

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16282

研究課題名(和文) 抗原性を消失させた膵島細胞シート移植による免疫寛容導入の試み

研究課題名(英文) Immunotolerance of islet transplantation using bioengineering cell sheet by induced loss of antigenicity

研究代表者

大野 慎一郎 (Shinichiro, Ono)

琉球大学・病院・助教

研究者番号：90567174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR/Cas9システムによりMHC class Iを構成する分子である 2ミクログロブリン遺伝子を欠失するように膵島細胞に対して遺伝子編集を行い、MHC class Iの発現を抑制し宿主のT細胞から認識出来なくし拒絶反応を軽減することを目的として研究を行った。まずは汎用的な非血液系細胞株である肝癌細胞株HepG2を用いて実験系の確立を行った。非血液系細胞でも遺伝子導入によるMHC class Iの抑制および高純度のMHC class I抑制細胞の細胞を分離可能であった。同手技を元に膵島細胞で同様の手技を確立しようとするも、MHC class I発現が一定せず、完遂出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は2点ある。1. 移植医療における安全確実な免疫寛容導入、2. 臓器移植に取って代わる、より効率的な組織(細胞)移植の普及、である。免疫寛容導入については前述の如く移植医療の究極的ゴールであり、近年では制御性T細胞を用いた細胞療法などが試みられているが、「安全確実」とはいえず、やはり代替治療が望まれる。本研究のようにグラフトの抗原性を消失させる試みの成功例は過去に報告がなく、その独創性は極めて高いと考えたが、最終的な結果を得ることが出来なかった。

研究成果の概要(英文)：To suppress the expression of HLA class I molecules, we designed guide RNA contrasts targeting 2 microglobulin that is required for the expression of HLA class I. Using lentiviral vector containing this guide RNA constructs, we generated HLA class I deficient HepG2 cell. We analyzed the expression of HLA of gene-edited T cells by flow cytometry analysis. By staining with HLA-A, B, C antibody, HLA deficient cells were found in approximately 25% of HepG2 cell. To enrich the HLA class I deficient cells, we performed beads selection and sorted HLA deficient cells with high purity, 99%. After establish of this technique, we adopted this technique to islet cell. In islet cell, MHC class I expression was not constant and could not be completed.

研究分野：膵島細胞移植

キーワード：膵島細胞移植 細胞シート MHC class I immunotolerance loss of antigenicity

1. 研究開始当初の背景

末期臓器不全に対する究極的な治療として、移植医療が実施されているが、拒絶反応を惹起し、その制御が成否のカギを握る。拒絶反応は宿主のリンパ球 (T細胞) が移植片 (グラフト) を攻撃することによって起こるため T細胞の機能を抑制するための免疫抑制剤の投与が必須である。しかし、免疫力も低下させてしまう、副作用が強い、という問題があるため投与調整は容易でなく、現行の免疫抑制療法では拒絶反応を完全に制御できない。

そのような中、「免疫寛容」の研究が進んでいる。しかし、現行の方法は宿主側の免疫応答を抑制するもので、グラフトの抗原性を消失させる試みはなされていない。免疫寛容の獲得は移植医療の究極のゴールであるが、未だ発展途上である。侵襲の少ない膵島移植は実際に臨床応用されているが、生着率が低く複数回の移植を要するなど臓器移植に比し力価が低い。一方、癌患者において自己のリンパ球を取り出して体外で抗腫瘍免疫機能を強化して体内に戻す細胞療法が臨床応用されており、細胞レベルの機能を利用した細胞療法は今後ますます発展していくことが予想される。申請者らは膵島細胞シート移植の開発に成功しているが、免疫不全マウスを用いる場合を除き、拒絶反応により長期生着は達成できていない。一方、申請者らは腫瘍免疫を利用した癌治療において、多量の T細胞ソースを得るべく、他人の T細胞を応用する手法を開発している。その中で、GVHD を予防するため、自己の T細胞の内因性 T細胞受容体および MHC 発現を抑制する手法を開発中である。これらの技術を組み合わせ、膵島細胞 MHC 発現を抑制することにより抗原性を除去する、つまり 宿主の T細胞がグラフトを認識できないようにする究極の免疫寛容導入が可能ではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵島移植において、移植した膵島表面の MHC 表出を抑制することで宿主リンパ球が抗原を認識できないように操作し、拒絶反応を起こさず長期生着させることを目的とした。

3. 研究の方法

第1段階：申請者 (研究協力者) らが開発した内因性 T細胞レセプター (TCR) の発現を抑制するレトロウイルスベクター (siTCR ベクター) 技術をもとにしてヒト膵島細胞の MHC 発現を抑制する siRNA 配列を導入したレトロウイルスベクターを作成し膵島細胞の MHC 発現を抑制する。さらに CRISPR/Cas9 により MHC 発現を規定する遺伝子をノックアウトし、MHC 発現を完全に消失させることを目指す。第2段階：MHC 発現を抑制・消失したヒト膵島細胞をシート化してマウスへ移植し、長期生着し機能維持できるか否かを検討する。

