

令和元年6月11日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11310

研究課題名(和文)人工多能性幹細胞由来のマクロファージ様免疫抑制性細胞を用いたぶどう膜網膜炎の制御

研究課題名(英文)Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis with macrophage-like induced pluripotent stem cell-derived suppressor cells

研究代表者

南場 研一(Namba, Kenichi)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：70333599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス脾臓B細胞由来の人工多能性幹(iPS)細胞から誘導したマクロファージ様免疫抑制性細胞(iPS-SCs)をヒト視細胞間レチノイド結合蛋白由来合成ペプチド(hIRBPP)1-20抗原から作製したマウス実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)に腹腔内投与することにより、眼底所見による臨床学的重症度とHE染色による組織学的重症度は、ともに対照群に比べ有意に炎症が軽症化した。In vitroの実験でもマウスEAUから採取したhIRBPP1-20抗原特異的なCD4陽性T細胞とhIRBPP1-20抗原と抗原提示細胞にiPS-SCsを加えて共培養すると、CD4陽性T細胞の増殖は有意に抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ぶどう膜炎の全身治療としてステロイド薬、免疫抑制薬、生物学的製剤があるが、それらは根本的な治療ではないため減量中に炎症が再燃することや、有害事象が生じることが問題となる。一方、より有害事象が少ない可能性のある治療法として免疫療法があげられる。動物モデルマウスにおいて制御性T細胞や樹状細胞といった治療が試みられたが、誘導できる細胞数に限界があること、逆にぶどう膜炎を増悪させる細胞の混入・誘導の可能性があった。今回検討したiPS-SCsは、患者自身の細胞から誘導するため、拒絶反応を起こさない点や大量に作製できる可能性がある点で、有用性が高いことが期待できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Macrophage-like induced pluripotent stem cells-derived suppressor cells (iPS-SCs) were induced from iPS cells derived from B cells enriched from mice spleen. The intraperitoneal administration of iPS-SCs significantly ameliorated experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) induced by the immunization of human interphotoreceptor-binding protein derived peptide (hIRBPP) 1-20 in both clinical severity with funduscopy and histological severity with HE staining than controls. In vitro experiment, hIRBPP1-20 antigen specific CD4 positive cells enriched from draining lymph nodes of immunized mice, antigen presenting cells and hIRBPP1-20 were co-cultured with or without iPS-SCs. As a result, we found that iPS-SCs significantly suppressed T cell proliferative response.

研究分野：眼科学

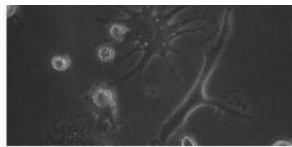
キーワード：マクロファージ様免疫抑制性細胞 マウス実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 抗原特異的なCD4+T細胞
iPS細胞 臨床スコア 組織学的スコア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

