な免疫抑制状態に陥らせることなく、免疫制御を誘導する手法の開発に取り組んできた。そのため的手段として、T 細胞への抗原提示機能に特化した細胞である樹状細胞を利用する方法について検討し、マウス ES 細胞より樹状細胞 (ES-DC) を分化誘導する方法を確立している。さらに ES 細胞に myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 由来のペプチドをコードする遺伝子と、免疫抑制性分子である TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) とを遺伝子導入し、ES-DC へ分化させた MOG 抗原特異的で且つ免疫抑制性機能を有する遺伝子改変 ES-DC (ES-DC-TRAIL/MOG) を作製した。そして、これをマウスに前投与することにより、MOG ペプチドで誘導される実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症が抑制できることを報告している。

以上の成果を利用して我々は、TRAIL が Treg 細胞に対しては細胞増殖性に働く一方で、IFN- γ 産生 CD4 陽性 T 細胞や通常の CD4 陽性 T 細胞に対しては増殖抑制性に働くという全く別々の作用を示すことを見出した。

これらの研究成果は、“自己免疫疾患発症に関与する自己抗原と TRAIL とを強制発現させることにより、抗原特異的な免疫抑制機能を有する遺伝子改変 ES-DC を作製できること、さらにこれを個体へ投与することにより、自己抗原特異的な免疫制御が可能であること”を示唆する実験結果である。そのため、この手法が複数の自己抗原が関与しているヒトの自己免疫疾患の治療においても有効であるかどうかを検証するために、単一抗原による誘導型自己免疫疾患モデルマウスの EAE だけではなく、複数の自己抗原が関与する自然発症型の自己免疫疾患モデルマウスである 1 型糖尿病モデルマウスの NOD マウスにおいても実験を行った。

その結果、自己抗原や免疫抑制性分子の遺伝子導入を行った遺伝子改変 ES-DC だけではなく、ES-DC 自体が免疫抑制性機能を有していること、ES-DC は主に Th1 細胞を抑制することが判明した (ikeda et al, PLoS One, 2014)。これらの結果からは、自己抗原や免疫抑制性分子の遺伝子導入を行わなくても、ES-DC 自体が免疫抑制性あるいは免疫制御性の機能を有している可能性が示唆される。

しかしながら、幾つかの問題点も存在する。ES, iPS 細胞から ES-DC への分化誘導に 3~4 週間程度の期間を必要とする点や、一度の工程で得られる ES-DC の細胞数が限られているため、継続投与が難しい点が課題である。

そのため我々は、マウス及びヒトの ES, iPS 細胞から大量のミエロイド系免疫細胞を作製する方法を開発し、これを ES, iPS-ML と命名している。ES, iPS-ML は通常、DC よりもマクロファージに類似した細胞であるものの、細胞表面マーカー上は CD11b や CD11c, クラス II 分子を発現しており、抗原提示能を有することが示唆される。ES, iPS-ML は単純な浮遊培養系で長期間にわたり増殖する細胞であり、自動培養装置を用いることで大量生産培養が可能である。

本研究は、主にこの大量培養が可能な ES-ML と iPS-ML を利用して、自己免疫疾患モデルマウスの細胞治療の可能性について検討を行った。

2. 研究の目的

- (1) EAE マウスに対して、臨床症状の発症後 (尾部の麻痺) に ES-ML を投与し、実際のヒトの臨床に沿った治療効果 (臨床症状改善効果) の判定
- (2) ES-ML に TRAIL の遺伝子導入を行い、より強力な免疫抑制あるいは制御が可能な遺伝子改変 ES-ML (ES-ML-TRAIL) を作成および EAE の治療検討
- (3) iPS-ML 細胞のマクロファージ機能の確認

3. 研究の方法

ES-ML の EAE 誘導マウスへの症状発症後の投与を行った。臨床症状を発症した MOG 誘導性の EAE に ES-ML を複数回投与し、非投与群と比較してその後の臨床症状が軽快するか検討を行った。