【ヒト膵島細胞】

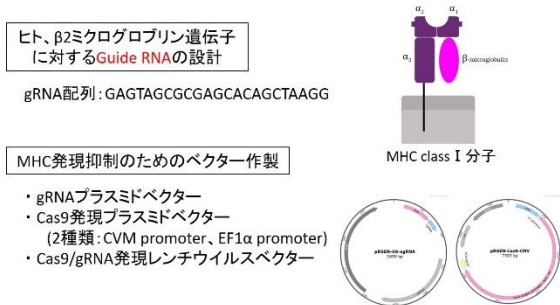
アルバータ大学より膵島細胞を空輸する。

【siTCR ベクターおよび CRISPR/Cas9 を用いたヒト膵島細胞の MHC 発現抑制技術の開発】

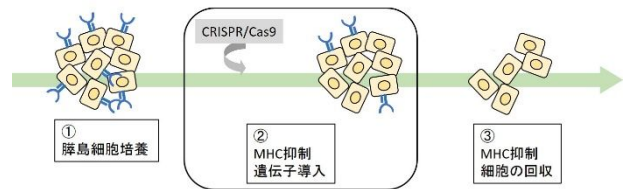
空輸した膵島細胞を用いて、申請者らが開発した T細胞における内因性 T細胞レセプター (TCR) の発現を抑制するレトロウイルスベクター (siTCR ベクター) 技術をもとにして、2 ミクログロブリン、または MHC の共通配列部分に対する siRNA を CRISPR/Cas9 システムでゲノ

ム編集する。MHC 発現抑制ベクターをウイルスベクター法にて膵島細胞に導入し、FACS で導入細胞の MHC 発現抑制を確認する。

MHC発現抑制ベクター作製

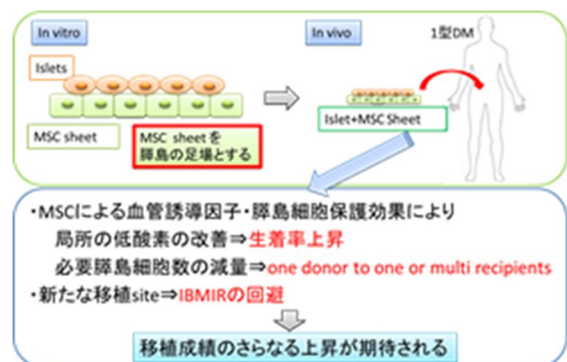


MHC発現抑制膵島細胞の作製



【ヒト膵島細胞シート（共培養）作成】

MSC(Mesenchymal stem cell)をシート化し膵島と培養、細胞間結合が完成した後に皮下へ移植することで膵島機能が膵島単独移植に比し維持出来ることを報告してきた (2015 Tissue Engineering; M Hirabaru, S Ono, et al.). 本研究ではMHC発現が抑制された膵島細胞を用いて、共培養シートを作製する。



【MHC非発現細胞シートの移植】

作製されたMHCを発現しない膵島細胞シートをマウスの皮下へ移植し、拒絶反応の有無と膵島機能を評価する。ラット細胞シートを免疫不全マウス(NOD SCID)の皮下へ移植する実験においては、移植された膵島細胞シートは血管新生を伴い良好な膵島機能維持効果を示した (2015 Tissue Engineering; M Hirabaru, S Ono, et al.). 正常な免疫機能を有するマウスにおいても、拒絶反応を起こすことなく同様の所見が得られるか否かを検討する。

4. 研究成果

CRISPR/Cas9システムによりMHC class Iを構成する分子である2ミクログロブリン遺伝子を欠失するように膵島細胞に対して遺伝子編集を行い、MHC class Iの発現を抑制し宿主のT細胞から認識出来なくし拒絶反応を軽減することを目的として研究を行った。まずは汎用的な非血液系細胞株である肝癌細胞株HepG2を用いて実験系の確立を行った。非血液系細胞でも遺伝子導入によるMHC class Iの抑制および高純度のMHC class I抑制細胞の細胞を分離可能であった。同手技を元にアルバータ大学よりヒト膵島細胞を輸入し、膵島細胞で同様の手技を確立しようとするも、MHC class I発現が一定せず、完遂出来なかった。そこで、iPS細胞より膵島細胞を分化し実験することを想起していたが、所属施設が変更となりシステム立ち上げを図っているところで研究期間が終了となった。従来の目的を達成できずに、研究が終了した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------