

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16141

研究課題名(和文) iPS細胞由来筋細胞-CD8T細胞-マクロファージ共培養でのPM/DMの病態解明

研究課題名(英文) Elucidating the pathology of PM/DM with human iPS cell derived muscle cell-CD8 T cell-macrophage mixed culture

研究代表者

長谷川 久紀 (Hasegawa, Hisanori)

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・講師

研究者番号：00707028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)は、病態に非特異的な既存の免疫抑制療法に抵抗例も多く、病態に基づいた新規治療薬開発が重要である。自己免疫性筋炎の発症に、細胞傷害性CD8T細胞(CTL)だけでなく、筋局所の自然免疫活性化も必須であるが、PM/DM患者の筋病変内のマクロファージ(M)の自然免疫活性化への寄与の理解は十分でない。本研究では、PM/DMの筋病変の炎症性細胞浸潤を再現したヒト筋細胞-CTL-M混合培養系で、MがCTLの筋細胞傷害能に与える影響を検証できるよう、まずは、ヒトiPS細胞(hiPSC)由来再生CTLによるhiPSC由来筋細胞への抗原特異的な細胞傷害の系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本でPM患者の疾患特異的hiPSCを用いてPM/DMの研究を行っているのは当研究室のみであり、また、hiPSCから分化させたヒト筋細胞に対する抗原特異的なヒトCTLによる細胞傷害系の確立と、その培養系にMを加えて、MのPM/DMの病態への関与や自然免疫活性化機序の解明を目的とする本研究は非常に独創性が高い研究と考えられる。また本研究は、PM/DMの病態に基づいた治療標的を提唱し、PM/DMの革新的な治療法の開発につながるだけでなく、政府が健康医療戦略2015で提唱した、疾患特異的hiPSCを用いた難病・希少疾病等の原因解析や創薬等に係る研究である点も非常に意義の高い研究である。

研究成果の概要(英文)： Polymyositis and dermatomyositis (PM/DM) are systemic autoimmune diseases. Conventional immunosuppressants used to treat PM/DM are non-specific to the pathological conditions of PM/DM. Hence there are many cases refractory to those immunosuppressants. Novel treatments specific to the pathological conditions of PM/DM are required. We have elucidated that both autoaggressive cytotoxic CD8 T cells (CTL) and the activation of local innate immunity in the muscles are necessary for the development of autoimmune myositis. Although we observe macrophages (M) in the muscle lesions of PM/DM patients, it is not fully understood how M activate the local innate immunity.

To evaluate how M modulate the cytotoxicity of CTL in a human muscle cell-CTL-M mixed culture, which is an ex vivo model of the muscle lesions of PM/DM patients, we initially developed a cytotoxic assay with human iPS cells (hiPSC) derived CTL attacking muscle cells differentiated from hiPSC antigen specifically.

研究分野： 膠原病・リウマチ内科学

キーワード： ヒトiPS細胞由来筋細胞 筋細胞傷害 多発性筋炎 筋細胞-CD8T細胞共培養

1. 研究開始当初の背景

多発性筋炎(PM)/皮膚筋炎(DM)の課題と当科/当研究室の関わり

PM/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。複数の研究結果から、PM/DMでは、少なくともPMの筋傷害の主病態は細胞傷害性CD8T細胞(CTL)が担うと推定されている。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低分子免疫抑制薬による病態に非特異的な免疫療法が行われているが、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)や治療抵抗性を示したりする症例も多く、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。

申請者が所属する東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科は、日本においてPM/DMの臨床と研究の中心的役割を担ってきた。臨床では、PM/DMの肺症状である間質性肺炎(IP)に対するタクロリムスの有効性を検証する医師主導治験を行い、タクロリムスはPM/DM-IPに対し追加適応症の承認を得た。研究では、PMと同様に筋傷害の主病態を自己反応性CTLが担うCIMモデルを開発し、CIMがPMの新規治療薬開発の検証に適切なモデルであることを示している(1,2)。また申請者は、T細胞上のCD28と抗原提示細胞上のCD80/86との補助刺激を阻害して、CD4T細胞の活性化を抑制する関節リウマチ治療薬CTLA4-Ig(アバタセプト)が、CD8T細胞の活性化も直接抑制してCIMに対して治療効果を有することをCIMモデルを用いて示している(3)。

