

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293311

研究課題名(和文)アロ iPS 細胞の臨床応用を目指した免疫寛容法の開発

研究課題名(英文) Development of immune tolerance method for clinical application of allogeneic iPS cells

研究代表者

宮川 繁 (Miyagawa, Shigeru)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授(常勤)

研究者番号：70544237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000 円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞を用いた再生医療は現在のところ他家移植が現実的であり、移植後の免疫反応が問題となっている。MHCを適合させた移植では非適合群に比べ免疫細胞の浸潤が少なく、細胞の生着が良好であった。また免疫寛容を誘導する作用のある間葉系幹細胞を併用移植することにより免疫抑制剤を投与しなくても移植細胞の生着が大きく延長された。自然免疫の機序を解明することにより自然免疫、および関連する獲得免疫を抑制できる可能性も考えられた。これらの結果より免疫抑制剤を中止もしくは減量できる可能性が示された。

また生体内での免疫反応の評価をTSP0-PETを用いて行うことにより免疫抑制剤の調整が容易となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The immune response against allogeneic cells is imperative issue in regenerative therapy using iPS cells. In MHC-matching transplantation of allogeneic iPS derived cardiomyocytes, infiltrating immune cells were less observed and transplanted cells were much survived compared with non-matching transplantation. The simultaneous transplanted MSCs showed the immune tolerance in allogeneic iPS derived cardiomyocytes transplantation without immunosuppressants. In addition, we revealed the mechanism of innate immune response against iPS derived cardiomyocytes, leading to suppression of innate and associated acquired immune response. Thus, the immunosuppressants could be stopped or reduced in allogeneic iPS derived cardiomyocytes transplantation by using these methods. The immune response could be evaluated using TSP0-PET, leading to exact adjustment of immunosuppressants.

研究分野：心臓再生医療

キーワード：iPS細胞 iPS細胞由来心筋細胞 他家移植 免疫寛容 MHC適合移植 MSC併用移植 自然免疫 免疫抑制剤

## 1. 研究開始当初の背景

心不全は罹患率が高く、一般的に進行性であるため先進国の主要な死亡原因の一つとなっている。心不全に対する効果的な治療は限られており、末期的心不全という状況に陥った場合には、心臓移植あるいは人工心臓の永久的使用以外には証明された効果的な治療がない。しかしながら、心臓移植や人工心臓といった置換型治療は、限られた患者しか受けることが出来ず、より汎用性の高い治療法の開発が急務である。自己組織から得られた体性幹細胞を増殖させて心臓に投与するという細胞移植療法は、基礎実験に始まり、一定の治療効果が数々の臨床試験を通じて証明されつつある。

しかしながら、その治療効果の主なメカニズムは、移植された細胞が様々な内因性修復因子を放出することにより、自己心の修復機能を向上させるという“パラクライン効果”であり、心筋細胞が極限まで減少していることが病態の主体となっている末期的心不全においては、治療効果が十分でないものと理論づけられる。これに対して、iPS細胞はその増殖能及び多分化能から、増殖させて心筋細胞にまで分化させてから心臓に投与することにより、心筋細胞数を増加させるという、末期的心不全に対する心筋再生治療を可能にすることが期待されている。

iPS細胞由来心筋細胞移植療法を臨床応用するまでには、腫瘍形成、大量培養、生着など様々な克服すべき問題がある。その一つに、iPS細胞由来心筋細胞の抗原性に対する宿主免疫反応がある。特にiPS細胞由来心筋細胞を末期的心不全治療に使用する際には、iPS細胞作成および分化誘導の安定性、迅速な治療の必要性から、あらかじめ樹立し、安全性、分化誘導効率などの検討がなされたiPS細胞株を複数用意した、細胞バンクからの同種他家移植が現時点では現実的と考えられている。細胞バンクからは、可能な限り主要組織適合抗原 (Major Histocompatibility Complex: MHC) のマッチしたiPS細胞が選択されるが、同種他家移植に伴う免疫原性を考慮し何らかの免疫抑制療法が必要となる可能性が高い。しかしながら、MHCのマッチングの程度を含め、免疫抑制剤の投与量などの具体的な方法論の検討は十分になされていない。心臓移植を含む各種臓器移植で得られた知見をもとに、移植細胞に対する宿主免疫反応を制御し、移植細胞の生着・治療効果を促進することを可能とするMHCのマッチングと免疫抑制剤の適正化を行う必要があると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、同種他家iPS細胞由来心筋細胞に対する宿主免疫反応を包括的に検討することにより、免疫抑制療法の最適化すること

