

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H05385・20K20391

研究課題名(和文)他家iPS細胞を用いたHLA適合移植後の新たな拒絶機構の解明と克服法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of novel rejection mechanism after HLA-matched transplantation using allogeneic iPS cells

研究代表者

大段 秀樹(Ohdan, Hideki)

広島大学・医系科学研究科(医)・教授

研究者番号：10363061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：Signal regulatory protein (SIRP)-CD47システムはマクロファージや樹状細胞の自己寛容機構として知られる。本研究ではSIRP 遺伝子多型がHLA非依存性のアロ認識機構として作動し、HLA3座一致iPS細胞由来の他家細胞が自然免疫応答の標的となることを解明した。他家細胞移植後に作動するT細胞の活性化経路は、直接認識と間接認識経路に分類される。HLA適合他家移植で回避し得る拒絶反応は、直接認識経路を介したものに限られる。本研究では、間接認識経路によって免疫反応を惹起するマイナー組織適合抗原に対するT細胞応答を肝類洞内皮細胞が特異的に寛容化する機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HLA3座一致iPS細胞由来の他家細胞移植においても、SIRP 遺伝子多型によりHLA非依存性のアロ認識機構が作動して拒絶反応が惹起され、抗SIRP 抗体によりその応答が回避し得る可能性が示された。この成果は、新規拒絶機構の解明と克服法の開発に繋がる。マイナー組織適合抗原に対するT細胞応答による拒絶反応を、肝類洞内皮細胞への抗原パルスによって回避できれば、免疫抑制薬を使用することなく移植されえたHLA3座一致iPS細胞由来の他家細胞永久生着させることが期待できる。以上の成果は、HLA一致iPS細胞由来の他家細胞移植における新たな免疫制御法として、再生医療への応用に期待できる。

研究成果の概要(英文)：The Signal regulatory protein (SIRP)-CD47 system is known as a self-tolerant mechanism for macrophages and dendritic cells. In this study, we elucidated that SIRP gene polymorphisms act as an HLA-independent allorecognition mechanism, and that allogeneic cells derived from HLA3-locus iPS cells are targets of innate immune response. The activation pathway of T cells that operates after allogeneic cell transplantation is classified into direct recognition and indirect recognition pathways. Rejection that can be avoided by HLA-matched allogeneic transplantation is limited to those via the direct recognition pathway. In this study, we elucidated the mechanism by which hepatic sinusoidal endothelial cells specifically tolerate the T cell response to minor tissue-compatible antigens that elicit an immune response through the indirect recognition pathway.

研究分野：外科学一般

キーワード：iPS細胞 他家細胞移植 HLA一致 SIRP 拒絶反応 免疫制御 自然免疫 獲得免疫

1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹 (induced pluripotent stem; iPS) 細胞を用いた再生医療は、疾病や老化により機能不全に陥った細胞を iPS 細胞から分化誘導した正常細胞に置換し、機能回復を図るものであり、臓器移植に近似する治療効果が期待されている。一般的に iPS 細胞は、罹患者自身から採取した細胞 (自家細胞) から作製されたものと、他人の細胞 (他家細胞) から作製されたものに大別される。自家細胞を使用する場合、罹患者ごとに iPS 細胞の作製から細胞の培養までを行うため製造期間が長くなり、治療時期を逸する可能性や製造コストの問題などのため実用化に向かない。そのため、既に樹立された他家細胞を用いた治療方法の確立が図られている。免疫拒絶反応を最小限にとどめるため、主要組織適合性抗原複合体 (MHC; Major Histocompatibility Complex)、すなわちヒト白血球抗原 (Human Leukocyte Antigen; HLA) を一致させた他家移植を想定して、HLA-A, B, DR ハプロタイプホモ由来の iPS 細胞を樹立してバンク化する「iPS 細胞ストック事業」が行われている。しかし、生体防御を司る自然免疫及び獲得免疫系には、MHC の直接認識を介するもの以外にも拒絶を惹起するポテンシャルを持つ機構が想定されるものの、未解明である。