当研究室ではさらに、CIMの研究から自己免疫性筋炎の発症には、活性化した自己反応性CTLだけでなく、筋局所の自然免疫活性化が必須であること、また、筋傷害後の筋再生時に筋組織で認めるTNF α やIL-1 α などの炎症性サイトカインが自己反応性CD8T細胞と協調して自己免疫性筋炎を誘導することを明らかにしている(4,5)。一方、筋損傷後に筋炎を誘導する炎症性サイトカインの主供給源が再生筋なのか、CIMマウスの筋病変に認めるマクロファージ(M ϕ)なのかは明らかではない。PM/DMでも筋病変に多数のM ϕ の浸潤を認めるが、病態への関与を含め、PM/DMにおける自然免疫活性化機序も明らかではない。また、CIMに対して有効な抗TNF α 製剤がPM/DMには必ずしも有効ではなく、マウスとヒトのM ϕ では産生するサイトカインの質や量に違いがある可能性がある。よって、PM/DMにおける自然免疫活性化機序の解明・PM/DMの新たな病態解明には、ヒト検体を用いた検証の方が望ましく、PM/DMの病態特異的な因子を標的とした新規治療薬の開発につながると考えられた。

2. 研究の目的

申請者は、自己免疫性筋炎の自己反応性CTLを抑制する治療法を開発したので、次にPM/DMの筋組織の自然免疫活性化機序の解明とその治療法開発に取り組みたいと考えた。PM/DMの筋病変に多数認めるM ϕ と筋細胞自体のPM/DMの病態への関与・自然免疫活性化への関与を追究するため、本研究ではPM患者由来の筋細胞とCTL、M ϕ を混合培養してin vivoの筋病変での炎症性細胞浸潤の状態をex vivoで再現し、M ϕ や筋細胞自体がCTLの筋細胞傷害能に与える影響を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HLA-A*24:02の同定

過去のAMED難治性疾患実用化研究事業：自己免疫疾患に関する調査研究において樹立したPM/DM患者由来hiPSCのドナーの血液をHLAハプロタイプ解析し、HLA-A*24:02を有しているか調べた(6)。

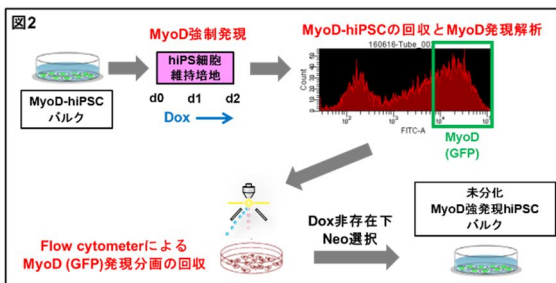
(2) ヒト筋細胞へ分化するhiPS細胞の樹立

hiPSCから筋細胞への分化効率を向上させるため、Tanaka A et alの方法を改良した(7)。DNA導入効率を上げるpluripro基質と培地、また細胞傷害性が低いトランスフェクション試薬のFugene HDを用いて、PM患者由来のhiPSCクローンにドキシサイクリン(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、Neo存在下で無数のサブクローンからなるMyoD-hiPSCバルクを樹立した(図1)。MyoD-hiPSCバルクをDox存在下のhiPSC維持培地でMyoD発現を誘導後、細胞を回収してMyoD発現分画をflow cytometerで分離後にDox非存在下/Neo存在下で増殖させてMyoD強発現hiPSCバルクを樹立した(図2)。樹立したMyoD強発現hiPSCは既存の筋分化条件で筋細胞へと分化させた(7)。

(3) 抗原特異的細胞傷害性CD8T細胞の活性化

京都大学ウイルス・再生医科学研究所の河本研究室よりWT1特異的再生CTLと抗原提示細胞となるHLA-A*24:02陽性lymphoblastoid cell line(LCL)を御供与いただいた。LCLは10%ウシ胎児血性(FBS)入りRPMI培地で培養増殖させた。事前にWT1ペプチドをパルスしたLCL

と WT1 特異的再生 CTL を IL-7、IL-21、ビタミン C を添加した 20%FBS 入り α MEM で共培養し、再生 CTL を活性化・増殖させた(8)。



(4) 筋細胞傷害の評価

hiPSC より分化させたヒト筋細胞と再生 CTL を共培養する前に、ヒト筋細胞の培養培地中に calcein-AM を添加し、分化したヒト筋細胞内に calcein-AM を取り込ませ、細胞内で蛍光発色する calcein へと分解させた。そして再生 CTL による筋細胞傷害時に培養上清中に放出される calcein 量を蛍光度計で測定し、0.1% triton X で筋細胞を傷害した際の蛍光強度との比率より再生 CTL の筋細胞傷害能を計算した。