次に、より強力な免疫抑制作用を有する ES-ML を作製するために、免疫抑制分子 TRAIL を遺伝子導入した遺伝子改変 ES-ML-TRAIL の作製し、ES-ML-TRAIL 投与による EAE 誘導マウスへの症状改善効果の確認と解析を行った。さらに研究成果の項目で後述するが、ES-ML では EAE の抑制効果を認めず、ES-ML-TRAIL でも EAE の抑制効果のためには大量の細胞を必要としたことから、ML 細胞のマクロファージとしての有用性を確認するために、iPS-ML において免疫抑制性マクロファージの発現マーカーの確認と貪食効果の確認を行った。

尚、マウスの臨床症状の判別には下記のスコアを用いた。

臨床評価の判別方法

下記の EAE clinical score を用いて判定を行った (7 段階評価)

- 0: 正常
- 1: 尾の脱力 かつ/または 遠位 1/2 の麻痺
- 2: 尾の完全麻痺 かつ 歩行異常
- 3: 後肢の部分的な麻痺
- 4: 後肢の完全麻痺
- 5: 前肢の麻痺 または 瀕死状態
- 6: 死亡

統計解析方法

EAE clinical score の研究データは連日の臨床症状をスコアにて評価するものであり、経時データに該当する。そのため、解析手法は混合モデルを用いて行った (図 1)。EAE

図1 統計学的モデルの概要

$$Y_{ij} = \alpha_0 + \beta_0 Y_{i\text{pre}} + \beta_1 \text{group}_i + \beta_2 Z_i + \varepsilon_{ij}$$

α_0 : 全体に共通の切片
 $Y_{i\text{pre}}$: 毎のEAE clinical scoreの値 (day10時点が該当)
 group_i : 治療グループ
 Z_i : 時点*i*に関するダミー変数
 $z = 1$ 投与11日後
 $z = 2$ 投与12日後
 :
 $z = 18$ 投与28日後
 $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$, 時点*j*毎に誤差が異なる

σ^2 の分散構造

$$\sigma^2 \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

独立

n数が少ないため、分散構造は“独立”に設定

clinical score は連続変数として扱った。

4. 研究成果

通常の ES-ML の免疫抑制効果を確認するために、MOG ペプチドと Complete Freund's adjuvant により C57BL/6 マウスに EAE を誘導後、尾部の麻痺が確認された誘導 10 日目より、 3.0×10^6 個 / 500 μ l (1 \times PBS) / 1 匹の ES-ML を 5 日間連続で腹腔投与し、その後の臨床症状の確認を行った。尚、コントロール群には、1 \times PBS の腹腔投与を 500 μ l (1 \times PBS) / 1 匹で行った。その結果、ES-ML 投与群は、コントロール群と比較して臨床症状の改善が殆ど認められなかった。また、連続投与日数を 7 あるいは 10 日に延長した場合でも同様に改善効果に乏しかった。

以上の結果から、通常の ES-ML において、免疫抑制効果は殆ど認められない可能性が考えられた。

そこで、より強力な免疫抑制作用を有する免疫抑制分子 TRAIL を遺伝子導入した遺伝子改変 ES-ML-TRAIL の投与を前述と同様の条件で行った。その結果、ES-ML-TRAIL は、5 日間連続投与では軽度の臨床症状の改善を認め、7, 10 日と連続投与回数を増やすに従って、ES-ML-TRAIL のより強い臨床症状の改善効果が確認された。

次にこれらの投与マウスにおける脊髄浸潤細胞について解析を行ったところ、ES-ML-TRAIL 群ではコントロール群及び ES-ML 群と比較し、CD11b 陽性ミエロイド細

胞の割合上昇、CD4 陽性 T 細胞の割合低下が確認された。CD4 陽性 T 細胞について、分画の検討をさらに行った結果 (Th1, Th17, Treg)、その割合について有意な差は認められなかったものの、脊髄浸潤 Th1 細胞数の減少がコントロール群と比較して認められた。

