

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659201

研究課題名(和文)人工多能性幹細胞由来自己反応性リンパ球を用いた自己免疫疾患霊長類モデルの開発

研究課題名(英文)Development of a non-human primate autoimmune model using autoreactive lymphocytes derived from induced pluripotent stem cells

研究代表者

伊藤 靖 (Itoh, Yasushi)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90324566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患のカニクイザルモデルを作成するため、自己抗原に反応するリンパ球をiPS細胞から作製することを試みた。線維芽細胞由来のiPS細胞をサイトカイン、フィーダー細胞と培養し、造血幹細胞に類似する性質をもつ細胞を試験管内で誘導した。この細胞をTリンパ球への分化に必要な信号を生み出す分子を発現するフィーダー細胞とサイトカインと培養し、成熟Tリンパ球の発現する分子、T細胞抗原受容体を発現する細胞の分化に成功した。しかしながら、このiPS細胞由来Tリンパ球は自己の細胞に対する反応性は示さなかった。

研究成果の概要(英文)：We sought to establish an autoimmune cynomolgus macaque model using autoreactive T lymphocytes derived from iPS cells. iPS cells were derived from fibroblasts in the skin of a cynomolgus macaque. The iPS cells were culture with feeder cells in the medium containing cytokines to induce hematopoietic stem cells. Furthermore, induced hematopoietic like cells were cultured with feeder cells inducing T lymphocyte differentiation in the medium containing cytokines. The cultured cells had T-cell antigen receptors, which were expressed on the surface of mature T lymphocytes. The induced T lymphocytes did not respond to cells from the donor macaque.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：iPS細胞 リンパ球 霊長類モデル 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患の病因と治療法の開発のために人の病態を反映する動物モデルが必要となる。さらに人での治療法の開発を考慮するとより人に近い症状と病態を再現できる霊長類モデルが必要である。しかし、霊長類の自己免疫疾患モデルは抗原が判明している関節リウマチ(抗原:コラーゲン)、実験的自己免疫性脳脊髄炎(抗原:ミエリン塩基性タンパクなど)などに限られる。また、特定の主要組織適合抗原複合体(MHC)を有するサルでしか、これらの疾患を誘導できず、近交系動物が容易に使用できない霊長類では限られた実験しか行われていない。そこで本研究ではiPS細胞から胸腺環境を介さず自己反応性Tリンパ球を誘導、ドナーサルに移植することで、自己免疫疾患モデルを作製することを計画した。

Tリンパ球が胸腺内で分化する時、通常自己抗原と反応する抗原受容体を発現する細胞は「負の選択」により除去される。そのため、末梢免疫組織には自己反応性Tリンパ球は存在せず、自己免疫疾患を起こさない。そこで胸腺環境を介さずにTリンパ球を分化させれば、負の選択を回避し、自己反応性Tリンパ球を得られるのではないかと発想した。

研究開始当初ではマウスiPS細胞からTリンパ球の誘導した報告はあったが、誘導効率は低く、Tリンパ球の機能の解析はされていなかった。そのため霊長類iPS細胞から機能を有するTリンパ球の誘導法の開発が必要とされていた。

2. 研究の目的

自己免疫疾患の霊長類モデルの作成を目的とし、自己反応性Tリンパ球をiPS細胞から樹立する。次に自己反応性Tリンパ球をカニクイザルに移植し、自己免疫疾患を誘導する。最後に治療法の開発のためにiPS細胞から免疫抑制性Treg細胞の誘導条件の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) カニクイザル iPS 細胞の樹立

カニクイザルTリンパ球及び皮膚線維芽細胞に山中4因子(c-myc, Oct3/4, Klf4, Sox2)をレトロウイルス・レンチウイルスベクターを用いて導入し、iPS細胞を誘導した。マウス胎児線維芽細胞(MEF)上で培養し、継代を続けた。

MEFを除去後、iPS細胞をbone morphogenetic protein (BMP4, 100 ng/ml)を含むaggrewell内で培養し、embryonic bodyを誘導した。

(2) 造血幹細胞の誘導

embryonic bodyをX線照射したフィーダー細胞C3H/10T $\frac{1}{2}$ 上加え、L-アスコルビン酸、vascular endothelial growth factor (VEGF, 50 ng/ml)及びstem cell factor (SCF, 100

ng/ml)を含む培養液内で低酸素状態で1週間培養した。次の1週間は通常酸素濃度+5%炭酸ガスの状態で培養した。この時点でCD34陽性細胞が含まれていることを蛍光標識抗体とフローサイトメーターで確認した。

