

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20933

研究課題名（和文）自己免疫性下垂体疾患の発症メカニズム解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenic mechanism of autoimmune pituitary diseases

研究代表者

蟹江 慶太郎（KANIE, Keitaro）

京都大学・iPS細胞研究所・研究員

研究者番号：90905829

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：自己免疫性下垂体疾患の一つである自己免疫性下垂体炎は、その発症に特異的なキラーT細胞の関与が示唆されているが、特異的抗原の同定が困難であり、患者固有のHLAを持つヒト下垂体を用いた疾患モデルが必要であることから解析が困難であった。本研究では、自己免疫性下垂体炎の患者由来iPS細胞を利用した疾患モデルを作成し、自己免疫性下垂体疾患の発症メカニズムを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一部の自己免疫疾患では、その発症に特異的なキラーT細胞の関与が示唆されているが、特異的抗原の同定および病原性キラーT細胞の単離は困難であった。本研究では、患者末梢血液より病原性をもつキラーT細胞を単離する方法を開発し、自己免疫性下垂体炎の患者由来iPS細胞を利用した疾患モデルを作成した。

研究成果の概要（英文）：Few models using induced pluripotent stem cells (iPSCs) have been reported for autoimmune diseases. Anti-pituitary-specific transcription factor (PIT)-1 hypophysitis is caused by autoimmunity against PIT-1-expressing anterior pituitary cells, and cytotoxic T cells (CTLs) play an essential role in the disease. Using tissues expressing the same human leukocyte antigen (HLA) is essential for establishing a T cell-mediated autoimmune disease model; therefore, we used patient-derived iPSCs. First, we cloned PIT-1-specific CTLs and determined the set of epitopes and T cell receptors. Then we analyzed the cytotoxicity of the iPSC-derived pituitary cells in co-culture with CTLs. Activation of CTLs and PIT-1-positive cell-specific cytotoxicity were observed only in co-culture of iPSC-derived pituitary cells and PIT-1-specific CTLs. Furthermore, we determined specific T cell receptors and HLA haplotypes. Specific cytotoxicity was inhibited by immunosuppressive agents.

研究分野：自己免疫性下垂体疾患

キーワード：iPS細胞 下垂体機能低下症 自己免疫疾患 自己免疫性下垂体疾患 自己免疫性下垂体炎 キラーT細胞 細胞傷害性T細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

内分泌疾患である「下垂体機能低下症」は、医療費助成対象の指定難病であり、QOLの低下と生命予後の悪化を引き起こすことが知られている。

申請者は、これまで下垂体機能低下症をきたす自己免疫性下垂体疾患である抗PIT-1下垂体炎の病態を明らかにしてきた (*J Clin Endocrinol Metab* 2014、*Endocr Rev* 2020)。本疾患は下垂体にT細胞浸潤を認めるためキラーT細胞による細胞性免疫の関与が示唆された。一方で、全集積症例に高力価の自己抗体(抗PIT-1抗体)を認め、液性免疫の関与も示唆されたが、補体依存性細胞傷害活性(CDC)あるいは抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)の病態への関与は未解明のままであった。さらに、他の自己免疫性下垂体疾患(IgG4関連下垂体炎、ACTH単独欠損症あるいは免疫チェックポイント阻害薬(ICI)関連下垂体炎)においても細胞浸潤や疾患特異的自己抗体の存在が認められたが、これらの病態への関与は未だ明らかではなかった。

研究課題の核心をなす学術的「問い」は、「自己免疫性下垂体炎の発症にはどのような免疫機構の変調が関わるのか」とした。

2. 研究の目的

自己免疫性下垂体疾患の適切な疾患モデルが存在しないことから病態解明は進んでこなかった。疾患モデル作成における障壁として以下の理由が挙げられた。

- ・キラーT細胞による細胞傷害はHLAに拘束される
- ・ヒトとマウスでは免疫機構が異なり、マウス免疫では病態再現が出来ない

患者iPS細胞を利用した疾患モデルの作成は、これらの問題を解決する解析ツールとして非常に有効である。従って、自己免疫性下垂体炎の患者由来iPS細胞を利用した疾患モデルを作成し、細胞性免疫あるいは液性免疫の細胞傷害への関与を明らかにし、アンメット・メディカル・ニーズの高い自己免疫性下垂体疾患の発症メカニズムを解明することを本研究での目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、(1)患者iPS細胞から下垂体の作成、(2)患者由来PIT-1特異的キラーT細胞の単離及び、下垂体との共培養を用いた*in vitro*モデル作成、(3)下垂体と患者血清、末梢血液単核球細胞(PBMC)を用いたCDC活性、ADCC活性の評価の3ステップで実施した(図1)。

