

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293357

研究課題名(和文)人工多能性幹細胞(iPS細胞)由来網膜色素上皮細胞の免疫原性解析

研究課題名(英文)Immunogenicity of iPS-derived retinal pigment epithelial (RPE) cells

研究代表者

杉田 直(Sugita, Sunao)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・副プロジェクトリーダー

研究者番号：10299456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：サルiPS-RPEを他家移植(MHC一致 vs不一致)で網膜下に移植した。RPE他家移植in vivoモデルでは、免疫系の細胞がMHCの型が合わないRPEを認識、逆に合うRPEは認識せずに拒絶が見られずにグラフトは生着していた。In vitroの試験ではヒト末梢血細胞を用いてHLAホモiPS-RPE細胞と共培養し、末梢血単核球の活性化を見た。In vivoの結果と同様にHLAが合うPBMCやT細胞はHLAホモiPS-RPE細胞に対してその反応が弱かった、一方、HLAが合わないRPE細胞は逆に活性化が見られていた。これらの結果はStem Cell Reportsで2報同時に掲載された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated experimentally that immune responses can be avoided when retinal pigment epithelial (RPE) cells generated from iPSCs derived from a MHC/HLA homozygous donor are matched with MHC/HLA of recipient. Our research team developed an in vivo experimental method in a primate model, in which they transplanted RPE cells derived from iPSCs from a MHC homozygote monkey into a different monkey (MHC-matched), and an in vitro experimental system using RPE cells derived from human iPSCs and co-cultured them with human immune cells. In vivo data, no signs of immune rejection were observed in recipients of MHC-matched grafts, and the sheet grafts survived for at least six months post-transplantation. Similarly, the matching of at least three HLA gene loci (HLA-A, HLA-B, and HLA-DRB1) between iPSCs-derived RPE cells and the donor immune cells was sufficient for preventing the trigger of an immune response in vitro. Our study was published in two separate papers in Stem Cell Reports.

研究分野：眼免疫

キーワード：iPS細胞 網膜色素上皮細胞 MHC抗原 移植 拒絶反応

1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、多種類の細胞・組織に分化する事が可能な細胞として注目され、現在様々な再生医療のための基礎研究およびヒト臨床試験が取り組まれ始めている。我々の研究所では、ヒト iPS 細胞由来の網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium: RPE) の分化誘導に成功し、早ければ来年にも加齢性黄斑変性患者に iPS 細胞由来 RPE シートが投与される計画がある。この RPE シートの品質規格試験や安全性試験は多数の項目で行われ、これらに関して問題はないと考えられているが、その免疫原性、例えば、投与後の RPE シートの生着の有無とその拒絶反応に関してはまだ研究が行われていない。最近、マウス iPS 細胞を皮膚下に移植すると自家移植にも関わらず拒絶反応が起こる事が報告された (Zhao et al, Nature 474; 212-215; 2011)。同様の移植方法でマウス胚性幹細胞 (embryonic stem cells: ES 細胞) では拒絶反応が起こらない事から iPS 細胞は免疫原性が高い細胞である可能性が示されている。一方、眼に存在する特殊な免疫抑制機構 (眼の免疫寛容: ocular immune privilege) の中心を担う RPE 細胞は強い免疫学的抑制機能を有する事がわかっている。この RPE シートの移植場所は網膜下 (sub-retinal space) で immune privilege site として知られている。

2. 研究の目的

本研究では、iPS 細胞由来 RPE 細胞を用いて、その抑制能力をより詳細に解析し (抑制分子同定まで) また投与後の生着とその拒絶反応に関して詳細に解明する事を最終目標とする。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞およびマウス

iPS 細胞由来 RPE 細胞を分化誘導し、品質規格試験を行う。ヒト iPS 細胞に関しては、バクター残存試験 (定性・定量 PCR)、未分化マーカー確認試験 (免疫染色) を行う。ヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞に関しては、RPE 外観 (形態、色調) RPE 特異的遺伝子発現 (RT-PCR) RPE 純度試験 (免疫染色) 増殖因子分泌試験 (VEGF/PEDF ELISA) 貪食試験 (蛍光顕微鏡) 経上皮電気抵抗測定などを行う。次に、その iPS 細胞由来 RPE 細胞の免疫調節作用と、T 細胞 (Th1/Th17/Th22 および CD8 など)、B 細胞、樹状細胞、マクロファージなどの免疫担当細胞の免疫調節作用を解析する。ヒトおよびマウス iPS 細胞由来 RPE が炎症細胞に対して抑制能を有するか細胞増殖試験、サイトカイン産生能などで検討する。その分子機構を明らかにして、その機能分子を遺伝子および蛋白レベルで同定する。またこれらの RPE 細胞の MHC-class I、class II、および副刺激分子 (CD80, CD86, B7-H1 など) の発現変化を炎症条件下で検討する。また、マウス、ウサギの網膜下に RPE シート投与しその拒絶反応について in vivo での観察 (カラー眼底撮影、網膜断層撮影、蛍光眼底造影撮影) また組織を回収し遺伝子分子レベルでも炎症拒絶反応があるかどうか検討する。拒絶反応試験には自家細胞 (iPS-RPE 細胞) 他家細胞 (iPS-RPE 細胞) を用意する。対照 RPE 細胞に HLA 3 座ホモドナー由来の iPS-RPE 細胞 (HLA-A, B, DR がマッチ) ES 細胞由来の RPE 細胞、胎児由来の primary RPE 細胞 (fetal RPE) およびヒト RPE 細胞株 (ARPE-19 セルライン) を使用する。また対照細胞にヒト iPS 細胞、ヒト線維芽細胞を使用する。これらの細胞を炎症下 (IFN-g 添加) で培養し、MHC-class I、class II の発現変化について検討する。また、ヒト CD4 または