(3) リンパ球の誘導

Delta-like ligand 1を発現したフィーダー細胞OP9-DL1をコンフルエントになるまで培養したシート上で上記のCD34陽性細胞を培養した。その際にSCF(10 ng/ml)、Flt3 ligand (Flt3L, 5 ng/ml)、interleukin-7 (IL-7, 5 ng/ml)を加えた。1ないし2日おきに上記3種のサイトカインを含む培養液を交換した。

NOGマウス(リンパ球欠損)に上記のCD34陽性細胞を移植した。経時的に採血し、蛍光色素標識抗体で染色し、フローサイトメーターを用いて、サル由来細胞の存在を解析した。

カニクイザルBリンパ球ラインは末梢血リンパ球をherpes virus macaca fascicularis (HVMF1)産生細胞の培養上清内で培養し、不死化させて作製した。

4. 研究成果

(1) カニクイザル iPS 細胞の樹立

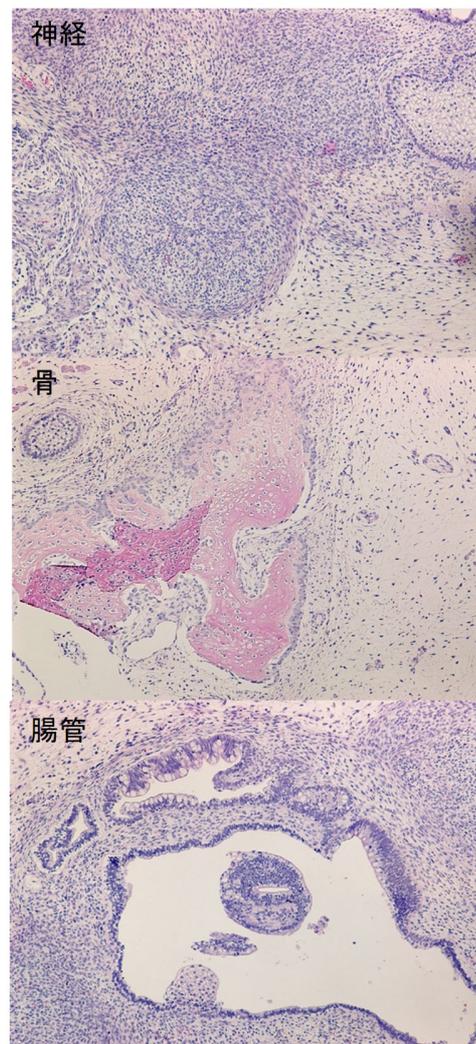


図1 マウスに移植したカニクイザル iPS 細胞が形成した奇形腫。神経、骨、腸管のほか図に示す以外に軟骨、筋肉、皮膚等にも分化した。三胚葉に分化し、多能性を持つことが確認された。

カニクイザルの末梢血リンパ球と皮膚線維芽細胞に山中 4 因子を導入し、iPS 細胞を樹立した。この細胞をリンパ球欠損マウスの皮下、精巣に移植したところ、神経、骨、腸管等への分化が認められ、多能性が確認された（図1には線維芽細胞由来 iPS 細胞の結果を示す）。

BMP4 を含む aggreWell 内でこの iPS 細胞を培養し、embryonic body を作製した。

(2) 造血幹細胞の誘導

iPS 細胞由来 embryonic body をフィーダー細胞 10T $\frac{1}{2}$ 上で2週間培養すると iPS sac が形成された。この細胞中の 10 ないし 20%が CD34 陽性細胞であった。

これらの細胞を抗 CD34 抗体及び抗 VEGF 受容体 2(VEGFR2)抗体で染色すると、CD34 陽性 VEGFR2 陰性細胞（図2の P3）、CD34 陽性 VEGFR2 陽性細胞（図2の P2）、CD34 陰性 VEGFR2 陰性細胞（図2の P4）に分類された。CD34 陽性 VEGFR2 陰性細胞は造血幹細胞、CD34 陽性 VEGFR2 陽性細胞は血管・間質細胞の幹細胞と同様の表現型を示した。従って、セルソーターを用いて CD34 陽性 VEGFR2 陰性細胞を分離した（図2の左上の細胞集団 P3）。

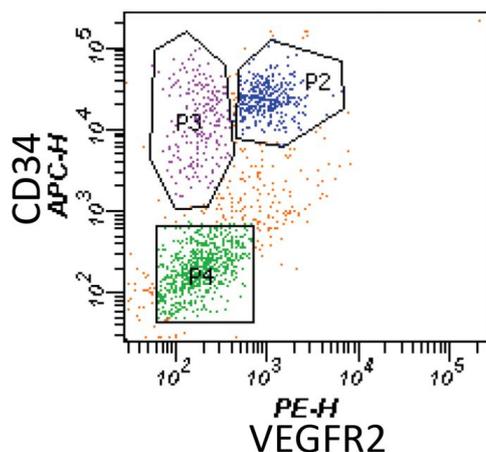


図2 iPS 細胞から誘導された造血幹細胞様細胞。カニクイザル iPS 細胞をフィーダー細胞上でサイトカインと2週間培養した。得られた細胞を蛍光色素標識抗体で染色後、フローサイトメーターで解析、P3 のゲート内の細胞を分取した。

