

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08477

研究課題名（和文）iPS細胞由来免疫寛容性樹状細胞を用いた自己免疫疾患に対する新規細胞療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel cell therapy for autoimmune diseases using iPS cell-derived tolerogenic dendritic cells

研究代表者

藤岡 数記 (Fujioka, Kazuki)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：30762174

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：樹状細胞は獲得免疫系の上流に位置し免疫応答の開始機転として重要な役割を担っているが、実際には複数のサブセットが存在しており、免疫応答を負に制御する免疫寛容誘導性樹状細胞（tolerogenic dendritic cell: toIDC）も存在している。本研究で我々はヒトiPS細胞を用いてtoIDC様細胞を誘導することに成功した。さらに本細胞が自己免疫疾患患者由来T細胞の活性を抑制することを示した。本結果は自己免疫疾患に対する新規の免疫細胞療法の可能性を示唆するものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の自己免疫疾患に対する治療は目覚ましい進歩を遂げた。しかしそれでも既存治療に抵抗性の難治性病態は存在し、新しい治療法の開発が必要なことは論を待たない。本研究ではiPS細胞を用いて免疫細胞を制御する細胞の創出に成功した。iPS細胞は性質を保持したまま無限に増殖するため、こうした細胞を安定的に供給できると考えられる。この結果は免疫疾患に対する新規の細胞治療を創出した可能性を示唆するものであり、大きな社会的意義を有すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Dendritic cells are located upstream of the acquired immune system and play an important role as the initiators of the immune response, but in reality there are multiple subsets, including tolerogenic dendritic cells (toIDCs), which negatively regulate the immune response. In this study, we have successfully induced toIDC-like cells using human iPS cells. Furthermore, we showed that these cells suppress the activity of T cells derived from patients with autoimmune diseases. We believe that these results suggest the possibility of a new cellular immunotherapy for autoimmune diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：iPS細胞 免疫寛容誘導性樹状細胞 自己免疫疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の自己免疫疾患に対する治療は目覚ましい進歩を遂げている。しかしそれでも既存治療に抵抗性の難治性病態は存在し、新しい治療法の開発が必要なことは論を待たない。これら免疫疾患において重要な細胞として樹状細胞が挙げられる。樹状細胞は獲得免疫系の上流に位置し免疫応答の開始機転として重要な役割を担っているが、実際には複数のサブセットが存在しており、免疫応答を負に制御する免疫寛容誘導性樹状細胞 (tolerogenic dendritic cell: tolDC) も存在している。tolDC はヒト末梢血由来単球にいくつかの薬剤を添加することで人為的に誘導が可能であり、誘導した tolDC を移植することで自己免疫疾患を治療する試みも行われている。

しかしこの末梢血単球由来薬剤誘導性 tolDC を直ちに臨床応用するには困難な面もある。すなわち患者状態により誘導源となる機能的な単球が僅かな例もあり、また全てが tolDC へと分化するわけではなく、十分な数を得ることが困難な場合があると予想される。さらに移植が複数回にわたる場合は、そのたびにこれらの問題が生じる。真に臨床応用を視野に入れるならば tolDC として均一な品質を保ち、かつ十分な量を何度も供給できる必要があるが、現在のヒト末梢血単球由来 tolDC は上記の通りそれを満足しない。

そこで我々は iPS 細胞を用い tolDC を誘導することで上記課題を解決しようと考えた。なぜなら iPS 細胞は性質を保持したまま無限に増殖するため、tolDC 分化が効率的に可能なクローンを選択することで機能的な tolDC を安定的に供給できると想定される。しかしこれまでにヒト iPS 細胞から通常の樹状細胞への誘導プロトコールは報告があるが、tolDC への誘導は開発されていない。また、誘導できたとしてもそれが実際の自己免疫疾患患者の免疫細胞を制御しうるか、またそれがどのような機序で生じうるかは明らかではない。