4. 研究成果

(1) HLA-A*24:02 陽性 hiPS 細胞からの筋細胞分化

ex vivo 上の筋細胞-CTL-M 混合培養系において、M の働きや活性化因子の追究、筋細胞の自然免疫への関与の検証には、頻回の実験を要する。CTL や M は低侵襲な採血で入手可能だが、筋生検由来の筋細胞は長期継代が困難であり、実験の度に侵襲を伴う筋生検を繰り返すことは現実的でない。近年、ヒト iPS 細胞(hiPSC)に対して MyoD を導入して強制発現させることで、筋細胞へと分化可能であることが報告されている(7)。hiPSC は患者血液から樹立でき、無限増殖能を持つので、一度 PM 患者の血液から疾患特異的 hiPSC を樹立すれば、hiPSC 由来の筋細胞の入手に制限はなく、複数回の実験・検証が可能である。当研究室では、過去の AMED 難治性疾患実用化研究事業：自己免疫疾患に関する調査研究において、PM/DM 患者複数名から hiPSC 株を樹立しているため、PM 患者由来の疾患特異的 hiPSC から筋細胞を分化させて準備することとした。

詳細は下記(2)抗原特異的細胞傷害性 CD8T 細胞の活性化の項で記すが、本研究では特定の HLA ハプロタイプ(HLA-A24*02)が重要なため、樹立済の hiPSC のドナーである PM 患者 3 例の血液の HLA ハプロタイプ解析を行ったところ、1 例 HLA-A*24:02 陽性であった(hiPSC : TKSPD3 株)。

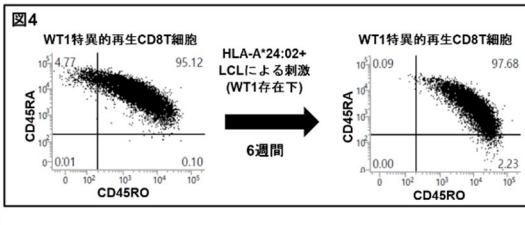
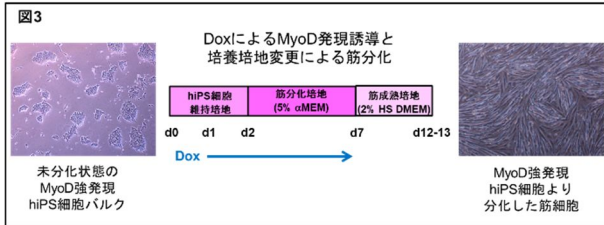
HLA-A*24:02 陽性 PM 患者由来の hiPSC 株(TKSPD3#D、TKSPD3#F、TKSPD3#M)に、Dox 誘導性 MyoD 発現ユニットと Neo 耐性ベクターを導入し、MyoD-hiPSC バルクを樹立した。次に、それぞれのバルク株の MyoD 発現を Dox で誘導し、MyoD 発現分画を flow cytometer で分離後、Dox 非存在下/Neo 存在下で増殖させて、未分化状態を維持した MyoD 強発現 hiPSC バルクを樹立した。MyoD 強発現 hiPSC バルク(TKSPD3#D、TKSPD3#F、TKSPD3#M)を再度 Dox 存在下の筋分化条件で培養し、MyoD を再強制発現させたところ、いずれの MyoD 強発現 hiPSC バルクは安定してヒト筋細胞へと分化した(図 3)。よって、以後の実験は主に MyoD 強発現 hiPSC TKSPD3#D 株で行った。

(2) 抗原特異的細胞傷害性 CD8T 細胞の活性化

本研究課題申請時は、筋細胞へと分化させる hiPSC のドナーである PM 患者の末梢血から CD8T 細胞を単離し、筋細胞と共培養して抗原特異的な筋細胞傷害系を確立する予定であった。しかし、既に副腎皮質ステロイドや他の免疫抑制剤で治療を受けている PM 患者の末梢血中に PM の病態に関わる抗原特異的な CTL 数は少ないと予想されること、PM/DM の病態特異的な抗原は依然同定されておらず、ex vivo で病態特異的な CTL を増加させることが困難であることより、Maeda 等が WT1 特異的 CD8T 細胞から樹立した hiPSC から分化させた WT1 特異的再生 CTL に着目した(8)。WT1 ペプチドは種々の固形癌で発現し、日本人の約 60%がヘテロで有する HLA-A*24:02 に提示されるため、WT1 と WT1 特異的再生 CTL を用いれば、HLA-A*24:02 陽性 PM 患者由来の hiPSC から分化させた筋細胞に対する抗原特異的な細胞傷害系が確立可能と考えた。

