

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06469

研究課題名(和文) ヒトMHC拘束性機能的ヒトT細胞の解析を可能にする免疫ヒト化マウスの作出

研究課題名(英文) Generation of humanized mice to analyze human MHC-restricted T cells

研究代表者

米谷 耕平 (Kometani, Kohei)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：50437258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞から胸腺上皮細胞(Thymic epithelial cell: TEC)を分化誘導するために、TECの発生に必要と考えられる転写因子をドキシサイクリン依存的に任意のタイミングで発現させることのできるiPS細胞を樹立した。樹立したiPS細胞をTECの発生起源である内胚葉に分化させた後にドキシサイクリンを添加し、導入した転写因子を発現させた。ドキシサイクリン存在下でさらに培養を継続し、得られた細胞の遺伝子発現を定量的PCR法にて検証した結果、胸腺上皮前駆細胞様細胞(TEC-progenitor-like cell: TEPLC)が誘導された可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト免疫細胞のin vivoでの解析には、免疫細胞をヒト由来細胞と置き換えた「免疫ヒト化マウス」の利用が有用である。しかしながら、既存の免疫ヒト化マウスでは胸腺上皮細胞がレシピエントであるマウス由来であり、分化するヒトT細胞がマウスMHCと結合して分化するため、ヒトT細胞としての機能が完全ではなかった。一方、今回の研究で得られたヒト胸腺上皮前駆細胞様細胞を免疫ヒト化マウスに移植することで、ヒト胸腺環境を備え機能的なヒトT細胞が発生する改良型免疫ヒト化マウスを作製し、ヒトT細胞の生体内での機能を解析できる可能性が提示された。

研究成果の概要(英文)：To induce human Thymic Epithelial cell (TEC) from human iPS cells, I generated iPS cell lines which induce the expression of transcription factor essential for TEC development in a doxycycline-dependent manner. The iPS cells were induced into definitive endoderm which is the original germ layer of TECs. Then, doxycycline was added to the culture medium and the culture was continued. After the culture, gene expression of the cells was analyzed by qPCR. The result suggests that the TEC-progenitor like cells are induced by this method.

研究分野：免疫学

キーワード：胸腺上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

免疫細胞本来の機能を研究するためには *in vivo* での挙動を観察できる実験系が必要とされている。このため、マウスなどのモデル生物を用いた *in vivo* レベルでの免疫学研究が遂行されてきたが、ヒトに関しては、ヒト体内における免疫システムの再現には至っておらず、ヒト免疫細胞が抗原を排除する過程を観察できる最適な実験系の開発が求められていた。重度免疫不全マウスにヒト造血幹細胞を移植して作製される「免疫ヒト化マウス」は、血液細胞がヒト由来の細胞に置き換わっておりヒト血液細胞の解析を可能とする生体モデルシステムである。しかしながら、免疫細胞の一種、T細胞は多種多様な抗原に対する反応性を獲得するために、胸腺で発生する過程で胸腺の主要なストロマ細胞である胸腺上皮細胞(Thymic Epithelial Cell: TEC)上の MHC と相互作用し、MHC との親和性をチェックする必要がある。ところが、既存の免疫ヒト化マウスでは、ヒト T細胞がマウスの胸腺上皮細胞との相互作用を経て発生するため、マウスの MHC に拘束されて分化する。そのため、マウス内で分化したヒト T細胞は、ヒト MHC を発現するヒト抗原提示細胞との相互作用が不完全となり、ヒト T細胞としての免疫機能を完全には発揮できないことが大きな課題であった。

ヒト T細胞研究を進展させるツールとして、T細胞の分化に必須のストロマ細胞である TEC をヒト ES 細胞から分化誘導したという試みが報告されていた (Sun et al., *Cell Stem Cell* (2013), Parent et al., *Cell Stem Cell* (2013))。しかしながら、これらの手法は TEC を成長因子の複雑な組み合わせにより誘導するものであり、分化誘導条件のコントロールが難しい手法であった。そこで、より簡便に均質な TEC を安定的に供給できるプロトコルの確立が求められていた。さらに、多様なヒト MHC に対応する解析を行うためには、多くのドナー由来の多能性幹細胞が必要となるが、現実的に多くのドナー由来の ES 細胞を入手するも新規に作製することも難しい。一方ヒト iPS 細胞は多様な HLA に対応できる株を入手することが比較的容易と考えられる状況であった。

