

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790276

研究課題名(和文) 多能性幹細胞における免疫特権の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of immune privilege in pluripotent stem cells

研究代表者

沖田 圭介 (Okita, Keisuke)

京都大学・iPS細胞研究所・講師

研究者番号：90512434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞に対してIFN γ で刺激を行い、HLAのわずかな発現上昇が認められることを確認した。しかし、その上昇幅は線維芽細胞に対し10分の1程度であった。一方で、申請者はヒト末梢血より効率よくiPS細胞を作製する方法を開発し報告した(Stem Cells, 31, 458-466, 2013)。この方法を発展させ、カニクイザルからiPS細胞の樹立に成功した。この細胞を用いると、ヒトの移植時における免疫原性の有無や程度を類推するモデルの作出が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Induced pluripotent stem (iPS) cells showed slight upregulation of HLA expression by the stimulation with IFN γ , but it was ten fold lower than that in fibroblasts. On the other hand, we have recently developed an efficient method to make iPS cells from human peripheral blood. This study enabled us to establish iPS cells from Macaca fascicularis. Transplantation of differentiated cells from monkey iPS cells can be a useful model to examine human immune response after transplantation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：再生医学 多能性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

MHC クラスI は生体のほぼすべての細胞表面に発現しており、細胞内で消化したペプチド断片を免疫担当細胞へと提示する。細菌やウイルス感染に対する応答をはじめ、移植片への免疫拒絶反応や腫瘍免疫において重要な役割を担う。

申請者の所属する研究室では、ヒトやマウス線維芽細胞に、4つの遺伝子(Oct3/4, Sox2, Klf4およびc-Myc)を導入することによって、ES細胞様のiPS細胞が作製できることを報告した(Cell, 126, 663-676, 2006; Cell, 131, 861-872, 2007)。その結果、ヒトiPS細胞やES細胞などの多能性幹細胞を用いた細胞移植医療への期待がこれまで以上に高まってきている。しかし、こうした多能性幹細胞はMHCやその関連遺伝子の発現量が低く、免疫原性が弱いことが知られている(PNAS, 99, 9864-9869, 2002)。これは免疫特権(immune privilege)と呼ばれている。また、IFN等の抗ウイルスサイトカインに対する反応も減弱している。さらに多能性幹細胞から作製した分化細胞においても、免疫原性が低下しているという報告もある(PNAS, 104, 20920-20925, 2007; Stem Cells, 24, 221-229, 2006)。このような免疫原性の低下は、移植後の拒絶反応の軽減につながるが、一方で免疫系による監視が弱くなるためウイルス感染や腫瘍化などへの応答が不十分となり、安全性を損なう危険がある。iPS細胞の特徴の一つは、自分自身の細胞から作れることである。さらに、将来的にはバンクという形でドナーとレシピエントのMHCを合わせて移植し拒絶反応を回避することも想定されている。そのため、免疫特権により拒絶反応の軽減を図るよりも、安全性を向上させるために免疫原性を増強することが望ましいと考えられる。

しかしながら、多能性幹細胞が免疫特権を持つ機構については、現象論での解析にとどまっており、詳細なメカニズムの解析は国内外でもほとんどなされていない。例えば、マウスES細胞から心筋細胞を分化させ、これをマウスへと移植するなどの研究がおこなわれているが、組織学的に免疫応答反応の有無を解析しているのみである(Circulation, 112, 1166-1172, 2005)。今後、多能性幹細胞を用いた細胞移植治療を進める上で、免疫特権の分子機構を解明することは必須であると考えられる。

2. 研究の目的

ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞では主要組織適合性複合体(MHC)をはじめとする免疫応答に関与する遺伝子の発現量が低く、免疫原性が低いことが知られている。またインターフェロン(IFN)などのサイトカイン刺激に対しての応答も弱い。しかし、その分子メカニズムについては、ほとんど明らかにされていない。

本研究課題ではヒトとマウスの多能性幹細胞

において、なぜ免疫原性が低下しているのか、その分子基盤の解明を目的とする。そして遺伝子導入等により免疫原性の再獲得に挑戦する。

3. 研究の方法

本研究は以下のような5つのステップからなる研究を想定していた。

1. 遺伝子発現解析による候補因子のスクリーニングを行う。マウスおよびヒト多能性幹細胞をIFNやポリI・Cヌクレオチド等で刺激し、その後の遺伝子発現変化を体細胞と比較することでMHC発現機構の阻害部位の候補を検索する。

2. 遺伝子やshRNA導入によるMHC発現回復により、阻害部位を同定する。

3. 機能的な免疫原性の回復を調べる。

マウスではin vitroとin vivoで、ヒトではin vitroで免疫原性の亢進を判定する。

4. エピゲノム解析等を組み合わせ、阻害メカニズムを解明する。

5. (可能であれば)腫瘍細胞でも同様の阻害メカニズムが存在するか検討する。

しかしながら、研究途中においてカニクイザルiPS細胞の樹立に成功したため、ヒトの移植系のモデルとしてこれを使用することを想定し、計画を変更した。

はじめにサル線維芽細胞にレトロウイルスベクターで遺伝子を導入しiPS細胞の作製に成功した。しかし、レトロウイルスで作製したiPS細胞は免疫原性が高いという報告(Nature, 474, 212-215, 2011)があったため、移植実験には不向きであると考えられた。そこでサル末梢血より単核球を分離し、iPS細胞の樹立を試みた。この際、すでに私たちが報告していたヒトiPS細胞の樹立方法(Stem Cells, 31, 458-466, 2013)を応用した。得られたES細胞用の細胞に対し、培養皿のコートニングや支持細胞の種類、さらに培養液の組成等を検討して、安定して継代できる条件の検索を行った。また、凍結方法についても検討を行った。得られた細胞における未分化細胞のマーカー遺伝子等の発現を調べた。高橋淳先生(京都大学iPS細胞研究所)と共同研究を行い、カニクイザル個体の末梢血液からiPS細胞を作製し、これから作製したドパミン産生神経細胞を同個体もしくは他個体に移植して、免疫応答の違いについて検討を行った。

