

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 元年 6 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16591

研究課題名（和文）iPS由来心筋細胞移植後の自然免疫による拒絶メカニズムの解明とその治療法の開発

研究課題名（英文）The investigation of innate immune rejection after transplantation of cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cell

研究代表者

中村 優貴（NAKAMURA, YUKI）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70793313

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究ではMHC適合モデルによる自然免疫応答に伴う移植後拒絶反応が移植細胞の生着に及ぼす影響を検討した。方法としてはC57BL/6由来iPS細胞を心筋細胞へ分化誘導し、C57BL/6マウスの皮下へ移植した（同種移植）。iPS細胞由来心筋細胞（iPSC-CM）移植後にレシピエントNK細胞の活性化による移植細胞の生着阻害が認められた。この免疫反応はiPSC-CM上のMHC class I低発現やCD226 リガンド、NKG2Dリガンド発現をによるものであった。以上よりiPSC-CM 移植後の移植細胞の長期生着にはNK細胞に対する免疫抑制治療が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた知見によりはiPS細胞由来心筋シート移植後のNK細胞による免疫応答を制御することで移植細胞のさらなる長期生着を得られる可能性があり、iPS細胞由来心筋シート移植による不全心へのより効果的な心筋細胞補充を行い、さらなる心機能改善効果を得ることが期待でき、重症心不全治療における再生医療の有効性及び重要性を高めるものであると考えらる。また本研究成果は将来的にiPS細胞由来心筋シート移植を自家移植で行う場合にも有効な治療法となりうることに加えて、iPS細胞を用いた再生医療治療全般に応用可能であると思われ、再生医療分野において汎用性の高いものとなることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Transplantation of cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cell (iPSC-CMs) is a promising approach for increasing functional CMs during end-stage heart failure. Although MHC class I matching between donor cells and recipient could reduce acquired immune rejection, innate immune responses may have negative effects on transplanted iPSC-CMs. Here, we demonstrated that natural killer cells (NKCs) infiltrated in iPSC-CM transplants even in a syngeneic mouse model. The depletion of NKCs using an anti-NKC antibody rescued transplanted iPSC-CMs, suggesting that iPSC-CMs activated NKC-mediated innate immunity. iPSC-CMs lost inhibitory MHCs but not activating ligands for NKCs. Re-expression of MHC class I induced by IFN- γ as well as suppression of activating ligands by an antibody rescued the transplanted iPSC-CMs. Thus, NKCs impede the engraftment of transplanted iPSC-CMs because of lost MHC class I, and our results provide a basis for an approach to improve iPSC-CM engraftment.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：再生医療 iPS細胞 自然免疫 NK細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症心不全の治療は内科的薬物加療から心臓移植まで多岐にわたるものの、我が国において心不全は死因の第2位であり、さらなる治療成績の向上が望まれている。近年では再生医療も重症心不全治療の選択肢の一つとして確立されつつあり、当科では iPS 細胞を心筋細胞へ分化誘導し、シート状にして不全心に移植する新しい心不全治療を開発に取り組み、臨床応用に向けて、その有効性と安全性を報告してきた。iPS 細胞由来心筋シート移植はシートから分泌されるサイトカインなどによるパラクライン効果のみならず作業心筋として働き得る心筋細胞の補充により、効果的な心機能改善が得られると期待されている。また臨床応用に際して安全性、経済性及び治療までの時間短縮の観点から、現時点では他家移植を行うことが想定されているため、移植組織への拒絶反応が問題となっている。これまでに皮下への MHC(major histocompatibility complex; 主要組織適合遺伝複合体)適合 iPS 細胞由来心筋細胞の他家移植実験で、MHC 適合移植にて心臓移植と同様に免疫抑制剤 3 剤(タクロリムス、ステロイド、ミコフェノール酸モフェチル)を併用することで MHC 非適合移植と比べ移植細胞の生着率の改善が得られたため⁶⁾、国のネットワークプログラム事業として京都大学 iPS 細胞研究所が 3 座ホモ接合型 HLA を持つ iPS 細胞株のバンクを作成する予定である。しかし MHC 適合移植に免疫抑制剤を併用しても最終的には iPS 細胞由来心筋細胞は消失しており、従来から拒絶反応の主体とされてきた獲得免疫以外の移植後拒絶反応が長期の移植組織生着に関与している可能性が示唆されている。