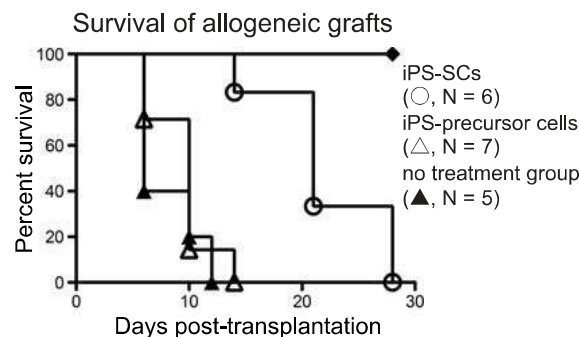
1. 研究開始当初の背景

ぶどう膜炎は40歳以上の中途失明原因の約10%を占める重要な疾患であり、その多くがペーチェット病やサルコイドーシスなど全身性炎症性疾患に伴うものである。これまでぶどう膜炎の治療には主としてステロイド薬、消炎鎮痛薬 (NSAIDs)、免疫抑制薬が用いられてきた。しかしこれらの治療は対症療法にすぎないため、減量とともに再発することが多く、したがって長期投与が余儀なくされ、いずれも副作用が高頻度に見られることが問題となっている。最近では、炎症性サイトカインに標的を絞った治療の開発研究・臨床応用が進んできている。例えば、難治性ペーチェット病に対する抗 tumor necrosis factor (TNF)- 抗体 (Ohno S et al: J Rheumatol, 2004) が高い有効性を示している。しかしこれも対症療法の域を出ることはなく、治療の継続が必要である点が問題となっており、根治治療にはほど遠いという現実がある。そこで、対症療法に頼らない根治治療を目指すべく、これまでにいくつかの免疫抑制性細胞を用いたぶどう膜炎制御に関する研究がおこなわれてきた。つまり、疾患の根幹にあると考えられている過剰な自己免疫反応を、免疫抑制性細胞を用いた免疫治療を行うことにより制御するという理論である。これまでに免疫抑制細胞として制御性 T 細胞と制御性樹状細胞の2種類の細胞が用いられ、マウスにおいて研究がなされてきた (Namba K et al: J Leukoc Biol, 2002. Usui Y et al: Arch Ophthalmol, 2009)。

これらの手法は遺伝的背景が同一な同系マウスでは別個体間での移入が可能であるが、ヒトへの臨床応用を考える際には患者本人の免疫抑制性細胞を用いることが必須条件となる。しかしながら、*in vitro* で免疫抑制性細胞を誘導・増殖させるには、得られる細胞数に限界があること、逆に免疫を増強させる細胞が混入するリスクがあることが問題であった。そんな中、共同研究者の清野研一郎の研究室において人工多能性幹細胞 (iPS) 細胞から誘導したマクロファージ様免疫抑制性細胞 (iPS-SCs) の誘導に成功した。この iPS-SCs はマクロファージと類似の細胞表面マーカーを持ち、抗原提示能を有する。マウスにおいて同種異系間の心筋様細胞の移植に際し、事前に iPS-SCs を投与しておくことにより移植片の生着期間が延長することを報告している (Sasaki H et al: Transplantation, 2015)。



EA1



この手法を用いることにより患者本人の iPS 細胞から誘導した充分量の免疫抑制性細胞を得ることが可能となり、自己免疫疾患の治療に有効であることが期待される。

2. 研究の目的

今回我々は効率的に充分量の細胞を得ることができるマウス iPS 細胞から誘導した iPS-SCs を用い、マウス EAU での有効性を検討する。

3. 研究の方法

マウス iPS 細胞から iPS-SCs を誘導し、それらの移入によりマウス EAU を抑制できるかどうか、以下の点について検討する。

(1) 誘導された iPS-SCs の機能について検証

In vitro での抗原特異的 T 細胞活性化抑制

iPS-SCs の機能について以下のことが判明している (Sasaki H et al: Transplantation, 2015)。

- ・ 同種異系 (アロ) 抗原に対する T 細胞の反応を強く抑制する。
- ・ その T 細胞抑制効果は誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 依存的である。

- ・ アロ抗原に対する抗体産生を抑制する。

しかし、抗原特異的な免疫抑制効果については検証されていないため以下の実験をおこなう。

ヒト視細胞間レチノイド結合蛋白由来合成ペプチド(hIRBPp)1-20抗原でC57BL/6マウスを免疫し、9日後にリンパ節を摘出する。リンパ節よりCD4陽性T細胞を抽出してT細胞増殖反応をみる際に、抗原を提示させたiPS-SCsを加えることで、細胞増殖反応、サイトカイン産生が抑制できるかどうかを検討する。また、iPS-SCsがT細胞の増殖を抑制する際に他の細胞(APCやCD4陽性T細胞)との細胞間接着が必要かどうかを検討するために、0.4umの穴の空いたメンブレンの付着したtranswellを用いて、つまり液性因子が通過できる状態にして、iPS-SCsと他の細胞とを分離し、同様にT細胞増殖反応を検討した。

