

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09677

研究課題名(和文)単球由来iPS細胞の作出と応用に関する研究；難治性喘息の有効な治療のために

研究課題名(英文)Study in production and application of monocyte-derived iPS cells,For effective treatment of severe asthma

研究代表者

磯谷 澄都 (Isogai, Sumito)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：10351032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：免疫系を制御する制御性T細胞を人工多能性幹細胞(iPS細胞)から分化誘導し、喘息の新規治療法を追求する。独自の手法でヒト単球由来iPS細胞の作製とリプログラミング時の細胞viabilityについて数回再現実験に成功した。今まで単球から市販化iPS細胞ベクターを用いてiPS細胞を作製成功例は無いため、そのiPS細胞の証明を行った。さらに単球由来iPS細胞からも複数回分化誘導実験を行い単球および樹状細胞へ分化誘導する事に成功した。分化誘導した樹状細胞は、異なる複数の抗原曝露により樹状細胞の抗原提示能の指標のHLAclass2:HLA-DRの発現増加を確認しiPS細胞の証明の成果を論文発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の治療薬では喘息の病態コントロールが難しい難治性喘息患者が未だに多数存在する。近年、様々領域でiPS細胞を用いた研究が行われている。ただ、気管支喘息に関しては遅れをとっている。我々はヒトの単球を用いた新しいiPS細胞研究を行った。

我々は独自の手法で作出することに成功したヒト単球由来iPS細胞の作製実験とリプログラミング時の細胞viabilityについて数回再現実験に成功した。これまでに単球から市販されているiPS細胞作製ベクターを用いてiPS細胞を作製することに成功した報告例は無かったため、iPS細胞の作製およびiPS細胞としての証明に関する成果をまとめた。

研究成果の概要(英文)：We seek to develop a novel therapeutic method for asthma by inducing differentiation of regulatory T cells that control the immune system from induced pluripotent stem cells (iPS cells).

We have succeeded in reproducing human monocyte-derived iPS cells and the cell viability during reprogramming several times by our original method. Since there have been no reports of successful production of iPS cells from monocytes using commercially available iPS cell vectors so far, we have been proved as iPS cells. Furthermore, we performed multiple differentiation experiments from monocyte-derived iPS cells and succeeded in inducing differentiation into monocytes and dendritic cells. Differentiation-induced dendritic cells were confirmed to have increased expression of HLA Class 2 HLA-DR, which is an index of dendritic cell antigen-presenting ability, by exposure to different antigens. We summarized the results of proof as iPS cells and presented the paper (Cell Reprogram 20(6), 347-355, 2018.).

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：気管支喘息 iPS細胞 単球 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は年々死亡率が低下傾向であり、新規喘息薬も開発されているが、現在の治療薬では喘息の症状コントロールが難しい難治性喘息患者が未だに多数存在する。

本研究では喘息を誘発する特異的抗原に反応する免疫系細胞を制御する制御性 T 細胞 (regulatory T Cell : Treg) を人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cell : iPS 細胞) から分化誘導し、その細胞を用いた喘息の基本的病態を根本的に制御する新規治療法の可能性を追求するものである。

まず平成 29 年度の実績として、我々が独自の手法で作出することに成功したヒト単球由来 iPS 細胞の再現実験とリプログラミング時の細胞 viability についての検証を行った。我々の考案した培養方法であれば、高生存率を維持したまま細胞周期を保持させることができ、これが単球由来 iPS 細胞の作出に必要な培養条件であることを確認した。

次に単球由来 iPS 細胞から分化誘導実験を行ったところ、単球への分化誘導は複数回にわたり再現することができた。単球から樹状細胞への分化誘導にも成功しており、細胞の抗原提示能の指標となる HLA Class2 の HLA-DR の発現を確認した。この HLA-DR の発現に関する再現性実験は成功しているが、樹状細胞に一部で形態的、かつ CD14 のマクロファージ様細胞が混在している状況である。今後、より高率的かつ特異的に樹状細胞への分化誘導を検証していく予定である。

他方、免疫制御系の細胞である Treg に未熟リンパ球からの誘導作用がある IL-35 について、実臨床の喘息患者血清中の IL-35 を測定するため、サンプルの収集を行っている。予定検体数を確保しつつあるため、随時測定して、喘息病態と血清 IL-35 濃度についての検証を行っていく。

2. 研究の目的

これまでの我々の研究において、独自の手法で市販の iPS ベクターを用いて末梢血単球から iPS 細胞を作製することに成功し、論文報告した (Cell Reprogram 20(6), 347-355, 2018)。2019 年度の研究成果として、この新しい手法で作成した単球由来 iPS 細胞を用いて、免疫の司令塔であり、免疫をアクセル的に駆動させる樹状細胞やリンパ球への分化誘導およびアレルギーの細胞療法としての可能性を見出す、免疫のブレーキ的な役割をはたす免疫制御性細胞への検討を試みた。単球由来 iPS 細胞からマトリゲル上で分化誘導することで、単球 (エステラーゼ染色陽性、貪食能あり、CD45 +、CD14 +、CXCR1 +) 樹状細胞様細胞 (CD209 +、CD83 +) に分化した。