我々は、特定の成熟期の NK 細胞 (CD56bright CD94+ CD16-, maturational stage 4) に TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-death receptor (DR) 系を介した強い抗腫瘍活性を誘導できることを見出し(1)、肝臓に局在する stage 4 NK 細胞を用いて肝細胞癌患者に対する肝移植後再発予防の NK 細胞移入治療の臨床試験を施行している(2)。最近、ヒト iPS 細胞から stage 4 NK 細胞 (iPS-NK 細胞) を誘導することに成功し(図 1)、様々な癌種に対する抗腫瘍効果を *in vitro* で確認できた。今後、癌免疫療法の臨床応用に向けて、HLA3 座一致の他家由来 iPS-NK 細胞が HLA 非依存性に拒絶を被るメカニズムを解明し、その克服法を開発する。

2. 研究の目的

I. 自然免疫系 SIRP-CD47 システムによる他家(アロ)免疫機構の解明

従来、自然免疫応答には同種異系 (アロ) 抗原の認識機構は存在せず、移植臓器の拒絶反応はもっぱら獲得免疫応答が担うと考えられていた。最近、ドナーの単球に発現する阻害受容体シグナル制御蛋白 signal regulatory protein (SIRP) の遺伝子多型がレシピエントの細胞表面に発現する CD47 (インテグリン関連蛋白) との親和性に影響し、主要組織適合性抗原 (MHC) に依存しない活性化シグナル伝達が惹起されるという新規のアロ認識機構がマウスモデルで証明された(図 2) (3)。SIRP-CD47 システムはマクロファージや樹状細胞の自己寛容機構として知られる(4)。SIRP が自己細胞上に ubiquitous に発現する CD47 を認識し貪食活性を抑制するが、CD47 はブタ-ヒト間でホモロジーが低く異種認識機構として拒絶反応を惹起することを我々は報告している(5)。本研究ではヒト-ヒト間においても SIRP 遺伝子多型が HLA 非依存性のアロ認識機構として作動し、HLA3 座一致 iPS 細胞由来の他家細胞が自然免疫応答の標的になりえるか否かを解明し、その制御法を探索する (図 1)。

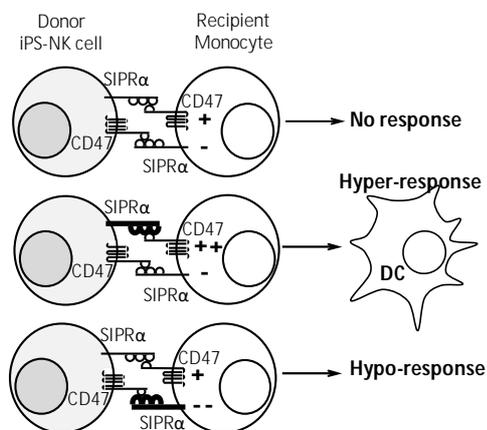


図 1. ドナーの単球に発現する SIRP の SNP がレシピエントの細胞に発現する CD47 との親和性に影響し、MHC に依存しない活性化シグナル伝達が惹起される (新規アロ認識機構) (中段)。同種同型では SIRP-CD47 システムが双方向性に同等に作動し、免疫応答は惹起されない (上段)。レシピエント SIRP の SNP によっては、抑制性のシグナル強度が優位となり低反応性を獲得される場合もある (下段)。

II. 獲得免疫系間接認識経路によるアロ免疫機構の解明

他家細胞移植後に発症するアロ免疫応答は、細胞性拒絶反応と抗体性拒絶反応に分類される。細胞性拒絶反応は活性化した T 細胞により起こり、T 細胞の活性化経路は抗原提示細胞の由来の違いにより直接認識経路と間接認識経路に分類される。直接認識経路では、移植片内のドナー抗原提示細胞の HLA を、レシピエント T 細胞が T 細胞受容体 (TCR) を介して直接認識する (図 2A)。これは、本来自己 HLA 拘束的に反応するレシピエント T 細胞が、一種の交差反応をおこすためと理解されている。直接認識経路で活性化する T 細胞の割合は、通常の抗原特異的反應での割合と比べ非常に高く反応も強い。HLA 適合他家移植で回避し得る拒絶反応は、理論的にはこの直接認識経路を介したものに限られる。