CD8 陽性 T 細胞を上記 RPE 細胞と共培養してその反応について炎症サイトカイン測定にて検討する。

4 . 研究成果

ヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞 (human iPS-RPE) 、マウス iPS 細胞由来 RPE (mouse iPS-RPE) 、およびサル iPS 細胞由来 RPE (monkey iPS-RPE) を分化・誘導した。ヒト iPS 細胞および上記 3 種類の RPE のこれらの品質規格試験に特に問題は見られなかった。我々は、human iPS-RPE の T 細胞などの免疫炎症細胞の免疫調節作用を解析し、報告したが (Sugita S et al, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015) 、同様の方法を用いて、mouse iPS-RPE および monkey iPS-RPE の免疫抑制能も解析した。いずれの RPE 細胞も T 細胞、B 細胞、樹状細胞、単球、NK 細胞らの強い抑制を示した (論文投稿中) 。

また、mouse iPS-RPE および monkey iPS-RPE の免疫原性解析を行った。MHC-class I、class II、および副刺激分子 (CD80, CD86, B7-H1, B7-H3 など) の発現変化を flow cytometry で検討したところ MHC-class I の構成的な発現、class II の無発現、副刺激分子は B7-H1、B7-H3 の発現が見られていた。MHC-class II は IFN-gamma 存在下発現が見られていた (human iPS-RPE の類似の結果) 。我々は、human iPS-RPE 分化誘導方法に類似して、MHC ホモラインの monkey iPS-RPE (カニクイザル) を樹立した。その iPS-RPE の品質規格試験には PCR、flow cytometry など解析した。カニクイザル iPS-RPE の MHC 発現や typing は flow cytometry 及び遺伝子多型アレル解析で確認した。また、その iPS-RPE を他家移植 (MHC 一致 vs 不一致) で網膜下に移植して、術後 1、2、4、8 週、3 ヶ月、6 ヶ月で眼底写真、蛍光眼底撮影 (FA) 網膜断層検査 (OCT) で拒絶の有無を評価した。その結果、MHC

不一致の組み合わせでは FA でのリーク、OCT での黄斑浮腫、網膜剥離、網膜の非薄化など拒絶を示唆する所見が見られた。一方、MHC アレルサル (MHC 一致) への移植では炎症の所見はなく網膜は intact であった。これらの結果、サルの RPE 他家移植モデルでは、免疫系の細胞が MHC の型が合わない RPE を認識、逆に、合う RPE を認識しない可能性が示唆された。以上より、iPS バンクの HLA ホモ RPE ラインを他家移植で使用できる可能性があると思われた。

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)

1) Sugita S, Iwasaki Y, Makabe K, Kimura T, Futagami T, Suegami S, Takahashi M. Lack of T Cell Response to iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells from HLA Homozygous Donors. Stem Cell Reports. 2016;7:619-634. 査読有

2) Sugita S, Iwasaki Y, Makabe K, Kamao H, Mandai M, Shiina T, Ogasawara K, Hiramami Y, Kurimoto Y, Takahashi M. Successful Transplantation of Retinal Pigment Epithelial Cells from MHC Homozygote iPSCs in MHC-Matched Models. Stem Cell Reports. 2016;7:635-648. 査読有

3) Sugita S, Kamao H, Iwasaki Y, Okamoto S, Hashiguchi T, Iseki K, Hayashi N, Mandai M, Takahashi M. Inhibition of T-cell activation by retinal pigment epithelial cells derived from induced pluripotent stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015;56:1051-62. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1) 杉田 直 : 招待講演 iPS 細胞関連網

膜色素上皮移植の現状と今後の展望 第9回 Saitama Ophthalmology Free Talk Meeting 3/4/2017 ラフレ埼玉(埼玉県)

2)杉田 直:兵庫県職員薬剤師会総会総合研究会 特別講演「iPS細胞と網膜再生医療について」3/5/2016 ホテルクラウンパレス神戸(神戸市)

3)杉田 直:シンポジウム<細胞移植と免疫反応>-網膜再生移植時の拒絶反応 第15回日本再生医療学会 3/17-19/2016 グランキューブ大阪(大阪市)

4)杉田 直:シンポジウム<ぶどう膜炎におけるトランスレーショナルリサーチ>網膜色素上皮iPS細胞移植の現状 第120回日本眼科学会総会 4/7-10/2016 仙台国際会議場(仙台市)

5)杉田 直:大阪府医師会研究会 招待講演 iPS細胞関連網膜移植の現状と未来 5/18/2016 池田市医師会館(大阪府池田市)

6)杉田 直:シンポジウム iPS細胞で眼炎症性疾患が治せるか?…賛成フォーサム 2016 7/1-3/2016 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

7) Sunao Sugita: RPE regulation of innate immune activity and functionality in macrophages - RPE cells differentiated from iPS cells possess immune functions similar to primary RPE cells. ISER2016. 9/25-29/2016 (東京都新宿区)

〔図書〕(計 1件)

1)杉田 直 月刊糖尿病: iPS細胞を用いた網膜疾患に対する再生医療開発 医学出版. 8: 60-67, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉田 直(SUGITA, Sunao)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・副プロジェクトリーダー

研究者番号: 10299456

(2)研究分担者

高橋政代(TAKAHASHI, Masayo)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・プロジェクトリーダー

研究者番号: 80252443

万代道子(MANDAI, Michiko)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・副プロジェ

クトリーダー

研究者番号： 80263086

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()