一方、フィーダー細胞を用いずに比較的短期間でリンパ球 (CD4 +) に分化誘導する新たな分化誘導法の確立がさらに望まれるためこれも含めて研究することとした。

3. 研究の方法

まず平成 29 年度の実績として、我々が独自の手法で作出することに成功したヒト単球由来 iPS 細胞の再現実験とリプログラミング時の細胞 viability についての検証を行った。我々の考案した培養方法であれば、高生存率を維持したまま細胞周期を保持させることができ、これが単球由来 iPS 細胞の作出に必要な培養条件であることを確認した。

次に単球由来 iPS 細胞から分化誘導実験を行ったところ、単球への分化誘導は複数回にわたり再現することができた。単球から樹状細胞への分化誘導にも成功しており、細胞の抗原提示能の指標となる HLA Class2 の HLA-DR の発現を確認した。この HLA-DR の発現に関する再現性実験は成功しているが、樹状細胞に一部で形態的、かつ CD14 のマクロファージ様細胞が混在している状況である。今後、より高率的かつ特異的に樹状細胞への分化誘導を検証していく予定である。他方、免疫制御系の細胞である Treg に未熟リンパ球からの誘導作用がある IL-35 について、実臨床の喘息患者血清中の IL-35 を測定するため、サンプルの収集を行っている。予定検体数を確保しつつあるため、さらに随時測定して、喘息病態と血清 IL-35 濃度についての検証を行っていく。

4. 研究成果

本研究の主体の 1 つである単球からの iPS 細胞の作製、さらに単球由来 iPS 細胞からの単球および樹状細胞への分化誘導について複数回再現実験に成功した。これまでに単球から市販されている iPS 細胞作製ベクターを用いて iPS 細胞を作製することに成功した報告例は無かったため、iPS 細胞の作製および iPS 細胞としての証明に関する成果をまとめて、論文発表 (Cell Reprogram 20(6), 347-355, 2018.) した。

末梢血リンパ球を用いて、iPS 細胞を作出する内容は多数報告されている。しかし、末梢血 T 細胞は、胸腺から末梢血に流出した段階で、ナイーブ T 細胞ではなく、特定の機能や抗原反応性にのみ特化した T 細胞 (TCR 遺伝子が組み換え・再構成された細胞) となっていることから、末梢血 T 細胞から iPS 細胞を作出して、その後さまざまな機能な抗原に反応性を獲得する前段階のナイーブ T 細胞を作製することは非常に難しい。

これまでの我々の研究において、独自の手法で市販の iPS ベクターを用いて末梢血単球から iPS 細胞を作製することに成功し、論文報告した (Cell Reprogram 20(6), 347-355, 2018)。2019

年度の研究成果として、この新しい手法で作成した単球由来 iPS 細胞を用いて、免疫の司令塔であり、免疫をアクセル的に駆動させる樹状細胞やリンパ球への分化誘導およびアレルギーの細胞療法としての可能性を見出す、免疫のプレーキ的な役割をはたす免疫制御性細胞への検討を試みた。

単球由来 iPS 細胞からマトリゲル上で分化誘導することで、単球 (エステラーゼ染色陽性、貪食能あり、CD45 +、CD14 +、CXCR1 +) 樹状細胞様細胞 (CD209 +、CD83 +) に分化した。一方、フィーダー細胞を用いずに比較的短時間でリンパ球 (CD4 +) に分化誘導する新たな分化誘導法も確立した。