間接認識経路では、アロ抗原がレシピエント由来の抗原提示細胞に取り込まれ、分解後にレシピエント HLA クラス II 上に提示され、レシピエント CD4+ T 細胞が TCR を介して認識し活性化する (図 2B)。通常の外来抗原に対する反応と本質的に同じであり、反応する T 細胞は自己

HLA に拘束されている。また HLA クラス I は本来、内在性ペプチドを結合し CD8+T 細胞に提示するが、樹状細胞がアロ抗原を取り込んでクラス I に提示し、CD8+T 細胞を活性化する（クロスプレゼンテーション）。間接認識経路によって免疫反応を惹起するポテンシャルをもつ MHC 以外の抗原をマイナー組織適合抗原（Minor Histocompatibility Antigen; MiHA）と定義される。すなわち、MiHA とは患者細胞表面の HLA 上に提示される細胞内タンパク由来のペプチドのうち、遺伝子多型により患者とドナー間で異なるアミノ酸配列を持ち、非自己の T リンパ球に認識されるものをいう。ヒトでは 48 個の HLA class I-restricted autosomal MiHA と 8 個の HLA class II-restricted MiHA が分子レベルで同定されている(6)。

MiHA によるアロ免疫応答を制御し免疫寛容を誘導するには、間接認識経路によって誘導される T 細胞のアロ免疫応答を特異的に抑制する必要がある。我々は、門脈を介して移入したアロ細胞は、類洞内皮細胞 liver sinusoidal endothelial cell (LSEC) に貪食され、間接認識経路による T 細胞応答を特異的に抑制することをマウスモデルで証明している(7-9)。本研究では、MiHA を想定した仮想抗原を門脈内移入や経口摂取により LSEC に貪食させ、間接認識経路により T 細胞を特異的に寛容化し、免疫抑制薬を使用することなく移植片を永久生着させ得るか否かを探索する。

3. 研究の方法

1. 自然免疫系 SIRP -CD47 システムによるアロ免疫機構の解明

SIRP は細胞外に 3 つのイムノグロブリン様構造をもつ受容体型蛋白質で、細胞内領域に 4 つのチロシンリン酸化部位があり、増殖因子や細胞接着刺激によりリン酸化を受け、SHP-2 あるいは SHP-1 が結合し下流シグナルとして機能する。神経や造血幹細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、顆粒球および骨髄前駆細胞などミエロイド細胞に発現が認められる。我々が誘導した iPS-NK 細胞にも SIRP の発現を認めており、SIRP 遺伝子多型が HLA 非依存性のアロ認識機構として作動し、拒絶の標的となる可能性がある。誘導した iPS-NK 細胞の genomic DNA から第 3 エクソンにコードされる SIRP IgV ドメインをシークエンスし SIRP haplotype を同定した。健常人ボランティアの末梢血単球と in vitro で混合培養し、SIRP haplotype マッチングが単球の活性化に如何に影響するかを解析するため、フローサイトメーターで樹状細胞への分化を評価した。iPS-NK 細胞に発現する SIRP の遺伝子多型が、レシピエントの細胞表面に発現する CD47 との親和性に影響し、HLA 非依存性アロ認識機構がヒトにも作動するか否か、さらには抗 SIRP 抗体により SIRP -CD47 シグナルが遮断し得るか否かを解明し、新規拒絶機構を解明し克服法を探索した。

11. 獲得免疫系間接認識経路によるアロ免疫機構の解明

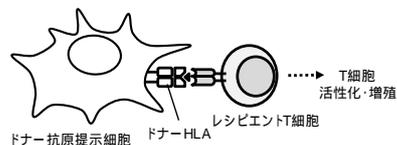
LSEC は、ペプチド抗原の phagocytosis/endocytosis 機構を備え、HLA I/II、共刺激分子 (CD40, CD80, CD86)、programmed death ligand-1 (PD-L1) を発現することはすでに確認している。LSEC に仮想 MiHA として外来ペプチドをパルスし、同種同型 T 細胞と混合培養する。培養産物を外来ペプチドでパルスした樹状細胞と混合培養し、T 細胞のアロ免疫応答を細胞傷害性で評価、LSEC により特異的 T 細胞免疫制御（抑制）機構を解析した(図 3)。

