

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06769

研究課題名(和文)疾患特異的ヒトiPS細胞によるPM/DM筋線維のMHCクラスI発現亢進機序の解明

研究課題名(英文)Clarifying the mechanism of MHC class I overexpression on polymyositis muscle fibers with disease specific human iPS cells.

研究代表者

長谷川 久紀(HASEGAWA, Hisanori)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00707028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：多発性筋炎(PM)患者の筋線維ではMHCクラスI発現が健常人より亢進しており、PM患者のヒト(h)iPS細胞から分化した筋細胞のMHCクラスI発現を健常人と比較し、発現の差に寄与する分子を同定すれば、PMの新規治療に応用可能と考えた。

健常人/PM患者のhiPS細胞クローンに対し、筋原性転写因子MyoDを導入し、無数のMyoD-hiPS細胞サブクローンからなるバルクとバルク細胞の筋分化条件を樹立した。同一患者の複数のMyoD-hiPS細胞バルクは、同様の筋細胞へと分化したが、蛋白産生には差を認め、hiPS細胞由来筋細胞を用いた健常人とPM患者のMHCクラスI発現の比較検証は困難と判断した。

研究成果の概要(英文)：MHC class I are more expressed on muscle fibers of polymyositis patients (PM Pts) than those of healthy donors (HDs). We considered to evaluate the differences of MHC class I expression and genetic properties between PM Pts and HDs by differentiating myocytes from human iPS cells (hiPSCs). If molecules that induce overexpression of MHC class I on PM muscles are identified, they can be targets for the treatment of PM.

MyoD-hiPSC bulks, which are composed of multiple MyoD-hiPSC clones, were established by transfecting MyoD, a myogenic transcription factor, into PM Pt or HD derived-hiPSC clones. We established also a differential condition for MyoD-hiPSC bulks to differentiate into myocytes. Three MyoD-hiPSC bulks from the same donor differentiated similarly into myocytes. However, protein production differed between the three MyoD-hiPSC bulks. We concluded that it is difficult to evaluate the differences of MHC class I expression of PM Pts and HDs with myocytes derived from hiPSCs.

研究分野：膠原病・リウマチ内科

キーワード：多発性筋炎 ヒトiPS細胞 筋分化 MHCクラスI

1. 研究開始当初の背景

(1) 多発性筋炎/皮膚筋炎の課題

多発性筋炎 (PM)/皮膚筋炎 (DM) は慢性進行性で近位筋優位の筋痛と筋力低下を呈する全身性自己免疫疾患である。PM 患者の炎症筋組織における免疫組織学的研究や PM 患者の末梢血 T 細胞の T 細胞受容体のクローン型解析から、少なくとも PM における筋傷害の主病態は細胞傷害性 CD8T 細胞が担っていると推定されている。しかし、PM/DM の治療は、高用量副腎皮質ステロイドやメソトレキサート等の免疫抑制薬による非特異的な免疫療法が行われており、これらの薬剤に対して副作用 (感染症、骨粗鬆症、ステロイド筋症等) を呈したり、治療抵抗性を示したりする症例を多く認める。よって、PM/DM の病態に基づいた新規治療薬の開発が喫緊の課題である。

(2) 当科/当研究室と多発性筋炎/皮膚筋炎

私が所属する東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科の研究室では、PM のモデルマウスとして、骨格筋由来の C 蛋白を免疫して筋炎を発症する C 蛋白誘導性筋炎 (C protein-induced myositis) モデルの開発に成功しており、CIM の筋傷害の主病態が PM と同様に自己反応性の細胞傷害性 CD8T 細胞が担うことも示している (Sugihara T. Arthritis Rheum 2007, 2010)。CIM を用いた研究から、我々は自己免疫性筋炎の発症には、自己骨格筋蛋白 (C 蛋白) に反応する T 細胞 (種) の活性化だけでなく、土壌となる筋局所における自然免疫活性化も必須であることを明らかにし、自己免疫性疾患における Seed and Soil model と提唱している (Okiyama N. Arthritis Rheum 2012)。また、筋損傷後に、マウスの再生筋線維が TNF- α や CCL2 などの炎症性サイトカインを産生して自然免疫活性化を担い、自己反応性 T 細胞と協調して自己免疫性筋炎を発症させることも明らかにしている (Kimura N. Arthritis Rheum 2015)。

