

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08862

研究課題名(和文) 同種異系iPS心筋細胞移植治療に対するiPS間葉系幹細胞を用いた免疫抑制法の開発

研究課題名(英文) Development of immunosuppressive treatment using iPS-derived mesenchymal stem cells for allogeneic iPS cardiomyocyte transplantation therapy.

研究代表者

小田 紀子(Oda, Noriko)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい准教授

研究者番号：90373092

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)：重症心不全における他家由来細胞移植治療では、免疫抑制剤の投与による腎不全や悪性腫瘍などの副作用が問題となる。本課題では、免疫寛容を誘導することが報告されている間葉系幹細胞(hiPS-MSC)と、ヒトiPS細胞由来心筋細胞(hiPS-CMs)を共移植することで、免疫抑制剤を用いず、移植細胞の長期生着を可能とする移植法を開発することを目的とした。まずhiPS-MSCの分化誘導法を確立し、in vitroでの免疫抑制作用を確認した。さらにin vivoにおいて、皮下に移植したhiPS-CMsの生着延長が示され、共移植による免疫制御の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症心不全治療においては、iPS細胞由来心筋細胞の移植治療が新たな選択肢として期待され、代表者らが所属する研究グループで、医師主導治験が実施された。しかし他家細胞移植であるため、免疫抑制剤投与が必要であり、腎不全や悪性腫瘍などの副作用を起こす可能性があり、免疫抑制剤を用いない移植法が開発が望まれている。hiPS-MSCとの共移植により、移植されたhiPS-CMsの生着延長が認められたことから、免疫制御が可能となることが示され、免疫抑制剤の副作用に対する安全性の向上が期待される。また免疫抑制剤使用に適さない患者に対して、他家iPS心筋細胞移植治療の適応拡大の可能性も示された。

研究成果の概要(英文)：In allogeneic cell transplantation therapy in severe heart failure, side effects such as renal failure and malignancy due to administration of immunosuppressive agents are problematic. In this project, we aimed to develop a transplantation method that enables long-term viability of transplanted cells without the use of immunosuppressive agents by co-transplanting mesenchymal stem cells (hiPS-MSCs), which have been reported to induce immunotolerance, and human iPS cell-derived cardiomyocytes (hiPS-CMs). First, we established a differentiation induction method for hiPS-MSCs and confirmed their immunosuppressive effects in vitro. Furthermore, in vivo, prolonged engraftment of subcutaneously transplanted hiPS-CMs was demonstrated, indicating the possibility of immunomodulation by co-transplantation.

研究分野：再生医療

キーワード：細胞移植 免疫制御 iPS細胞由来間葉系幹細胞 iPS細胞由来心筋細胞 他家移植

### 1. 研究開始当初の背景

重症心不全においては、細胞移植による心筋再生医療への期待が大きい。代表者らが所属するグループは、重症心不全症に対して、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞移植治療法を開発し、大小動物実験等で有効性、安全性の検証を経て、2020年1月に虚血性心筋症患者を対象とした医師主導治験（第1例目の被験者に iPS 心筋シート移植）を実施した(1)。当該治験で用いている同種他家 iPS 細胞は、自家 iPS 細胞に比べて即時性・安全性・費用面で利点があるが、免疫抑制剤の投与が必要である。当科では、心臓移植で用いられる免疫抑制剤プロトコルを元に各種動物を用いて iPS 心筋シート移植に適した免疫抑制剤プロトコルを構築し、臨床応用している。しかしながら、免疫抑制剤は腎不全、悪性腫瘍などの副作用を引き起こす可能性があり、かつ感染症対策が世界的・将来的にこれまで以上に重要性を増すことが予想される状況下で、長期にわたる免疫抑制剤の服用は、患者の QOL を著しく低下させる。よって、細胞移植治療の現実的な有効性をより高めるために、同種移植でかつ免疫抑制剤を使用しない治療法の開発が望まれている。