(1) 患者iPS細胞から下垂体の作成

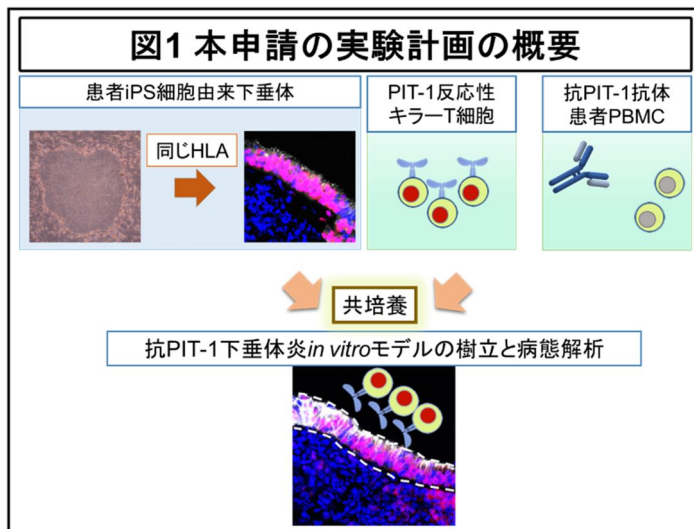
既に稼働しているiPS細胞からの下垂体分化手法を用いて、患者iPS細胞由来下垂体(iPSC下垂体)を作成した。健常対照として201B7株、HC06株等の複数株を用いた。

(2) 患者由来PIT-1特異的キラーT細胞の単離およびiPSC下垂体との共培養を用いた*in vitro*モデル作成

患者PBMCに対し、全長PIT-1タンパクをカバーする10アミノ酸毎のペプチドを作成し、個別に添加して活性化するキラーT細胞を分取した。予備実験により特異的ペプチドを同定し、その特異的T細胞の活性化(4-1BB発現)、細胞傷害性(CD107a発現)を確認していた。*in vitro*疾患モデルを用いて、フローサイトメトリー、qRT-PCRによるキラーT細胞の特異的細胞傷害性、免疫染色法によるiPSC下垂体における特異的アポトーシスおよびキラーT細胞浸潤を評価した。

(3) 下垂体と患者血清、PBMCを用いたCDC活性、ADCC活性の評価

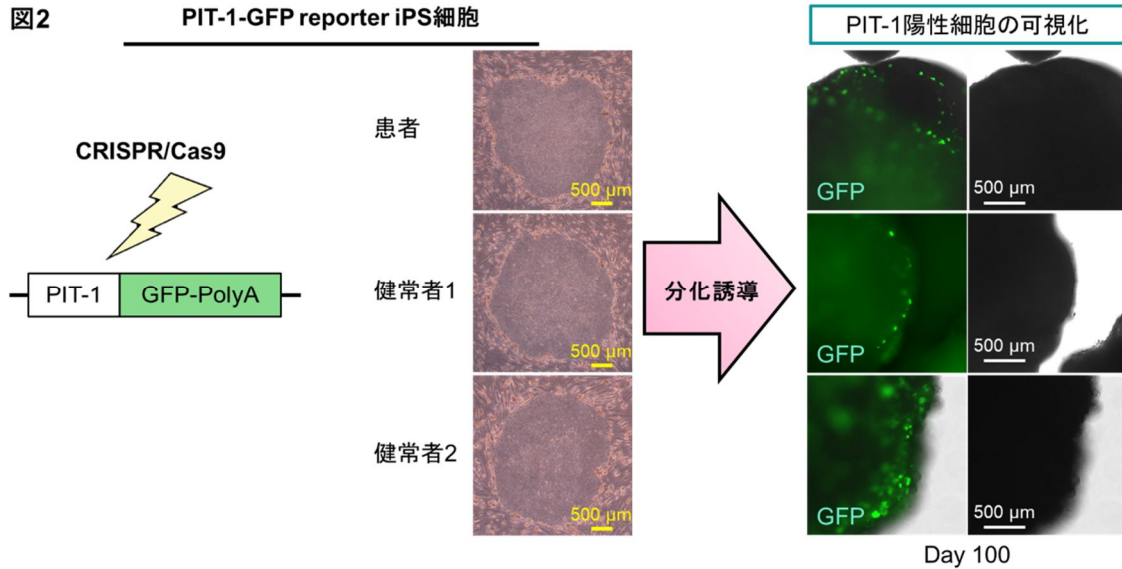
iPSC下垂体に対して、患者PBMCおよび患者血清の添加によるADCC活性をフローサイトメトリーによる、PIT-1陽性細胞あたりのアポトーシス細胞率により評価した。またiPSC下垂体に対する患者血清の添加によるCDC活性の評価を同アッセイにより行った。



