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［全文の要約］
Author(s)	佐々木, 元
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。　配架番号：2151 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/59086
Type	doctoral thesis
File Information	Hajime_Sasaki_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文(要約)

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)

2015 年 3 月

北海道大学

佐々木元

【緒言】臓器不全に対する治療として臓器移植医療が発展してきた一方で、近年臓器不足が深刻な問題として存在する。近年、ES 細胞及び 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、これら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。多能性幹細胞を用いた細胞移植を免疫学的な視点から想定した場合、ES 細胞由来組織を用いた移植では、ES 細胞は受精来由来のため基本的にアロ移植となり拒絶反応が起きる一方、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、immunogenicity 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、現時点において患者個々の体細胞から 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る。さらに脊髄損傷などの神経細胞移植など、緊急性を要する疾患や慢性神経疾患や遺伝子病などの治療は非自己由来の細胞に頼らざるを得ない現実があり、iPS 細胞ソースによる移植医療は自家移植ではなく、アロ移植が想定されている。このため多種類の iPS 細胞の banking 構想が進められている。具体的には、ヒト白血球抗原(HLA)の major antigen である HLA-A、HLA-B、HLA-DR の homo 接合子のドナーから作製した iPS 細胞を banking するという構想である。HLA homo 接合子のパターンとして、140 種類を確保できれば、日本人の HLA パターンのおよそ 90%をカバー可能と報告されている。しかしながら一卵性双生児間の移植でない限り HLA の完全一致は不可能であり、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。免疫制御法の一つに、これまで臓器移植により培われてきた免疫抑制療法がある。免疫抑制剤の開発が進んだ結果、移植臓器の生着率は目覚ましく改善した。特に腎臓移植においては、 1980 年代以降の cyclosporine や tacrolimus に代表される calcineurin inhibitors(CNI)の出現と 2000 年以降の mycophenolate mofetil (MMF)や IL2 受容体α鎖に対する monoclonal antibody(mAb)である basiliximab が免疫抑制の導入に加わったことにより、CNI 及び MMF が存在しなかった時代と比較し生体腎移植における生着率は著明に延長しており、10 年生着率は 90%を超える。一方でこれらの薬物療法では、薬の長期服用が不可欠な事に加え、発癌と感染症発症の危険性が高く、超長期的には慢性拒絶による移植腎喪失が問題となっている。そのため、非特異的な免疫抑制に依存した移植片の拒絶抑止法ではなく、ドナー臓器特異的な免疫寛容の導入が望まれてはいるが、現状では上記のような非特異的免疫抑制法である薬物療法が標準的手法である。細胞治療による免疫制御に着目してみると、臓器

移植においてアナジーT 細胞や制御性マクロファージ、造血幹細胞を用いた免疫寛容誘導の報告がある。ひとつめにアナジーT 細胞を誘導し、非ヒト霊長類における免疫寛容を誘導した報告である。T 細胞活性に必須なシグナルのひとつである CD80/86 副刺激分子を CD80/86 mAb によりブロックする事により T 細胞アナジーを誘導し、T 細胞増殖が抑制されることが知られている。これを応用して非ヒト霊長類腎移植における免疫寛容誘導が報告されている。制御性マクロファージに関しては、腎臓提供ドナーから単離した制御性マクロファージを生体腎移植レシピエントへ投与し、グラフト機能は安定のまま CNI の減量が可能であったという報告がある。また、上述の末梢性寛容を誘導した２つの報告とは異なり、mixed chimerism に着目した中枢性の免疫寛容誘導によりヒト腎移植における免疫寛容を誘導した報告がある。これは、レシピエントに対し骨髄非破壊的な前処置を行った後に腎臓と造血幹細胞を同時に移植(CKBMT: combined kidney and bone marrow transplantation)する事でドナー特異的な免疫寛容を誘導し、免疫抑制剤を中止可能であったとする報告である。このように免疫制御性細胞の投与あるいは造血幹細胞を用いた免疫寛容の誘導が少ないながら存在する。一方で、多能性幹細胞由来の免疫制御の報告は動物実験の報告があるのみである。ラット ES 様細胞投与にて mixed chimerism を成立させ、アロ移植片をドナー特異的寛容に導いた報告がある。一般に造血幹細胞は、in vitro で自己複製および増殖させる事が困難であるため、自己複製能に関する転写因子である *Hoxb4* をマウス ES 細胞へ遺伝子導入する事で造血幹細胞を誘導し、CKBMT と同様に、骨髄移植による mixed chimerism を誘導し、アロ移植片に対する免疫寛容誘導の報告があるが、多能性幹細胞由来の免疫抑制性細胞の報告は限られている。また臨床の現場で倫理的な障壁となる ES 細胞を用いるのではなく再生医療においてグラフトソースとして期待されている iPS 細胞由来アログラフトの免疫制御法に関する研究はない。以前、我々は、Senju らが報告した多能性幹細胞から樹状細胞やマクロファージへの分化誘導法を応用してマウス ES 細胞からマクロファージ様細胞へ分化させることで、Mixed lymphocyte reaction(MLR)においてアロ T 細胞増殖を阻害することを見いだした。またマクロファージ様細胞を移植前にアロ個体へ投与することで、ES 細胞由来移植片の生着を延長することに成功している。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。iPS 細胞を用いて、ES 細胞と同様に免疫制御性マクロファージ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を検証し、ドナー抗原に対する特異性を検討した。さらに、誘導した制御性マクロファージが他 strain のマウス iPS 細胞やヒト iPS 細胞からも同様に誘導可能であり generality を有するかを検討した。最後に HLA-homo ドナーから hetero であるレシピエ

