

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17883

研究課題名(和文) SLE患者由来iPS細胞を用いた研究ツール開発・創薬研究

研究課題名(英文) Development of research tools and drug discovery research using SLE patients derived iPS cells

研究代表者

夏本 文輝 (Natsumoto, Bunki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20837653

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)：我々は既報のマウスやヒトES細胞での方法を吟味し、Sac法(Takayamaら、2008)をModifyした方法を用いて、ヒトiPS細胞からIFN産生樹状細胞、CD3陽性細胞、CD56陽性細胞、CD19陽性/VpreB-like発現細胞への分化培養に成功した。またSLE関連Variantsのゲノム編集を行い、IFN産生樹状細胞における機能改善/増悪を確認した。Sac法ではDay14時点で得られる幹細胞数に限りがあったため、我々はElizabeth S Ngらの報告を参考にし、feeder free、animal freeでの分化に取り組み、100倍以上の幹細胞誘導効率を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性エリテマトーデス(SLE)は代表的な自己免疫疾患であり、多彩な臓器障害を示す多因子疾患である。患者の免疫細胞に遺伝的背景に基づく異常が報告されているが、免疫細胞の絶対数が少ないこと、治療や環境などの影響を受けていることがこれまでの研究を難しくしていた。申請者らは患者のゲノムを引き継ぎ、環境及び治療の影響が少なく、無限のソースとなるSLE患者由来人工多能性幹細胞(SLE-iPS細胞)を用いた実験系を構築した。多因子疾患であるSLEにおいて、患者背景(複数の原因)を健常iPS細胞株に構築するのは困難であり、SLE-iPS細胞を用いる意義は大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We examined the previously reported methods in mice and human ES cells, and succeeded in differentiation from human iPS cells to IFN-producing dendritic cells, CD3-positive cells, CD56-positive cells and CD19-positive/VpreB/-like expressing cells using a modified method of the Sac method (Takayama et al., 2008). In addition, we genome edited SLE-related variants and confirmed improvement/exacerbation of IFN secretion in IFN-producing dendritic cells. Since the number of stem cells obtained at culture day 14 by the Sac method was limited, we referred to the method of Elizabeth S Ng et al., worked on differentiation in feeder free and animal free environment, and achieved 100 times higher stem cells induction efficiency.

研究分野：自己免疫疾患

キーワード：SLE iPS細胞 ゲノム編集 分化培養 免疫細胞 IFN

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) は多彩な臓器障害を示す自己免疫疾患であり、免疫学的な異常としては、I型 interferon (IFN) signature の亢進と抗 dsDNA 抗体に代表される自己抗体産生を特徴としている (Tsokos, G. N Engl J Med 365, 2011)。SLE は腎臓、皮膚、肺、神経など多様な臓器に障害をもたらす、患者の QOL を大きく低下させると共に生命予後を脅かすことも多い (Pons-Estel, GJ et al. Semin Arthritis Rheum 39, 2010)。一方で、病態の全容は解明されておらず、治療薬の選択肢は未だ十分ではない。ステロイド (prednisolone; PSL) やシクロホスファミド (cyclophosphamide; CyA) などといった病因非特異的な免疫抑制剤が用いられているのが現状であり、長期間のステロイド投与による感染症などの副作用は SLE 患者の第一の死因となっている (Bertsias, G. K. et al. Ann Rheum Dis 69, 2010)。

SLE の病態において、核心となる治療ターゲットは B 細胞 (自己抗体産生)、T 細胞 (獲得免疫の制御)、樹状細胞 (DC) (IFN- γ 産生) などの免疫細胞と考えられている。B 細胞表面の CD20 に対する抗 CD20 キメラ抗体、rituximab による、比較的中程度の活動性を有する SLE 患者に対する大規模二重盲検比較対象試験 (EXPLORE 試験, Merrill, J.T et al. Arthritis Rheum. 62, 2010)、ループス腎炎患者に限定して行われた LUNAR 試験 (Rovin BH et al. Arthritis Rheum. 64, 2012) は有意な効果が得られなかった。また同じく抗 CD20 抗体であるオクレリズマブ (ocrelizumab) (Mysler EF et al. Arthritis Rheum. 65, 2013) も期待する効果が得られなかった。B 細胞の膜表面分子である CD22 に対するモノクローナル抗体、epratuzumab の中～高活動性の SLE 患者に対する大規模二重盲検比較対象試験 (EMBODY 1, EMBODY 2 試験) でも、プラセボに比較し従来の治療薬に対する上乗せ治療効果は得られなかった。ヒト化抗 CD154 モノクローナル抗体、BG9588 は IgG 抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞数を著明に低下させ、有意な抗 dsDNA 抗体価の低下と血清 C3 値の上昇を認め、腎症を改善させると報告されているが (Boumpas DT et al. Arthritis Rheum. 48: 719-727, 2003)、臨床試験において心筋梗塞、肺梗塞、脳血栓症、深部静脈血栓症などの血栓形成性の病態が出現し撤退を余儀なくされた。