4. 研究成果

(1) 患者 iPS 細胞から下垂体の作成

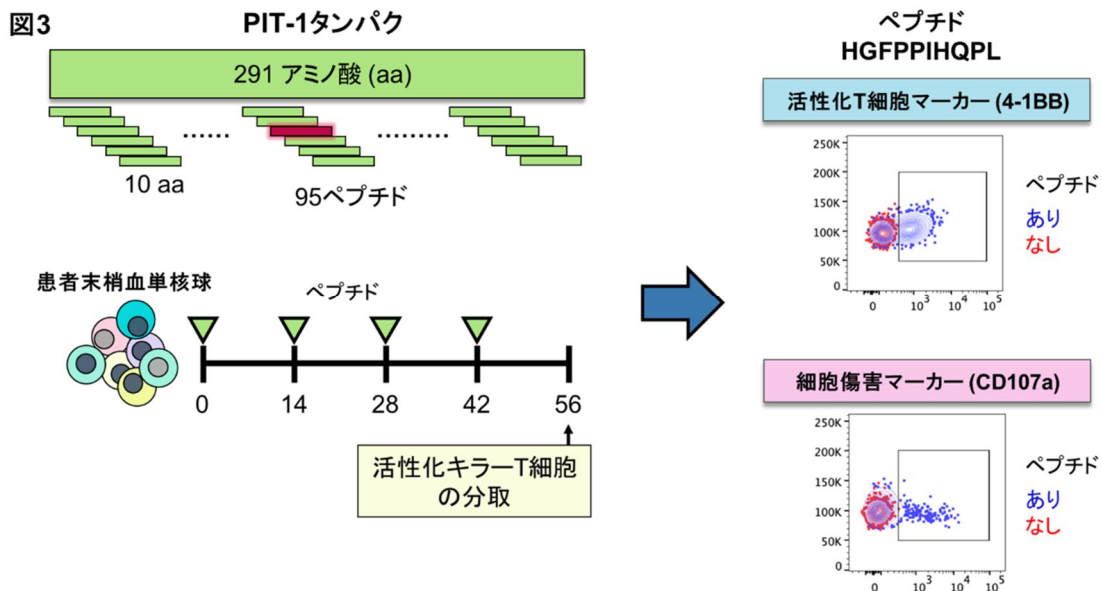
患者および健常人末梢血中の単球からそれぞれ iPS 細胞を樹立し、立体浮遊培養法によって凝集体とし、下垂体細胞へと分化誘導を行った。分化 40 日目には LHX3 陽性下垂体前駆細胞が出現し、さらに長期間の培養によって PIT-1 陽性細胞へ分化誘導された。また、各 iPS 細胞に対して CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子編集を行い、PIT-1-GFP reporter iPS 細胞を作製し、PIT-1 陽性細胞の可視化を行った (図 2)。