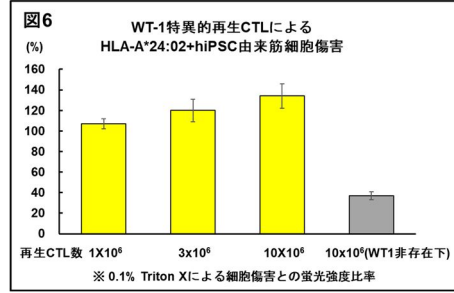
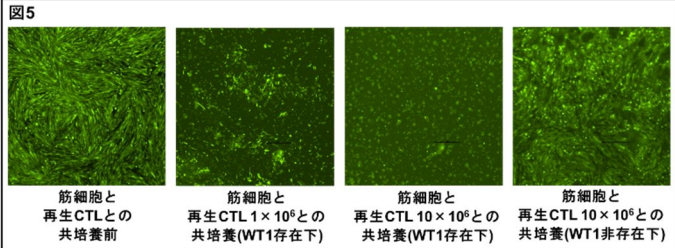
京都大学ウイルス・再生医科学研究所の河本研究室より WT1 特異的再生 CTL と HLA-A*24:02 陽性 LCL を御供与いただき、当研究室でも WT1 ペプチド存在下で LCL による WT1 特異的再生 CTL の活性化・増殖を試みた。再生 CTL の活性化・増殖は、1 回目の実験では認められたが、2 回目以降、再生 CTL の活性化・増殖に再現性を認めなくなった。種々のトラブルシューティングの結果、LCL と再生 CTL を共培養する際に用いる α MEM 培地に入れる FBS が原因であること、特定の FBS でないと再生 CTL が活性化・増殖しないことが判明したが、この問題解決に多大な月日を要し、実験計画が大幅に遅れた。

LCL と WT1 特異的再生 CTL の共培養時の培地(α MEM)に特定の FBS を使用後は、再現性を持って再生 CTL を活性化・増殖させることが可能となった(図 4)



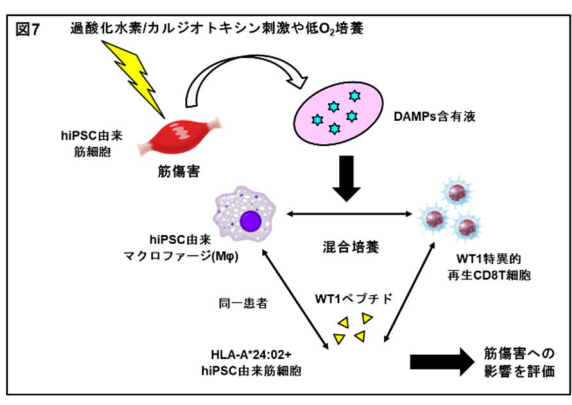
(3) PM 患者 hiPS 細胞由来筋細胞に対する抗原特異的 CD8T 細胞による細胞傷害系の確立

HLA-A*24:02 陽性 PM 患者由来の MyoD 強発現 hiPSC バルク(TKSPD3#D 株)を Dox 存在下の筋分化条件で培養してヒト筋細胞へと分化させ、WT1 ペプチドでパルスした後に、活性化した WT1 特異的再生 CTL と共培養したところ、抗原特異的な筋細胞傷害が生じた(図 5)。WT1 存在下での筋細胞-CTL 共培養系では、WT1 非存在下での筋細胞-CTL 共培養系と比較し、有意に培養上清中に calcein が放出された(図 6)。今回、PM 患者由来の hiPSC から分化させたヒト筋細胞に対する抗原特異的 CTL による細胞傷害系を確立できたが、WT1 特異的再生 CTL による細胞傷害能が強力であったため(0.1% triton X と同程度の傷害能)、今後、M との混合培養による CTL の細胞傷害能への影響(CTL の細胞傷害能への上乗せ効果)を評価できるように、CTL の細胞数調整による筋細胞傷害能の程度の調整を行っていく。



