

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659324

研究課題名(和文) 分化異常に関わる環境要因解析法の開発

研究課題名(英文) Development of new protective method against environmental factors.

研究代表者

藤田 博美 (Fujita, Hiroyoshi)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60142931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：免疫不全マウスにreMAIT細胞を移入した動物実験系の作製に成功した。この系を用いて非定型抗酸菌の感染実験を行った。その結果、reMAIT細胞移入により肝臓、脾臓に分布する抗酸菌数が著減していた。さらに、実験動物血液中にヒトに存在するがマウスには存在しないグランジュリンが著増しており、本因子が細菌壁を攻撃して抗細菌活性を發揮し、静菌したこと、即ち新たな多剤耐性菌治療法が可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated anti-mycobacterial activity of human reMAIT cells. Immunocompromised mice received human reMAIT cells could resist against *M. abscessus* infection. reMAIT cells transferred mice demonstrated marked expression of granulysin whose gene was absent in mice, indicating that human reMAIT cells killed mycobacteria through granulysin. Hereby, a novel method against infectious diseases is demonstrated.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：MAIT細胞 iPS化 多剤耐性菌対策 細胞治療 抗菌活性 抗酸菌

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 環境因子の変遷

様々な環境因子による汚染がヒトの疾病を引き起こしてきたことは良く知られている。それらの環境因子の中で、かつては人類生存に致命的な影響を持っていたが、ここ半世紀以上にわたって克服されつつあり、またまもなく克服されると楽観されてきたものが細菌である。

長い間、人類存続に対する最大の危険因子であった感染症は抗生物質の発見により、次々と制圧されてきたように見えた。しかし、抗生物質の開発は即座に耐性菌の発生に繋がりが、融ごっこを続けてきた。

Lancet Infectious Diseases (2013年11月号) に特集されたように、この融ごっこの不幸なゴールが見え始めるようになってきた。主な理由は二つある。第一は三種類に分類される抗生物質の開発の限界が近づいてきたこと、第二に薬剤耐性遺伝子のトランスポゾン化が進んできていること、である。しかも、従来非病原性とされてきた菌による日和見感染も問題となってきた。

本年4月30日、世界114ヶ国における感染症情報に基づいた報告書「WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health」が世界保健機構からリリースされた。本報告書では、耐性菌問題の深刻化が国際的に警告されている。

### (2) 復活する環境要因 = 細菌をどう予防するか?

抗生物質に頼り過ぎたために引き起こされた感染症の復活をどう予防するかは社会医学的に重要な問題と考えられる。従来型の予防法の多くは、体内への進入を防ぐことであった。しかしながら、細菌の体内進入を完全に防ぐことは不可能である。

細菌の体内進入を前提とすれば、増殖を抑制することによる発症を予防する新たな方法を考えなければならない。

### (3) 粘膜関連インバリアント T 細胞 (MAIT 細胞) とは

我々は自然免疫系細胞であり感染防御との関連が想定されている MAIT 細胞に着目した。20年あまり前に発見された本細胞は、例えば肝臓内の T 細胞の 50% に達することもあるほどヒトでは豊富に存在する。しかしながら、試験管内での増殖が不可能なため in vitro での解析が遅れてきた。同時に、マウスには殆ど存在しないので in vivo での研究も極めて困難である。

そこで、我々はヒト幹細胞あるいは iPS 細胞からの MAIT 細胞誘導を検討することとした。iPS 細胞の利点は個々人の細胞から作製することが可能であり、拒絶反応を考慮する必要がないことである。一方で、ガン遺伝子を含む山中因子の導入により作製される

iPS 細胞は、ゲノム遺伝子の修飾を伴った場合、**ガン化の可能性**を完全に否定することが出来ない。

### (4) 理論的にガン化の可能性を否定できる iPS 細胞とは

この iPS 細胞の短所を避けるために、我々は産総研筑波中西研究室からセンダイウイルス由来ベクターの提供を受け実験に用いることとした。

センダイウイルスは核に移行しないためゲノムを修飾せず、従って原理的にガン化の恐れは否定できるので、このベクターを利用した iPS 細胞が樹立できれば優位性を持つことは、云うまでもない。

### (5) ゲノム修飾のない iPS 細胞の構築

3種類のヒト臍帯血から MAIT 細胞を精製し、この細胞にセンダイウイルス由来で原理的に発がん性が否定されるベクター KOSM を用いて山中因子を導入し iPS 化を試みたところ、極めて効率の良い iPS 化が観察され、処理後 22 日にはヒト幹細胞と極めて類似したコロニーが出現した。

### (6) iPS 細胞から reMAIT 細胞経の分化誘導の試み

この iPS 細胞からリンパ球前駆細胞への分化誘導を経由し、OP9/DL1 上で培養することにより、30 日で 98% が reMAIT 細胞へと分化した。分化に伴う表面抗原の変化を FACS 解析した結果、多くは末梢型 MAIT 細胞と類似する発現パターンを示したが、一部は全く異なりナイーブ型の性格を示した。

また、reMAIT 細胞の分化に伴う遺伝子発現パターンの解析を進めたところ、末梢 MAIT 細胞との相関係数が 0 日目の 0.807 から 30 日目の 0.918 へと、明確に類似していることが示された。こうした分化に伴ってサイトカイン類の分泌能力が亢進した。これらのことから、reMAIT 細胞は試験管内で生体内とほぼ同じ分化をすることが確認された。

### (7) 生体内に移入された reMAIT 細胞の動態

reMAIT 細胞を細胞治療に応用するためには、生体内で正常な分布と分化を示すことを確認する必要がある。そこで、免疫不全マウスへの reMAIT 細胞移入実験を行った。その結果、肝臓や脾臓など予測された臓器への移行と分化が示された。