(3) リンパ球の誘導

分取した iPS 細胞由来 CD34 陽性 VEGFR2 陰性細胞をフィーダー細胞 OP9-DLL1 上で SCF、Flt3L、IL-7 を加えて培養したところ、培養から4週間後に CD8 と CD4 の両方が陽性の細胞が検出された（図3）。

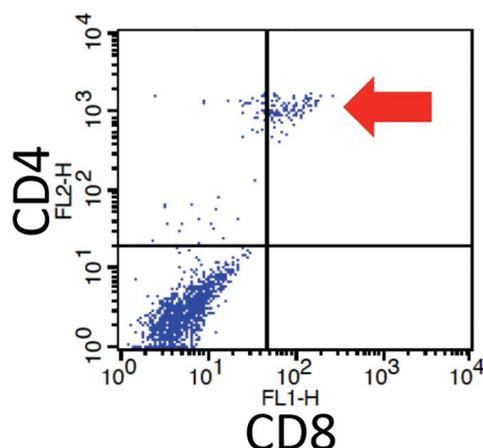


図3 iPS 細胞由来造血幹細胞から分化した T リンパ球様細胞。T リンパ球分化用フィーダー細胞とサイトカインを加えて培養後、蛍光色素標識抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した。正常の胸腺に存在する CD4CD8 ダブルポジティブ細胞に相当する細胞が誘導された（赤矢印）。

CD34 陽性細胞の培養開始から 11 週後、TCR 陽性細胞が検出された。この細胞は CD8 陽性、CD4 陰性であり、キラー T 細胞様の表現型を持つ細胞であった（図4）。

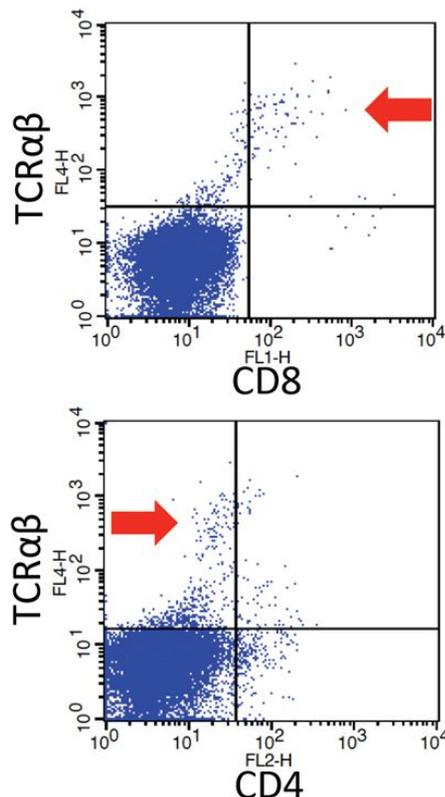


図4 T 細胞抗原受容体の発現。CD4CD8 ダブルポジティブ細胞の培養を継続し、T 細胞抗原受容体 TCR の発現を解析した。TCR 陽性細胞の多くは CD8 陽性（上図矢印）、CD4 陰性（下図矢印）であった。

(4) リンパ球の機能

リンパ球の機能を調べるため、上記 CD8 陽性 TCR 陽性細胞を抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体 + 抗 CD49d 抗体で刺激したところ、増殖反応が見られた(図5上の棒グラフ)。さらに T リンパ球を自己 B 細胞ライン、アロ(MHC 不一致他己) B 細胞ライン、MHC 一致他己 B 細胞ラインと培養したところ、MHC 一致他己 B 細胞ラインに対して増殖反応が見られた(図5下3個の棒グラフ)。以上より、iPS 細胞より誘導された T リンパ球は機能を有する T 細胞抗原受容体(TCR)を発現するが、自己抗原に対する反応性は持たないと考えられた。

