

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04915

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた新規胸腺再生法の確立とアロ移植拒絶ならびに免疫学的病態への応用

研究課題名(英文) Induction of thymic epithelial cells from iPS cells and application to allogeneic transplantation

研究代表者

清野 研一郎 (Seino, Ken-ichiro)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：20312845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子Foxn1をレンチウイルスベクターを用いてマウスiPS細胞へ遺伝子導入を行った。このiPS細胞による分化誘導の結果、Ly51、UEA1、DLL4を発現する細胞の割合は有意に上昇した。胸腺上皮細胞マーカーを発現する細胞をセルソーターにより分取したのち、ヌードマウスをレシピエントとして腎臓被膜下への移植を行った。移植6週後のレシピエント末梢血をフローサイトメトリーにより解析した結果、有意に末梢血中のT細胞の割合が大きいたという結果を得た。さらに移植片内部における未熟T細胞マーカーの発現が見られたことから、作製した胸腺上皮細胞はin vivoにおいて機能的であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Transplantation grafts generated from allogeneic induced pluripotent stem cells (iPSCs) could be rejected by recipient immune system. In this study, we aimed to generate functional thymic epithelial cells (TECs) to regulate recipient immune response and prolong iPSC-derived allograft survival. We established iPSC line expressing mouse Foxn1 (Foxn1-iPSC) and novel TEC induction protocol. After stepwise differentiation of Foxn1-iPSC, significantly larger population of cells expressed TEC-related surface molecules, such as EpCAM, DLL4, Ly51 and UEA-1, compared with using parental iPSC line. EpCAM positive and negative cells were sorted individually and transplanted under the kidney capsule of Nude mice. 6 weeks after transplantation, T cell proportion in peripheral blood of mice received EpCAM positive graft was significantly higher than that of EpCAM negative graft recipient. These data suggested functional TECs were induced by our newly established cell line and TEC induction method.

研究分野：再生医療

キーワード：免疫制御

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ES 細胞や iPS 細胞に代表されるヒト多能性幹細胞 (PSC) の樹立が報告されており、これらを応用した細胞移植医療の研究開発が進んでいる。この PSC を用いた移植に伴う免疫拒絶反応であるが、患者本人由来の iPS 細胞から作製した細胞を用いた場合には問題がない (起きない) と考えられる。しかし、ES 細胞あるいは他人由来の iPS 細胞を用いる場合、免疫拒絶の問題は避けられない。現在、京都大学を中心に HLA の一部をホモ化させた iPS 細胞のバンク構想が進行中であり、これにより免疫反応が減弱される可能性はある。しかし、一卵性双生児間の移植でない限り minor antigen を含めた抗原の完全一致は不可能であり、major HLA が一致したとしてもレシピエントのアロ免疫反応が起こると考えられる。実際、非ヒト霊長類 iPS 細胞由来のアロ移植片は自己移植片と比較するとレシピエントの免疫反応をより強く引き起こすことが京都大学のグループから報告されている (Morizane, et al. Stem Cell Rep 1:283, 2013)。また、MHC ホモのグラフトの移植の場合、hybrid resistance と呼ばれる NK 細胞を介した拒絶反応が発生する事も知られている (Kumar et al. Curr Opin Immunol 1997)。即ち、「他人由来の多能性幹細胞を用いた移植医療」(現実的にほとんどのケースが当てはまると考えられる)を実現させるためには、これに特化した適切な免疫抑制療法の開発が不可欠である。

その方策として、一つにはこれまで臓器移植研究によって培われて来た免疫抑制剤の使用が考えられる。これまでにカルシニユリンインヒビターなど優秀な免疫抑制剤の開発が進められて来た。一方で副作用も問題となっており、免疫抑制剤を中止しても移植臓器が生着し続ける状態、即ち免疫寛容の誘導が期待される。実際、京都大学の中辻憲夫教授や米国の研究者は最近、「PSC 由来の細胞

を用いた細胞移植においても抗原特異的な免疫寛容誘導法を開発することが今後重要である」と述べている (RegMedNet 07 Oct 2014, Stem Cell Dev 2014, doi:10.1089)。ヒト臓器移植においては、免疫抑制剤に加え骨髄キメラ法を駆使した方法により、腎臓移植後免疫寛容の誘導症例が報告されるに至っている (Kawai, et al. N Engl J Med. 358:353, 2008)が、これまでのところ iPS 細胞由来アログラフトの免疫制御法に関する研究報告はほとんどない。

研究代表者の清野は最近、PSC から移植片を作製する他に同一の PSC から免疫抑制細胞を同時に作製し移植片拒絶阻止を図るというコンセプトの研究を展開し、免疫抑制性マクロファージを誘導し、PSC 由来心筋細胞のアロ移植拒絶反応を抑制することに成功した (Kudo et al. Induction of macrophage-like immunosuppressive cells from mouse ES cells that contribute to prolong allograft survival. PLoS One, in press)。現在我々は、移植拒絶をさらに強力に抑制しうる中枢性免疫寛容に着目している。PSC を用いてこれを誘導する方法として、アロ由来の胸腺原基を移植されたマウスで後にそのアロ由来の皮膚に対して寛容が誘導された事例 (Salaun J et al. Science, 1990) を踏まえ、iPS 細胞から胸腺構成細胞を誘導し生体内で胸腺を再生することが考えられる。胸腺を構成する細胞であるが、まず胸腺上皮細胞が挙げられる。ヒト ES 細胞から胸腺上皮細胞を誘導したとする報告 (Parent et al. Cell Stem Cell 2013) はあるが、免疫寛容に関する機能は調べられていない。また、胸腺上皮細胞の完全な成熟には T (前駆) 細胞との相互作用が必要である。我々はこれまでの検討で iPS 細胞から T 前駆細胞が誘導可能である事を示している (Wada, et al. Int Immunol 2011)。

