

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08413

研究課題名(和文) iPS細胞由来血小板を用いたNK細胞免疫逃避の機序解明と治療展開

研究課題名(英文) Elucidation of the NK cell immune escape mechanism using iPS cell-derived platelets and development of treatment

研究代表者

杉本 直志 (Sugimoto, Naoshi)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点准教授

研究者番号：10447956

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)：HLAクラスIの違いに起因する拒絶反応によって起こる血小板輸血不応症への対応手段として、我々はHLAクラスI欠失iPS細胞由来血小板を開発した。本研究では、HLAクラスI欠失iPS血小板とその元となるHLAクラスI欠失巨核球株imMKCLを用いた、インビトロNK細胞共培養解析、NK細胞再構成ヒト化マウスを用いた移植検証、細胞動態ライブイメージング解析、プロテオミクス解析を行った。これらの解析により、HLAクラスI欠失iPS血小板の免疫逃避性を再確認するとともに、免疫抑制分子であるTGF- $\beta$ がこの血小板のNK細胞に対する免疫逃避性に寄与することを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血小板は、赤血球輸血や骨髄移植、臓器移植と異なり、適合性を考慮しなくとも他者に輸血が可能という特異的な免疫性質を有する。そのメカニズムはこれまで不詳であったが、本研究はその一端を解明することによって貢献する。このような血小板の特徴は、血小板増加をしばしば引き起こすことのある、がんが免疫システムの攻撃を逃れていることに関与している可能性も考えうる。本研究で示された血小板の免疫を逃れる性質とそのメカニズムは、その応用によって輸血や移植医療の免疫的なバリアーの克服を一歩進める一方、抑制的に制御することによってがんに対する新たな治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To overcome platelet transfusion refractoriness caused by rejection due to HLA class I incompatibility, we developed HLA class I-deficient iPS cell-derived platelets. In this study, we performed in vitro NK cell co-culture analysis, transplantation verification using NK cell-reconstituted humanized mice, live imaging analysis of cell kinetics, and proteomic analysis using HLA class I-deficient iPS platelets and their source, the HLA class I-deficient megakaryocytic line (imMKCL). These studies confirmed the immune evasiveness of HLA class I-deficient iPS platelets against NK cells, and also suggested that the immunosuppressive molecule TGF- $\beta$  contributes to this unique characteristic.

研究分野：血液学、免疫学、再生医療学

キーワード：iPS細胞 血小板 HLAクラスI 遺伝子編集 NK細胞 TGF- $\beta$  ヒト化マウス

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血小板は血管統合性の維持に必須な血球成分であり、血小板が高度に減少した場合は、脳出血などの出血に対する予防・治療として血小板輸血が行われる。血小板は免疫原性が低く、通常は混入する血漿成分による抗 A 抗体、抗 B 抗体を念頭に ABO 型のみ一致したランダム製剤が投与される。しかしながら、血小板輸血や妊娠を契機に血小板に発現する主に HLA クラス I (HLA-I) に対する同種抗体が産生されることにより、輸血血小板が拒絶される事が約 5-15% ある。このような血小板輸血不応症では適合血小板の輸血が必要だが、稀な型や緊急時には供給不足リスクが高いため、ユニバーサル製剤としての HLA-I 欠失血小板の臨床応用が期待されている。そこで申請者らは、過去に確立した、iPS 細胞から樹立する不死化巨核球前駆細胞株 imMKCL を経由して血小板製剤 (iPS 血小板) を製造する技術 (Nakamura et al, *Cell Stem Cell* 2014) をベースに、遺伝子編集により HLA-I の発現を欠失させたユニバーサル血小板を作出した。

HLA-I を欠失した細胞は NK 細胞に攻撃されることが知られていることから、NK 細胞に対する免疫原性の検証を行なったところ、HLA 欠失 iPS 血小板は NK 細胞の攻撃活性を惹起しないことを見出した。さらにヒト生体内に極めて近い状態を持つ NK 細胞再構成ヒト化マウスを用いて、HLA-I 欠失 iPS 血小板が野生型と同等に循環することを確認した (Suzuki et al, *Stem Cell Rep*, 2020)。以上のことから、血小板に対する NK 細胞に対する免疫原性が低いことが実証されたが、そのメカニズムは不詳であった。