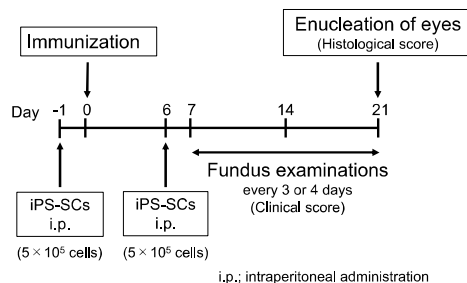
*In vivo*での抗原特異的T細胞活性化抑制

抗原を提示させた iPS-SCs を事前に腹腔内投与しておき、その後マウスを hIRBPp 抗原で免疫し9日後に取り出したリンパ節由来の CD4 陽性 T 細胞を用いて、抗原に対する CD4 陽性 T 細胞増殖反応をみる。

(2) iPS-SCs によるマウス EAU の抑制

誘導した iPS-SCs をマウスに腹腔内投与 (5 × 10⁵ 個/匹) をおこない、1日後に IRBP 由来合成ペプチドを免疫し、EAU を誘導する。免疫6日後にも iPS-SCs をマウスに腹腔内投与 (5 × 10⁵ 個/匹) をおこない、7日後から3-4日おきに21日目まで、麻酔下で散瞳薬と検眼鏡を用いて経瞳孔的にマウス眼底検査を行う。我々の既報 (Namba K et al: J Immunol, 2000) に基づきぶどう膜炎を経時的に評価する (臨床的重症度)。また、21日目にマウスを安楽死させ、眼球を摘出し、固定後組織標本を作製し、組織学的に重症度を評価検討する (組織学的重症度)。

Suppression of EAU with iPS-SCs



なお、マウス iPS-SCs の誘導は、共同研究者清野研一郎の研究室において iPS-SCs の誘導手法は確立されている。C57BL/6 マウスの末梢血から MACS® ビーズカラムを用いて脾臓 B 細胞を抽出。ベクターを用いて Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Myc の 4 遺伝子を導入し 17 日間培養し iPS 細胞のコロニーを得る。iPS 細胞を leukemia inhibitory factor を除去した培地にて培養し 5 日目に胚様体を得る。この胚様体を血液細胞の分化を支持する OP9 細胞とともに培養するが、その際、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、IL-4 を加えて 20 日間培養し、その後リポポリサッカライドを添加して 2 日培養すると培養皿に強附着性の iPS-SCs が得られる。

EAU の誘導方法は、6 週齢の C57BL/6 マウスを hIRBPp1-20 (200 μg) と結核菌強化完全フロインドアジュバントの懸濁液で背部皮下に免疫する。追加免疫として百日咳菌毒素 (0.1 μg) を腹腔内投与して EAU を惹起する。約 10 日後に EAU を発症し、この手法はすでに我々の北海道大学眼科眼免疫学グループで確立されている (Iwata D et al: Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010)。