を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 同種他家iPS細胞由来心筋細胞移植における免疫抑制療法の適正化のため、細胞移植における拒絶反応の評価をTSPOターゲットとしたPET-CTを用いて確立する。

(2) iPS細胞由来心筋細胞の抗原を、他家由来抗原とその他のiPS細胞由来抗原に分けて検討する。マウス同系移植モデルを用いて、iPS細胞由来抗原の検索を行う。

(3) MHCのマッチングと具体的な免疫抑制剤の用量を検討するため、ヒトと比較しMHC遺伝子配列や薬物代謝能が近いカニクイザルを用いた他家移植モデルにより、MHCのマッチングと免疫抑制剤の用量の検討を行う。iPS細胞にGFP遺伝子を導入し、移植後に蛍光顕微鏡で観察することにより生着を評価した。

(4) MSCの免疫寛容効果を検討するために、マウス他家iPS細胞由来心筋細胞移植モデルを用いて、免疫反応の評価および移植細胞の生着を評価する。ルシフェラーゼ遺伝子を導入したiPS細胞由来心筋細胞を作成し、IVISを用いて生着を評価した。

(5) 獲得免疫をコントロールできたとしても移植した細胞は臓器のような被膜を持たないことから自然免疫による拒絶を受けやすいと考えられた。マウス同系移植モデルを用いてiPS細胞由来心筋細胞に対する自然免疫の機序を解明し、自然免疫を制御することを目的とし実験した。

## 4. 研究成果

(1) 自家iPS細胞由来心筋細胞および他家iPS細胞由来心筋細胞をマウス心表面に移植し、活性化マクロファージが多く発現するTSPOをターゲットとしたPET-CTを撮影したところ、他家移植モデルではPET-CTにおけるSUV値が高値となり、強い炎症が起こっていることが明らかとなった。組織学的に免疫を活性化させるM1マクロファージと抑制的に作用するM2マクロファージの割合が異なっており、TSPOをターゲットとしたPET-CTは免疫反応の評価として有用と思われた。

(2) マウス未分化iPS細胞およびマウスiPS細胞由来心筋細胞を同系移植し血清中の抗体を抽出し、マウスiPS細胞を溶解し得られた蛋白質と抗原抗体反応を起こさせた。反応した蛋白質をアレイ解析にて調査したところマウス未分化iPS細胞とマウスiPS細胞由来心筋細胞では糖鎖抗原の発現が異なり、未分化iPS細胞抗原となる可能性のある糖鎖の

構造解析が可能であった。

(3) MHC 適合、非適合移植群にて経時的に高い GFP 蛍光強度を持続したが、3-4 ヶ月にかけては低下傾向であった。また MHC 適合群は非適合群に比べ蛍光強度が長く持続し、免疫抑制剤 3 剤を併用した MHC 適合群では 3 ヶ月時点で GFP 陽性細胞の残存が確認され、免疫細胞の浸潤は認めなかった。一方非適合群では免疫抑制剤の継続あるいは中止に関わらず、3 ヶ月時点で GFP 陽性細胞が認められたが、免疫抑制剤を継続しても使用しても 4 か月時点で免疫細胞の浸潤を認め拒絶反応が示唆された。