### 2. 研究の目的

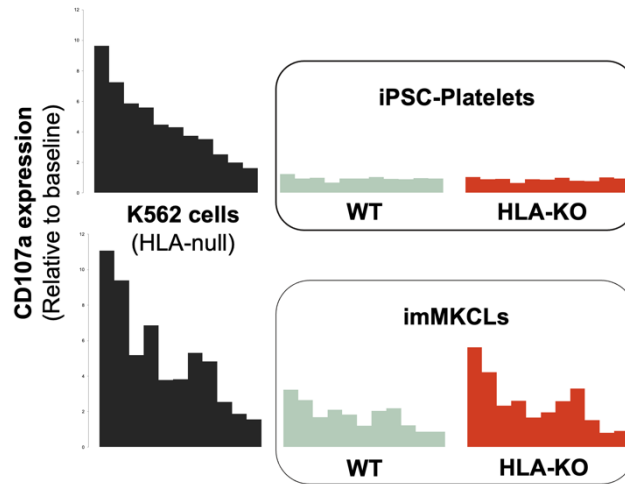
本研究は、HLA-I 欠失 iPS 血小板を用いることにより、ヒト血小板の NK 細胞に対する免疫逃避のメカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

- (1) HLA-I 欠失 iPS 血小板と HLA-I 欠失 imMKCL の NK 細胞に対する免疫原性のインビトロ比較検証：iPS 血小板と imMKCL それぞれの、HLA-I 欠失型および野生型を用いて、NK 細胞と共培養を行なって、NK 細胞の殺細胞活性マーカーである CD107 等の発現をフローサイトメーターで解析する。
- (2) HLA-I 欠失 iPS 血小板と HLA-I 欠失 imMKCL の NK 細胞に対する免疫原性の動物モデル検証：MSTRG マウスまたは NSG-SGM マウスにヒト臍帯血由来造血幹細胞を移入し、ヒト血球の生着後、ヒト IL-15/IL-15R $\alpha$  を投与してヒト NK 細胞を十分に再構成したマウス (NK 細胞再構成ヒト化マウス) をまず準備する。ついで、野生型の細胞と、比較する HLA-I 欠失型などの細胞をそれぞれを標識して混ぜて、肺や脾臓での生存をフローサイトメーターを用いて解析する。投与する細胞は、i) iPS 細胞由来造血前駆細胞 (iHPC; 野生型、HLA-I 欠失型、HLA-AB 欠失型)、ii) imMKCL (野生型と HLA-I 欠失型、および K562 細胞)、iii) iPS 細胞由来 T 細胞 (野生型と HLA-I 欠失型) の 3 種類。
- (3) プロテオミクス解析：iPS 血小板、imMKCL、赤血球、iPS 細胞由来赤芽球株のマス・スペクトロメトリー解析を行い、この 4 者の発現タンパクの違いから、NK 細胞免疫に寄与し得る細胞表面発現分子の候補をリストアップする。
- (4) 細胞動態ライブ解析：  
HLA-I 欠失型および野生型の iPS 血小板と imMKCL が、NK 細胞とどの様な接触容態をビトロで示すかタイム・ラプス・イメージング顕微鏡を用いて観察する。その動態により、HLA-I 欠失 iPS 血小板が NK 細胞と接触しないのか、接触しても活性化させないか、といった情報を取得する。