2. 研究の目的

本プロジェクトでは iPS 細胞から tolDC を誘導するプロトコールを確立し、本細胞が各種自己免疫疾患において新規の治療オプションとなる可能性を検証する。また、本細胞がどういったメカニズムで免疫細胞の機能を抑制することが出来るのか、その機構を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では京都大学 iPS 細胞研究所により樹立された iPS 細胞株である 253G4 を用いた。本 iPS 細胞はヒトラミン 511E8 断片 (iMatrix-511) を 1250ng/ml の濃度で添加した StemFit AK02N 無血清培地により継代し、StemFit AK02N 無血清培地により維持を行った。ヒト iPS 細胞から tolDC への分化にあたっては、太田ら (Ohta R, et al. J. Vis. Exp. (148), e59823, doi:10.3791/59823 (2019) や山口ら (Yanagimachi MD, et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e59243. doi:10.1371/journal.pone.0059243) などの報告に準拠し、iPS 細胞から monocyte lineage cell へ誘導し、これを DC に、そして tolDC に変化させるというステップで行った。まず CD14 陽性細胞を効率よく得るために iPS 細胞は micro-fabricated plastic vessel (EzSphere SP Microplate, AGC テクノグラス) に 1 ウェルあたり 3×10^4 個で播種することによりスフェロイドを形成させ、以降の分化誘導に用いた。以降は下記の通りのプロトコールで分化誘導を進めた。

1) (Day0, Step1 中胚葉分化)

StemFit AK02N 無血清培地に CHIR99021、BMP4、VEGFA を添加した誘導培地を用いた。

2) (Day2, Step2 側板中胚葉分化)

Essential 6 培地に SB 431542、VEGFA、bFGF、Stem cell factor を添加した誘導培地を用いた。

3) (Day4-10, Step3 血管造血前駆細胞 ~ monocyte lineage cell の誘導)

Stemline II 培地 (Sigma-Aldrich) に ITSX (insulin-transferrin-selenium-ethanolamine, Thermo Fisher Scientific) を 100 倍希釈で添加した培地に VEGFA、Stem cell factor、Thrombopoietin、IL-3、FLT-3 ligand を添加した誘導培地に変更し 48 時間培養した後、引き続き含有サイトカインを Stem Cell Factor や Thrombopoietin、IL-3、FLT-3 ligand、M-CSF に変更しさらに 4-5 日程度培養した。なお株により培養を 2-3 日延長した方が良いこともある。

4) (Day10 以降, Step4 Monocyte 系 precursor への分化/増殖)

Stemline II 培地 (Sigma-Aldrich) に ITSX を 100 倍希釈で添加した培地に FLT-3 ligand、M-CSF、GM-CSF を添加した誘導培地を用いた。Day14-24 で浮遊細胞を回収し、うち CD14 陽性かつ CD11c 陽性の細胞をそれぞれの CD 抗原に対する抗体とセルソーター (SH800, SONY) を用いて選択し、浮遊細胞培養へ移行した。(細胞密度例: 3×10^4 cells/cm²)。なおこれ以降の培養では ultra-low attachment surface の培養皿 (PrimeSurface® シャーレ 35mm、住友ベークライト) を用いて行った。

5) (toIDC への分化誘導)

上記で回収した浮遊細胞を Stemline II 培地(Sigma-Aldrich)に ITSX を 100 倍希釈で添加した培地に minocycline, GM-CSF、IL-4 を添加した誘導培地で 7 日間培養した。培養 3 日目からはさらに dexamethasone を、培養 5 日目からは TNF- α 、LPS を添加した。

フローサイトメトリー解析は、BD FACS Canto II(Becton Dickinson and Company 製)を用いてデータを収集し、FlowJo ソフトウェアパッケージ(Becton Dickinson and Company 製)を用いて解析した。死細胞は Fixable Viability Dye eFluor™ 78 (Thermo Fisher Scientific)を用いて除去した。以下の抗体は Biolegend 社から購入した。CD3-FITC, CD4-BV450, CD45RA-APC, CD11c-PE, CD14-FITC, CD80-FITC, CD83-PerCP-Cy5.5, CD86-Pacific blue, HLA-DR-Pacific blue, HLA-DR-APC, IL-10-Pacific blue