4. 研究成果

平成24年度研究成果

ヒトiPS細胞に対してIFNで刺激を行い、HLAのわずかな発現上昇が認められることを確認した。しかし、その上昇幅は線維芽細胞に対し10分の1程度であった。申請者が利用していた培養系ではマウスの胎仔線維芽細胞に由来するフィーダー細胞が混ざっており、iPS細胞そのものの反応を明瞭に捉えることが困難であった。そこで線維芽細胞とiPS細胞の比

較を厳密に行うために、市販されている無フィーダー培養系の試薬の利用を検討した。ところがiPS細胞の継代を繰り返してみると、iPS細胞の形態が変形しディッシュから剥離していき、安定した実験系の確立が難しいことがわかった。複数の試薬を取り寄せ、体細胞およびiPS細胞が安定して継代できる培地を検討している。それぞれの培養条件で培養したiPS細胞よりRNAを調製し遺伝子発現を見ても、培地やディッシュのコートに依存した遺伝子発現が認められた。

一方で、iPS細胞の樹立そのものに免疫系の活性化が必要であるという論文が発表された(Cell, 151, 547-558, 2012)。この論文ではpoly IC刺激によりiPS細胞の誘導効率の上昇が認められるという結果を示している。iPS細胞の細胞内の免疫機構を調べる上でも、非常に興味深い報告であり、再現を試みた。さらに、申請者はヒト末梢血より効率よくiPS細胞を作製する方法を開発し報告した(Stem Cells, 31, 458-466, 2013)。この方法を発展させ、サルiPS細胞の樹立を検討した。ヒトに近い動物において、iPS細胞を作製し、自家移植や他家移植を比較することで、ヒトの移植時における免疫原性の有無や程度を類推することが可能になると期待される。

平成 25 年度研究成果

前年度に引き続き、市販されている無フィーダー培養系の試薬の利用を検討した。ところがヒト iPS 細胞の継代を繰り返してみると、形態が変形しディッシュから剥離していき、安定した培養と実験系の構築は困難であった。

一方で、カニクイザルの皮膚および末梢血から iPS 細胞の樹立に挑戦し、これに成功した。そこで京都大学 iPS 細胞研究所の高橋淳先生と共同研究を行い、樹立したサル iPS 細胞からドパミン産生神経細胞を作製し、カニクイザル脳内へ自家および他家移植を実施した。その結果、他家移植の場合では免疫反応が認められるものの、自家移植ではほとんど免疫反応が見られないことが明らかとなった。また、自家移植の場合は、より多くの移植細胞の生着が確認された。同様の実験系を他の分化細胞や移植法で用いることで、ヒトの移植時における免疫原性の有無や程度を類推することが可能になると期待している。

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 8 件)

Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Okita K, Hotta A, Kawasaki T, Hayashi T, Onoe H, Shiina T, Yamanaka S, Takahashi J. Direct Comparison of Autologous and Allogeneic

Transplantation of iPSC-Derived Neural Cells in the Brain of a Nonhuman Primate. Stem Cell Reports, 査読有, 2013, 1: 283-292. DOI: 10.1016/j.stemcr.2013.08.007

Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, Sato Y, Amano N, Watanabe A, Goshima N, Yamanaka S. An Efficient Non-viral Method to Generate Integration-Free Human iPSC Cells from Cord Blood and Peripheral Blood Cells from Stem Cells, 査読有, 2013, 31: 458-466. DOI: 10.1002/stem.1293

Kajiwara M, Aoi T, Okita K, Takahashi R, Inoue H, Takayama N, Endo H, Eto K, Toguchida J, Uemoto S, Yamanaka S. Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 査読有, 2012, 109: 12538-12543. DOI: 10.1073/pnas.1209979109

[学会発表](計 6 件)

沖田圭介 iPS細胞の臨床応用を目指して日本薬学会関東支部 第38回学術講演会(招待講演) 2013/12/22 東京

沖田圭介 iPS細胞研究の最前線から 岩国市科学センター 市民科学講座(招待講演) 2013/3/16 山口

沖田圭介 iPS細胞を、医療へ 大阪大学 附属病院 未来医療センター10周年・未来医療開発部開設記念シンポジウム(招待講演) 2013/1/13 大阪

沖田圭介 iPS細胞の臨床応用を目指して北海道大学第一回 IGM 特別セミナー(招待講演) 2012/12/20 北海道

Keisuke Okita Re-characterization of iPSC cells. Netherlands - Japan Cross Debate Workshop on RM and Stem cells (招待講演) 2012/6/17 神奈川

Keisuke Okita, Yasuko Matsumura, Yoshiko Sato, and Shinya Yamanaka Immunogenic potential of mouse pluripotent stem cells. ISSCR 10th annual Meeting 2012/6/15 神奈川

[図書](計 2 件)

島本廉, 沖田圭介 学研メディカル秀潤社 細胞工学 2012: 308-313.

山川達也、沖田圭介 羊土社 実験医学増刊 2012: 101-106.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/okita/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖田 圭介 (OKITA, Keisuke)

京都大学・iPS細胞研究所・講師

研究者番号：90512434

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：