

令和元年5月16日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19691

研究課題名(和文) iPS細胞を用いたアロの壁と時空間を超える免疫制御法に関する研究

研究課題名(英文) A study for immune-regulation overcoming allogeneic spacio-temporal barrier using iPS cells

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ドナー脾臓細胞をレシピエントへ輸注することでドナー特異的に免疫寛容を誘導できることが明らかとなった。さらに脾臓に含まれるB細胞分画のみの移入によってドナー特異的に皮膚移植片の長期生着が達成可能であることがわかった。一方でドナー脾臓中のT細胞の移入は移植片の長期生着に寄与しなかった。また、免疫抑制剤投与下で生着を維持した皮膚移植片からiPS細胞を樹立し、多分化能(テラトーマ形成)、未分化マーカーの発現、増殖能等に異常がないことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現状では、iPS細胞を用いた細胞移植は他家の細胞を用いる事が想定されている。しかし、その方法で移植を行った際の免疫反応や免疫制御に関する研究はほとんど存在しない。またDelayed Tolerance Inductionは臓器移植学に分類される内容である。既存の医学分野の一つである「臓器移植学」の改善・発展にiPS細胞を応用するという発想はこれまでになかった。本研究で得られた結果から、ドナーのB細胞を用いることで特異的な免疫寛容を誘導可能であることが明らかとなった。同じく免疫寛容誘導法として知られている骨髓移植法と比較してドナー低侵襲下や手技の簡便化につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have identified that the infusion of donor splenocytes resulted in donor-specific immunological tolerance. Moreover, among heterogenous splenocyte populations, the single infusion of isolated donor B cells was able to induce donor-specific tolerance. However, T cells, which occupy a large proportion of splenocytes together with B cells, did not contribute to long-term donor graft survival. We generated iPS cells from skin grafts which were recovered from recipients after long-term treatment with immunosuppressants. These iPS cells showed high proliferation activity, expression of pluripotent stem cell marker molecules, and the ability to differentiate into three embryonic germ layers.

研究分野：移植免疫学、腫瘍免疫学

キーワード：免疫寛容

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

1. 研究開始当初の背景

近年、アロ iPS 細胞を用いた細胞移植の開発が期待されている。日本では HLA の一部がホモである iPS 細胞のストックが進められており、これをソースにすれば免疫拒絶反応の減弱化が期待できる。しかし「減弱化」と書いた通り、マイナー抗原などの存在によりアロ免疫反応は必ず起きると考えられる。iPS 細胞を用いた細胞移植の開始当初は免疫抑制剤を使用する事になる。

一方、これまで実際に医療として進められてきた臓器移植においては、免疫抑制剤を中止しても移植臓器が生着し続ける状態、即ち免疫寛容誘導の研究が進められている。ヒト腎臓移植においては Massachusetts General Hospital (Harvard 大学) の河合らによって、ドナー骨髄を用いた cell therapy を駆使した方法により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)。さらに最近この方法をさらに簡便化し、骨髄を用いずともドナー由来免疫細胞を適切に移入 (Donor Lymphocyte Infusion: DLI) すれば寛容誘導可能であると言う最新のデータが得られている (未発表)。

研究代表者の清野は数年前から「多能性幹細胞から免疫寛容源となる細胞を創出する」というコンセプトを提唱してきた。iPS 細胞を用いた細胞移植 (再生医療) の時代においても、臓器移植が辿ってきたのと同様に免疫寛容の誘導が望まれるようになってきたと考えたからである。本研究では iPS 細胞から免疫寛容源となる細胞を得、iPS 細胞を用いた細胞移植の時代にも免疫抑制剤フリーの移植を実現させるための基礎的データを取得する。

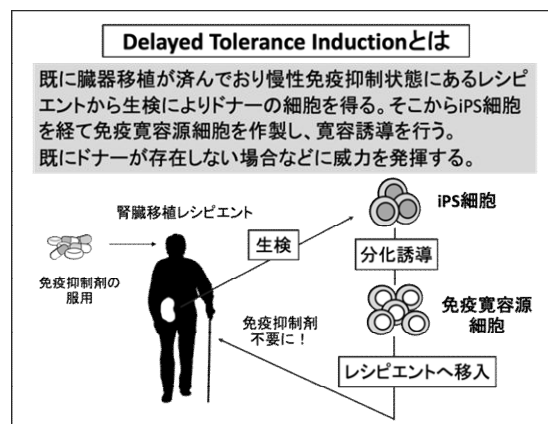
2. 研究の目的

- (1) iPS 細胞から DLI の元となる免疫細胞の探索および分化誘導法の検討
- (2) 寛容が誘導された場合には regulatory T 細胞 (Treg) の状態などメカニズムの解析
- (3) 既に臓器移植が済み慢性的に免疫抑制状態にあるレシピエントへ本法の応用 (Delayed Tolerance Induction)

