

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10516

研究課題名(和文) 抗原性を消失させた肝細胞シート移植による免疫寛容導入の試み

研究課題名(英文) Induction of immune tolerance by transplantation of hepatocyte sheet that lost antigenicity

研究代表者

高槻 光寿 (TAKATSUKI, Mitsuhsa)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：80380939

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)：主要組織適合抗原(MHC)をCRISPR/Cas9システムを用いて細胞性拒絶反応を制御した細胞シートの開発を行った。MCH抑制細胞を作製するため、CRISPR/Cas9システムを肝癌細胞株への導入・回収後、温度応答性培養皿上で7日間培養後細胞シートを作製。作製した肝細胞シートを野生マウスに皮下移植し、細胞性拒絶反応を評価した。皮下断面をH&E染色した結果、細胞シート周辺に免疫系細胞が散在する状態ではあるが、免疫拒絶された様子はなかった。CRISPR/Cas9システムによってMCH抑制された細胞は細胞性拒絶反応を起こしにくく、他家移植において有望な細胞ソースになりえることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器あるいは細胞の他家移植時に生じる細胞性拒絶は主要組織適合抗原(major histocompatibility complex: MHC)によって制御されている。細胞性拒絶の制御においては移植後の免疫抑制剤によって行われているものの、過剰な免疫抑制は感染や悪性腫瘍、薬剤性腎障害等の副作用を引き起こしてしまう。このような問題点を解決させる方法としてドナー細胞表面に存在するMHCに着目し、CRISPR/Cas9システムを用いてMCH抑制細胞の開発ならびに移植後の細胞性拒絶反応に関して検討することで新たな移植細胞源の確保が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We used the CRISPR/Cas9 system to develop a cell sheet in which major histocompatibility antigen (MHC). The CRISPR/Cas9 system was introduced into a liver cancer cell line, and then treatment-cells cultured on a temperature-responsive culture dish for 7 days to prepare a cell sheet. The treatment-hepatocyte sheet was subcutaneously transplanted into a wild mouse to evaluate cellular rejection. As a result of H&E staining of the subcutaneous section, the immune system cells were scattered around the cell sheet and immune rejection was not occurred. Therefore, it was suggested that MHC-knock out hepatocyte by CRISPR / Cas9 system hardly cause cellular rejection and these cells is a possibility to promise cell source in allogeneic transplantation.

研究分野：肝臓外科学

キーワード：細胞シート 組織適合性抗原 肝細胞 細胞性拒絶

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末期臓器不全に対する究極的な治療として臓器移植が開発され、現在心・肺・肝・腎・膵・小腸移植が臨床応用されて多くの患者が救命されているが、自己もしくは一卵性双生児以外からの臓器は必ず拒絶反応を惹起し、その制御が成否のカギを握る。拒絶反応は宿主のリンパ球(T細胞)が移植片(グラフト)を攻撃することによって起こるためT細胞の機能を抑制するための免疫抑制剤の投与が必須である。しかし、(1)グラフトだけでなく他の病原体や癌に対する免疫力も低下させてしまう、(2)副作用が強い、という問題があるため投与調整は容易でなく、現行の免疫抑制療法では拒絶反応を完全に制御できない。そのような中、臓器移植において宿主がグラフトを拒絶することなく受容する、いわゆる「免疫寛容」の研究が進み、動物実験はもちろん近年では臨床においても徐々に試みられるようになってきている。しかし、現行の方法は全て宿主側の免疫応答を抑制するものであり、グラフトの抗原性を消失させる試みはなされていない。免疫寛容の獲得は移植医療の究極のゴールとされているが、まだ発展途上であり確立されているとはいえない。臓器移植は一人の提供者(ドナー)から一臓器しか提供できず、保存手段や時間にも制限がある。また、特に本邦で多く施行されている生体移植(肝、腎など)においてはドナーに与える負担が大きく、実際にドナーの死亡例が発生して大きな社会問題となっている。

これらの臓器移植の欠点を補うひとつの方法として組織・細胞移植があり、先に挙げた臓器のうち、心(心筋細胞シート)、膵(膵島細胞)などは実際に臨床応用されている。肝細胞移植についても多くの動物実験でその有用性が知られており、特に肝細胞機能の一部である代謝性疾患などで臨床応用が期待されている。一方、癌患者において自己のリンパ球を取り出して体外で抗腫瘍免疫機能を強化して体内に戻す細胞療法が臨床応用されており、細胞レベルの機能を利用した細胞療法は今後ますます発展していくことが予想される。

前述の如く、申請者らは肝細胞シート移植の開発に成功しているが、宿主に免疫不全マウスを用いる場合を除き、やはり拒絶反応により長期生着は達成できていない。一方、腫瘍免疫を利用した癌治療において、自己のT細胞しか使用できないという問題を克服するべく、他人のT細胞を応用する手法を開発している。その中で、体内に注入されたT細胞から自己への攻撃(移植片対宿主病(graft versus host disease(GVHD)))を予防するため、自己のT細胞の内在性T細胞受容体およびMHC発現を抑制する手法を開発中である。これらの技術を組み合わせ、肝細胞MHC発現を抑制することにより抗原性を除去する、つまり宿主のT細胞がグラフトを認識できないようにする究極の免疫寛容導入が可能ではないかと考えた。