ントへ移植されることを想定し、hybrid resistance を抑制できるかを検討した。
【実験結果】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 ear tip fibroblast に 4 因子(*Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc*)を遺伝子導入し、21 日後にマウス ES 様の形態を示し、増殖する複数のコロニーを確認し、そのうち 6 種類の iPS コロニーを単離した。単離したコロニーの未分化性を評価するために Alkaline phosphatase 染色を行ったところ 3 種類のコロニーで陽性を確認した。さらに ES 細胞の転写因子である *mNanog, Sox2, Oct4* の発現の評価のためフローサイトメトリーで検討したところ 2 種類のコロニーでこれらの発現を確認した。また作製した iPS コロニーの多分化能を評価するために、NOD-SCID マウスにテラトーマ形成を行い、HE 染色にて解析したところ、1 種類のコロニーのみで、神経様細胞(外胚葉由来)、筋肉組織(中胚葉由来)、線毛上皮様細胞(内胚葉由来)への 3 胚葉へと分化した組織を確認した。以上より未分化性と多分化能を有した iPS コロニーを今後の分化誘導に用いた。②マウス iPS 細胞から免疫抑制性細胞への分化誘導。iPS 細胞を免疫抑制細胞への分化プロトコールを図 2A に示した。誘導の実際は、材料と方法の稿に従い行った。まず中胚葉分化を検証するために、培養 5 日目の胚葉体を、iPS 細胞と比較した。ES 細胞マーカーの一つである SSEA1 は、iPS 細胞が平均 91%の陽性率であるのに対し、胚葉体は 29.4%まで減少していた。一方で中胚葉系の細胞表面分子である Flk1 は、iPS 細胞は平均 0.2%程度の陽性であるが、19.6%程度陽性となっており、中胚葉系への分化が進んでいる事を確認した。次に培養 10 日目と 15 日目に得られた血液細胞をフローサイトメトリーにて解析した。培養 10 日目に得られた球状で OP9 feeder に弱付着性の血液細胞(図 2B 右上)は、CD45、CD11b が陽性でありミエロイド系血液細胞であった。また MHC class Ⅰの発現も認め、F4/80 が陽性であった。培養 15 日目の血液細胞は、CD45、MHC class Ⅰ、F4/80 陽性の他に CD11b が high となった。これらの血液細胞は、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 iPS-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。③誘導した免疫抑制性細胞の細胞表面分子と遺伝子発現の解析。Day24 で回収した iPS-SCs をフローサイトメトリーで解析した。マクロファージマーカーが陽性で、特に M2 (alternative activated macrophage)の表面分子が陽性であった。樹状細胞と骨髄由来抑制細胞マーカーは陰性であった。またその他の特徴として、CD115(MCSF レセプター)陰性、CD14(LPS レセプター)陽性の一方でその複合体である Toll-like receptor 4 (TLR4)は陰性、副刺激分子が部分陽性、免疫抑制性分子の一部が陽性であった。次に iPS-SCs は precursor cells と比較して、M2 および M1 (classically activated macrophage)遺伝子の発現が高値であった。免疫抑制性分子の一部は、precursor cells

