

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870540

研究課題名(和文) マウスES細胞由来樹状細胞による自己免疫疾患の抑制、制御機構の解明

研究課題名(英文) Suppression of autoimmunity by mouse embryonic stem cell-derived dendritic cells

研究代表者

池田 徳典 (IKEDA, TOKUNORI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・特任助教

研究者番号：00613530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患の治療として、全身的な免疫抑制状態に陥らせることなく免疫抑制を誘導する手法として、ES細胞から樹状細胞(ES-DC)を分化誘導し利用する方法を検討した。ES-DCを1型糖尿病モデルマウスのNODマウスに投与したところ、糖尿病発症の抑制が確認され、脾臓中のTh1細胞の割合が低下した。また、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)モデルによる検討では、ES-DC治療群において、脊髄浸潤細胞におけるTh1細胞数の減少が認められた。一方で、ES-DCを投与したマウスの外来抗原に対する免疫応答は維持されていたことから、ES-DCは自己免疫疾患に対する有望な治療法になりえる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrate the immune-regulatory effect of embryonic stem cell-derived dendritic cells (ES-DCs) using two models of autoimmune disease, namely non-obese diabetic (NOD) mice and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Treatment of pre-diabetic NOD mice with ES-DCs exerted almost complete suppression of diabetes development during the observation period. Development of EAE was also inhibited by the treatment with ES-DCs, and the treatment of EAE-induced mice with ES-DCs reduced the infiltration of inflammatory cells into the spinal cord and ES-DCs suppressed Th1 cells. Moreover, the ES-DC treatment did not affect T cell response to an exogenous antigen, and we observed the inhibition of differentiation and proliferation of Th1 cells by ES-DCs in vitro. These results suggest a clinical application for pluripotent stem cell-derived DCs as a therapy for T cell-mediated autoimmune diseases.

研究分野：神経内科

キーワード：ES細胞由来樹状細胞 細胞治療法 自己免疫疾患 自己免疫疾患モデルマウス Th1細胞

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は、様々な自己抗原に対して免疫寛容が破綻した結果、病原性 T 細胞の攻撃により組織障害を来す疾患である。これに対する現在の治療法として、免疫抑制剤や分子標的薬が使用されているが、これらの薬剤を使用することで、免疫応答能が全般性に低下し感染症誘発等の危険性が高まることが懸念される。そこで、全体的な免疫応答能を低下させずに、自己抗原に対する免疫応答のみを特異的に抑制する治療法の開発が期待される。

このような背景から我々は全身的な免疫抑制状態に陥らせることなく、免疫制御を誘導する手法の開発に取り組んできた。そのため的手段として、T 細胞への抗原提示機能に特化した細胞である樹状細胞を利用する方法について検討し、マウス ES 細胞より樹状細胞 (ES-DC) を分化誘導する方法を確立している。さらに ES 細胞に myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 由来のペプチドをコードする遺伝子と、免疫抑制性分子である TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) とを遺伝子導入し、ES-DC へ分化させた MOG 抗原特異的で且つ免疫抑制性機能を有する遺伝子改変 ES-DC (ES-DC-TRAIL/MOG) を作製した。そして、これをマウスに前投与することにより、MOG ペプチドで誘導される実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症が抑制できることを報告している。

以上の成果を利用して我々は、TRAIL が Treg 細胞に対しては細胞増殖性に働く一方で、IFN- γ 産生 CD4 陽性 T 細胞や通常の CD4 陽性 T 細胞に対しては増殖抑制性に働くという全く別々の作用を示すことを見出した。