健康人末梢血由来 PBMC より CD3(-), CD19(-), CD14(+)細胞を cell sorter(SH800, SONY)により回収し、と同様の分化培養系を用いて DC および toIDC への分化を図った。得られた各々の細胞の表面マーカーの相違が iPS 細胞由来の DC および toIDC と同様のものであるかを解析した。

iPS-DC および iPS-toIDC からの total RNA 抽出は ISOGEN II(ニッポンジーン)を用いて行った。得られた RNA は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO)を用いて cDNA に変換し、real time PCR のテンプレートとして使用した。Real time PCR の施行および解析は StepOnePlus System(Applied Biosystems)を用いて行った。プライマーおよびプローブ混合物として IL-10 は Hs00961622_m1, GAPDH は Hs02786624_g1 を用いた (Thermo Fisher Scientific)。

ヒト末梢血 T 細胞と iPS-toIDC の共培養について、抗ヒト CD3 抗体、抗ヒト CD28 抗体 (eBioscience TM)を 10 μ g/ml の濃度で含有した PBS を 96 ウェルプレートに添加し、4 $^{\circ}$ C で一晩おくことでプレートをコーティングした。健康人および京都府立医科大学附属病院膠原病リウマチアレルギー科に通院中の自己免疫疾患患者より同意を得て回収したヒト末梢血由来 T 細胞を CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit でプロトコール通りに染色した。染色した T 細胞と iPS-DC、または iPS-toIDC を 5:1 の割合で混合し、上記の抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体をコーティングした 96 ウェルプレートを用いて共培養を行った。培養 5 日目に、FACS Canto により T 細胞の増殖・分裂の差を確認した。

iPS-toIDC の T 細胞抑制機能が tolerogenic ではない通常の DC による T 細胞プライミング効果に拮抗しうるものであるかを検証するために、健康人由来ヒト末梢血 T 細胞と iPS-DC および iPS-toIDC の 3 者を種々の割合で共培養し、T 細胞の増殖への影響を解析した。と同様に T 細胞はあらかじめ CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit で染色し、培養 5 日目に、FACS Canto により T 細胞の増殖・分裂の差を確認した。

4. 研究成果

研究成果の一部を図に示す。

ヒト iPS 細胞から toIDC への誘導

上記 3 で示した分化誘導プロセスとそれに応じた iPS 細胞コロニーの形態上の変化および CD11c および CD14 陽性細胞の経時的な出現について示す(図 1)。iPS 細胞コロニーの辺縁が次第に浮遊細胞化し、day10 以降で CD11c および CD14 陽性細胞