(3) 多発性筋炎/皮膚筋炎と MHC クラス I

PM/DM 患者で筋組織の自然免疫を活性化する因子は明らかではないが、今回、種である自己反応性 CD8T 細胞と土壌の筋組織をつなぐ分子として MHC クラス I に着目した。ナイーブ CD8T 細胞は、抗原提示細胞 (APC) 上の MHC クラス I が提示している抗原を認識して増殖・分化して細胞傷害能を獲得するが、標的細胞を傷害するには、標的細胞が発現している MHC クラス I-抗原複合体を再認識して、細胞傷害蛋白を放出する必要がある。理由は不明だが、PM/DM 患者の筋繊維では、健常人と比較し、MHC クラス I 発現が亢進しており (Pas JVD. J Neurol Neuro Psychiatry 2004, Nagaraju K. Arthritis Rheum 2005)、PM/DM 患者では筋繊維に高発現した MHC クラス I-抗原複合体を自己反応性 CD8T 細胞が認識し、

筋の細胞傷害、つまり筋炎が生じていると考えられる。また、高発現した MHC クラス I が筋細胞内の NF- κ B を活性化する報告もあり (Nagaraju K. Arthritis Rheum 2005)、活性化した NF- κ B の標的遺伝子である炎症性サイトカインの産生が筋細胞で亢進し、自然免疫活性化に寄与しているとも考えられる。よって、PM/DM 患者において MHC クラス I 発現亢進の機序を解明することは、PM/DM の病態に基づいた治療標的を提唱し、新規治療薬の開発に応用可能と考えられる。PM/DM では、病態に遺伝因子の関与も推定されており、複数の遺伝子が PM/DM の疾患感受性遺伝子である可能性が報告されていることから (Chinoy H. Arthritis Rheum 2008, Sugiura T. Ann Rheum Dis 2012, Jani M. Ann Rheum Dis 2014)、PM/DM 患者では、遺伝的背景により MHC クラス I の発現が亢進していると考えられた。

(4) 多発性筋炎/皮膚筋炎疾患特異的ヒト iPS 細胞

ヒト人工多能性幹細胞 (human induced pluripotent stem cell; hiPS 細胞) は、その個人の遺伝情報を維持するので、疾患発症に遺伝的背景の関与が推定される患者から疾患特異的ヒト iPS 細胞を樹立し、健常人由来の hiPS 細胞と種々の分子の発現の違いを比較することで、その疾患の発症に寄与している分子を抽出することが可能と考える。近年、筋原性転写因子 Pax7 や MyoD を hiPS 細胞に導入後に強制発現させることで、hiPS 細胞を筋細胞へと分化可能であることが複数報告された (Darabi R. Cell Stem Cell 2012, Goudenege S. Mol Ther 2012, Tedesco FS. Sci Trans Med 2012, Tanaka A. PLOS ONE 2013)。hiPS 細胞は患者から低侵襲で採取可能な血液から樹立でき、無限の増殖能を持つので、PM/DM 患者の血液から樹立した疾患特異的 hiPS 細胞を筋細胞へと分化させれば、PM/DM 患者の筋生検サンプルから得られる primary な筋細胞を用いるより、多数の被験者間比較や再現性実験が可能であると考えられた。以上より、PM/DM 患者の筋線維での MHC クラス I 発現亢進機序の解明に PM/DM 疾患特異的 hiPS 細胞を用いることが適切と考えた。

2. 研究の目的

PM/DM 疾患特異的 hiPS 細胞を樹立し、筋原性転写因子 MyoD を導入後に強制発現させて筋細胞へと分化させ、健常人 hiPS 細胞由来の筋細胞と比較し、MHC クラス I 発現亢進に寄与する分子を同定する。また、同定した分子が実際に筋炎を増悪させて PM/DM の新規治療標的に成り得るかを、PM モデルマウス (CIM) を用いて検証する。