一方、自然免疫系は傷害関連分子パターンを感知することで無菌的な炎症反応を誘導し組織の再構築を行う新たな免疫系として注目されており、移植後免疫においてレシピエントの自然免疫応答は移植組織を除去する方向に働くことが知られている。iPS 細胞などの幹細胞に対するレシピエントの自然免疫応答を引き起こすメカニズムの一つとして、NK 細胞が移植組織の拒絶に関与していると報告されている。NK 細胞は自己の細胞表面に発現する MHC class II を認識し自己と非自己を認識するが、未分化 iPS 細胞では MHC class II が欠損しているため、NK 細胞に非自己と認識され自然免疫応答が起こるとされている。iPS 細胞由来心筋細胞においても MHC class II の発現の欠損または低発現が複数報告されており、MHC 適合 iPS 細胞由来心筋細胞の移植において移植細胞の長期生着が得られない原因として NK 細胞による自然免疫応答が移植後拒絶反応の一部である可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では NK 細胞が関与する移植後免疫応答が iPS 細胞由来心筋細胞移植後の移植細胞の生着を阻害すると仮説を立て検証すると共にそのメカニズムを解明し、NK 細胞をターゲットした免疫抑制治療の確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6 由来 iPS 細胞を用いた心筋への分化誘導法の確立

Luciferase 遺伝子を導入した C57BL/6 マウス由来の iPS 細胞を使用し、BIO(GSK3 阻害剤)の濃度を調整することで、Wnt シグナルを刺激し、心筋細胞へ分化誘導を行う。こうして得られた embryonic body を無糖培地処理して、心筋細胞の純化を行う。心筋細胞はシングル化したのち、温度応答性細胞培養皿に播種してシート状にする。

フローサイトメトリーを用いて心筋細胞への分化誘導効率や未分化細胞残存率を検討することで適正な分化誘導法を確立するとともに、分化誘導された細胞における MHC class II などの NK

細胞活性に関わるリガンドの発現の有無について評価する。

(2) C57BL/6 マウスへiPS 細胞由来心筋細胞シートの皮下移植（自然免疫モデルの確立）

獲得免疫の影響を可能な限り低減するため、実験モデルは C57BL/6 マウス由来心筋を C57BL/6 マウスの皮下に移植する syngeneic 移植(MHC match モデル)を基本とする。

1. 本実験モデル(syngeneic 移植)における獲得免疫応答や自然免疫応答の有無など移植後の免疫学的評価を行い、実験モデルが自然免疫応答による移植細胞の生着評価に適切であるかを評価する。
2. マウスにルシフェリンを投与することで Luciferase 遺伝子を導入された移植細胞の発光を測定する IVIS imaging system を用いて in vivo に経時的な移植細胞の生着を評価する。
3. 移植部位の組織を採取して免疫染色などの組織学的評価や qPCR 法や Western Blot 法などの分子生物学的評価を行う。
4. 移植細胞に対する自然免疫応答としての NK 細胞の浸潤や活性について in vivo のみでなく、脾臓から採取した NK 細胞を iPS 細胞由来心筋細胞と共培養し in vitro でも評価する。

(3) NK 細胞除去(in vivo cell depletion)による移植細胞の生着の改善及びその免疫学的機序の検討

上記で確立された自然免疫モデルを用いて下記の評価を行う。

1. マウスにanti-mouse NK1.1抗体を投与してNK細胞を除去することで移植細胞の生着が改善を得られる画像評価する。
2. NK細胞を活性化させるMHC classI以外のリガンド(RAE1, MULT1, H60など)についてin vivo とin vitro両面から分子生物学的評価(qPCR法など)にて検索する。
3. 活性化しているNK細胞のサブセットを細胞表面マーカー(CD56, CD27, CD11bなど)を用いて検証し、拒絶反応に関与するNK細胞のサブセットを特定する。