樹状細胞様細胞にアレルゲンとなる抗原をばく露したところ、抗原提示に関与する HLA-DR の発現が増強することも明らかとなった。これら一連の結果は論文で報告した (Med Mol Morphol 2020, Online ahead of print)。制御性細胞への分化誘導において、一部、泡沫状マクロファージ様の細胞も混在しているのが現状であり、分化誘導の方法は更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Isogai S., Yamamoto N., Hiramatsu N., Goto Y., Hayashi M., Kondo M., Imaizumi K.	4. 巻 20
2. 論文標題 Preparation of induced pluripotent stem cells using human peripheral blood monocytes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reprogram.	6. 最初と最後の頁 347-355
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/cell.2018.0024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi M., Yamamoto N., Hiramatsu N., Isogai S., Gotoh Y., Goto Y., Kondo M., Imaizumi K.	4. 巻 54
2. 論文標題 A basic study on self-reconstitution of alveolar epithelium-like cells by tissue stem cells in mouse lung.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 In Vitro Cell Dev Biol-Animal.	6. 最初と最後の頁 648-657
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11626-018-0287-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiramatsu N., Yamamoto N., Soma T., Watanabe T., Akao K., Horiguchi T., Isogai S., Imaizumi K.	4. 巻 4
2. 論文標題 Detection of the Streptococcus milleri group in sputum samples and investigation of its clinical significance in respiratory diseases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Fujita Medical Journal	6. 最初と最後の頁 45-49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20407/fmj.4.2_45	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Akao K., Minezawa T., Yamamoto N., Okamura T., Inoue T., Yamatsuta K., Uozu S., Goto Y., Hayashi M., Isogai S., Kondo M., Imaizumi K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Flow cytometric analysis of lymphocyte profiles in mediastinal lymphadenopathy of sarcoidosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0206972
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0206972	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto N., Hiramatsu N., Isogai S., Kondo M., Imaizumi K., Horiguchi M.	4. 巻 53
2. 論文標題 Mechanism of atopic cataract caused by eosinophil granule major basic protein.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Med Mol Morphol.	6. 最初と最後の頁 94-103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-019-00234-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 平松 範子, 山本 直樹, 磯谷 澄都, 近藤 征史, 今泉 和良
2. 発表標題 アレルギー研究領域における新しいツールとしてのヒト末梢血単球由来iPS細胞株作製の試み
3. 学会等名 日本組織培養学会第91回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平松範子, 山本直樹, 磯谷澄都, 近藤征史, 今泉和良
2. 発表標題 ヒト末梢血単球由来iPS細胞から分化誘導した樹状細胞の機能解析
3. 学会等名 第50回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 磯谷澄都, 山本直樹, 平松範子, 森川紗也子, 峯澤智之, 榊原洋介, 岡村拓哉, 魚津桜子, 三重野ゆうき, 後藤康洋, 林正道, 近藤征史, 今泉和良
2. 発表標題 ヒト末梢血単球由来iPS細胞の分化誘導に関する検討
3. 学会等名 第50回藤田学園医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 磯谷 澄都, 平松 範子, 山本 直樹, 伊奈 拓摩, 井上 敬浩, 前田 真吾, 渡邊 俊和, 相馬 智英, 赤尾 謙, 堀口 智也, 後藤 祐介, 丹羽 義和, 山蔦 久美子, 森川 紗也子, 峯澤 智之, 榊原 洋介, 岡村 拓哉, 魚津 桜子, 三重野 ゆうき, 加藤 敦, 後藤 康洋, 林 正道, 中西 亨, 近藤 征史, 今泉 和良
2. 発表標題 単球由来iPS細胞の作出と応用に関する研究(難治性喘息の有効な治療のために)
3. 学会等名 第66回 日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平松 範子, 山本 直樹, 磯谷 澄都, 今泉 和良
2. 発表標題 培養法改良によるヒト末梢血単球由来iPS細胞の作出 - 難治性喘息に対する新規免疫細胞療法の基礎研究 -
3. 学会等名 第49回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 磯谷 澄都, 山本 直樹, 平松 範子, 伊奈 拓摩, 井上 敬浩, 前田 真吾, 渡邊 俊和, 相馬 智英, 赤尾 謙, 堀口 智也, 後藤 祐介, 丹羽 義和, 山蔦 久美子, 森川 紗也子, 峯澤 智之, 榊原 洋介, 岡村 拓哉, 三重野 ゆうき, 魚津 桜子, 後藤 康洋, 林 正道, 中西 亨, 近藤 征史, 今泉 和良
2. 発表標題 幼若な肺に存在する組織幹細胞を用いた再生医療に関する基礎研究
3. 学会等名 第49回 藤田学園医学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平松 範子, 山本 直樹, 磯谷 澄都, 日比谷 睦子, 伊奈 拓摩, 井上 敬浩, 前田 真吾, 渡邊 俊和, 相馬 智英, 赤尾 謙, 堀口 智也, 後藤 祐介, 丹羽 義和, 山蔦 久美子, 森川 紗也子, 峯澤 智之, 榊原 洋介, 岡村 拓哉, 魚津 桜子, 三重野 ゆうき, 後藤 康洋, 林 正道, 中西 亨, 近藤 征史, 今泉 和良
2. 発表標題 ヒト末梢血由来単球を用いた新規iPS細胞の作出【奨励賞受賞】
3. 学会等名 第49回 藤田学園医学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本直樹、平松範子、磯谷澄都、近藤征史、今泉和良.
2. 発表標題 ヒト末梢血単球由来iPS細胞の作製と樹状細胞への分化誘導.
3. 学会等名 第28回国際喘息学会日本・北アジア部会(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本直樹、平松範子、磯谷澄都、堀口正之、平野耕治、近藤征史、今泉和良.
2. 発表標題 アレルギー疾患に合併する白内障の発症メカニズム.
3. 学会等名 第28回国際喘息学会日本・北アジア部会(国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.fujita-hu.ac.jp/achievements/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山本 直樹 (Yamamoto Naoki) (00267957)	藤田医科大学・共同利用研究設備サポートセンター・准教授 (33916)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	今泉 和良 (Imaizumi Kazuyoshi) (50362257)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	