3. 研究の方法

上記目的を達成するため、本研究では当初、

以下の方法を計画した。

(1) 複数の健常人と PM/DM 患者由来の hiPS 細胞の樹立と、樹立した健常人と PM/DM 患者 hiPS 細胞への筋原性転写因子 MyoD の導入による MyoD-hiPS 細胞を樹立する。(2) 健常人、PM/DM 患者由来 MyoD-hiPS 細胞を筋細胞へと分化させ、筋細胞上の MHC クラス I 発現を免疫染色法により評価する。(3) 健常人と PM/DM 患者の MyoD-hiPS 由来の筋細胞において、MHC クラス I 発現に関与する分子の蛋白や mRNA の発現レベルを比較する。(4) 健常人と PM/DM 患者の筋細胞で発現に差を認めた分子に対し、PM/DM 患者由来の筋細胞でその発現を抑制または亢進した際に、MHC クラス I 発現に及ぼす影響を観察する。(5) 注目した分子の阻害剤を投与したマウスで CIM を誘導し、通常の CIM マウスとの筋炎の程度を比較する。以上の結果を通じ、PM/DM において MHC クラス I 発現亢進と筋炎の発症に寄与する分子を同定し、PM/DM の病態に基づいた治療標的を提唱する。

4. 研究成果

(1) PM/DM 疾患特異的 hiPS 細胞の樹立

PM/DM は単一遺伝子疾患ではなく多因子疾患であるため、MHC クラス I 発現亢進に関わる分子を正確に抽出するには、検証する PM/DM 患者は複数が望ましい。本研究では、健常人と PM 患者 3~5 名から hiPS 細胞を樹立し、MyoD を導入後に強制発現させて筋細胞へと分化誘導することで PM/DM で MHC クラス I 発現亢進に関わる分子の探索を行うこととした。

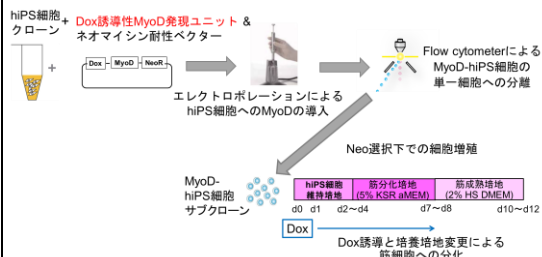
hiPS 細胞は、東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センターシステムセルバンク大津真先生の協力の下、検者の末梢血 CD34 陽性非リンパ球細胞にセンダイウイルスを用いて山中 4 因子を導入して樹立することとし (Takahashi K. Cell 2007)、本研究期間内に、健常人 5 名分、PM 患者 5 名分の hiPS 細胞を樹立した。

(2) MyoD-hiPS 細胞サブクローンの樹立と筋分化

樹立した 1 つの hiPS 細胞クローンに対し、エレクトロポレーションにより Dox 誘導性 MyoD 発現ユニットとネオマイシン (Neo) 耐性ベクターを導入し、flow cytometer により単一細胞へと分離後、Neo 存在下で MyoD-hiPS 細胞を増殖させた (=MyoD-hiPS 細胞サブクローン、図 1)。そして、MyoD-hiPS 細胞サブクローンを図 1 のように、培養培地を変更することで筋細胞へと分化させた (Tanaka A. PLOS ONE 2013)。