間葉系幹細胞(MSC)は免疫寛容能をもち、様々な細胞治療への応用が報告されている。これまでに代表者らが所属する研究グループは、マウスを用いて、マウス由来 iPS 細胞由来心筋細胞(miPS-CM)とマウス由来 MSC を同時移植することにより、免疫寛容性獲得に重要な Treg が誘導され、移植された miPS-CM の生存率を高めることを明らかにした(2)。また、MSC を同時移植すると、移植された miPS-CM の成熟性が増し、心機能改善効果を高める可能性があることも示した(3)。すなわち、MSC 共移植により、免疫寛容に加えて iPS 心筋細胞の成熟性促進という2つの効果が期待できる(図1)。

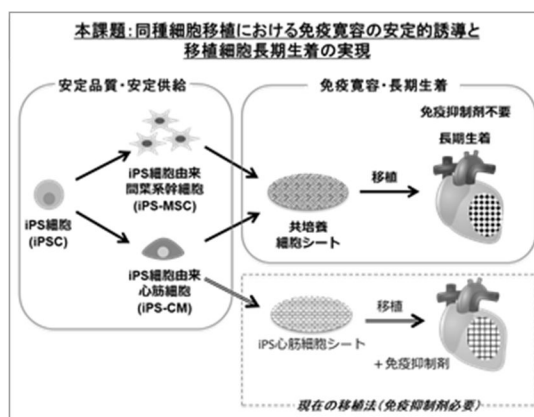


図1. 本研究のスキーム

- (1) Miyagawa S. et al. Front Cardiovasc Med 2022;9:950829
- (2) Yoshida S. et, al. Sci Rep. 2020;10(1):4593
- (3) Yoshida S. et, al. Mol Ther. 2018;26(11):2681

### 2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞由来間葉系幹細胞 (hiPS-MSC) とヒト iPS 細胞由来心筋細胞(hiPS-CMs)を共移植することにより、免疫抑制剤を用いず、移植細胞の長期生着を可能とし、心機能と QOL のより効率的な改善をもたらす移植法を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト iPS 細胞株からの MSC 分化誘導法の確立

臨床応用を見据えて、ヒト iPS 細胞株より、MSC への分化誘導の最適化を行う。分化誘導薬剤の選択、濃度と反応時間を検討し、作製した iPS 細胞由来間葉系幹細胞(hiPS-MSC)を、典型的な MSC マーカーを用いて評価する。

#### (2) hiPS-MSC の免疫抑制能の in vitro での評価

MSC は炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-12 の分泌抑制と、免疫抑制性サイトカインである IL-10 の分泌の促進、Th1, NK 細胞の IFN- $\gamma$  の分泌抑制による graft-versus host disease (GVHD) 制御、Treg の誘導などにより免疫反応を抑制することが報告されている。そこで、hiPS-MSC も同様の免疫制御作用を有するかについて、in vitro で T 細胞活性化アッセイにて評価する。具体的には、Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) でラベルした健常人ドナー由来の T リンパ球を共刺激用抗体 (抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体) で共刺激し、hiPS-MSC と混合培養を行って T リンパ球の増殖を評価する。

#### (3) hiPS-MSC の免疫抑制能の in vivo での評価

MHC ダブルノックアウト NOG マウスに、ヒト末梢血単核球 (PBMC) を尾静脈投与により移

植して免疫系ヒト化マウスを作製する。

作製したヒト化マウスの皮下に hiPS-CMs のみ、もしくは hiMSC と hiPS-CMs を同時移植する。hiPS-CMs のみに比べて hiPS-MSC と同時移植する事により、免疫拒絶反応が抑制されているかを検証するため、移植後の皮下組織での hiPS-CMs の生着率を組織化学的に評価する。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト iPS 細胞株からの MSC 分化誘導法の確立と特性評価

iPS 細胞から MSC への分化誘導方法は複数報告されているが、bFGF 依存性分化誘導法によりヒト iPS 細胞由来間葉系幹細胞 (hiPS-MSC) を作製する方法を用いた(図 2)。