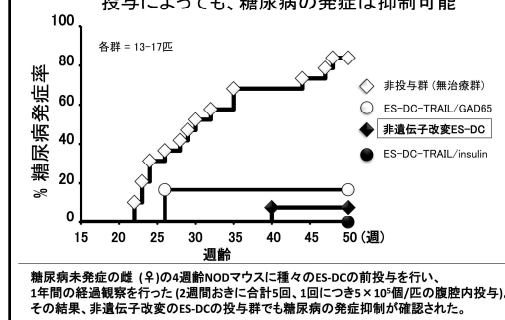
これらの研究成果は、“自己免疫疾患発症に關与する自己抗原と TRAIL とを強制発現させることにより、抗原特異的な免疫抑制機能を有する遺伝子改変 ES-DC を作製できること、さらにこれを個体へ投与することにより、自己抗原特異的な免疫制御が可能であること”を示唆する実験結果である。そのため、この手法が複数の自己抗原が關与しているヒトの自己免疫疾患の治療においても有効であるかどうかを検証するために、単一抗原による誘導型自己免疫疾患モデルマウスの EAE だけではなく、複数の自己抗原が關与する自然発症型の自己免疫疾患モデルマウスの 1 型糖尿病尾モデルマウスの NOD マウスにおいても実験を行った。

その結果、自己抗原遺伝子 (GAD65 あるいは insulin) と TRAIL とを強制発現させた ES-DC (ES-DC-TRAIL/GAD65, insulin) を 5 回、糖尿病未発症マウスに前投与した場合、糖尿病の発症が抑制できることを確認した (図 1)。

一方で、驚くべきことに自己抗原 GAD65 や insulin、免疫抑制性分子 TRAIL を遺伝子導入していない通常の ES-DC の前投与によっても糖尿病の発症が同程度に抑制されるこ

とも確認された (図 1)。

図 1 遺伝子改変 ES-DC に加え、非遺伝子改変 ES-DC の投与によっても、糖尿病の発症は抑制可能



これらの結果からは、自己抗原や免疫抑制性分子の遺伝子導入を行わなくても、ES-DC 自体が免疫抑制性あるいは免疫制御性の機能を有している可能性が示唆される。

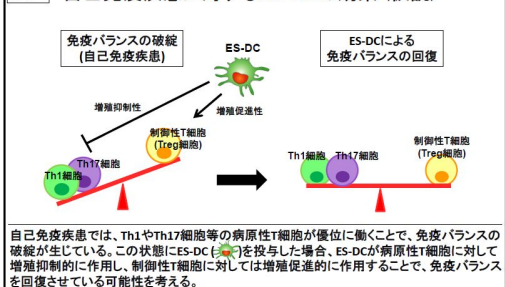
2. 研究の目的

本研究では、以下の 2 つについて検討を行うことを目的とする。

- (1) ES-DC の自己免疫疾患モデルマウスへの症状抑制効果の確認と、その制御機構の解明
- (2) ES-DC による自己免疫制御の状態で、外来抗原に対する免疫応答能が保持されるのか解析

我々は自己免疫疾患に対する ES-DC の効果として、図 2 のような仮説を考えた。これを検証するために、ES-DC を用いた自己免疫疾患の治療法が、複数の自己免疫疾患モデルマウスに対して有効であるかどうか検証し、その抑制性の機構について研究を行う。また ES-DC による自己免疫制御の状態で、外来抗原に対する応答が保たれるか解析を行う。

図 2 自己免疫疾患に対する ES-DC の効果 (仮説)

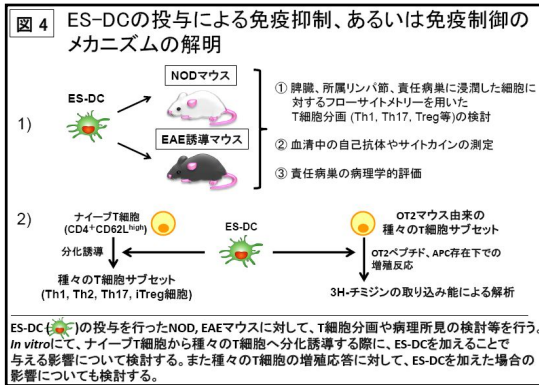
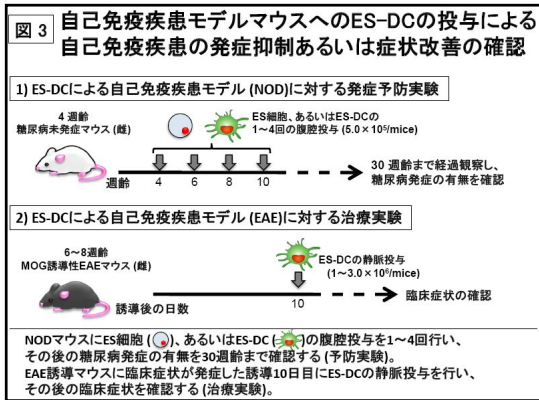