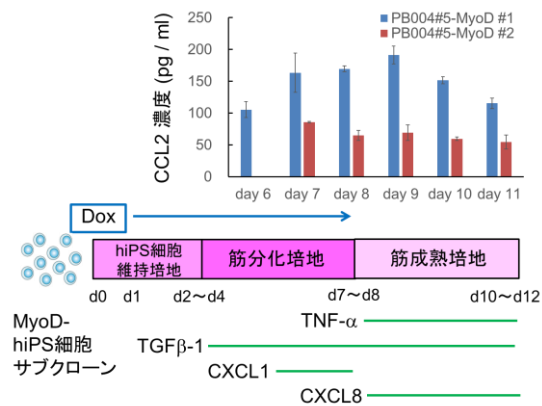
hiPS 細胞から分化した筋細胞が、実際のヒト筋細胞と同様な蛋白発現をするかをサイトカインの産生で確認したところ、一人の健常人由来の hiPS 細胞 1 クローン (PB004#5) から樹立した MyoD-hiPS 細胞サブクローンは、

図 1



筋分化時に、再生筋繊維と同様に CCL2 等の複数のサイトカインを産生した。しかし、PB004#5-MyoD #1 と PB004#5-MyoD #2 のサブクローン間では、CCL2 産生量に大きな差を認めた (図 2)。

図 2



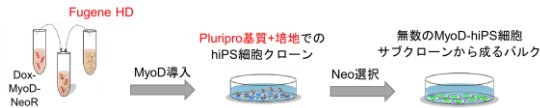
(3) MyoD-hiPS 細胞バルクの樹立

MyoD-hiPS 細胞サブクローンの蛋白 (サイトカイン) 発現にサブクローン間差が生じた理由として、MyoD 発現ユニットのゲノムへの導入箇所やコピー数の違いにより、各サブクローンの細胞変化に差が生じた可能性が考えられたため、多因子疾患の PM/DM 患者と健常人との遺伝的特性の差を正確に評価するには、MyoD-hiPS 細胞サブクローンの細胞変化の差が平均化される無数のサブクローンからなる MyoD-hiPS 細胞バルクを用いた検証が最適と考えられた。

MyoD-hiPS 細胞サブクローンを樹立した際に MyoD 発現ユニットを hiPS 細胞に導入したエレクトロポレーションでは細胞傷害が大きく、得られるサブクローン数が少数となり、無数のサブクローンからなる MyoD-hiPS バルクは形成できなかった。そこで、細胞傷害が少なく、高い導入効率で MyoD 発現ユニットが hiPS 細胞に導入される方法を模索した。

結果、hiPS 細胞への DNA 導入効率を上げる pluripro 基質と培地で hiPS 細胞培養時に、細胞傷害が少ないトランスフェクション試薬である Fugene HD で MyoD 発現ユニットと Neo 耐性ベクターを導入した際、無数のサブクローンからなるバルクの樹立に成功した (図 3)。

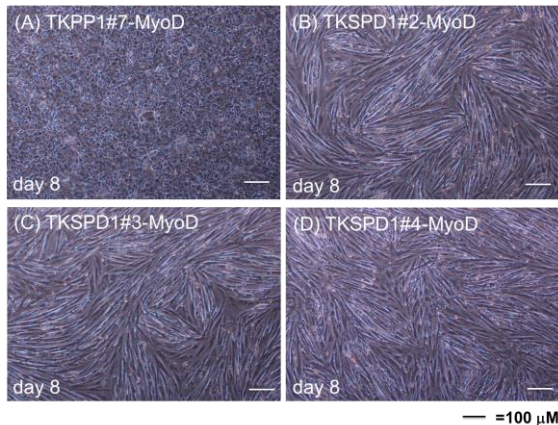
図 3



(4) MyoD-hiPS 細胞バルクの筋細胞分化

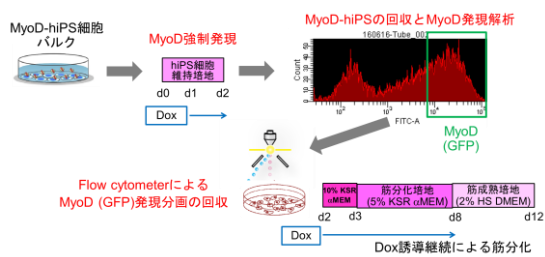
樹立した MyoD-hiPS 細胞バルク (TKPP1#7-MyoD) を、図 1 の従来の筋分化条件で分化誘導した際、MyoD-hiPS 細胞バルクは筋細胞へと分化しなかった (図 4-(A))。