4．研究成果

C57BL/6 マウス由来 iPS 細胞を心筋細胞(iPSC-CM)へ分化誘導したのち、MHC 適合モデル(syngeneic 移植)を実施したところ、自然免疫に関する細胞の中で NK 細胞のみが移植部位への浸潤を認めた。そこで抗 NK1.1 抗体を投与することで体内の NK 細胞を除去したマウスに iPSC-CM を移植した群(NK-depletion 群)をコントロール群と比較したところ、移植後 7 日目に NK-depletion 群にて有意に良好な移植細胞の生着を認めた。また iPSC-CM の表面マーカーを解析したところ MHC classI の低発現認め、IFN- γ を iPSC-CM 培養中に添加することで native cell と同等の MHC classI 発現を誘導できた。さらに NK 細胞活性化リガンドである CD112, CD155 (CD226 リガンド), RAE-1(NKG2D リガンド)の発現を認めた。そのため in vitro にて iPSC-CM と C57BL/6 マウスから単離した NK 細胞を共培養したところ、IFN- γ 添加により iPSC-CM の MHC classI 誘導または抗 CD226 抗体や抗 NKG2D 抗体の添加により iPSC-CM に対する NK 細胞の細胞障害性が有意に抑制された。次に in vivo (syngeneic 移植)においても IFN- γ 添加による MHC classI 誘導または抗 CD226 抗体や抗 NKG2D 抗体のマウスへの投与により移植部位の NK 細胞の浸潤や移植細胞のアポトーシスが有意に抑制された。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

中村優貴 iPS細胞由来心筋細胞移植後のNK細胞による自然免疫応答が移植細胞の生着に及ぼす影響 Organ Biology (査読無) VOL25 NO.2 2018

〔学会発表〕(計8件)

- (1) **Y. Nakamura**, S. Miyagawa, S. Yoshida, S. Sasawatari, T. Toyofuku, Y. Sawa. Immunologic impacts of Natural killer cell-related innate immune rejection mediated by CD226 and NKG2D on the engraftment of syngeneic cardiomyocyte derived from induced pluripotent stem cell (American Heart Association, 2018)
- (2) **Y. Nakamura**, S. Miyagawa, S. Yoshida, S. Sasawatari, T. Toyofuku, Y. Sawa. Immunologic impacts of Natural killer cell-related innate immune rejection mediated by CD226 and NKG2D on the engraftment of syngeneic cardiomyocyte derived from induced pluripotent stem cell (International Society of Heart Lung Transplantation, 2018)
- (3) **中村優貴**、宮川繁、吉田昇平、上野高義、倉谷徹、戸田宏一、笹渡繁己、豊福利彦、澤芳樹. iPS細胞由来心筋細胞移植におけるNK細胞活性化抑制が移植細胞を生着延長する (第48回日本心臓血管外科学会学術総会, 2018)
- (4) **Y. Nakamura**, S. Miyagawa, S. Yoshida, S. Sasawatari, K. Toda, T. Kuratani, T. Ueno, T. Toyofuku, Y. Sawa. Immunologic impacts of Natural killer cell-related innate immune rejection mediated by CD226 and NKG2D on the engraftment of syngeneic cardiomyocyte derived from induced pluripotent stem cell (第82回日本循環器学会学術集会, 2018)
- (5) **中村優貴**、宮川繁、吉田昇平、上野高義、倉谷徹、戸田宏一、笹渡繁己、豊福利彦、澤芳樹. Syngenic iPS細胞由来心筋細胞移植におけるNK細胞を介した自然免疫に関する検討 (第17回日本再生医療学会総会, 2018)
- (6) **Y. Nakamura**, S. Miyagawa, S. Yoshida, S. Sasawatari, T. Toyofuku, Y. Sawa. Immunologic impacts of Natural killer cells related-innate immune rejection on the engraftment of syngeneic cardiomyocyte derived from induced pluripotent stem cell (American Heart Association, 2017)
- (7) **中村優貴**、宮川繁、吉田昇平、笹渡繁己、豊福利彦、澤芳樹. iPS細胞由来心筋細胞移植後のNK細胞による自然免疫応答が移植細胞生着に及ぼす影響 (第44回日本臓器保存生物医学会学術集会, 2017)
- (8) **Y. Nakamura**, S. Miyagawa, S. Yoshida, S. Sasawatari, K. Toda, T. Toyofuku, Y. Sawa. Immunologic impacts of Natural killer cells related-innate immune rejection on the engraftment of syngeneic cardiomyocyte derived from induced pluripotent stem cell (第70回日本胸部外科学会定期学術集会, 2017)

〔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：
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：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：豊福 利彦

ローマ字氏名：TOYOFUKU TOSHIHIKO

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。