3. 研究の方法

- (1) ES-DC の糖尿病未発症 NOD マウスへの投与 (発症予防実験) と制御機構の解析

病原性 T 細胞が体内で発生するとされる 4 週齢から雌の NOD マウスに ES-DC の投与を行い、30 週齢程度まで観察し、糖尿病発症抑制効果が ES-DC の投与回数依存性かどうかを確認する (図 3-1)。

また NOD-ES 細胞をコントロールとして使用し、ES-DC 投与群と糖尿病発症率の比較検討を行う。ES-DC を投与した NOD マウスに対し、Th1, Th17, Treg 細胞を中心とした T 細胞分画の検討をフローサイトメトリーにて行う (図 4-1)。



(2) ES-DCのEAE誘導マウスへの症状発症後の投与(治療実験)と制御機構の解析

臨床症状を発症したMOG誘導性のEAEにES-DCを投与し、非投与群と比較してその後の臨床症状が軽快するか検討を行う(図3-2)。

またNODマウスと同様に、ES-DCを投与したEAEマウスに対し、Th1, Th17, Treg細胞を中心としたT細胞分画の検討をフローサイトメトリーにて行う(図4-1)

(3) In vitroでの種々のT細胞分画にES-DCが与える影響の解析

OT2マウスのナイーブT細胞から種々のT細胞分画に誘導後、APC存在下でOT2ペプチドを加え再刺激による増殖反応を促す。その際にES-DCを加えて、種々のT細胞分画の増殖が促進もしくは抑制されるか比較検討する(図4-2)。

(4) ES-DCの投与を行ったマウスにおける外来抗原への免疫応答能の確認

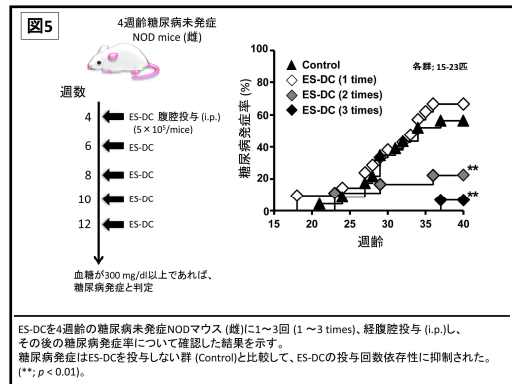
ES-DCの投与を行ったマウスが、全身的な免疫抑制状態になっていないことを検証する。ES-DCを投与したマウスに外来抗原Keyhole limpet hemocyanin (KLH)の免疫を行い、その後に回収した外来抗原特異的なT細胞の増殖応答が、ES-DC非投与群と比較して同程度に保たれているか検証する。

4. 研究成果

(1) ES-DCの糖尿病未発症NODマウスへの投与(発症予防実験)と制御機構の解析

図3-1)の計画に基づいて、実験を行った結果を示す。

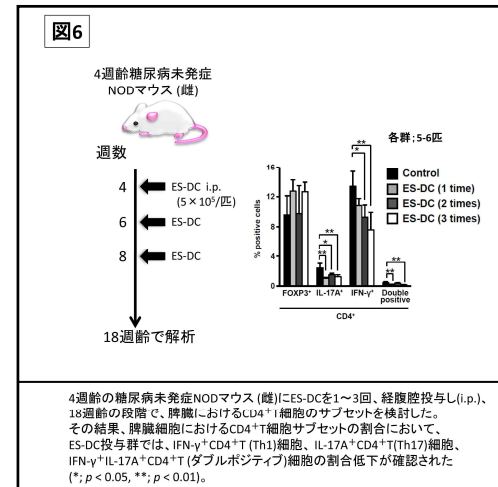
無治療群と比較して、ES-DCを投与した場合、糖尿病の発症が投与回数依存性に抑制され