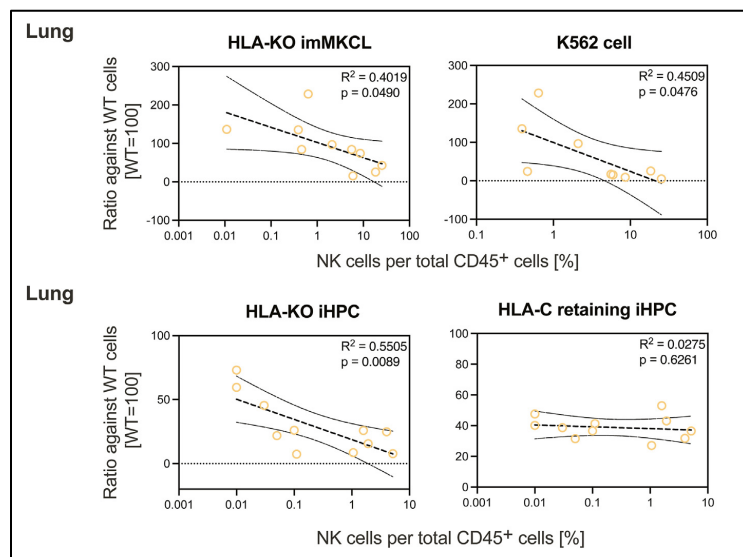
#### 4. 研究成果

- (1) NK 細胞とのインビトロ培養後のフローサイトメリー解析の結果、iPS 血小板は HLA-I の発現の有無によらず NK 細胞の CD107 の発現を誘導しなかったが、HLA-I 欠失 imMKCL は野生型に比較して NK 細胞の CD107 の発現を促進した。また iPS 血小板との接触前後の NK 細胞の変化を見ると、imMKCL との接触ごと比較して、免疫チェックポイント分子が発現上昇することが判明した。このことは、HLA-I 欠失 imMKCL は、HLA-I の NK 細胞活性化抑制作用の欠落により、NK 細胞のサブ細胞活性を惹起するのに対し、HLA-I 欠失血小板は、免疫チェックポイントリガンドなどを介して NK 細胞の活性化を抑制することを示唆した。



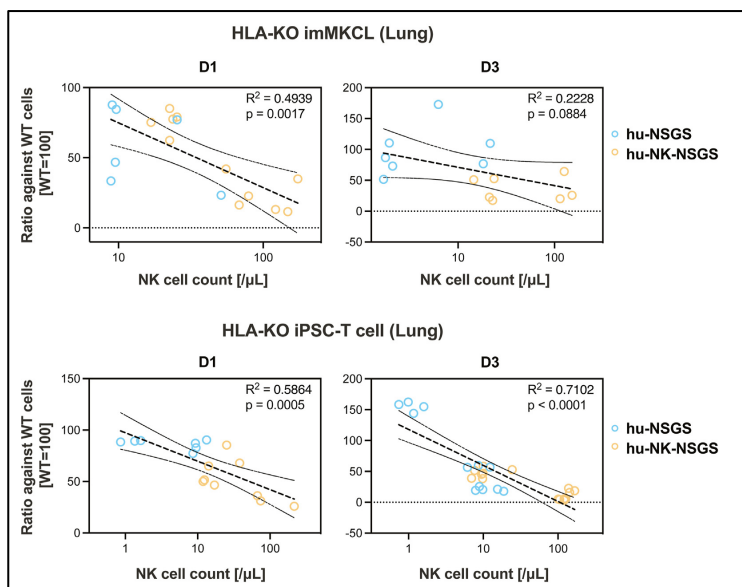
#### (2) NK 細胞再構成ヒト化マウスの結果

1. MSTRG マウスに、iHPC (野生型、HLA-I 欠失型、HLA-AB 欠失型) または imMKCL (野生型と HLA-I 欠失型、および K562 細胞) を投与し、肺を解析したところ、HLA-I 欠失型 iHPC と imMKCL、K562 細胞は NK 細胞の量依存的に排除された一方、HLA-C を残した HLA-AB 欠損 iHPC は野生型と同等の生存を示した。このことは、このマウスモデルのヒト NK 細胞の活性を正確に反映するとともに、HLA-C を残すことにより、NK 細胞免疫から逃避可能なことをビボで証明した。

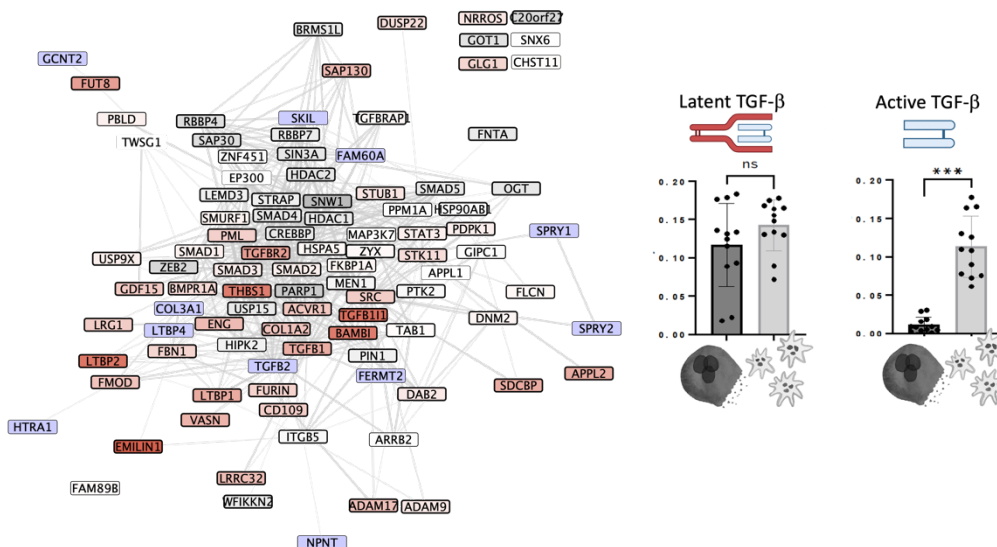


2. NSG-SGM3 マウスに、imMKCL(野生型と HLA-I 欠失型)または iPS 細胞由来 T 細胞 (野生型と HLA-I 欠失型) を投与したところ、前者は投与 1 日後、後者は 1 日後および 3 日後で、欠失型の肺での生存が優位に少なかった。このことは、このマウスモデルが、異なる種でもヒト NK 細胞の活性が同様に見られることを示すとともに、imMKCL は T