## 2. 研究の目的

マウス iPS 細胞由来胸腺上皮細胞及び T 前駆細胞からの胸腺原基誘導法、さらに生体内での胸腺再生法を確立し、アロの免疫反応の制御が可能であるかどうかを検証する胸腺再生により自己免疫疾患や免疫老化の制御が可能かについて検討を行う

ヒト iPS 細胞からも同様の胸腺構成細胞の分化誘導が可能であるかどうか検討する

## 3. 研究の方法

マウス iPS 細胞から胸腺構成細胞として胸腺上皮細胞ならびに T 前駆細胞の分化誘導を行いその方法の最適化を行う。得られた細胞を混合し、胸腺原基の構築を行う。次に、移植の前処置として放射線照射や抗体の投与について検討を行い、生体への移植、胸腺再生を試みる。移植された細胞の分布や形態について検討し移植の成功を確認した後、アロ反応性 T 細胞の deletion (negative selection) の確認、ドナータイプからの皮膚移植等を行い、アロの免疫寛容を検討する。マウス iPS 細胞に加え、ヒト iPS 細胞を用いた同様の細胞の分化誘導を検討する。

## 4. 研究成果

他人由来多能性幹細胞から組織を作出した場合、その移植片はレシピエントの免疫系から拒絶される可能性があり、その場合はレシピエント免疫系の制御が必要である。胸腺移植はドナー由来胸腺上皮細胞の働きにより、拒絶反応の原因となる T 細胞の排除および制御性 T 細胞の誘導に働き、ドナーに対する免疫寛容を成立させることが知られている。本研究では、iPS 細胞由来抗原への免疫寛容の達成を目標とし、マウス iPS 細胞から胸腺上皮細胞を分化誘導した。これまでに当研究室で作製した胸腺上皮細胞誘導プロトコルに従って分化誘導を行ったところ。上皮細胞マーカーである EpCAM を発現する細胞を得る

ことが出来た。これらの細胞のうち胸腺上皮細胞での発現が知られる Ly51、UEA1、DLL4 を発現する細胞は極僅かであった。前年度までの検討により、転写因子 Foxn1 の導入が胸腺上皮様フェノタイプ獲得へ寄与する期待が期待されたことから、レンチウイルスベクターを用いてマウス iPS 細胞への遺伝子導入を行った。この iPS 細胞による分化誘導の結果、Ly51、UEA1、DLL4 を発現する細胞の割合は有意に上昇した。胸腺上皮細胞マーカーを発現する細胞をセルソーターにより分取したのち、ヌードマウス (BALB/c-nu/nu) をレシピエントとして腎臓被膜下への移植を行った。移植 6 週後のレシピエント末梢血をフローサイトメトリーにより解析した結果、胸腺上皮細胞マーカー分子を発現する細胞を移植したマウスでは、胸腺上皮細胞マーカー分子を発現していない細胞を移植した場合と比較して、有意に末梢血中の T 細胞の割合が大きいという結果を得た。さらに移植片内部における未熟 T 細胞マーカーの発現が見られたことから、作製した胸腺上皮細胞は in vivo において機能的であることが示唆された。同時に当研究室ではこれまでに iPS 細胞からインスリン産生細胞を分化誘導しており、上記の胸腺上皮細胞の移植による他家 iPS 細胞由来インスリン産生細胞の生着期間への影響を検討する予定である。

## 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)大塚亮、清野研一郎

再生医療時代におけるあらたな移植免疫制御

医学のあゆみ Vol. 263 Nos. 11, 12, 927-931, 2017 (査読なし)

(2)大塚亮、和田はるか、ムハンマド・バグデー、辻飛雄馬、清野研一郎  
多能性幹細胞を用いた免疫寛容誘導  
移植 52 巻 6 号 p. 489-494, 2017( 査読なし )

(3)Sasaki H, Wada H, Baghdadi M, Tsuji H, Ohtsuka R, Morita K, Shinohara N and Seino K. New immunosuppressive cell therapy to prolong survival of iPS cell-derived allografts. Transplantation 99: 2301-2310, 2015. ( 査読あり )  
DOI: 10.1097/TP.0000000000000875

(4)清野研一郎. 移植における免疫制御の現在・過去・未来 . 今日 の 移植 28 巻 4 号、419-423. 2015 ( 査読なし )

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

(1)大塚亮、和田はるか、辻飛雄馬、Muhammad Baghdadi、清野研一郎. 免疫寛容誘導を目指した iPS 細胞由来胸腺組織作製の試み . 第 15 回日本再生医療学会総会、大阪国際会議場、2016 年 3 月 17-19 日

(2)大塚亮、和田はるか、辻飛雄馬、清野研一郎. 多能性幹細胞由来胸腺組織の作製とその応用 . 第 13 回日本免疫治療学研究会学術集会、東京ガーデンパレス、2016 年 2 月 27 日

[ 図書 ] ( 計 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 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 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

清野研一郎 ( SEINO Ken-ichiro )

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号 : 20312845

(2)研究分担者

和田はるか ( WADA Haruka )

北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師

研究者番号 : 70392181

(3)連携研究者

( )

研究者番号 :

(4)研究協力者

( )