ここまでの経過から、ES-ML は ES-DC と比べると EAE の臨床症状を抑制するために、免疫抑制分子 TRAIL を遺伝子導入したとしても連続投与する必要性があり、また多量の細胞数が必要であった。この結果は、ES-ML の免疫抑制効果が ES-DC よりも弱いことを示唆する。そのため、ES-ML は大量生産が可能ではあるが、ヒトの自己免疫疾患に対する実際の臨床応用を念頭においた場合、その応用は難しいことが予想された。そこで、ML 細胞は DC よりもマクロファージに類似した細胞であることを考慮して、ML 細胞が抑制性マクロファージとして機能できないか検証を行った。その結果、iPS-ML 細胞は免疫抑制性マクロファージに属する細胞表面分子 (CD206, CD163) を発現し、貪食作用を有していた。

最終的に、ML 細胞の自己免疫疾患への応用は、多量の細胞を必要とする点で困難であることが予想されたが、本研究を遂行していく過程で、マクロファージ機能を利用してヒトの疾患に適應できる可能性が高まった。本研究成果の一部、あるいはその延長上に知り得た知見を報告した論文は、6 報であった。

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)

[雑誌論文](計 6 件)

- (1) Suenaga G, Ikeda T, Masuda T, Motokawa H, Yamashita T, Takamatsu K, Misumi Y, Ueda M, Matsui H, Senju S, Ando Y. Inflammatory state exists in familial amyloid polyneuropathy that may be triggered by mutated transthyretin. *Scientific Reports*. 2017 May 8;7(1):1579 査読有
- (2) Tsukamoto H, Fujieda K, Hirayama M, Ikeda T, Yuno A, Matsumura K, Fukuma D, Araki K, Mizuta H, Nakayama H, Senju S, Nishimura Y. Soluble IL-6R expressed by myeloid cells reduces tumor-specific Th1 differentiation and drives tumor progression. *Cancer Res*. Feb 24, 2017 査読有
- (3) Sakisaka M, Haruta M, Komohara Y, Umemoto S, Matsumura K, Ikeda T, Takeya M, Inomata Y, Nishimura Y, Senju S. Therapy of primary and metastatic liver cancer by human iPS cell-derived myeloid cells producing interferon- β . *J Hepatobiliary Pancreat* Feb;24(2):109-119, 2017 査読有

- (4) Hosoi A, Su Y, Torikai M, Jono H, Ishikawa D, Soejima K, Higuchi H, Guo J, Ueda M, Suenaga G, Motokawa H, Ikeda T, Senju S, Nakashima T, Ando Y. Novel Antibody for the Treatment of Transthyretin Amyloidosis. *J Biol Chem*. Nov 25;291(48), 2016 査読有
- (5) Suenaga G, Ikeda T, Komohara Y, Takamatsu K, Kakuma T, Tasaki M, Misumi Y, Ueda M, Ito T, Senju S, Ando Y. Involvement of Macrophages in the Pathogenesis of Familial Amyloid Polyneuropathy and Efficacy of Human iPS Cell-Derived Macrophages in Its Treatment. *PLoS One*. Oct 3;11(10):e0163944, 2016 査読有
- (6) Imamura Y, Haruta M, Tomita Y, Matsumura K, Ikeda T, Yuno A, Hirayama M, Nakayama H, Mizuta H, Nishimura Y, Senju S. Generation of Large Numbers of Antigen-Expressing Human Dendritic Cells Using CD14-ML Technology. *PLoS One*. Apr 6;11(4):e0152384, 2016 査読有

〔学会発表〕(計1件)

- (1) 池田徳典、千住覚.大量培養可能なES細胞由来ミエロイド細胞(ES-ML)を利用した自己免疫疾患モデルマウスの治療. 第114回日本内科学会講演会、2017.04.15、東京、東京国際フォーラム

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

池田 徳典 (IKEDA TOKUNORI)

熊本大学医学部附属病院

特任助教

研究者番号：00613530