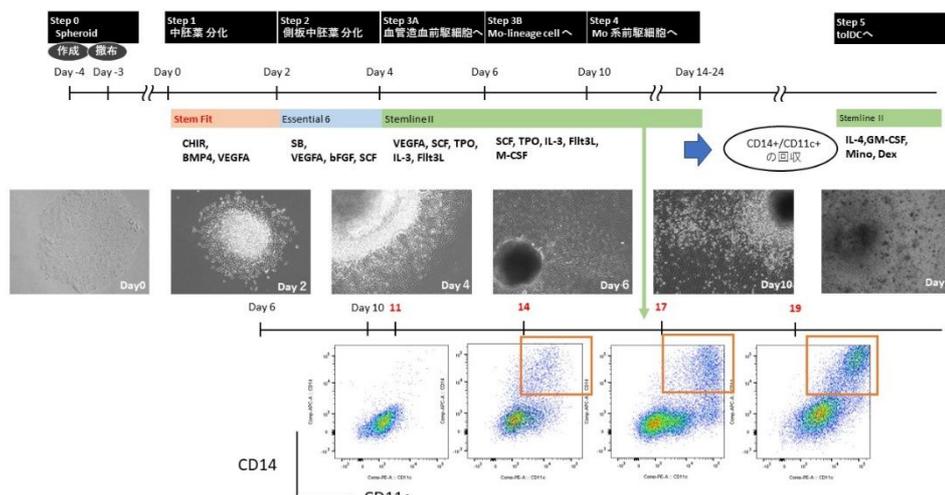


図1: ヒト iPS 細胞から toIDC への誘導

の割合が増加していることがわかる。これらを回収し GM-CSF、IL-4 等の存在下で培養すると DC が、さらに minocycline や dexamethasone を加えた条件下で培養することで toIDC が得られる。これらの DiffQuick 染色像を示す。形態学的には両者の差異は明らかではない。

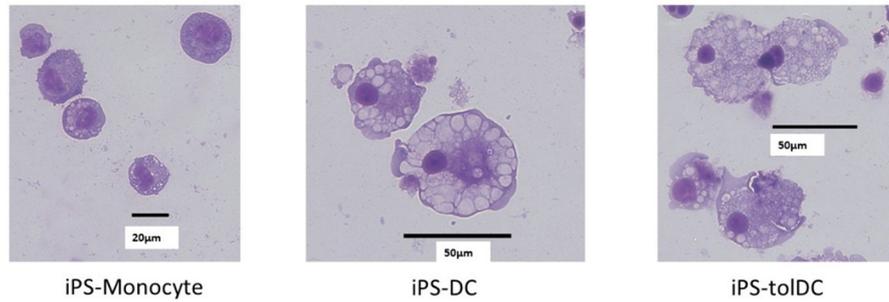


図2：iPS細胞由来単球、DC、toIDCのDiffQuick像（×40）

iPS-toIDC は iPS-DC と比較し共刺激分子が低発現となる

誘導した iPS-toIDC と iPS-DC について CD80、CD83、CD86、HLA-DR の発現の相違を flowcytometry で検証した。既報によると toIDC 化することで共刺激分子の発現が低下することが知られており、我々が誘導した iPS-toIDC も iPS-DC と比べて HLA-DR の発現には差異がないが、CD80、CD83、CD86 については低発現となっていることが確認された（図3）。実際にヒト末梢血 PBMC より回収した CD14 陽性細胞を基に同様のプロトコルで誘導した DC および toIDC の共刺激分子発現を確認したところ、iPS 細胞由来のものと同様に toIDC での共刺激分子の発現低下が見られることが確認でき、iPS 細胞からの誘導系においても primary cell 由来のものと同様の phenotype を示した（図4）。