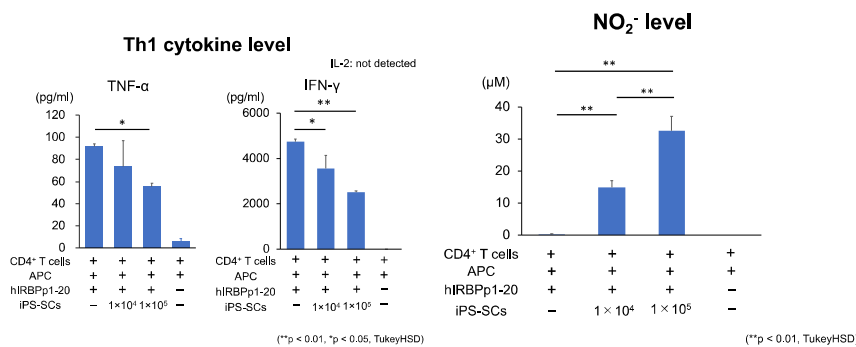
4. 研究成果

(1) 誘導された iPS-SCs の機能について検証

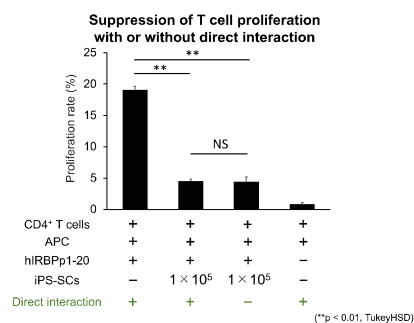
*In vitro*での抗原特異的 T 細胞活性化抑制

hIRBPp1-20 抗原で免疫し、9 日目に所属リンパ節を採取し、MACS®ビーズを用いて、CD4 陽性 T 細胞を抽出し、CellTrace Violet で蛍光標識を行った。1 ウェルに蛍光標識した CD4 陽性 T 細胞とナイーブなマウスの脾臓細胞由来の APC と hIRBPp1-20 抗原に iPS-SCs を加えて 4 日間共培養した後に、フローサイトメーターで CD4 陽性 T 細胞の増殖率を計測した。結果は、iPS-SCs を加えた群では細胞数に依存し、対照群と比較して抗原特異的な T 細胞の増殖を有意に抑制していることがわかった。

その際、同時に培養上清中の炎症性サイトカインや一酸化窒素(NO)の代替として亜硝酸(NO₂⁻)濃度について測定した。Th1 サイトカインであるインターフェロン(IFN)- γ や腫瘍壊死因子(TNF)- α 濃度が iPS-SCs を加えた群では対照群に比べて有意に減少しており、Th2 サイトカインでは IL-13 が有意に上昇しており、Th17 サイトカインでは IL-17A と IL-17F が有意に上昇していた。トランスフォーム増殖因子(TGF)- β 1 濃度と NO₂⁻濃度も iPS-SCs 添加群では有意に上昇していた。



次に、iPS-SCs が T 細胞の増殖を抑制する際に他の細胞（抗原提示細胞や CD4 陽性 T 細胞）との細胞間接着が必要かどうかを transwell を用いて検討した結果、iPS-SCs は細胞間接着非依存的に T 細胞の増殖を抑制しており、抑制には NO などの何らかの液性因子が関わっていると考えられた。



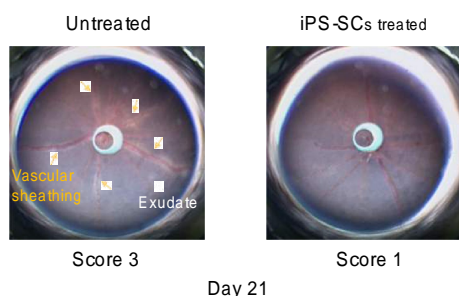
*In vivo*での抗原特異的 T 細胞活性化抑制

免疫の1日前と6日後に1匹あたり iPS-SCs 5 \times 10⁵/200 μ L 投与群と control として PBS/200 μ L 投与群の CD4 陽性 T 細胞を抽出し、ナイーブなマウスの脾臓由来の抗原提示細胞と hIRBPp1-20 抗原(0 μ M, 0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M)を共培養し、4 日後にフローサイトメーターで CD4 陽性 T 細胞の増殖率を計測した。結果は、0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M のすべてにおいて有意に iPS-SCs 投与群では control 群に比べて有意に T 細胞の増殖率は抑制されていた(***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05, Student's t-test)。

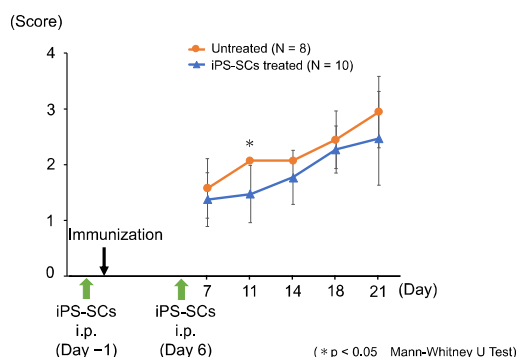
(2) iPS-SCs によるマウス EAU の抑制

免疫の1日前と6日後に iPS-SCs 投与群には1匹あたり 5 \times 10⁵個/200 μ L の iPS-SCs を投与し、対照群では1匹あたり PBS200 μ L を投与した。7日目から3、4日毎に眼底検査を行い、臨床的重症度を評価し、21日目に眼球を摘出し HE 染色を行い組織学的重症度について評価した。結果、臨床的重症度では11日目で iPS-SCs 投与群では対照群に比べて有意に炎症が軽症化していることがわかった。