(4) 免疫抑制剤を使用せずに iPS 細胞由来心筋細胞の他家移植を施行した場合、移植 9 日目には残存細胞を認めなかったが、MSC を併用移植した場合移植 17 日目まで iPS 細胞由来心筋細胞の残存を認めた。7 日目の移植部位を免疫染色したところ MSC を併用移植した場合、制御性 T 細胞の誘導や CD8 陽性 T 細胞のアポトーシスが有意に多く認められた。また制御性 T 細胞の誘導に必要なサイトカイン (IL-2, TGF- $\beta$ ) の発現が多く、制御性 T 細胞が分泌するとされる抗炎症サイトカイン IL-10 の発現も移植後 10 日間以上に渡って多く見られた。制御性 T 細胞を除去したモデルでは同様の効果が見られなかったことから、MSC 併用移植により制御性 T 細胞が誘導され免疫寛容を引き起こしていると考えられた。

(5) 自家 iPS 細胞由来心筋細胞を移植した部位の免疫染色では NK 細胞の集積を有意に多く認めた。iPS 細胞由来心筋細胞は NK 細胞の抑制リガンドである MHC クラス I の発現が低く、また NK 細胞に対する活性化リガンドの発現が高い傾向にあった。また NK 細胞を除去したモデルに移植したところ生着率の上昇が見られたことから自家 iPS 細胞由来心筋細胞移植における自然免疫には NK 細胞が強く関与していると考えられた。今後 NK 細胞に対するリガンドの発現をコントロールすることにより自然免疫が制御できる可能性が示唆された。

## 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 7 件)

1. Development of PET Imaging to Visualize Activated Macrophages Accumulated in the Transplanted iPSC-Derived Cardiac Myocytes of Allogeneic Origin for Detecting the Immune Rejection of Allogeneic Cell Transplants in Mice. Kashiwama N, Miyagawa S, Sawa Y, et al. PLoS One. 2016

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165748>

PMID: 27930666

2. Cardiomyocytes Derived from MHC-Homozygous Induced Pluripotent Stem Cells Exhibit Reduced Allogeneic Immunogenicity in MHC-Matched Non-human Primates. Kawamura T, Miyagawa S, Sawa Y, et al. Stem Cell Reports. 2016(2)1org/10.1016/j.stemcr.2016.01.012 PMID: 26905198

3. Building A New Treatment For Heart Failure-Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cells into the Heart. Miyagawa S, Fukushima S, Imanishi Y, Sawa Y, et al. Curr Gene Ther. 2016 16 巻 5-13 10.2174/1566523216666160119094143 PMID: 26785736

4. Teratocarcinomas Arising from Allogeneic Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Tissue Constructs Provoked Host Immune Rejection in Mice. Kawamura A, Miyagawa S, Sawa Y, et al. Sci Rep. 2016 29 巻 22130 10.1038/srep19464. PMID: 26763872

5. Structural Changes in N-Glycans on Induced Pluripotent Stem Cells Differentiating Toward Cardiomyocytes. Kawamura T, Miyagawa S, Sawa Y, et al. Stem Cells Transl Med. 2015 4 巻 1258-1264 10.5966/sctm.2015-0029 PMID: 26378261

6. N-glycans: phenotypic homology and structural differences between myocardial cells and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Kawamura T, Miyagawa S, Sawa Y, et al. PLoS One. 2014 org/10.1371/journal.pone.0111064 PMID: 25357199

7. Regulating ES or induced pluripotent stem cells by innate lymphoid cells. Masuda S, Miyagawa S, Sawa Y, et al. Transplantation. 2014 PMID: 25171529

[学会発表](計 13 件)

1: 発表演題: 再生医学を持ちた重症心不全に対する挑戦

発表者: 宮川 繁

学会名: 第 53 回日本人工臓器学会(招待講演) 2015/11/21 東京ドームホテル 東京

2: 発表演題: Preventing Tumor Formation Following iPS Cell-Derived Cardiomyocytes Transplantation Therapy by Carbohydrate Vaccine Therapy Targeting Undifferentiated iPS Cell-Specific Antigen.

発表者: Kawamura T, Miyagawa S, Fukushima S, Kawamura A, Kashiwama N, Sawa Y et al.

学会名：AHA2015 2015/11/7-11 Orland (USA)

3：発表演題：Impact of PET imaging to visualize activated macrophages in immune rejection of allogeneic iPS cell derived Cardiomyocytes in mice .