3. 研究の方法

DLI の元となる細胞としては、抗原提示能を持った細胞-マクロファージ、B 細胞、形質細胞様樹状細胞 (pDC) などが想定されている。そこで本項目では、マウス iPS 細胞からこれらの細胞種を分化誘導し、河合らの寛容誘導プロトコルに適用し、免疫寛容誘導の可否とそのメカニズムについて検討する。

Delayed tolerance induction とは、既に臓器移植が済み慢性免疫抑制状態にあるレシピエントに免疫寛容を誘導し、免疫抑制剤の副作用から解放させようとする新しい方法である。この方法は ES 細胞では行う事は出来ず、iPS 細胞の特徴



を生かした時空間を超えた免疫制御法である（右図）

4．研究成果

【免疫寛容源となりうるドナー細胞の探索】

我々はこれまでに iPS 細胞由来マクロファージの免疫抑制能に関して報告してきた。本研究でははじめに、免疫“寛容”源となる細胞を探索するため、ドナー脾臓細胞および脾臓から分取した B 細胞をレシピエントマウスへ輸注し、皮膚移植によりその効果を検討した。その結果、脾臓細胞投与および B 細胞投与の両群においてドナーマウス系統の皮膚移植片の長期生着が認められた。一方で 3rd party となるマウス系統の皮膚は早期に拒絶された。この結果から、投与された細胞のマウス系統に特異的な免疫寛容状態が誘導されたと考察される。従って、iPS 細胞由来組織に対する免疫寛容を誘導しうる細胞として、iPS 細胞由来 B 細胞もその候補の 1 つとして考えられる。さらに、脾臓に含まれる B 細胞以外の細胞分画についても同様に免疫寛容を誘導する機能があるか探索を行った。脾臓含まれる細胞のうち、T 細胞の投与では皮膚移植片の生着延長効果は認められなかった。また、骨髄から GM-CSF を使用して分化誘導した樹状細胞を用いた場合でも皮膚移植片の生着延長は認められなかった。したがってこれまでの検討では、寛容誘導源となる細胞として B 細胞が最適と考えられた。

【Delayed Tolerance Induction の検討】

本研究の研究計画に基づき、免疫抑制剤投与下で長期生着後の皮膚移植片から iPS 細胞の作製を行った。皮膚移植片はタクロリムスおよび抗 CD4、CD8 モノクローナル抗体の投与によって生着を維持した。移植 30 日後に回収した皮膚移植片から線維芽細胞を単離しドナー細胞の割合を解析したところ、90%程度の割合でドナー線維芽細胞が分取可能であった。この線維芽細胞に対し、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入法（山中 4 因子: Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc）により iPS 細胞様コロニーを形成する細胞を得た。このうち、未分化細胞マーカーである SSEA1 を高発現している細胞が 1%程度認められた。これらの細胞から複数のクローン化株を樹立し、アルカリフォスファターゼ染色陽性、および 30 日間の維持培養においても細胞増殖に変化がないことを確認した。また樹立した細胞は免疫不全マウスへの接種によりテラトームを形成し、三胚葉への分化を認めた。また、内因性の Oct4, Sox2, Klf4, cMyc の発現には免疫抑制下の組織から作成した iPS 細胞と、無処置マウス組織から作製した iPS 細胞の間で差はなかった。今後次世代シーケンサーを用いてにより、RNA-sequence、Whole genome sequence を実施し、無処置マウス由来 iPS 細胞と遺伝子発現、ゲノム状態等に差が無いかを検証していく予定である。加えて、移植片由来線維芽細胞から作製した iPS 細胞を用いて免疫寛容源となりうる細胞を分化誘導する。この細胞を免疫抑制剤投与下にあるレシピエントマウスへ投与することによって、免疫抑制剤からの離脱もしくは使用量を減量し、移植片の生着維持が可能であるか検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 村田 智己、和田 はるか、大塚 亮、辻 飛雄馬、佐々木 愛里、柴田 悠平、安宅 司、小林 拓斗、ムハンマド・バグダーディー、清野 研一郎 . iPS 細胞由来組織移植に想定される拒絶反応の制御に有効な細胞療法の検討 . 第 18 回日本再生医療学会総会 . 2019 年 3 月 21 23 日
2. 大塚 亮、和田 はるか、辻 飛雄馬、佐々木 愛里、村田 智己、ムハンマド・バグダーディー、清野 研一郎 . Exogenous Foxn1 expression promotes in vitro differentiation of thymic epithelial cells from induced pluripotent stem cells that contribute to the prolonged survival of allogeneic transplants. 第 47 回日本免疫学会総会. 福岡コンベンションセンター . 2018 年 12 月 10 12 日

他 7 件

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：和田 はるか

ローマ字氏名：WADA, Haruka

所属研究機関名：北海道大学

部局名：遺伝子病制御研究所

職名：講師

研究者番号 (8 桁): 70392181

研究分担者氏名：バグダーディー ムハンマド

ローマ字氏名：BAGHDADI, Muhammad

所属研究機関名：北海道大学

部局名：遺伝子病制御研究所

職名：講師

研究者番号 (8 桁): 60711570

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。