た(図5)。

一方で、ES細胞を1~3回糖尿病未発症マウスに投与し、糖尿病発症の有無を確認したが、ES細胞の投与では糖尿病発症抑制効果は認められなかった。

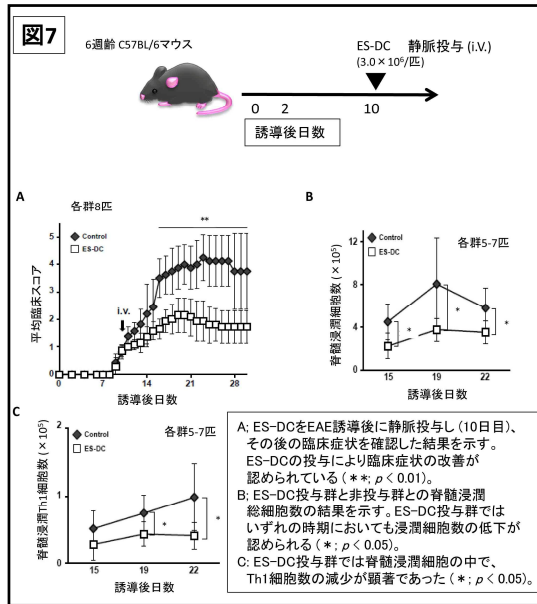
またES-DCを投与したNODマウスの脾臓細胞の解析を行った結果、ES-DC投与群では、Th1細胞、Th17細胞、ダブルポジティブ細胞



の割合の低下が確認された(図6)

(2) ES-DCのEAE誘導マウスへの症状発症後の投与(治療実験)と制御機構の解析

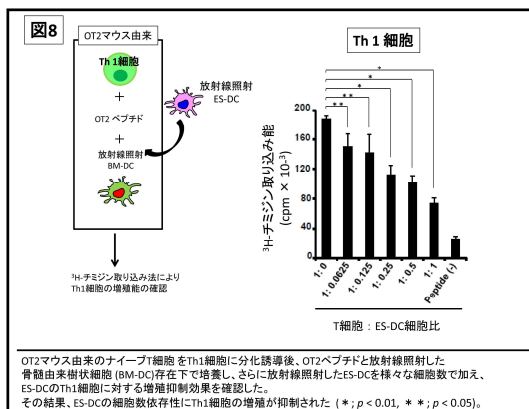
NODマウスでは糖尿病発症前、すなわち臨床症状発症前に、ES-DCの投与を行ったが、EAEでは将来的なヒトでの臨床応用を考慮し、EAEの臨床症状発症後(尾部の麻痺)にES-DCの投与を行った。その結果、臨床症状発症後であっても、ES-DC投与群では、治療効果(臨床症状の軽減)が確認された(図7-A)。また、ES-DCを投与したEAE誘導マウスでは、脊髄浸潤細胞数の減少が確認され(図7-B)、この脊髄浸潤細胞数においてT細胞分画の検討を行った結果、ES-DC投与群ではTh1細胞数の低下が認められた(図7-C)。その他、Treg細胞についてはES-DCの効果は認められず、Th17細胞への影響もわずかであった。



(3) *In vitro* での種々の T 細胞分画に ES-DC が与える影響の解析

OT2 マウスのナイーブ T 細胞から Th1 細胞を分化誘導し、骨髄由来樹状細胞 (BM-DC) を抗原提示細胞として OT2 ペプチドを加えて、Th1 細胞の増殖反応を ^3H -チミジン取り込み法にて確認した。その際、ES-DC を一定の細胞数で加えたところ、Th1 細胞の増殖は共培養した ES-DC の細胞数に逆比例して減少が認められ、ES-DC の Th1 細胞に対する増殖抑制効果が確認された (図 8)。この ES-DC の効果は、Treg 細胞には影響を与えず、Th17 細胞ではわずかな増殖抑制効果を与えるのみであった。