2. 研究の目的

ヒト T細胞が機能を発揮できる免疫ヒト化マウスを作製するために、ヒト MHC を発現するヒト TEC を移植し、ヒト胸腺環境を構築することが一つの手段として考えられる。しかしながら、ヒト胸腺は小児以降に急速に退縮を起こすため、移植に十分量のヒト TEC をヒトから採取することも、増殖させて大量に調整することも現実的には困難である。そこで申請者はこの問題点を克服するために、大量に調整することが可能で、かつ様々な細胞への分化能を有するヒト人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cell: iPS 細胞) から胸腺上皮細胞(TEC)を誘導し、既存のヒト化マウスに移植することで、改良型免疫ヒト化マウスを作製することを目指す。

3. 研究の方法

TEC 分化のマスター遺伝子として知られている転写因子を、ドキシサイクリン依存的に任意のタ

イミグで発現させることのできるヒト iPS 細胞を piggyBac ベクターを用いて作製する。作製した iPS 細胞をアクチビン A と GSK3beta の阻害剤を用い、TEC のオリジナルの胚葉である内胚葉に分化させる。その後、ドキシサイクリンを添加して TEC の発生に必要な転写因子を発現させる。転写因子誘導発現後に、胸腺上皮細胞が分化初期から発現する遺伝子 (EPCAM、ケラチン 5/8(KRT5, KRT8)、TEC 特異的プロテアソーム・サブユニット(PSMB11)) ならびに成熟に伴い発現する MHC クラス II、AIRE 遺伝子の発現を確認する。

樹立した iPS 細胞由来の TEC を、免疫ヒト化マウス作製において実績のある重度免疫不全 NOG マウスにガンマ線を照射した後に腎臓皮膜下に移植する。この時同時にヒト T 細胞のソースとしてヒト臍帯血由来 CD34 陽性造血幹細胞を移植する。移植後、ヒト免疫系が再構築されたことをマウス末梢血を採取しフローサイトメトリーを用いて確認する。ここでは、T 細胞のマーカーの一つであるヒト CD3 陽性細胞が出現していることを確認する。この時、T 細胞の主要なサブセットである CD4 陽性ヘルパー T 細胞、CD8 陽性キラー T 細胞の両方が分化していることも確認する。

4 . 研究成果

ヒト iPS 細胞から胸腺上皮細胞(Thymic epithelial cell: TEC)を分化誘導するために、TEC の発生に必要なと考えられる転写因子をドキシサイクリン依存的に任意のタイミングで発現させることのできる iPS 細胞を、piggyBac ベクターを用いて樹立した。ベクターコンストラクトが染色体中にランダムに挿入されることにより、クローンごとに表現型が異なる可能性を考え、複数のラインをスクリーニングにより選別した。樹立した iPS 細胞ラインをアクチビン A と GSK3beta の阻害剤を用い、TEC の発生起源である内胚葉に分化させた。内胚葉誘導後にドキシサイクリンを添加し、導入した転写因子を発現させた。転写因子の mRNA の発現は定量的 PCR にて、さらにタンパク質の発現はウェスタンブロットティング法にて確認した。その後、ドキシサイクリン存在下で培養を継続した。培養後の細胞を回収し、定量的 PCR にて TEC が発現する遺伝子(EPCAM、ケラチン 5(KRT5), DLL4)が発現していることを確認した。一方、成熟 TEC が発現している HLA-DR, AIRE などは発現が認められなかった。これらの結果から、iPS 細胞から誘導された細胞は胸腺上皮前駆細胞様細胞(TEC-progenitor-like cell: TEPLC)であることが示唆された。さらに成熟した TEC に誘導するためには、マウス生体内の環境が必要と考えられたため、iPS 細胞由来の細胞を胸腺上皮細胞欠損マウスに移植し、移植した iPS 細胞由来細胞が成熟胸腺上皮細胞に分化し、機能的な T 細胞を産生するかどうかの検証を行った。また、胸腺環境を模倣した in vitro のオルガノイドでの継続培養も成熟した TEC を誘導できる可能性があるため、同時に検証を進めた。

以上、本研究により、iPS 細胞から TEPLC を誘導できるようになったことから、今後 iPS 細胞由来の TEC を用いて機能的なヒト T 細胞を産生し、ヒト T 細胞の機能解析を行えるプラットフォームが作製できる可能性が提示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------