

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659629

研究課題名（和文） iPS細胞を用いたMDSCへの分化誘導および免疫細胞療法の開発に関する研究

研究課題名（英文） Establishment of immune cell therapy using iPS-derived MDSC

研究代表者

梨井 康（LI XIAOKANG）

（独）国立成育医療研究センター・研究所・室長

研究者番号：60321890

研究成果の概要（和文）：マウスiPS細胞から造血幹細胞へ分化誘導した後、GM-CSFを添加し、肝星細胞存在下MDSC（iPS-MDSC）への分化を試みた。その結果、iPS-MDSCでは、骨髄由来のMDSC（BM-MDSC）とほぼ同様で、iPS、骨髄由来DCと比較して、Ia、CD11c、CD40分子の発現は顕著に減弱した。また、抗原提示能としてT細胞に対する増殖効果がなく、アロ刺激によるCD4、CD8陽性T細胞増殖の抑制機能が有した。また、B6マウスからBDF1マウスへのリンパ球移植による急性GvHDモデルも確立でき、免疫細胞療法の実施へと繋げていきたい。

研究成果の概要（英文）：To establish a novel method to generate myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) from mouse induced pluripotent stem (iPS). We demonstrated that the iPS cell-derived MDSCs (iPS-MDSCs) possessed the characteristics of MDSCs including the morphology of typical BM-derived MDSC; low expression of the surface molecular, Ia, CD11c, and CD40; capacity of suppress the allogeneic T cell responses. Also we set up a unique mouse GvHD model (B6 to BDF1) for valuation the iPS-MDSCs function by immune cell therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学臨床医学

キーワード：移植・再生医療、遺伝子、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

現在用いられている免疫抑制剤による移植医療は、移植を臓器不全に対する最終的な解決方法としての医療へと導きはしたが、半永久的な投与による副作用、精神的および経済的な負担が大きい為、新たな拒絶反応抑制方法の確立が切望されている。一方、人工多能性幹細胞（iPS細胞；induced Pluripotent Stem cell）は、幅広い研究領域において革新的な発展を遂げる可能性を秘めた「夢の細胞」として、大きな注目を集めている。これら幹細胞は自己再生能と多分化能を有し、幹細胞を用いた細胞・組織の再生こそが再生医療の核であると考えている。ミエロイド由来

抑制細胞（Myeloid-derived suppressor cells; MDSC）は、強力なT細胞機能障害誘導活性を持つ未成熟な骨髄性細胞の不均一な細胞集団で、種々の病的な状態（ガン、感染、自己免疫疾患）において、未成熟なミエロイド系前駆細胞の、顆粒球、マクロファージ、樹状細胞への分化が部分的に阻害され、その結果として、この未成熟な集団が増殖して数を増やしたものである。近年、MDSCによる臓器移植後の拒絶反応抑制、自己免疫疾患の治療に対する臨床応用の可能性が期待されている。しかしながら、骨髄由来細胞はマウス等実験動物ではその採取が容易であるが、ヒトの場合骨髄細胞の採取は患者に大き

な負担を課す。また、MDSC への分化・誘導には長い期間が必要であり、細胞調整は容易では無く臨床応用の可能性が制限されている。iPS 細胞の利用は患者への負担が極めて少なく、培養は実験室レベルで大規模に行う事が可能であり、十分な細胞が供給できる。本研究の展開により、幹細胞の免疫担当細胞への分化誘導を中心とした再生医学を樹立することにより、移植後の拒絶反応抑制、自己免疫疾患の治療に新たな可能性を生み出せると確信している。

2. 研究の目的

本研究は、幹細胞 (iPS) から MDSC への分化誘導を中心とした再生医学 (基礎医学) を、移植後の拒絶反応抑制や自己免疫疾患の治療等の医療 (臨床医学) へと展開させるための基礎研究として進められる。そのために、2年間の研究期間内において、今現在進めている iPS 細胞による制御性樹状細胞 (DC) への分化誘導研究の成果を生かし、iPS 細胞から MDSC への分化誘導方法の確立および動物移植モデルの検証等による細胞療法の構築を目標としている。

3. 研究の方法

1) マウス iPS 細胞から MDSC への分化誘導

iPS-MDSC の分化誘導は共同研究者 Lu らが確立された肝星細胞 (hepatic stellate cells、HSC) を用いた骨髄由来 MDSC (BM-MDSC) への分化誘導技術を基盤として検討した上、マウス iPS 細胞を用いて、MDSC への分化誘導を試みた。分化誘導過程中、細胞の形態を指標として細胞を経時的に回収し、培養中の各時期における MDSCs の特徴、機能および細胞回収のタイミング等について検討を行い、iPS 細胞から MDSC への分化誘導、ならびに免疫制御細胞としての高機能化を目指す。