こららをターゲットとした創薬および臨床試験は盛んに行われてきたが、今のところ革新的な成果は得られていない。2011 年にアメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) は約 50 年ぶりに SLE の新規治療薬として、ヒトモノクローナル抗体のベリムマブ (Belimumab) を認可した。既存の治療薬と併用することにより、重症腎炎患者を除いた患者への治療効果 (主要項目達成率) を 10% 程度高める (Navarra, S. V. et al. Lancet 377, 721-731, 2011) ことはできたものの、有効率は 50% 程度であった。

これらの経験を踏まえると、SLE に対する核心的な治療ターゲット検索のために、より深い病態の理解及び新たな研究ツールの開発が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

SLE 患者由来人口多能性幹細胞 (SLE-iPS 細胞) を用いた大きな研究成果は現在までのところ世界的にも報告はみられない。SLE に対するより深い病態の理解、更なる治療戦略の構築のためには、SLE-iPS 細胞は以下に示すように有益な研究ツールであると考えられた。SLE 患者のゲノム背景を引き継ぐ SLE-iPS 細胞を用いることで、理論的に無限のリソースが得られ、容易に分子生物学的手法 (ゲノム編集など) を適応させることができ、SLE 病態を *in vitro* に再現 (病原細胞へ分化) することで、SLE に対する治療ターゲットの検索、創薬研究を行う。

3. 研究の方法

SLE-iPS 細胞および健常者由来 iPS 細胞を用いて、DC、T/NK 細胞、B 細胞系細胞への分化培養法を検討する。CRISPR/Cas などのゲノム編集技術を用い、新規 Variants または既報の疾患関連 SNP の改変を行うことにより、シグナリングパスウェイ、病態解明を行う。また薬剤スクリーニングの系の構築に努める。

4. 研究成果

我々は既報のマウスやヒト ES 細胞での方法を吟味し、Sac 法 (Takayama ら、2008) を Modify した方法を用いて、ヒト iPS 細胞から IFN 産生 DC、CD3 陽性細胞、CD56 陽性細胞、CD19 陽性/VpreB-like 発現細胞への分化培養に成功した。また SLE 関連 Variants の検索および機能スクリーニングを行なった。SLE の病原性に関連すると思われる Variants を SLE-iPS 細胞及び健常者由来 iPS 細胞でゲノム編集を行い、IFN 産生樹状細胞における機能改善/増悪を確認した。

Sac 法において、Day14 時点で得られる幹細胞数に限りがあった。健常と SLE の多クローンによる比較の際や T/B 細胞系への分化の際において、後半の分化培養に必要な細胞数を確保する

ために、これまでは大掛かりな準備(大量のフィーダー細胞の放射線照射やジェラチンコーティングディッシュの用意など)が必要であった。我々は Elizabeth S Ng らの報告を参考にし、feeder free、animal free での分化に取り組み、100 倍以上の幹細胞誘導効率を達成した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 Takashi Okumura, Yumi Horie, Chen-Yi Lai, Huan-Ting Lin, Hirofumi Shoda, Bunki Natsumoto, Keishi Fujio, Makoto Otsu	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 Res Ther	6. 最初と最後の頁 185
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 庄田宏文, 夏本文輝	4. 巻 29
2. 論文標題 免疫疾患の感受性多型のゲノム編集	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 68 - 71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 夏本 文輝、庄田 宏文、林 煥庭、永淵 泰雄、大津 真、山本 一彦、谷口 英樹、藤尾 圭志
2. 発表標題 姉妹SLE患者由来iPS細胞及びゲノム編集技術を用いたrare variantsの探索と機能証明
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 夏本 文輝、庄田 宏文、林 煥庭、永淵 泰雄、大津 真、山本 一彦、谷口 英樹、藤尾 圭志
2. 発表標題 姉妹SLE患者由来iPS細胞及びゲノム編集技術を用いたrare variantsの探索と機能証明
3. 学会等名 第6回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Bunki Natsumoto, Hirofumi Shoda, Huan-Ting Lin, Yasuo Nagafuchi, Makoto Otsu, Kazuhiko Yamamoto, Hideki Taniguchi, Keishi Fujio
2. 発表標題 Identification and functional analysis of SLE rare variants using patients-derived iPS cells
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 夏本 文輝、庄田 宏文、林 煥庭、永淵 泰雄、大津 真、東條 有伸、山本 一彦、谷口 英樹、藤尾 圭志
2. 発表標題 姉妹SLE患者由来iPS細胞及びゲノム編集技術を用いたrare variantsの探索と機能証明
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 夏本 文輝、庄田 宏文、永淵 泰雄、大津 真、山本 一彦、谷口 英樹、藤尾 圭志
2. 発表標題 SLE患者由来iPS細胞を用いたrare variantsの探索と免疫学的機序の解明
3. 学会等名 第49回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Bunki Natsumoto, Hirofumi Shoda, Yasuo Nagafuchi, Makoto Otsu, Kazuhiko Yamamoto, Hideki Taniguchi, Keishi Fujio
2. 発表標題 Functional analysis of rare variants associated with SLE using patients derived iPS cells
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 夏本 文輝、庄田 宏文、永渕 泰雄、大津 真、山本 一彦、谷口 英樹、藤尾 圭志
2. 発表標題 SLE患者由来iPS細胞を用いたrare variantsの探索と免疫学的機序の解明
3. 学会等名 第5回日本免疫不全・自己炎症学会
4. 発表年 2022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