図 4



MyoD-hiPS 細胞バルクの MyoD 発現を調べたところ、MyoD 発現率が低いことが判明し、筋細胞へと分化しなかった原因と考えられた。そこで、MyoD-hiPS 細胞バルクの MyoD 発現分画を flow cytometer で回収することで筋細胞へと分化するバルク細胞を作成した (図 5)。

図 5



MyoD-hiPS 細胞バルクの MyoD (GFP) 発現分画は、Dox を含む筋分化培地で継続培養すると、紡錘状の筋細胞へと分化した。一人の PM 患者由来の hiPS 細胞 3 クローンから樹立した MyoD-hiPS 細胞バルクの TKSPD1#2-MyoD、TKSPD1#3-MyoD、TKSPD1#4-MyoD はいずれも同様な筋細胞へと分化した (図 4-(B)-(D))。

(5) MyoD-hiPS 細胞バルク由来の筋細胞の蛋白(サイトカイン)産生

PM 患者由来の hiPS 細胞から樹立した MyoD-hiPS 細胞バルクの TKSPD1#2-MyoD、TKSPD1#3-MyoD、TKSPD#4-MyoD バルクはいずれも筋細胞へと分化したが、蛋白発現 (CCL2) にはバルク間差を認めた (図 6)。また、各バルクの MyoD 発現レベルにもバルク間差を認

め、MyoD の発現レベルが低い細胞の割合が多い TKSPD1#4-MyoD バルクの MyoD 発現分画の CCL2 産生量が、他の 2 つのバルクより多かった (図 6、図 7)。

図 6

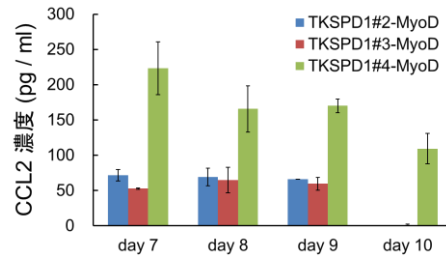
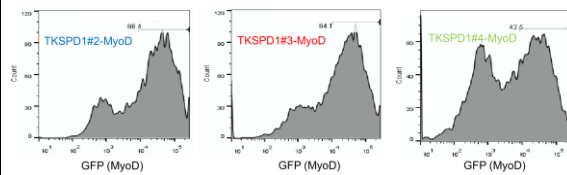


図 7



MyoD のゲノムへの導入箇所や導入数の違いにより、個々の MyoD-hiPS 細胞サブクローンの細胞変化に差が生じると考え、個々の細胞変化の差を平均化する MyoD-hiPS 細胞バルクなら多因子疾患の PM/DM 患者と健常人との遺伝的特性の差を正確に評価可能なのではないかと考えたが、MyoD-hiPS 細胞バルク由来の筋細胞でも蛋白 (CCL2) 産生にバルク間差を認めた。理由としては、① 大元の hiPS 細胞のクローン間差、又は② MyoD の発現レベルが高いバルク由来の筋細胞で CCL2 産生量が少なかったことから、MyoD 発現量の違いが筋細胞の分化や機能に影響を与え、蛋白産生量が変化した可能性が考えられた。いずれにせよ、サブクローン間差やバルク間が生じてしまう hiPS 細胞由来の筋細胞では、MHC クラス I の発現も正確には定量できず、多因子疾患の PM/DM 患者と健常人との遺伝的特性の差を評価すること、PM/DM において MHC クラス I 発現亢進に寄与する分子を同定することは困難と考えた。