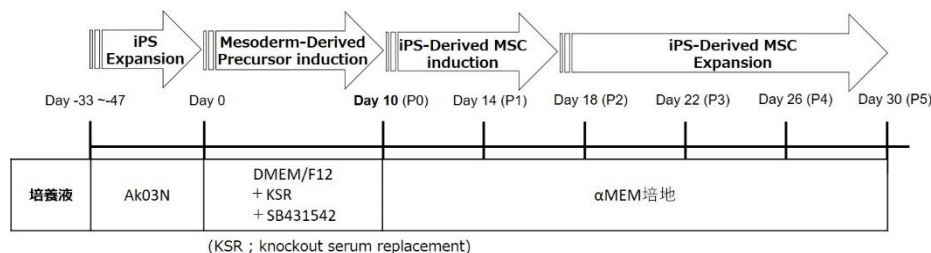


図 2 . hiPS-MSC の分化誘導法

作製した hiPS-MSC は、CD73、CD90、CD105、CD29、CD44、CD146 などの典型的な MSC の細胞表面マーカーを発現しており、マクロファージおよび単球マーカーの CD11b および CD14、造血マーカー CD45 および CD34 は発現していないことが確認された。また、骨芽細胞・軟骨細胞・脂肪細胞の 3 系統への分化能も有していることが示された。さらに、サイトカインアレイを用いてサイトカイン分泌能の評価を行った。その結果、Angiopoietin-1, 2、bFGF、VEGF などの血管新生を促進するサイトカインの分泌が確認できた。以上から MSC への分化誘導法が確立できた。

##### (2) iMSC の免疫抑制能の in vitro での評価

in vitro の系で hiPS-MSC の免疫制御作用の評価として、T 細胞活性化と細胞傷害性を測定した。前者は、CFSE で標識した健常人ドナー由来 T リンパ球を抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体で共刺激し、positive control である骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC) もしくは hiPS-MSC と混合比率を変えて培養した。その結果、BM-MSC と同様に、共培養する hiPS-MSC の容量依存的に T リンパ球の増殖が抑制された。細胞傷害性は、NK 細胞 (Effector 細胞) と CellTrace Violet 染色した K562 細胞 (標的細胞) BM-MSC もしくは hiPS-MSC を混合培養し、標的細胞の細胞死を評価した。BM-MSC と同様に hiPS-MSC は Effector 細胞による標的細胞への細胞障害性を抑制することが示された。

##### (3) in vivo での免疫抑制能の評価

in vivo では、他家移植による免疫拒絶反応の抑制を評価した。具体的には、ヒト末梢血単核球を投与しても GVHD が起きにくいとされる MHC class I/II-deficient NOG マウス (NOG-dKO) を用いて免疫系ヒト化マウスを作製し、iPS 細胞由来心筋細胞のみの皮下移植に比べて hiPS-MSC と同時移植により免疫拒絶反応が抑制され、移植片の生着が延長するかを検証する。

まず、他科移植を評価出来る免疫系ヒト化マウスの作製を行い、NOG マウスにヒト由来 PBMC を尾静脈から投与した。ヒトの他家由来細胞に対して十分な免疫応答感受性を持つようなモデルを作製するため、投与するヒト由来 PBMC への刺激や投与量について組織化学的に検討したが、最適化が終了しておらず、本測定に十分なヒト化マウスモデルの作製に至っていない。

そこで、並行して免疫が正常な Lewis ラットを用いて同様の細胞移植を行い、組織化学的評価を行った。その結果、iPS 細胞由来心筋細胞 (hiPS-CMs) のみの皮下移植に比べて、hiPS-MSC と同時移植した群において、移植片の生着の延長が見られた。

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
研究分担者	伊東 絵望子  (Ito Emiko)  (80595629)	大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員    (14401)	

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