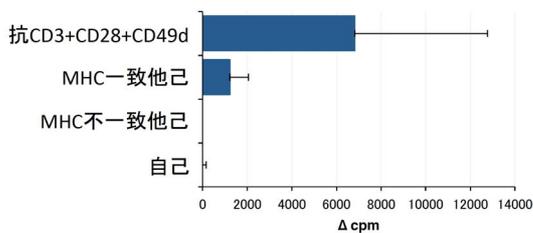


図5 iPS 細胞由来 T リンパ球の増殖反応。カニクイザル iPS 細胞由来 T リンパ球を抗体(抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体、抗 CD49d 抗体)あるいは B リンパ球ラインと培養した。培養終了 16 時間前にトリチウム標識チミジンを加え、DNA 複製反応を測定した。T リンパ球のみを培養した数値を引き、cpm として表示した。

なお、リンパ球欠損マウスに CD34 陽性細胞を移植しても、カニクイザル由来の血液細胞の増加は見られなかった。

今後、TCR のレパトリーの解析、自己反応性細胞の誘導のためにカニクイザル MHC を発現するフィーダー細胞を用いた培養が必要と考えられる。さらに抑制性 Treg 細胞など特定の機能を有する T リンパ球への分化誘導条件と産生するサイトカインを解析の上で、生体内での細胞動態の研究へと進める必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Nakayama M, Shichinohe S, Itoh Y, Ishigaki H, Kitano M, Arikata M, Pham VL, Ishida H, Kitagawa N, Okamoto M, Sakoda Y, Ichikawa T, Tsuchiya H, Nakamura S, Le QM, Ito M, Kawaoka Y, Kida H, Ogasawara K. Protection against H5N1 highly pathogenic avian and pandemic (H1N1) 2009 influenza virus infection in cynomolgus monkeys by an inactivated H5N1 whole particle vaccine. *PLoS ONE* 8: e82740, 2013 査読有 (doi:10.1371/journal.pone.0082740)

Pham VL, Nakayama M, Itoh Y, Ishigaki H,

Kitano M, Arikata M, Ishida H, Kitagawa N, Shichinohe S, Okamoto M, Sakoda Y, Tsuchiya H, Nakamura S, Kida H, Ogasawara K. Pathogenicity of pandemic H1N1 influenza A virus in immunocompromised cynomolgus macaques. *PLoS ONE* 8: e75910, 2013 査読有 (doi:10.1371/journal.pone.0075910)

Arikata M, Itoh Y, Okamoto M, Maeda T, Shiina T, Tanaka K, Suzuki S, Nakayama M, Sakoda Y, Ishigaki H, Takada A, Ishida H, Soda K, Pham VL, Tsuchiya H, Nakamura S, Torii R, Shimizu T, Inoko H, Ohkubo I, Kida H, Ogasawara K. Memory immune responses against pandemic (H1N1) 2009 influenza virus induced by a whole particle vaccine in cynomolgus monkeys carrying Mafa-A1*052:02. *PLoS ONE* 7: e37220, 2012 査読有 (doi:10.1371/journal.pone.0037220)

Kitano M, Itoh Y, Kodama M, Ishigaki H, Nakayama M, Ishida H, Baba K, Noda T, Sato K, Nishashi Y, Kanazu T, Yoshida R, Torii R, Sato A, Ogasawara K. Efficacy of single intravenous injection of peramivir against influenza B virus infection in ferrets and cynomolgus macaques. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55: 4961-4970, 2011 査読有 (doi:10.1128/AAC.00412-11)

〔学会発表〕(計4件)

Itoh Y, Nakayama M, Ishigaki H, Ogasawara K. Pathogenicity of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus in immunosuppressed cynomolgus monkeys. 第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月12日、幕張メッセ(千葉県)

Itoh Y, Ishigaki H, Nakayama M, Ishida H, Ogasawara K. Therapeutic efficacy of a human-mouse chimeric anti-H5 hemagglutinin antibody on lethal H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection in cynomolgus macaques. 第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月7日、神戸国際会議場(兵庫県)

Itoh Y, Arikata M, Ishigaki H, Nakayama M, Ishida H, Ogasawara K. Influenza virus peptides specifically bound to cynomolgus macaque major histocompatibility complex class I Mafa-A1*5202. 第40回日本免疫学会学術集会、2011年11月29日、幕張メッセ(千葉県)

Itoh Y, Arikata M, Maeda T, Shiina T, Ishigaki H, Takada A, Okamoto M, Sakoda Y, Nakayama M, Kida H, Ogasawara K. Identification of pandemic influenza virus NP peptides bound to cynomolgus macaque MHC class I Mafa-A1*5202 and stimulating CTL responses. XV International Congress of Virology, 2011

年 9 月 15 日、札幌コンベンションセンター
(北海道)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shiga-medac.jp/~hqpatho2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 靖 (ITOH YASUSHI)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90324566

(2) 研究分担者

小笠原 一誠 (OGASAWARA KAZUMASA)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：20169163

石垣 宏仁 (ISHIGAKI HIROHITO)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90432301