(6) MyoD-hiPS 細胞由来筋細胞-細胞傷害性 CD8T 細胞-マクロファージの共培養による PM/DM の病態解明

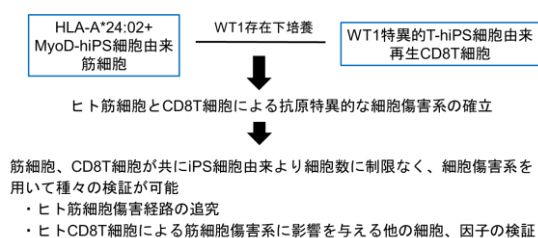
本研究で当初予定していた MyoD-hiPS 細胞から分化させた筋細胞を用いて、PM/DM 患者における MHC クラス I 発現機序に寄与する分子の同定を通じて、PM/DM 患者の筋組織での自然免疫活性化機序の解明は実現困難と考えたが、MyoD-hiPS 細胞由来の筋細胞を用いた別のアプローチによって、PM/DM における自然免疫活性化機序の追究は可能と考えた。

PM/DM 患者の筋病変局所では、リンパ球と同程度、マクロファージの浸潤を認めるが筋炎の病態への寄与は不明である。そこで、

MyoD-hiPS 細胞由来筋細胞を抗原特異的に傷害する CD8T 細胞の系を樹立し、マクロファージを共培養し、in vivo の筋病変での炎症性細胞浸潤の状態を ex vivo で再現すれば、自然免疫を司るマクロファージが CD8T 細胞の筋細胞傷害能に与える影響を検証することが可能と考える。

上述したように PM における筋傷害の主病態は細胞傷害性 CD8T 細胞が担っているが、CD8T 細胞を活性化させる PM/DM の病態に関わる特異抗原は同定されていない。そこで、京都大学ウイルス・再生医科学研究所の河本先生らが WT1 特異的 CD8T 細胞由来の hiPS 細胞から分化させた WT1 特異的 TCR を発現する再生細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に着目することとした (Maeda T. Cancer Res 2016;76:6839)。抗原蛋白 WT1 は、日本人の約 60% がヘテロ、約 36% がホモで有する HLA-A*24:02 に提示されるため、HLA-A*24:02 陽性の MyoD-hiPS 細胞を筋細胞へと分化させ、WT1 存在下で WT1 特異的な再生 CTL と培養すれば抗原特異的なヒト筋細胞傷害系が確立できると考えた (図 8)。そして、確立した MyoD-hiPS 細胞由来筋細胞-CD8T 細胞細胞傷害系に対し、同一患者のマクロファージも共培養させて筋細胞傷害へ及ぼす影響を解析していくすることとした。

図 8



本研究期間内には、京都大学ウイルス・再生医科学研究所の河本先生と MTA を締結して、WT1 特異的再生 CD8T 細胞と再生 CD8T 細胞の増殖に用いる抗原提示細胞の lymphoblastoid cell line (LCL) を御供与いただき、WT1 特異的再生 CD8T 細胞を刺激する際の LCL の培養条件を当研究室で再検討した。また、樹立済みの PM 患者 MyoD-hiPS 細胞が HLA-A*24:02 を発現するかを知るために、患者の HLA ハプロタイプも調べ、少なくとも 1 人の患者において HLA-A*24:02 陽性であることを確認した。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 長谷川 久紀、溝口 史高、頼 貞儀、大津 真、上阪 等。「筋原性転写因子 MyoD を導入したヒト人工多能性幹細胞の多クローン集団の樹立と筋細胞分化時のサイトカイン産生評価」、第 4 回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、2017 年 10 月 13 日～14 日、東京、ポスター
- ② 長谷川 久紀、溝口 史高、頼 貞儀、大津 真、上阪 等。「MyoD を導入したヒト人工多能性幹細胞の多クローン集団の樹立と筋細胞分化時のサイトカイン産生評価」、第 3 回日本筋学会学術集会、2017 年 8 月 4 日～5 日、東京、ポスター
- ③ 長谷川 久紀、川畑 仁人、頼 貞儀、大津 真、上阪 等。「筋原性転写因子 MyoD を導入されたヒト人工多能性幹細胞の多クローン集団の樹立と筋細胞への分化」、第 44 回日本臨床免疫学会総会、2016 年 9 月 8 日～10 日、東京、ポスター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 久紀 (HASEGAWA, Hisanori)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00707028