(4) ES-DC の投与を行ったマウスにおける外来抗原への免疫応答能の確認



C57BL/6 マウスに KLH の免疫を行い、10 日目に ES-DC を静脈投与し、21 日後に所属リンパ節細胞を回収、その後 KLH タンパク存在下で 3 日間培養後、 ^3H -チミジン取り込み法にて細胞増殖能を確認した。その結果、ES-DC 投与群におけるリンパ節細胞の細胞増殖能は抑制を認めず、外来抗原に対する免疫応答は維持されていた。

以上の結果より、ES-DC を用いた自己免疫疾患の治療法は、全身的な免疫抑制状態に陥

らせることなく、複数の自己免疫疾患モデルマウスに対して有効であり、有望な治療法であることが示された。

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 8 件)

- (1) Ikeda T, Hirata S, Takamatsu K, Haruta M, Tsukamoto H, Ito T, Uchino M, Ando Y, Nagafuchi S, Nishimura Y, Senju S: Suppression of Th1-mediated autoimmunity by embryonic stem cell-derived dendritic cells. *PLoS One*: 18;9(12):e115198, 2014 査読有
- (2) Takamatsu K, Ikeda T, Haruta M, Matsumura K, Ogi Y, Nakagata N, Uchino M, Ando Y, Nishimura Y, Senju S: Degradation of amyloid beta by human induced pluripotent stem cell-derived macrophages expressing Nprilysin-2. *Stem Cell Res* 13: 442-53, 2014 査読有
- (3) Haga E, Endo Y, Haruta M, Koba C, Matsumura K, Takamatsu K, Ikeda T, Nishimura Y, Senju S: Therapy of peritoneally disseminated colon cancer by TAP-deficient embryonic stem cell-derived macrophages in allogeneic recipients. *The Journal of Immunology* 193: 2024-2033, 2014 査読有
- (4) Senju S, Koba C, Haruta M, Matsunaga Y, Matsumura K, Haga E, Sasaki Y, Ikeda T, Takamatsu K, Nishimura Y: Application of iPS cell-derived macrophages to cancer therapy. *Oncimmunology*. 1; 3 (1): e27927, 2014 査読有
- (5) Haruta M, Tomita Y, Imamura Y, Matsumura K, Ikeda T, Takamatsu K, Nishimura Y, Senju S: Generation of a large number of functional dendritic cells from human monocytes expanded by forced expression of cMYC plus BMI1. *Human Immunology*. 74 (10): 1400-1408, 2013 査読有
- (6) Koba C, Haruta M, Matsunaga Y, Haga E, Sasaki Y, Ikeda T, Takamatsu K, Nishimura Y, Senju S: Therapeutic effect of human iPS-cell derived myeloid cells expressing IFN- β against peritoneally disseminated cancer in xenograft models. *PLoS One*. 24; 8 (6): e67567, 2013 査読有
- (7) Haruta M, Tomoita Y, Yuno A, Matsumura K, Ikeda T, Takamatsu K, Haga E, Koba C, Nishimura Y, Senju S: TAP-deficient human iPS cell-derived myeloid cell lines as unlimited cell source for dendritic cell-like antigen-presenting cells. *Gene Therapy*. 20, 504-513, 2013 査読有
- (8) Ikeda T, Matsuo Y, Ueda A, Hirano T: Pseudo eye of the tiger sign in atypical parkinsonism.

Neurological Sciences. 34, 777-778, 2013
査読有

〔学会発表〕(計3件)

- (1) 池田徳典、高松孝太郎、西村泰治、千住覚. 多能性幹細胞由来樹状細胞を利用した自己免疫疾患の細胞治療法. 第41回日本臨床免疫学会総会、2013.11.28、下関市
- (2) 池田徳典、高松孝太郎、安東由喜雄、西村泰治、千住覚. ES細胞由来樹状細胞(ES-DC)を用いたマウス自己免疫疾患モデルに対する細胞治療法. 第111回日本内科学会講演会、2014.04.11、東京都千代田区
- (3) 池田徳典、高松孝太郎、西村泰治、安東由喜雄、千住覚. 多能性幹細胞由来樹状細胞を利用した実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する細胞療法. 第55回日本神経学会学術大会、2014.05.23、福岡市

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 徳典 (IKEDA TOKUNORI)
熊本大学大学院生命科学研究部
特任助教
研究者番号：00613530