で高値であった。④誘導した免疫抑制性細胞の 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、Mixed lymphocyte reaction (MLR)を行った。Donor strain の骨髄樹状細胞(BMDCs)とアロであるレシピエントの T 細胞を共培養すると、BMDCs による抗原提示にて T 細胞増殖が見られるが、ここに IPS-SCs を添加することで、有意に T 細胞増殖を抑制する事ができた。また、iPS-precursor cells を添加しても T 細胞増殖は抑制できなかった。次に iPS-SCs の数を減少させて抑制能を検討したところ、1/10 量以下では抑制能が消失しため、容量依存的な機能であることを確認した(図 4C)。さらに、iPS-SCs の T 細胞増殖抑制のメカニズムを検証するために、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 細胞増殖抑制能はキャンセルされた。iPS-SCs の培養上清には、iPS-precursor cells と比較し、NO を多く有していた。次に B 細胞増殖能の抑制効果を検討した。IL-4 と LPS 存在下で B 細胞を刺激すると B 細胞増殖が起こるが、iPS-SCs の添加にて増殖抑制効果を確認した。さらに iNOS 阻害薬である L-NMMA の投与によりこの増殖抑制効果は阻害された。NK 細胞の細胞傷害機能の抑制効果について検討した。IL-2 で刺激した NK 細胞を effector cells、YAC-1 を target cells とし、effector/target 比を 20 と 40 に設定した。いずれの E/T 比においても NK 細胞による細胞傷害が確認できる一方で、iPS-SCs と培養された NK 細胞を用いても、細胞傷害機能は抑制されなかった。⑤他のマウス strain または human iPS-SCs 誘導の検討。iPS-SCs の generality を確認するために、他のマウス 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 細胞から図 2A で示したプロトコールで iPS-SCs を誘導し、MLR にてアロ T 細胞の増殖抑制を確認した。また human iPS 細胞からは、同様のプロトコールで、免疫抑制性細胞の誘導を試み、培養皿に付着する紡錘形の細胞を確認した。これらの誘導した細胞と human iPS 細胞の遺伝子発現を RT-qPCR で比較したところ、*NOS2* と *TGFβ* が高く、*OCT3/4* が低い結果であった。形態学的所見と NOS の高発現を認め、iPS-SCs を誘導した可能性が示唆された。⑥iPS-SCs と骨髄由来マクロファージ(BMM)との比較。M-SCF で誘導した BMM は、common in vitro-generated macrophage と分類され、M2 と定義する報告もあり、生体内由来のマクロファージとして免疫抑制能および表面分子と遺伝子発現を iPS-SCs を比較対象として解析した。細胞表面分子は、F4/80、CD206、CD115 陽性 classⅡ陰性マクロファージであった。M2 および M1 関連遺伝子は *Ym-1* と *Il-12* のみ iPS-SCs と同等であったが *Arginase*、*Retnlα*、*Nos2* は iPS-SCS で高発現であった。免疫抑制性分子に関しては、iPS-SCs と比較しいずれも低かった。MLR においては、iPS-SCs と同様にアロ抗原提示細胞による T 細胞増殖の抑制効果を認める。一方で NO 産生量は低かった。⑦iPS 細胞由来胚葉体移植。iPS-SCs が、同じ iPS 細胞由来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(平均 16.6±1.6 日、P=0.0079)、Local 群(平均 18.2±2.1 日、P= 0.0098)、IV 群(平均 27±3.2 日、P=0.0011)いずれも、無治療群(平均 8.4±1.7 日)と比較し、グラフト生着が有意に延長した。治療法別には、IV 群において、最も生着日数が延長した。一方で、iPS-precursor cells 投与群は、IP 群(平均 10 日、P=0.8867)、Local 群(平均 8.4±1.4 日、P=0.8107)、IV 群(平均 8.4±1.4 日、P=0.8980)いずれも、無治療群(平均 8.4±1.7 日)と比較し有意差を認めなかった。投与した iPS-SCs がドナー抗原に対して特異性を有するかどうか検討するために、haplotype の異なる 3rd party の胚葉体をグラフトとし、IP で治療した。3rd party グラフトの平均生着日数は、16.1±1.6 日であり、IP 群と比較し有意差を認めず(P=0.6970)、iPS-SCs のドナー特異性は認めなかった。⑧iPS 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、これをグラフトとした。拍動心筋細胞は、材料と方法の稿に従い誘導した。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た。続いて移植実験を行った。iPS-SCs 投与群(平均 22.1±2.1 日、P=0.0007)は、同種異系の無治療群(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、iPS-precursor 投与群(平均 9.4±1 日、P=0.3974)と無治療群では、グラフト生着日数に差を認めなかった。⑨Hybrid resistance 現象の抑制の検討。HLA ホモ接合子のドナーから iPS 細胞を作製し、これを iPS 細胞由来グラフトのための供給源としてバンク化する構想下では、多くのドナーとレシピエントの組み合わせは、HLA ホモからヘテロへの移植となる事が想定される。マウス骨髄細胞移植においては、MHC ホモドナーからヘテロレシピエントの組み合わせでは移植した骨髄細胞がホストの NK 細胞により拒絶される現象が知られており Hybrid resistance と呼ばれている。固形臓器移植においては心移植モデルで Cardiac allograft vasculopathy を引き起こし、グラフト喪失の原因となる。iPS 細胞由来グラフトの移植においても Hybrid resistance によるグラフト傷害あるいは喪失の発生を想定し、iPS-SCs がこれを予防できるかどうか骨髄移植モデルを用いて検討した。移植後の造血幹細胞の生着は、レシピエントの colony forming unit-spleen(CFU-S)数を比較した。生着群、拒絶群、iPS-SCs 群の 3 群の CFU-S 数は、それぞれ 52.3±9.8 個、18.6±5 個、9±3 個であり、iPS-SCs 群と拒絶群の差は認めなかった(P=0.3154)。骨髄移植における Hybrid resistance は、今回の条件においては iPS-SCs の拒絶予防効果を認めない結果であった。