(4) マクロファージによる細胞傷害性 CD8T 細胞の筋細胞傷害能に与える影響の検証

上述したように、当研究室において、再現性をもった WT1 特異的再生 CTL の活性化・増殖に時間を要したため、またコロナ禍の影響で医師として研究に割ける時間が限定されたため、本研究課題期間中に主目的であった hiPSC 由来筋細胞-再生 CTL-M 混合培養による、M の CTL に対する筋細胞傷害系への影響の検証は行うことが出来た。今後、分化させている筋細胞と同一患者の hiPSC から M を分化させて用意する予定であるが、混合培養する hiPSC-M は M 1、M 2、M 1+M 2 の場合を検討している。M の追加のみで CTL の筋細胞傷害に変化が生じない場合は、CIM モデルの研究で筋傷害後の筋再生時に筋組織の自然免疫が活性化されて自己反応性 CTL と協調して自己免疫性筋炎を誘導した知見から、筋局所の筋傷害が自然免疫活性化の引き金となる可能性に着目し、筋細胞由来の DAMPs が筋細胞-再生 CTL-M 混合培養系での筋細胞傷害に与える影響を検証する。別に準備した hiPSC 由来筋細胞に、過酸化水素水やカルジオトキシン刺激、低酸素環境下での培養等で傷害を与え、筋細胞培養上清や筋細胞溶解液(以後、DAMPs 含有液)を回収する。そして、hiPSC 由来筋細胞-再生 CTL-M 混合培養系において、DAMPs 含有液の有無で、CTL による筋細胞傷害に差が生じるかを検証する(図 7)。なお、筋細胞由来の DAMPs が M の分化に影響を与える可能性も考慮し、混合培養する M の条件に M 0 も検討する。また、DAMPs が DAMPs 受容体を発現する筋細胞に直接作用して、間接的に CTL による筋細胞傷害に影響を与えている可能性も検証する予定である。



< 引用文献 >

1. Sugihara T et al. A New Murine Model to Define the Critical Pathologic and Therapeutic Mediators of Polymyositis. Arthritis Rheum 2007; 56: 1304-14.
2. Sugihara T et al. Definitive Engagement of Cytotoxic CD8 T Cells in C Protein-Induced Myositis, a Murine Model of Polymyositis. Arthritis Rheum 2010; 62: 3088-92.
3. Hasegawa H et al. Direct suppression of autoaggressive CD8+ T cells with CD80/86

blockade in CD8+ T cell-mediated polymyositis models of mice. *Clin Exp Rheumatol.* 2017; 35:593-7.

4. Okiyama N et al. T Lymphocytes and Muscle Condition Act Like Seeds and Soil in a Murine Polymyositis Model. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 3741-9.
5. Kimura N et al. Injury and Subsequent Regeneration of Muscles for Activation of Local Innate Immunity to Facilitate the Development and Relapse of Autoimmune Myositis in C57BL/6 Mice. *Arthritis Rheum* 2015; 67: 1107-16.
6. Okumura T et al. Robust and highly efficient hiPSC generation from patient non-mobilized peripheral blood-derived CD34+ cells using the auto-erasable Sendai virus vector. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10: 185. doi: 10.1186/s13287-019-1273-2.
7. Tanaka A et al. Efficient and Reproducible Myogenic Differentiation from Human iPS Cells: Prospects for Modeling Miyoshi Myopathy In Vitro. *PLOS One.* 2013; 8: e61540. doi: 10.1371/journal.pone.0061540. Print 2013.
8. Maeda T et al. Regeneration of CD8ab T Cells from T-cell-Derived iPSC Imparts Potent Tumor Antigen-Specific Cytotoxicity. *Cancer Res.* 2016; 76: 6839-50.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okumura Takashi, Horie Yumi, Lai Chen-Yi, Lin Huan-Ting, Shoda Hirofumi, Natsumoto Bunki, Fujio Keishi, Kumaki Eri, Okano Tsubasa, Ono Shintaro, Tanita Kay, Morio Tomohiro, Kanegane Hirokazu, Hasegawa Hisanori, Mizoguchi Fumitaka, Kawahata Kimito, Kohsaka Hitoshi, Moritake Hiroshi, Nunoi Hiroyuki, Waki Hironori, etc	4. 巻 10
2. 論文標題 Robust and highly efficient hiPSC generation from patient non-mobilized peripheral blood-derived CD34+ cells using the auto-erasable Sendai virus vector	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-019-1273-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川 久紀
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来CD8T細胞によるヒト筋細胞傷害系の確立と多発性筋炎の病態解明への挑戦
3. 学会等名 薬力学研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------