EAU clinical score

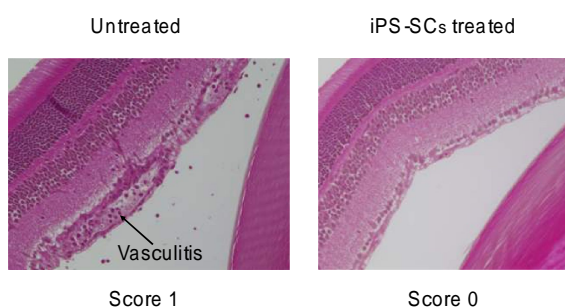


Clinical score

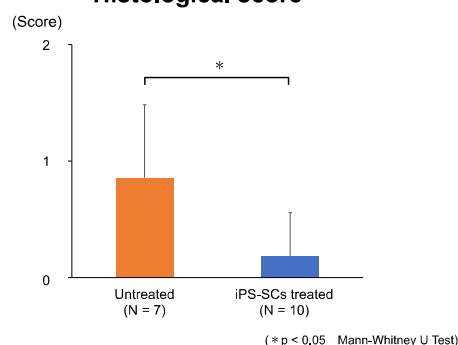


さらに、組織学的重症度でも iPS-SCs 投与群では対照群に比べて有意に炎症が軽症化されていた。

Histological assessment of EAU



Histological score



以上の結果により、iPS-SCs は NO などの液性因子を分泌することで、抗原特異的な T 細胞の増殖を抑制し、EAU を軽症化することが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

Goto H, Zako M, Namba K, Hashida N, Kaburaki T, Miyazaki M, Sonoda KH, Abe T, Mizuki N, Kamoi K, Brezin AP, Dick AD, Jaffe GJ, Nguyen QD, Inomata N, Kwatra NV, Camez A, Song AP, Kron M, Tari S, Ohno S. Adalimumab in Active and Inactive, Non-Infectious Uveitis: Global Results from the VISUAL I and VISUAL II Trials. *Ocul Immunol Inflamm*. 2019;27(1):40-50. 査読有. doi: 10.1080/09273948.2018.1491605.

南場研一、ぶどう膜炎への生物学的製剤。特集 Coming Soon! 新規治療。Retina Medicine.2017; 6 巻、P27-31. 査読無。

Iwata D, Mizuuchi K, Aoki K, Horie Y, Kase S, Namba K, Ohno S, Ishida S, Kitaichi N. Serial frequencies and clinical features of uveitis in Hokkaido, Japan. *Ocul Immunol Inflamm*. *Ocul Immunol Inflamm*.2017;25(sup1):S15-S18. 査読有 . doi: 10.1080/09273948.2016.1184286.

(他 12 件)

〔学会発表〕(計 37 件)

鈴木佳代、岩田大樹、南場研一、水内一臣、福原崇子、大野重昭、北市伸義、石田 晋。アダリムマブ治療中のぶどう膜炎患者の血中トラフ値と抗アダリムマブ抗体の検討、第 72 回日本臨床眼科学会、2018

Namba K. Detecting subclinical choroidal inflammation by multimodal imaging in Vogt-Koyanagi-Harada disease. Workshop on Vogt- Koyanagi-Harada Disease and sympathetic Ophthalmia Prognostic factors of VKH disease. Global Ocular Inflammation Workshops (GOIW), 2017

水内一臣、南場研一、北市伸義、竹内正義、鈴木智浩、齋藤理幸、岩田大樹、加瀬 諭、石田 晋。ぶどう膜炎患者硝子体液での終末糖化産物の検討。フォーサム 2017 大阪、2017

Namba K. Treatment in the biologic era. 17th International Conference on Behcet ' s Disease,2016

(他 33 件)

〔図書〕(計1件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：清野 研一郎

ローマ字氏名：SEINO KENISHIRO

所属研究機関名：北海道大学

部局名：遺伝子病制御研究所

職名：教授

研究者番号(8桁)：20312845

研究分担者氏名：北市 伸義

ローマ字氏名：NOBUYOSHI KITAICHI

所属研究機関名：北海道医療大学

部局名：予防医療科学センター

職名：教授

研究者番号(8桁)：40431366

(2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。