細胞と同様に HLA-I の欠失により NK 細胞に拒絶されることを証明した。

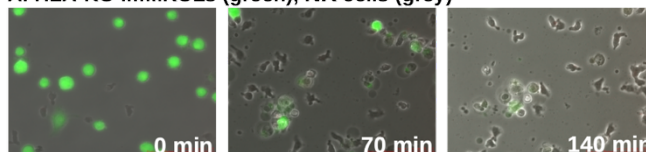


- (3) プロテオミクス解析の結果、iPS 血小板は、imMKCL に比較して、複数の免疫抑制分子の発現が高い一方、免疫活性化分子の発現は低かった。中でも TGF- $\beta$  関連タンパク群の発現が高かった。そして、発現解析を行うと、全 TGF- $\beta$  の発現は iPS 血小板と imMKCL で同等ながら、活性型 TGF- $\beta$  の発現は iPS 血小板で高かった。

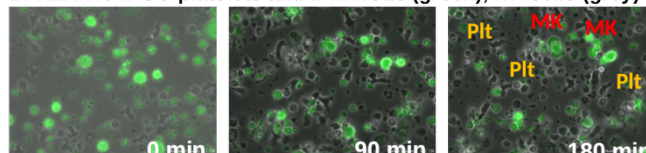


- (4) 細胞動態ライブ解析では、NK 細胞は、HLA-I 欠失 imMKCL と接触すると攻撃して細胞融解を引き起こす一方、HLA-I 欠失 iPS 血小板とは接触はするものの、短時間で終わり、iPS 血小板には細胞融解は生じなかった。つまり、iPS 血小板と接触は起こるが、持続的な細胞接着と細胞融解作用は起こらなかった。

A. HLA-KO imMKCLs (green), NK cells (grey)



B. HLA-KO iPSC-platelets and imMKCLs (green), NK cells (grey)



以上の結果から、HLA-I 欠失 imMKCL はビトロでもピボでも NK 細胞免疫を免れないのに対し、HLA-I 欠失 iPS 血小板は NK 細胞免疫を逃避することが確実に確認された。このことは、HLA-I 欠失 iPS 血小板の安全性と有効性を担保する基礎データとなる。この免疫逃避性には複数の分子メカニズムが寄与しているデータが得られたが、中でも TGF- $\beta$  が重要であると示唆された。

本研究の成果は、血液免疫学、特に多様な免疫病態に関与する血小板の作用メカニズムに新知見をもたらす。例えば、がんは血小板増加をしばしば引き起こすが、がんが免疫システムの攻撃を逃れていることに血小板が関与している可能性も考えうる。このような血小板の免疫を逃れる性質は、その応用によって輸血や移植医療の免疫的なバリアーの克服を一步進める一方、抑制的に制御することによってがんに対する新たな治療法の開発につながる可能性がある。また構築した NK 細胞再構成ヒト化マウスは再生医療の実用化にあたっての非臨床試験に有用となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Flahou Charlotte, Morishima Tatsuya, Higashi Natsumi, Hayashi Yoshikazu, Xu Huaigeng, Wang Bo, Zhang Chaoqi, Ninomiya Atsushi, Qiu Wei-Yin, Yuzuriha Akinori, Suzuki Daisuke, Nakamura Sou, Manz Markus, Kaneko Shin, Hotta Akitsu, Takizawa Hitoshi, Eto Koji, Sugimoto Naoshi	4. 巻 662
2. 論文標題 Humanized mouse models with endogenously developed human natural killer cells for in vivo immunogenicity testing of HLA class I-edited iPSC-derived cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 76 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.04.067	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 該当する

1. 著者名 Flahou Charlotte, Morishima Tatsuya, Takizawa Hitoshi, Sugimoto Naoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Fit-For-All iPSC-Derived Cell Therapies and Their Evaluation in Humanized Mice With NK Cell Immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 662360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.662360	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 Sugimoto Naoshi, Eto Koji	4. 巻 78
2. 論文標題 Generation and manipulation of human iPSC-derived platelets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 3385 ~ 3401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-020-03749-8	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 -

