HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウスiPS細胞から誘導した制御性マクロファージ様細胞によるiPS細胞由来アログラフトの生着延長効果の検討［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	佐々木, 元
Description	配架番号：2151
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11669号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59085
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hajime_Sasaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　佐々木　元

学 位 論 文 題 名

マウス iPS 細胞から誘導した制御性マクロファージ様細胞による iPS 細胞由来アログラフトの生着延長効果の検討

(Induction of immunosuppressive macrophage-like cells from mouse iPS cells that contribute to prolong same iPS cells-derived graft survival in allogeneic recipients)

【背景と目的】iPS 細胞に代表されるヒト多能性幹細胞の確立が報告されており、これを応用した再生医療が可能となれば、機能不全に陥った臓器の回復が期待できるため、多能性幹細胞は移植片の新たな供給源として期待されている。自己細胞由来の iPS 細胞を元に終末分化させた組織を移植に用いた場合、免疫原性は乏しいため拒絶反応は起こらないと予想されている。しかしながら、現時点において自己 iPS 細胞を樹立した上で、非癌化の安全性の確認と目的とする体細胞へ効率的な分化誘導と機能の担保には要するコスト及び日数から非現実的であり iPS 細胞ソースによる移植医療は自家移植ではなく、他家移植が想定されている。このため HLA 適合移植を意図した iPS 細胞の banking 構想が進められているが、完全な同系移植は不可能であり、レシピエントの対アロ免疫反応が起こると考えられる。非ヒト霊長類 iPS 細胞由来のアロ移植片は自己移植片と比較するとレシピエントの免疫反応を引き起こすことが報告されている。これらのことから、iPS 細胞由来の移植片に対する免疫学的な対策、制御法の開発が必要である。本研究は、グラフトソースとなる iPS 細胞から同時に免疫抑制性細胞を誘導し、同じ iPS 細胞から誘導したアログラフトに対する免疫制御を検討した研究である。マウス iPS 細胞を用いて、免疫制御性細胞を誘導可能であること、iPS 細胞由来の移植片の生着が延長できること､誘導した免疫抑制性細胞が generality を有するかを検討した。

【対象と方法】BALB/c マウスより iPS 細胞を作成し未分化性(アルカリフォスファターゼ染色、多能性遺伝子をフローサイトメトリー解析)と多分化能(テラトーマ形成後 HE 染色による組織学的検討)を評価した。iPS 細胞より免疫抑制性細胞を誘導し、フローサイトメトリーと RT-qPCR で解析した。免疫抑制能は mixed lymphocyte reaction(MLR)を行い評価した。グラフト移植実験は、アロレシピエントに免疫抑制性細胞投与と同時にグラフトを移植し、肉眼的な観察により生着を評価し生存曲線を解析した。

【結果】①マウス iPS 細胞の樹立。免疫抑制性細胞と移植片を誘導するためにマウス iPS 細胞を樹立した。マウス耳介線維芽細胞に 4 因子(*Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc*)を遺伝子導入し作製した。Alkaline phosphatase 染色陽性で ES 細胞の転写因子である *mNanog, Sox2, Oct4* の発現を認め、3 胚葉への分化能を有した iPS コロニーを分化誘導実験に用いた。②マウス iPS 細胞から免疫抑制性細胞への分化誘導。GM-CSF, M-CSF, IL-4, LPS を用いた分化プロトコー

ルに従い行った。培養 15 日目には、CD11b、F4/80 陽性の細胞へ分化した。この細胞は、分化の途上の段階であり、後の解析にて免疫抑制能を有さなかったため precursor cells と称した。培養 24 日目には、培養皿に強固に付着し突起を有する免疫抑制性細胞(iPS-SCs)を得た。③iPS-SCs の細胞表面分子と遺伝子発現の解析。iPS-SCs は、マクロファージマーカーが陽性(F4/80)で、特に alternative activated macrophage (M2)の表面分子(CD206)が陽性であった。副刺激分子のうち CD80 陽性、CD86 と CD40 は陰性、MHC classⅡが弱陽性であった。iPS-SCs は precursor cells と比較して、M2 および M1 遺伝子の発現が高値であった。④iPS-SCs の in vitro における機能。T 細胞増殖能の抑制効果の評価のために MLR を行ったところ、IPS-SCs の T 細胞増殖抑制効果を認め、容量依存的な機能であることを確認した。iPS-SCs の培養上清には、precursor cells と比較し、NO を多く有しており、induced Nitric Oxide Synthase(iNOS)阻害薬である L-NMMA による機能阻害実験を行ったところ、T 細胞増殖抑制能は阻害されたことから iNOS 依存的な抑制効果であることを認めた。次に B 細胞増殖能の抑制効果を検討したところ、iPS-SCs の添加にて B 細胞の増殖抑制効果を示し、L-NMMA の投与により増殖抑制効果は阻害された。⑤iPS-SCs の generality の検討。他マウス strain と human 由来の iPS 細胞から同様に iPS-SCs の誘導を試みた。C57BL/6 由来の iPS 細胞から iPS-SCs を誘導可能であり、human iPS 細胞からは、*NOS2* と *TGFβ* を発現する接着性の紡錘形細胞を誘導した。⑥iPS 細胞由来胚葉体移植。iPS-SCs が、同じ iPS 細胞由来アログラフトの生着を延長できるかを検討した。グラフトは胚葉体とした。iPS-SCs 投与群は、IP 群、Local 群、IV 群いずれも、無治療群と比較し、グラフト生着が有意に延長した。特に IV 群において、最も生着日数が延長した。一方で、precursor cells 投与群は、投与方法に関わらず、無治療群と比較し有意な生着延長効果を認めなかった。⑦iPS 細胞由来心筋移植。次に、iPS 細胞から拍動心筋細胞を誘導し、これをアログラフトとした。得られた心筋細胞は心筋特異的転写因子および、タンパク質の mRNA の発現が有意に高いことを確認し、移植実験を行った。iPS-SCs 投与群は、無治療群(平均 8±1.2 日)と比較し、グラフト生着日数が有意に延長した。一方で、precursor 投与群と無治療群では、グラフト生着日数に差を認めなかった。

【考察】iPS-SCs は、in vitro において iNOS 発現を介し免疫制御能を有する M1/M2 hybrid マクロファージと考える。また、in vivo におけるアログラフトの生着延長効果を有したメカニズムを推察する。iPS-SCs は、MHC classⅡ弱陽性、また副刺激分子である CD40 と CD86 が陰性であり、不完全な活性化状態であり T 細胞をアナジーに陥らせたため、グラフト生着に寄与したと推察する。また iPS-SCs は、マウスだけではなくヒトでも誘導可能であり、iPS 細胞由来グラフトを移植する時代におけるひとつの免疫制御の選択肢と考えられた。腎移植においては、ドナー由来の制御性マクロファージによる治療が少数ながら行われており、カルシニューリンインヒビター(CNI)の減量に成功している。CNI の腎毒性を考慮すると、制御性細胞による治療で CNI が減量できたことは大きな前進と考える。iPS 由来グラフトに対しての免疫制御療法においても、細胞治療を行う事で免疫抑制剤の減量を期待することはできる。

【結論】マウス iPS 細胞から M2 様マクロファージを誘導し、in vitro において、容量依存的かつ iNOS 依存的に T 細胞増殖抑制効果を示した。また活性化 B 細胞においても iNOS 依存的に細胞増殖抑制効果を示した。アロレシピエントに対し、iPS-SCs の投与のみでグラフト生着の延長に寄与する事を示した。