2. 研究の目的

前述の如く、肝細胞シート移植の開発に成功しているが、宿主に免疫不全マウスを用いる場合を除き、やはり拒絶反応により長期生着は達成できていない。一方、申請者らは腫瘍免疫を利用した癌治療において、自己のT細胞しか使用できないという問題を克服するべく、他人のT細胞を応用する手法を開発している。その中で、体内に注入されたT細胞から自己への攻撃(移植片対宿主病(graft versus host disease(GVHD)))を予防するため、自己のT細胞の内在性T細胞受容体およびMHC発現を抑制する手法を開発中である(Ikeda, Int Immunol 2016., Ikeda et al. Cancer Immunol Immunother 2015.)。これらの技術を組み合わせ、肝細胞MHC発現を抑制することにより抗原性を除去する、つまり宿主のT細胞がグラフトを認識できないようにする究極の免疫寛容導入が可能ではないかと考えた。

3. 研究の方法

第1段階: 研究代表者らが開発した内因性T細胞レセプター(TCR)の発現を抑制するレトロウイルスベクター(siTCRベクター)技術をもとにしてヒト肝細胞のMHC発現を抑制するsiRNA配列を導入したレトロウイルスベクターを作成し、肝細胞のMHC発現を抑制する。さらにCRISPR/Cas9によりMHC発現を規定する遺伝子をノックアウトし、MHC発現を完全に消失させることを目指す。

第2段階: MHC発現を抑制・消失したヒト肝細胞をシート化してマウスへ移植し、長期生着し機能維持できるか否かを検討する。

4. 研究成果

最適なMHC抑制細胞を作製するため、様々な遺伝子導入法を用いてCRISPR/Cas9システムを肝癌細胞株(HepG2)ならびにヒト初代肝細胞への導入を試みた(図1-A)。リポフェクションならびに電気穿孔法ではMHC抑制は確認できなかったものの、ウイルスベクター法ではどちらの肝細胞においても約15%の細胞においてMHC発現を抑制させた(図1-B)。そこでMHC抑制細胞から細胞シートを作製するために、磁気細胞分離法によってMHC抑制された細胞のみを高純度に回収(約90%)し、温度応答性培養皿上で7日間培養後細胞シートを作製した(図1-C)。作製した肝細胞シートを野生マウス(BALB/c)に皮下移植を行い、移植3、5日目における細胞性拒絶反応を評価した。MHC抑制細胞は移植3、5日目

ともにマウス皮下に残存していた。皮下断面を H&E 染色した結果、細胞シート周辺に免疫系細胞が散在するような状態ではあるものの、免疫拒絶された様子はなかった。これらの結果より CRISPR/Cas9 システムによって MHC 抑制された細胞は細胞性拒絶反応を起こしにくい MHC 抑制細胞は他家移植において有望な細胞ソースになりえることを明らかにした。グラフトの抗原性を消失させる試みの成功例は過去に報告がなく、その独創性は極めて高い。まずは確実に細胞レベルでの MHC 発現抑制を可能にし、すでに臨床応用されている膵島細胞移植や心筋細胞シート移植などへの応用を目指す。臓器ではなく組織(細胞)移植が拒絶の制御と相まって長期機能維持することが可能となれば、多大な負担を強いられる臓器移植を補うことにより臓器不全治療に新たな道が開かれることとなる。また、細胞レベルでの抗原性消失が可能となれば、iPS をはじめとする再生医療などにより臓器レベルまでの発展の足掛かりとなる。

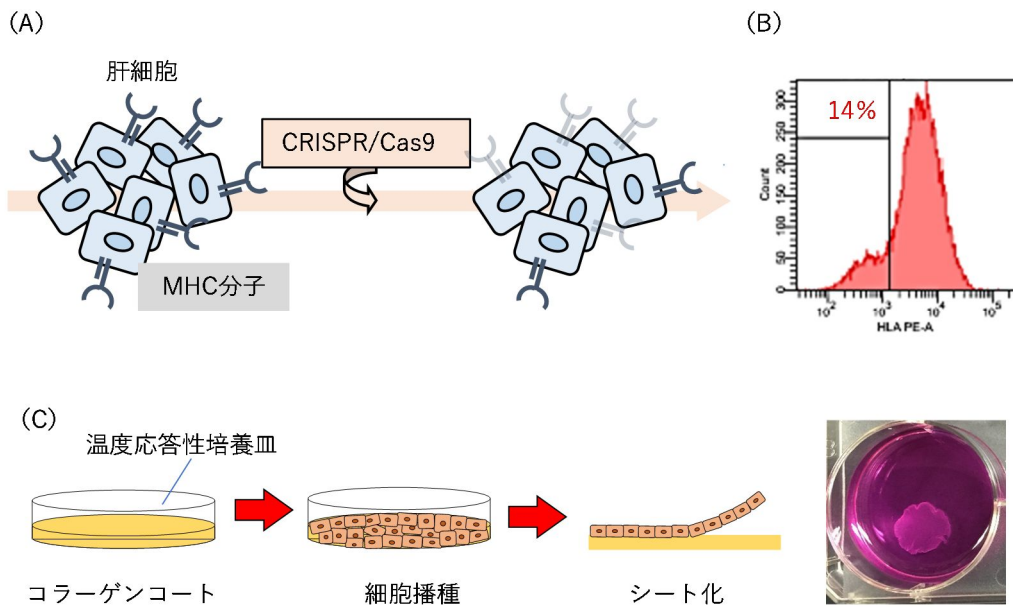


図 1. 研究成果の概要。(A) CRISP/CAS9 システムを用いた MHC 欠損肝細胞の作製過程。(B) CRISP/CAS9 システムによる MHC 欠損肝細胞の陰性率。(C) 温度応答性培養皿による肝細胞シートの形成工程と細胞形態。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田怜美、高槻光寿、堺裕輔、日高匡章、足立智彦、大野慎一郎、夏田孔史、濱田隆志、前川恭一郎、池田裕明、江口晋
2. 発表標題 抗原性を消失させた肝細胞/肝癌細胞シート作製の試み
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	池田 裕明 (IKEDA Hiroaki) (40374673)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	