1. 著者名 杉本直志、江藤浩之	4. 巻 8
2. 論文標題 iPS細胞技術を応用した血液疾患およびがんに対する治療戦略	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 先進医療Navigator	6. 最初と最後の頁 20-23
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 -

1. 著者名 Sone Masamitsu, Nakamura Sou, Umeda Sachiko, Ginya Harumi, Oshima Motohiko, Kanashiro Maria Alejandra, Paul Sudip Kumar, Hashimoto Kanae, Nakamura Emiri, Harada Yasuo, Tsujimura Kyoko, Saraya Atsunori, Yamaguchi Tomoyuki, Sugimoto Naoshi, Sawaguchi Akira, Iwama Atsushi, Eto Koji, Takayama Naoya	4. 巻 16
2. 論文標題 Silencing of p53 and CDKN1A establishes sustainable immortalized megakaryocyte progenitor cells from human iPSCs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2861 ~ 2870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.11.001	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 -

1. 著者名 Yuzuriha Akinori, Nakamura Sou, Sugimoto Naoshi, Kihara Shunsuke, Nakagawa Masato, Yamamoto Takuya, Sekiguchi Kiyotoshi, Eto Koji	4. 巻 53
2. 論文標題 Extracellular laminin regulates hematopoietic potential of pluripotent stem cells through integrin 1-ILK- -catenin-JUN axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102287 ~ 102287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2021.102287	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 -

1. 著者名 Nakamura Sou, Sugimoto Naoshi, Eto Koji	4. 巻 63
2. 論文標題 Development of platelet replacement therapy using human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 178 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12711	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10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 杉本直志, Charlotte Flahou, 森嶋達也, 東奈津美, 徐淮耕, 王博, 金子新, 堀田秋津, 滝澤仁, 江藤浩之
2. 発表標題 再生医療におけるHLA欠失細胞のin vivo免疫原性試験用のNK細胞を含む免疫系ヒト化マウスの確立
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉本直志, Charlotte Flahou, 森嶋達也, 東奈津美, 徐淮耕, 王博, 金子新, 堀田秋津, 滝澤仁, 江藤浩之
2. 発表標題 再生医療におけるHLA欠失細胞のin vivo免疫原性試験用のNK細胞を含む免疫系ヒト化マウスの確立
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Charlotte Flahou
2. 発表標題 Elucidating the immune escape mechanisms of HLA-KO iPSC-platelets from NK cells
3. 学会等名 第19回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Charlotte Flahou
2. 発表標題 Immune escape of HLA-KO iPSC-platelets from Natural Killer cells
3. 学会等名 30th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本直志
2. 発表標題 Developing in vivo preclinical models using human NK cell reconstituted mice for allogeneic regenerative medicine
3. 学会等名 6th International Workshop on Humanized Mice (国際学会)
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 Charlotte Flahou
2. 発表標題 Mechanisms of HLA-KO iPSC-platelets immune escape from NK cells
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本直志
2. 発表標題 Establishment of human immune system mice for evaluation of rejection of HLA-depleted cells in regenerative medicine
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本直志
2. 発表標題 HLA-KO iPSC-platelets immune escape from NK cells
3. 学会等名 Cell Symposium: Advances in Therapeutic Applications of Stem Cells (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本直志
2. 発表標題 iPS細胞技術を用いた血小板製造と動脈硬化研究への応用の可能性
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoshi Sugimoto
2. 発表標題 The first-in-human clinical trial of iPSC-derived platelets (iPLAT1): Autologous transfusion to an aplastic anemia patient with alloimmune platelet transfusion refractoriness
3. 学会等名 63rd Annual Meeting of the American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者:96名、技術情報協会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 602
3. 書名 ゲノム編集技術を応用した製品開発とその実用化 (9節)	

〔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
研究協力者	フラハウ シャーロット (Flahou Charlotte)	京都大学・iPS細胞研究所・研究生  (14301)	
研究協力者	中村 壮 (Nakamura Sou)	京都大学・iPS細胞研究所・教授  (14301)	
研究協力者	江藤 浩之 (Eto Koji)	京都大学・iPS細胞研究所・教授  (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	堀田 秋津  (Hotta Akitsu)  (50578002)	京都大学・iPS細胞研究所・教授    (14301)	
研究協力者	金子 新  (Kaneko Shin)  (40361331)	京都大学・iPS細胞研究所・教授    (14301)	
研究協力者	滝澤 仁  (Takizawa Hitoshi)  (10630866)	熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘教授	

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