4. 研究成果

1. 自然免疫系 SIRP -CD47 システムによるアロ免疫機構の解明

単球に発現する SIRP は正常細胞に発現する CD47 分子と結合し、自己寛容機構を形成する。我々はこの SIRP -CD47 シグナル機構が抗原提示細胞のアロ認識に関与しているという仮説のもと、同シグナルのアロ免疫応答制御機構の解明を目的として研究を実施した。SIRP の細胞外 IgV ド

A. Direct pathway



B. Indirect pathway

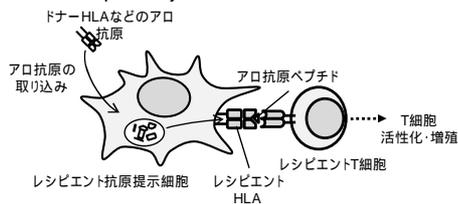


図 2. 細胞性拒絶反応のメカニズム
A. 直接認識経路。 B. 間接認識経路。

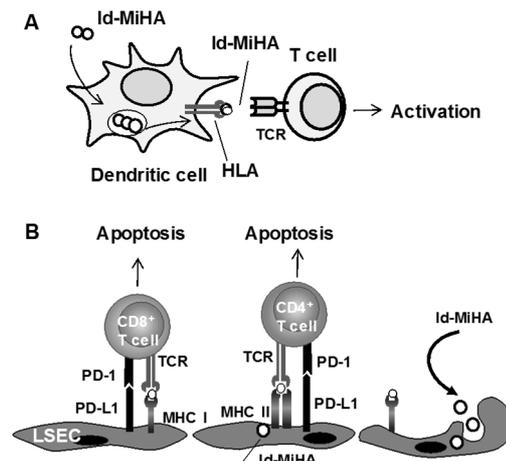
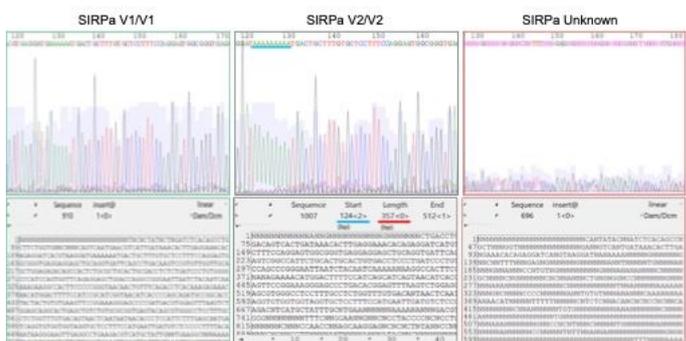


図 3. 獲得免疫系間接認識経路によるアロ免疫機構。A. Immuno-dominant MiHA (Id-MiHA) を仮想して外来ペプチドを exogenous antigen として貪食した樹状細胞より間接認識経路で T 細胞は活性化し拒絶機構が作動する。B. Id-MiHA/OVA が LSEC によりクロスプレゼンテーションし、T 細胞は抑制させる（仮説）。

の細胞外 IgV ド

メインの遺伝子多型に注目し、頻度の高い多型 1 (V1)と多型 2(V2)のホモ接合体を Sanger 法で同定した(図 4)。そして、V1/V1 遺伝型のヒト単球上の SIRP が V2/V2 遺伝型に比べ CD47 蛋白との結合能が低いことを明らかにした(図 5)。単球におけるアロ応答制御機構として、ドナー由来細胞との双方向 SIRP -CD47 シグナルの影響を評価するため、リンパ球混合試験 (MLR) を用いた抗原提示機能関連分子の評価を行った。ヒト末梢血単核球から CD14+単球を分離し、同じく分離したアロ単球を刺激細胞