2) 免疫細胞療法の検証するための GvHD モデルの確立

マウスを用いた局所および全身 GvHD (graft versus host disease) モデルにおける MDSC、制御性 DC の効果を検討するために、分化誘導された MDSC 或は制御性 DC を宿主に養子移植する。GvH 反応の抑制効果、免疫組織学的所見を検討すると共に、移植免疫寛容誘導・維持機構の解明を細胞免疫学的解析にて行う。MDSC がもたらす免疫制御の分子作用機構をマイクロアレイ、定量 RT-PCR を用いた網羅的な遺伝子発現解析により比較検討する。また、臨床応用を視野に入れ、微量の既存免疫抑制剤との併用による免疫抑制の相乗効果についても検討を

行う。

4. 研究成果

初年度の研究成果では、1) iPS細胞からより簡易・大量にミエロイド由来細胞作製する方法の確立を行った：今まで確立したES、iPS細胞から樹状細胞を作成する分化誘導技術を基盤として、細胞免疫治療に用いる各種免疫細胞を簡易に大量に作製するための分化誘導方法を検討した。DCへの分化誘導と同様、Step-1で7日間培養し、iPS細胞のコロニーが十分に分化したことを確かめたのち、Step-1の1枚の培養皿をトリプシン処理し、iPS細胞、OP9細胞とも単細胞にし、ゼラチンコートしたStep-1と同サイズの培養皿3枚に等量に播種し、Step-2の培養過程に入り、十分量の分化誘導された浮遊細胞を得ることができるとを見出した。2) iPS細胞からMDSCへの分化誘導およびその機能解析を行った：iPS-MDSCの誘導は共同研究者Luらが確立された肝星細胞 (hepatic stellate cells、HSC) を用いた骨髄由来MDSC (BM-MDSC) への分化誘導技術を基盤として検討した。その結果、iPS-MDSCでは、BM-MDSC とほぼ同様に、iPS-DC、BM-DCと比較して、Ia、CD11c、CD40分子の発現は顕著に減弱した (図1)。ギムザ染色による細胞形態の観察においては、iPS-MDSCとBM-MDSCの差が見られなかった。また、抗原提示能としてT細胞に対する増殖効果がなく、アロ刺激によるCD4、CD8T細胞増殖の抑制機能がiPS-MDSCの用量に比例していた。これらの結果からiPS細胞からMDSCに分化誘導することができたといえる。

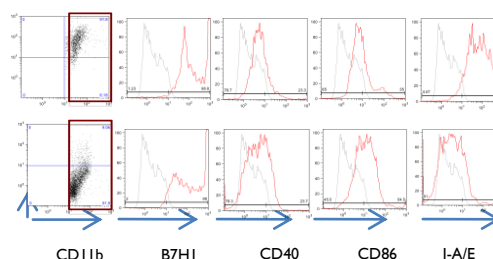


図1. iPS細胞から分化誘導出来たDC (上段) およびMDSC (下段) のFACSによる細胞表面分子の比較

初年度の成果を踏まえ、次年度の研究成果は、4) iPS-MDSCのアロ刺激によるT細胞増殖の抑制機能がiPS-MDSCが有する結果を踏まえて、今年度はiPS-MDSCの抗原提示能および抑制機能について、未熟iPS-DCを追加して、さらに詳細に比較検討した。その結果、BM-MDSC、未熟iPS-DCより、アロ刺激によるCD4、CD8T