(2) 患者由来 PIT-1 特異的キラーT 細胞の単離および iPSC 下垂体との共培養を用いた *in vitro* モデル作成

患者由来 PIT-1 特異的キラーT 細胞の単離

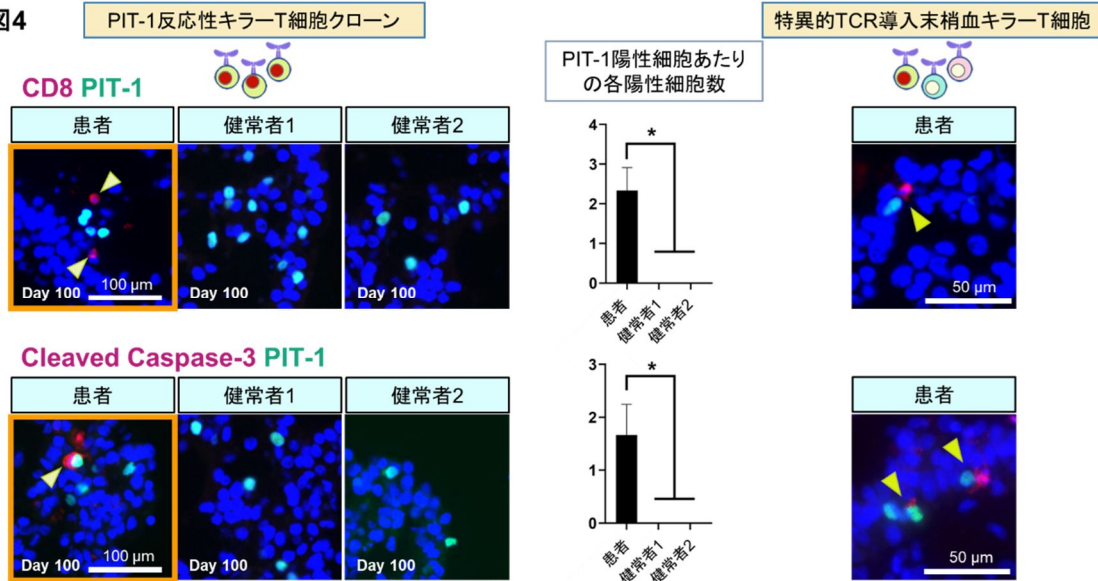
PIT-1 タンパクに対するキラーT 細胞の反応部位が不明であったため、291 アミノ酸残基全長をカバーする、10 アミノ酸ずつのペプチドを 95 個作成した。これらを個別に、患者末梢血単核球に添加して、活性化する CTL を分取した。長期培養において添加するサイトカインは様々検討したのち、ヒト IL-2 単独とした。最終的にペプチド HGFPPHQPL でのみ、キラーT 細胞の特異的活性化・細胞傷害性が認められ、他の 94 ペプチドでは特異的活性化・細胞傷害性を認めなかった (図 3)。



iPSC 下垂体との共培養を用いた *in vitro* モデル作成

患者および健常人の iPSC 下垂体と、PIT-1 反応性 CTL クローンの共培養実験を行ったところ、患者下垂体との共培養においてキラーT 細胞は特異的に活性化することが明らかとなった。共培養実験後の下垂体の免疫染色では、患者 iPSC 下垂体において、CD8 陽性キラーT 細胞が PIT-1 陽性細胞周囲に浸潤していた。また、患者 iPSC 下垂体では Cleaved caspase3 と PIT-1 の二重陽性細胞が特異的にみられ、患者 iPSC 下垂体に特異的な PIT-1 陽性細胞のアポトーシスが明らかとなった。キラーT 細胞による自己免疫疾患モデル樹立と考えられた (図 4)。

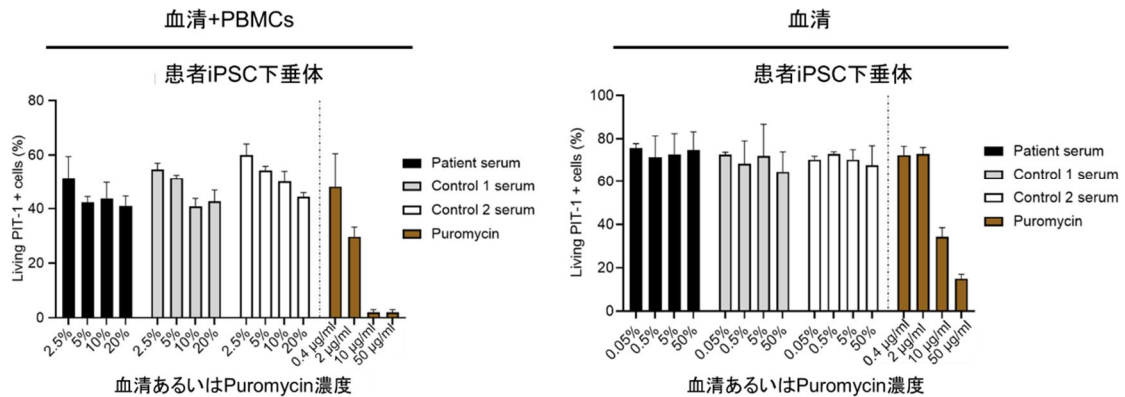
図4



(3) 下垂体と患者血清、PBMC を用いた CDC 活性、ADCC 活性の評価

患者および健常人の iPSC 下垂体に対して、患者血清を添加することによる CDC 活性の評価、および患者血清と患者 PBMC を添加することによる ADCC 活性の評価を行った。(2)の実験と同様に 48 時間のインキュベーションを行い、下垂体細胞の死細胞率をフローサイトメーターにより評価したが、患者および健常人の iPSC 下垂体において CDC 活性、ADCC 活性は示されなかった (図 5)。