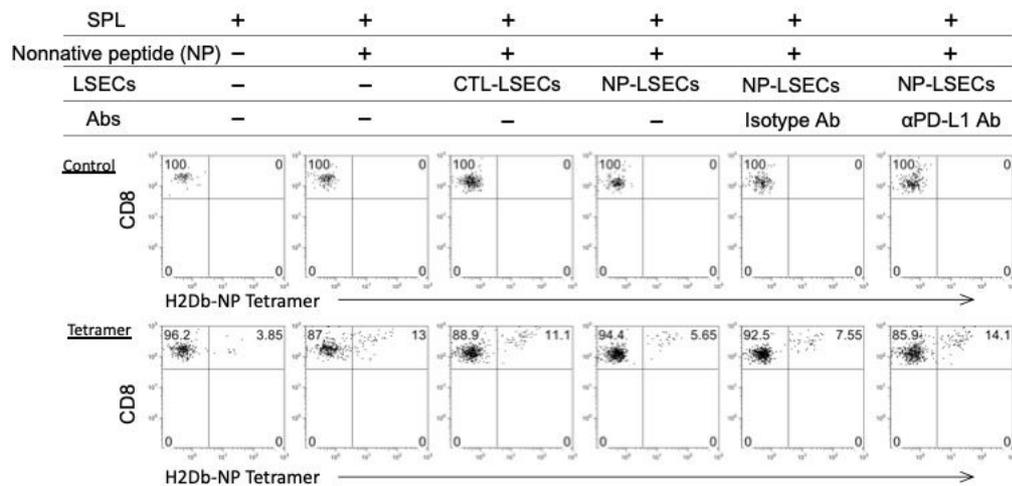


図6. B6 マウスから LSEC の T 細胞制御機構の解析結果。Control irrelevant peptide でパルスした LSEC(CTL-LSEC)、仮想 MiHA として nonnative peptide(NP)でパルスした LSEC(NP-LSEC)、脾臓リンパ球(SPL)、NP、抗 PD-L1 抗体(PD-L1 Ab)を様々な組み合わせで混合培養した。培養後 H-2Db-NP tetramer で NP に特異的な T 細胞受容体を出示する T 細胞を検出した。

<引用文献>

1. Ishiyama K, Ohdan H, Asahara T, et al. Difference in cytotoxicity against hepatocellular carcinoma between liver and periphery natural killer cells in humans. *Hepatology*. 2006;43(2):362-72.
2. Ohira M, Ishiyama K, Ohdan H, et al. Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. *J Clin Invest*. 2009;119(11):3226-35.
3. Dai H, Friday AJ, Lakkis FG, et al. Donor SIRP polymorphism modulates the innate immune response to allogeneic grafts. *Sci Immunol*. 2017;2(12). pii: eaam6202.
4. Oldenburg PA, Zheleznyak A, Lindberg FP, et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*. 2000;288(5473):2051-4.
5. Ide K, Wang H, Ohdan H, et al. Role for CD47-SIRPalpha signaling in xenograft rejection by macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(12):5062-6.
6. Griffioen M, van Bergen CA, Falkenburg JH. Autosomal Minor Histocompatibility Antigens: How Genetic Variants Create Diversity in Immune Targets. *Front Immunol*. 2016;7:100.
7. Tokita D, Shishida M, Ohdan H, et al. Liver sinusoidal endothelial cells that endocytose allogeneic cells suppress T cells with indirect allospecificity. *J Immunol*. 2006;177(6):3615-24.
8. Shishida M, Ohdan H, Asahara T, et al. Role of invariant natural killer T cells in liver sinusoidal endothelial cell-induced immunosuppression among T cells with indirect allospecificity. *Transplantation*. 2008;85(7):1060-4.
9. Banshodani M, Onoe T, Ohdan H et al. Adoptive transfer of allogeneic liver sinusoidal endothelial cells specifically inhibits T-cell responses to cognate stimuli. *Cell Transplant*. 2013;22(9):1695-708.
10. Morizane A, Kikuchi T, Takahashi J, et al. MHC matching improves engraftment of iPSC-derived neurons in non-human primates. *Nat Commun*. 2017;8(1):385.
11. Ichise H, Nagano S, Kawamoto H et al. NK Cell Alloreactivity against KIR-Ligand-Mismatched HLA-Haploidentical Tissue Derived from HLA Haplotype-Homozygous iPSCs. *Stem Cell Reports*. 2017;9(3):853-867.
12. Ohira M, Ohdan H, Tzakis AG, et al. Clinical-scale isolation of interleukin-2-stimulated liver natural killer cells for treatment of liver transplantation with hepatocellular carcinoma. *Cell Transplant*. 2012;21(7):1397-406.