以上のことで細菌という外的因子に生物がどのように応答するかの検索を行う基礎が整った。

## 2. 研究の目的

### (1) 多剤耐性菌問題

我々が特定の遺伝子を導入した大腸菌を選ぶとき、特定の遺伝子とともにベクターに特定の抗生物質への耐性遺伝子を導入し、そ

の薬剤耐性をマーカーとして、特定の抗生物質を含む栄養豊富な培地上に37度で孵置し、必要な遺伝子を持っている大腸菌候補を選択していく。この過程を「セレクションをかける」と表現する。

抗生物質の発見以来、人間が行ってきたのは栄養豊富な血液中に各種抗生物質を添加し、37度で孵置、生き残る能力を持つ細菌をセレクションし続けてきたと表現できよう。結果、様々な薬剤に耐性をもつ細菌が選り出され、その薬剤耐性遺伝子がトランスポゾン化して細菌間を移動できる能力を獲得するという状態が生まれた。

抗生物質の候補開発が既に限界になった以上、抗生物質による静菌の可能性は低下を続けることになる。

(2) 社会医学/衛生学は感染症にどう立ち向かってきたか？

世界初の衛生学講座を創始したミュンヘン大学のペッテンコッフは、下水道の普及により原因不明のコレラの流行を食い止めた。ベルリン大学衛生学講座を創設したコッホはコレラ菌、結核菌等を発見し、感染防御への道を拓こうとした。

コッホの弟子、北里柴三郎、ベーリングは破傷風やジフテリアの抗血清療法を開発した。コッホもツベルクリンを開発し、ヒト固有の免疫系を利用した結核菌の静菌を目指したが、科学知識の限界のため失敗した。この、コッホの挑戦に現代科学を武器に再び取り組むとどうなるか、興味深い。

そこで、結核菌を含む細菌感染の防御に働いていると想定されている、MAIT細胞が、実際に抗菌活性を発揮するか否かを明らかとし、進んで細胞予防法の開発の試みを行うこととした。

### 3. 研究の方法

reMAIT細胞が感染防御に機能するかどうかを明らかにする。そのためにreMAIT細胞を移入した動物実験系を確立する。

### 4. 研究成果

#### (1) 動物実験系の確立

reMAIT細胞を移入した動物実験系を、免疫不全マウスを用いて確立した。

(2) 生体内に移入されたreMAIT細胞の作用

非定形抗酸菌の感染実験を免疫不全マウスでおこなった。reMAIT細胞を移入した動物では、移入を受けていない動物に比し肝臓、脾臓の細菌数が著明に減少していた。

さらにreMAIT細胞移入マウスでは血液中にグラニューライシンが増加していることが観察された。グラニューライシン遺伝子はマウスには存在しないので、観察されたグラニューライシンが移入されたヒトreMAIT細胞において産生されたものである。

グラニューライシンは細菌膜を攻撃して抗菌活性を発揮することが知られている。従って、reMAIT細胞は免疫不全マウス体内において、グラニューライシンを産生、分泌し抗酸菌膜を攻撃することで静菌していると考えられる。

この抗菌作用は、従来の抗生物質の作用機序とは全く異なっており、多剤耐性菌時代の新たな細胞治療開発への一歩となると期待される。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

H Wakao, K Yoshikiyo, U Koshimizu, T Furukawa, K Enomoto, T Matsunaga, T Tanaka, Y Yasutomi, T Yamada, H Minakami, J Tanaka, A Oda, T Sasaki, R Wakao, O Lantz, T Udagawa, Y Sekiya, K Higuchi, N Harada, K Nishimura, M Ohtaka, M Nakanishi and H Fujita: Expansion of functional human Mucosal-Associated Invariant T Cells via reprogramming to pluripotency and redifferentiation. Cell Stem Cell, 12:546-558, 2013. (査読有)

H Wakao and H Fujita: Toward the realization of cell therapy; the advent of MAIT cells from iPSCs. Cell Cycle, 12:2341-2342, 2013. (査読有)

藤田博美: 衛生学の見た夢. 北海道医学雑誌, 87: 173-174, 2012. (査読有)

[学会発表](計 5件)

H Wakao, K Yoshikiyo, U Koshimizu, K Enomoto, T Tanaka, Y Yasutomi, H Fujita: The advent of mucosal-associated invariant T (MAIT) cells from iPSCs opens a novel avenue for immunology. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Milan, Italy, Aug. 22-27, 2013.

若尾宏、藤田博美: ガン化のおそれのないiPS細胞の開発. 第83回日本衛生学会学術総会. 金沢2013年3月24日~26日.

[図書](計 0件)

[産業財産権]  
出願状況(計 2件)

名称: MAIT様細胞およびその作成方法  
発明者: 若尾宏, 小清水右一, 吉清和則, 藤田博美  
権利者: 同上

種類：特許  
番号：特願 2012-239195  
出願年月日：2012 年 10 月 30 日  
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
北大プレスリリース  
[http://www.hokudai.ac.jp/news/130322\\_pr\\_med.pdf](http://www.hokudai.ac.jp/news/130322_pr_med.pdf)  
ガン化のおそれの無いヒト iPS 細胞作製と、  
これら細胞から抗菌活性を有する白血球の  
開発に初めて成功ー細胞予防医学へー

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤田 博美 (FUJITA, Hiroyoshi)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：60142931

##### (2) 研究分担者

若尾 宏 (WAKAO, Hiroshi)  
北海道大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：30360671

小田 淳 (ODA, Atsushi)  
北海道大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：50255436

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：