図5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Bando Hironori, Kanie Keitaro, Takahashi Yutaka | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Paraneoplastic autoimmune hypophysitis: An emerging concept | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism | 6. 最初と最後の頁 101601 ~ 101601 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.beem.2021.101601 | 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 Kanie Keitaro, Iguchi Genzo, Bando Hironori, Urai Shin, Shichi Hiroki, Fujita Yasunori, Matsumoto Ryusaku, Suda Kentaro, Yamamoto Masaaki, Fukuoka Hidenori, Ogawa Wataru, Takahashi Yutaka | 4. 巻 70 |
| 2. 論文標題 Mechanistic insights into immune checkpoint inhibitor-related hypophysitis: a form of paraneoplastic syndrome | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy | 6. 最初と最後の頁 3669 ~ 3677 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-021-02955-y | 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9件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 蟹江慶太郎、井口元三、伊藤剛、喜多山秀一、六車恵子、浦井伸、坂東弘教、松本隆作、山本雅昭、福岡秀規、金子新、小川渉、高橋裕 |
| 2. 発表標題 疾患iPS細胞/抗原特異的T細胞を用いた抗PIT-1下垂体炎疾患モデルの樹立 |
| 3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 蟹江慶太郎、井口元三、浦井伸、藤田泰功、坂東弘教、山本雅昭、福岡秀規、小川渉、高橋裕 |
| 2. 発表標題 自己免疫性溶血性貧血を伴った悪性胸腺腫合併抗PIT-1下垂体炎の1例 |
| 3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 蟹江慶太郎、井口元三、伊藤剛、喜多山秀一、六車恵子、浦井伸、坂東弘教、松本隆作、山本雅昭、福岡秀規、金子新、小川渉、高橋裕 |
| 2. 発表標題 疾患iPS細胞を用いた自己免疫性下垂体疾患のin vitro疾患モデルの樹立 |
| 3. 学会等名 第47回日本神経内分泌学会学術総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 浦井 伸、大井 佑夏、蟹江 慶太郎、山本 雅昭、坂東 弘教、山本 直希、鈴木 正暉、志智 大城、福岡 秀規、井口 元三、小川 渉 |
| 2. 発表標題 重症筋無力症を合併した抗PIT-1下垂体炎の新規症例 |
| 3. 学会等名 第32回一般社団法人日本間脳下垂体腫瘍学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大井佑夏、山本雅昭、浦井伸、坂東弘教、稲葉惟子、蟹江慶太郎、井口元三、福岡秀規、小川渉 |
| 2. 発表標題 胸腺腫術後に重症筋無力症を発症した抗PIT-1下垂体炎の1例 |
| 3. 学会等名 第31回臨床内分泌代謝Update |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大井佑夏、山本雅昭、浦井伸、坂東弘教、稲葉惟子、蟹江慶太郎、井口元三、福岡秀規、小川渉 |
| 2. 発表標題 重症筋無力症を合併した抗PIT-1下垂体炎の1例 |
| 3. 学会等名 第22回日本内分泌学会近畿支部学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 蟹江慶太郎、井口元三、浦井伸、高橋裕 |
| 2. 発表標題 疾患iPS細胞を用いた自己免疫性下垂体疾患のin vitro疾患モデル樹立 |
| 3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 蟹江慶太郎、伊藤剛、井口元三、六車恵子、浦井伸、坂東弘教、松本隆作、山本雅昭、福岡秀規、金子新、小川渉、高橋裕 |
| 2. 発表標題 疾患iPS細胞を用いた自己免疫性下垂体疾患のin vitro疾患モデル樹立と進展防止のための創薬への応用 |
| 3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 蟹江慶太郎、伊藤剛、井口元三、松本隆作、浦井伸、坂東弘教、山本雅昭、福岡秀規、小川渉、金子新、高橋裕 |
| 2. 発表標題 疾患iPS細胞を用いた自己免疫性下垂体疾患のin vitro疾患モデル樹立と進展防止のための創薬への応用 |
| 3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 松本隆作，蟹江慶太郎，坂東弘教，山本拓也，高橋裕 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 (有)科学評論社 | 5. 総ページ数 7 |
| 3. 書名 糖尿病・内分泌代謝科 | |

〔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 |
|---------|---------|