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 Ishida N, Ishiyama K, Saeki Y, Tanaka Y, Ohdan H.	4. 巻 19
2. 論文標題 Cotransplantation of preactivated mesenchymal stem cells improves intraportal engraftment of islets by inhibiting liver natural killer cells in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Transplant.	6. 最初と最後の頁 2732-2745
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ajt.15347.	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中友加, Dorskali Marlen, 清水誠一, 大平真裕, 小林剛, 大段秀樹
2. 発表標題 アフェレース凍結細胞からの活性化NK細胞リモデリングと抗腫瘍・抗ウイルス効果の検討
3. 学会等名 第54回日本移植学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋本修志、田中友加, Dorskali Marlen, 築山尚史, 井出隆太, Akhmet Seidakhmetov, 山根宏昭, 佐藤幸毅, 今岡祐輝, 本明慈彦, 中島一記, Jamilya Saparbay, 田口和浩, 田中飛鳥, 谷峰直樹, 森本博司, 田原裕之, 大平真裕, 井手健太郎, 小林剛, 大段秀樹
2. 発表標題 ヒトiPS細胞からの機能性NK細胞分化誘導法の確立
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Dorskali Marlen, Tanaka Y, Ohira M, Akimoto S, Ohdan H
2. 発表標題 THERAPEUTIC POTENTIAL OF HEMATOPOIETIC STEM CELL-DERIVED NATURAL KILLER CELLS ON CANCER RECURRENCE AND VIRAL INFECTION AFTER LIVER TRANSPLANTATION
3. 学会等名 19th Congress of the European Society for Organ Transplantation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷峰直樹, 田中友加, 大平真裕, 大段秀樹
2. 発表標題 肝臓内自然免疫の疾患制御能および病態による影響
3. 学会等名 JDDW 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大段秀樹, 大平真裕, 今岡祐輝, 佐藤幸毅, 田中友加
2. 発表標題 肝臓癌合併生体肝移植患者に対するドナー肝臓由来活性化ナチュラルキラー細胞移入療法
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井手健太郎, 大平真裕, 田原裕之, 谷峰直樹, 秋本修志, 今岡祐輝, 佐藤幸毅, 山根宏昭, 井出隆太, 築山尚史, 小野紘輔, 望月哲矢, 田中友加, 大段秀樹
2. 発表標題 肝移植におけるHLA抗体検査の意義 エピトープ解析と免疫応答の関連性についての検討
3. 学会等名 第56回日本移植学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野紘輔, 谷峰直樹, 築山尚史, 井出隆太, 佐藤幸毅, 山根宏明, 今岡祐輝, 秋本修志, 田原裕之, 大平真裕, 井手健太郎, 小林剛, 田中友加, 大段秀樹
2. 発表標題 リンパ球混合試験を用いた免疫モニタリングの肝移植免疫抑制漸減に関するCross-sectional study
3. 学会等名 第56回日本移植学会総会
4. 発表年 2020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
研究分担者	大平 真裕 (Ohira Masahiro) (30397947)	広島大学・病院(医)・助教 (15401)	
研究分担者	田原 裕之 (Tahara Hiroyuki) (30423354)	広島大学・病院(医)・助教 (15401)	
研究分担者	井手 健太郎 (Ide Kentaro) (50511565)	広島大学・病院(医)・講師 (15401)	
研究分担者	田中 友加 (Tanaka Yuka) (90432666)	広島大学・医系科学研究科(医)・准教授 (15401)	

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
---------	---------