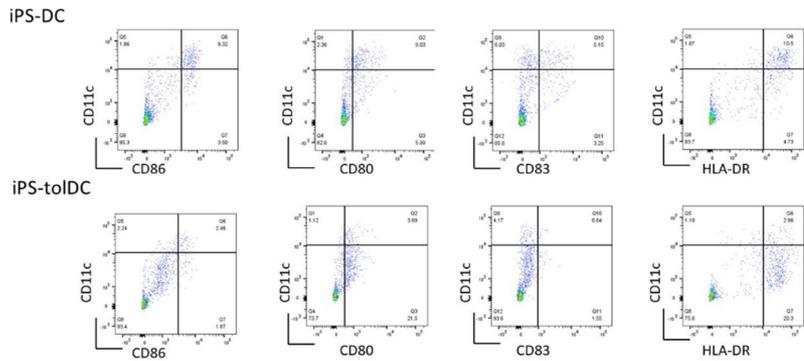


図3：iPS-DCおよびiPS-toIDCにおける共刺激分子の発現解析

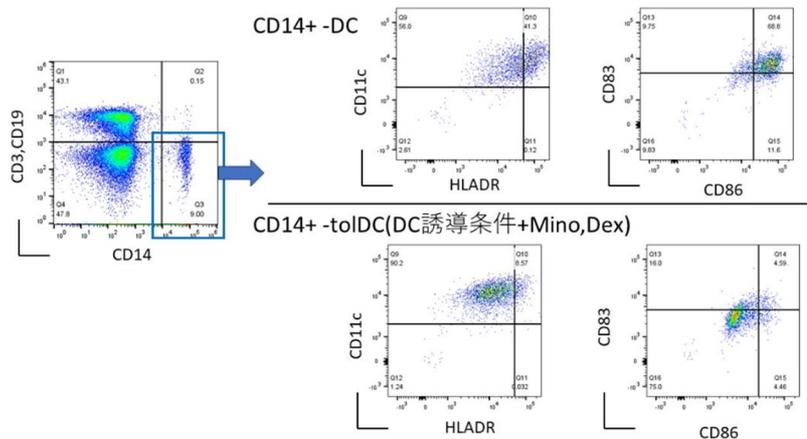


図4：健康人PBMC由来CD14+細胞から誘導したDC, toIDC

iPS-toIDC は IL-10 を産生する

iPS-toIDC の IL-10 産生能について real time PCR、細胞内染色による flowcytometry、培養上清の ELISA により検証した。いずれの検証系においても iPS-toIDC は iPS-DC に比べて有意に IL-10 を産生していることが判明した（図5）。

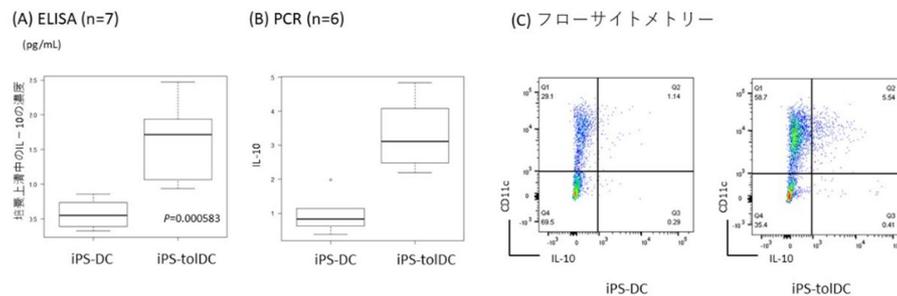


図5：iPS-toIDCはIL-10を産生する

iPS-toIDC は健康人由来および自己免疫疾患由来 T 細胞を抑制する
iPS-toIDC が実際に T 細胞の機能を抑制しているかを検証するために健康人由来 T 細胞および関節リウマチ患者、SLE 患者、ANCA 関連血管炎患者由来の T 細胞と iPS-DC および iPS-toIDC をそれぞれ抗 CD3/CD28 抗体の存在下で共培養を行った (図 6)。赤は iPS-DC との共培養、青は iPS-toIDC との共培養を示している。このアッセイ系ではピークが左によるほどに増殖していることを示すので、iPS-toIDC との共培養系では T 細胞の増殖が健康人由来 T 細胞でも自己免疫疾患患者由来 T 細胞でもともに抑制されていることが分かる。