細胞増殖の抑制機能が顕著であり、iPS-MDSCの用量に比例していた（図2）。

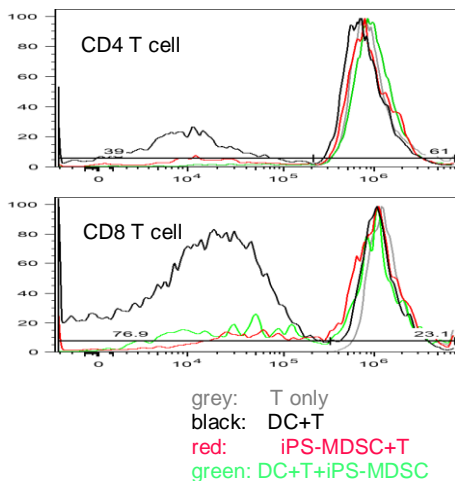


図2. iPS-MDSCがアロ刺激によるCD4、CD8細胞増殖の抑制機能を有した。

5) 急性GvHDモデルの確立においては、B6マウス脾臓から分離したT細胞を調製し、B6D2F1マウス尾静脈に注射した。細胞移植後7日後（Day7）と14日後（Day14）に各臓器をサンプリングし、解析に用いた。脾臓および肝臓においては、ドナー由来細胞であるH2K^b陽性細胞がDay7からDay14にかけて増加し、ドナー由来T細胞、特にCD8T細胞が増殖していることが分かった（図3）。

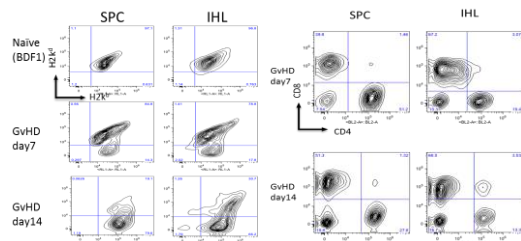


図3. GvHDマウス脾臓細胞（SPC）、肝臓浸潤細胞（IHL）におけるドナー由来細胞の増殖

また、レシピエントマウスの各臓器に対して免疫染色を行った結果、Day7とDay14の両方においてCD4及びCD8とBrdU（細胞活性マーカー）が共発現している箇所が多く観察された。この結果からレシピエント臓器内での活性化CD4、CD8T細胞の存在が確認できた。さらに、Day14では、CTL細胞に関連するサイトカインであるPerforin、GranzymeB遺伝子の発現が上昇することが分かった。以上の結果から、B6マウス脾細胞移植によるレシピエントB6D2F1マウスへの急性GvHD誘導が確認された。今後、

iPSから誘導出来た、しかもすでにin vitroで、その機能解析出来たiPS-MDSCを用いて、急性GvHDモデル等用いて引き続き行う予定である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 4 件）

1) Liu C, Zhu P, Saito T, Isaka Y, Nagahara Y, Zhuang J, Li Xiao K. Non-myeloablative conditioning is sufficient to induce mixed chimerism and subsequent acceptance of donor specific cardiac and skin grafts. **Int Immunopharmacol.** 16(3): 392-8; 2013.

2) Kitazawa Y, Li Xiao K, Xie L, Zhu P, Kimura H, Takahara S. Bone marrow derived conventional, but not cloned, mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation and prevent graft-versus-host disease in rats. **Cell Transplant.** 21(2): 581-90; 2012.

3) Liu Z, Hou J-G, Chen J-J, Tsumura H, Ito M, Ito Y, Hu X, Li Xiao K. Deletion of CD98hc in T cells results in cardiac allograft acceptance by increasing regulatory T cells. **Transplantation** 93(11): 1116-24; 2012.

4) Xie L, Ichimaru N, Morita M, Chen JJ, Zhu P, Wang JH, Urbanellis P, Shalev I, Nagao S, Sugioka A, Zhong L, Nonomura N, Takahara S, Levy GA, Li Xiao K. Identification of a novel biomarker gene set with sensitivity and specificity to distinguish between allograft rejection and tolerance. **Liver Transplant.** 18:444-454; 2012.

〔学会発表〕（計 3 件）

1) Cai SJ, Morita M, Kitajima Y, Zhang Q, Hou JG, Kimura H, Lu L, Li Xiao K. The requirement of the myeloid-derived suppressor cells for spontaneous acceptance after liver transplantation in mice. 第 39 回日本免疫学会総会, 幕張. 2011. 11. 27-29.

2) Zhang Q, Cai SJ, Hou JG, Yazawa K, Ichimaru N, Kobayashi M, Higuchi S, Uno A, Ando H, Sakurai K, Adachi Y, Ohno N, Xu JH, Li Xiao K, Takahara S. A novel siRNA delivery system specifically silencing target gene to induce permanent acceptance of mouse cardiac allograft. 24th International Congress of the Transplantation Society. Berlin, Germany; 2012. 7. 15-19.

3) 李小康, 森田美和, 杉岡篤. マウス肝移植モデルを用いた免疫寛容機序の解明. 第 48 回日本移植学会総会 名古屋. 2012. 9. 20-22.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梨井 康 (LI XIAOKANG)

(独) 国立成育医療研究センター・研究所
・室長

研究者番号：62321890

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