発表者：Kashiyama N, Miyagawa S, Fukushima S, Kawamura T, Yoshida S, Sawa Y et al.

学会名：AHA2015 2015/11/7-11 Orland (USA)

4：発表演題: Immunogenic Verification of MHC-homo iPS Cell-derived Cardiomyocytes transplantation to an MHC-matched Non-human Primate Ischemic Cardiomyopathy model : Pre-Clinical Study for Alogeneic Therapy using iPS cells

発表者：Kashiyama N, Miyagawa S, Fukushima S, Kawamura T, Yoshida S, Sawa Y,

学会名：AHA2015 2015/11/7-11 Orland (USA)

5：発表演題：重症心不全に対する iPS 細胞由来心筋細胞シート治療の現状と展望

発表者：宮川 繁

学会名：第 68 回日本胸部外科学会（招待講演）2015/10/18 神戸ポートピアホテル

6：発表演題：PET imaging to visualize activated macrophages for detection immune rejection in allotransplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes in mice

発表者：櫻山紀幸、宮川 繁、福嶋 五月、戸田 宏一 et al

学会名：第 79 回日本循環器学会 2015/4/26 大阪国際会議場

7：発表演題：Preventing allogeneic immune rejection by transplanting MHC-homo induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to an MHC-matched non-human primate

発表者：河村拓史、宮川 繁、福嶋 五月、戸田 宏一 et al

学会名：第 79 回日本循環器学会 2015/4/24-26 大阪国際会議場

8：発表演題：Translational Research of iPS Cell Sheet-based Myocardial Regeneration Therapy

発表者：宮川 繁

会場名：第 79 回日本循環器学会（招待講演）2015/4/24-26 大阪国際会議場

9：発表演題：iPS 細胞由来心筋細胞における糖鎖構造の解析とその意義

発表者：河村拓史 宮川 繁、福嶋 五月 et al  
学会名：第 115 回日本外科学会 2015/4/16-18 名古屋国際会議場

10：発表演題：PET 画像を用いたマウス iPS 細胞由来心筋細胞の同種異系移植における免疫拒絶反応の評価

発表者：櫻山紀幸、宮川 繁、仲村輝也、増田 茂夫、吉川泰司 他

学会名：第 14 回日本再生医療学会 2015/3/19-21 日 パシフィコ横浜

11：発表演題：MHC ホモカニクイザル iPS 細胞を用いた MHC 一致移植の有用性の検討

発表者：河村拓史、宮川 繁、福嶋 五月、斎藤 充宏、他

学会名：第 14 回日本再生医療学会 2015/3/19-21 パシフィコ横浜

12：発表演題：カニクイザル用いた MHC ホモ iPS 細胞由来心筋細胞移植の有用性の検討

発表者：河村拓史、宮川 繁、福嶋 五月、斎藤 充弘 他

学会名：第 45 回日本心臓血管外科学会 2015/2/16-18 京都国際会館

13：発表演題：Preventing Allogeneic Immune Rejection by Transplanting MHC-homo Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes to MHC-matched non-Human Primate

発表者：Kawamura T, Miyagawa Shigeu, Fukushima S, Masuda S, Kashiyama N, Kawamura A, Ito E, Maeda A, Toda K, Miyagawa Shuji, Sawa Y.

学会名：AHA2014 2014/11/15-19 Chicago(USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮川 繁 (MIYAGAWA, Shigeru)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任教授 (常勤)

研究者番号：7054237

(2)研究分担者

戸田 宏一 (TODA, Koichi)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40379235

福嶋 五月 (FUKUSHIMA, Satsuki)  
大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授  
(常勤)  
研究者番号: 80596867  
(削除: 平成 28 年 11 月 24 日)

秦 広樹 (HATA, Hiroki)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 80638198  
(追加: 平成 28 年 11 月 24 日)

今西 悠基子 (IMANISHI, Yukiko)  
大阪大学・大学院医学系研究科・研究員  
研究者番号: 10707582  
(削除: 平成 28 年 8 月 26 日)