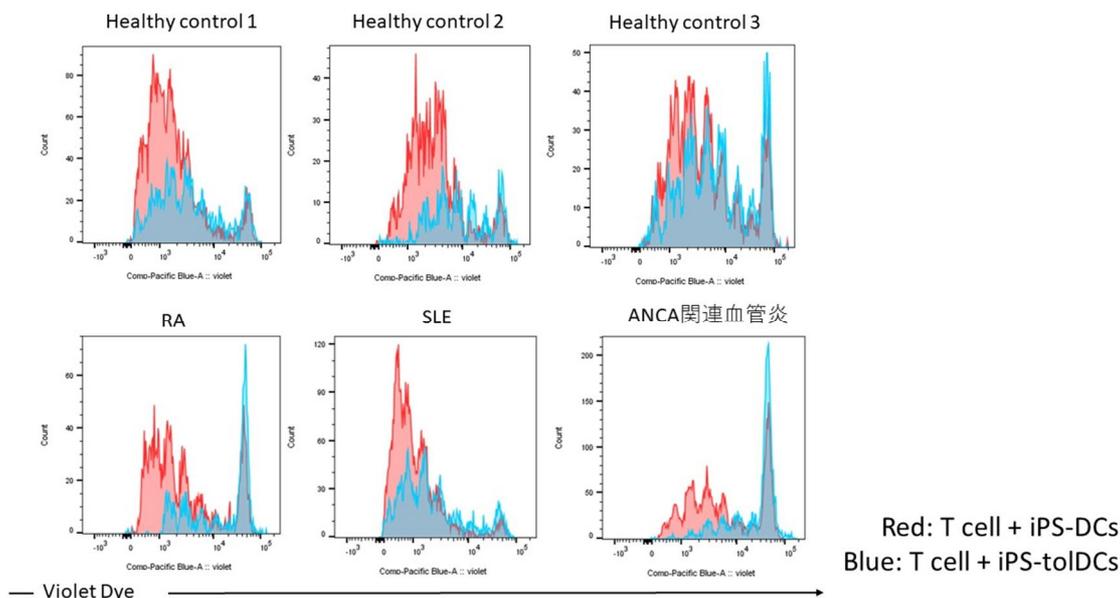


図6：iPS-toIDCはT細胞の増殖を抑制する

iPS-toIDC は通常型 DC の存在下でも T 細胞の増殖を抑制する
の実験系では iPS-toIDC のみと T 細胞での共培養でアッセイを行い、T 細胞増殖を抑制することを示しているが、実際のヒト疾患への応用を考えるとヒト体内では tolerogenic ではない通常の DC により T 細胞が priming を受けている状況も考えられ、その状況下でも iPS-toIDC が T 細胞機能を抑制しているかは検証の必要がある。そこで、iPS-toIDC と iPS-DC、健康人由来 T 細胞の 3 種を共培養し、T 細胞の増殖が抑制されるかを検討した。結果を図 7 に示す。A は iPS-toIDC と DC の比率が 1:4、B は toIDC と DC の比率が 1:1 の条件である。B の方がやや T 細胞の抑制が A よりも強い傾向にはあるが、DC の 4 分の 1 量であっても抑制することができており、iPS-toIDC が通常の DC によるプライミング作用を阻害していることが示された。

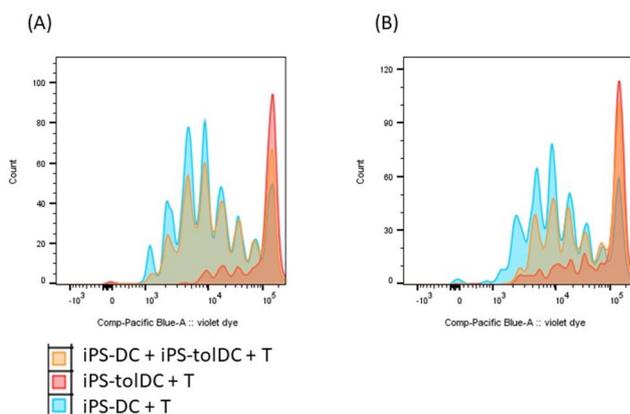


図7：iPS-toIDCはDCによるT細胞のプライミングを抑制する

他のデータは割愛するが、本研究により iPS-toIDC の分化誘導プロトコルを確立し得た。また、免疫制御性の phenotype を有していることを示すことが出来た。この結果は自己免疫疾患に対する新たな治療法の開発につながるものと考えられる。

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

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 IL-10高産生性免疫寛容樹状細胞を製造する方法	発明者 藤岡数記、平野愛子、川入豊、松田修	権利者 京都府公立大学法人
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-196390	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	松田 修 (Mazda Osam) (00271164)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	岸田 綱郎 (Kishida Tsunao) (00370205)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	
研究分担者	藤井 渉 (Fujii Wataru) (60755643)	京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医 (24303)	

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
---------	---------