【考察】臓器移植は、CNI や MMF および mAb(Basiliximab、rituximab)に代表される免疫抑制剤の著しい進歩により、移植臓器の生着率は著しく改善した。細胞治療の領域においては、制御性マクロファージの投与によるアロ免疫抑制の試みが行われ、CKBMT で

はトレランスを誘導している。一方で多能性幹細胞由来の免疫制御性細胞の報告としては、ES 様細胞または ES 由来造血幹細胞投与でアログラフト生着の報告があるが、iPS 由来抑制細胞の報告はなく、また多能性幹細胞由来グラフトに対して、同じ多能性幹細胞由来の免疫抑制性細胞によるアログラフト研究は報告がない。本研究は、今後の iPS 細胞をグラフトソースとする再生医療において、グラフトに分化誘導するドナーiPS 細胞からマクロファージ様の免疫抑制性細胞(iPS-SCs)を誘導し、アロレシピエントへ iPS-SCs を用いて治療する事で、グラフトの生着延長に寄与することを示した研究である。グラフト内においてマクロファージは、自然免疫としての働きだけではなく獲得免疫にも働き、急性あるいは慢性のグラフト傷害に関わるとされる。一方でグラフトの虚血再還流傷害から保護する抗炎症性マクロファージに代表される様に、組織の恒常性を保ち長期の生着に関わる働きもする。マクロファージを用いた治療戦略として考えることは、炎症部位への単球の遊走を阻害すること、抗炎症能あるいは組織修復能を発揮するマクロファージを体内で誘導する事、さらに制御性マクロファージを体外で誘導し投与することである。治療薬として直接レシピエントに細胞治療を行う事は、新規性があり挑戦的であるが、薬剤を用いて体内のマクロファージを操作することを回避できる。iPS-SCs は、ミエロイド血球誘導を経て IL-4 と LPS の刺激により誘導した。IL-4 により誘導されるマクロファージは M2 の subtype である M(IL-4)に分類する事ができ、T 細胞増殖抑制能を有する。一方で、LPS により誘導される iNOS の発現は M1 の側面をもつ。これまでのマウス制御性マクロファージの報告として、単球由来の IFNγ刺激マクロファージが制御性 T 細胞を介して抗炎症能を有する報告や、骨髄由来の IFNγ刺激マクロファージが iNOS 依存性に T 細胞増殖抑制を示す報告がある。本研究のプロトコールにおける LPS 刺激は、IFNγ刺激と同様に作用した可能性を考える。このように iPS-SCs は 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。iNOS の発現は、iFNγおよび LPS で容易に誘導できる。元来マクロファージの NO 産生は細胞傷害のある反応への保護作用と考えられており、自己免疫疾患や悪性疾患に対し免疫制御能を発揮している。iNOS は L-arginine を L-citrulline と NO に変換する酵素であり、iNOS を発現するマクロファージは、T 細胞から arginine を奪い、細胞障害性のある NO に暴露させる。NO 自体は細胞内シグナル分子であるが、NO と superoxide との反応によって生成される peroxynitrite が重要な影響を及ぼすとされている。本研究にて誘導したドナーstrain の iPS-SCs は、免疫抑制処置を全く加えない、完全に MHC ミスマッチのレシピエントに単回投与するだけで、アログラフトの生着を延長できた。その生着のメカニズムについて考察する。iPS-SCs は、iNOS、PDL1 が強陽性、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るといえる。

部分活性化状態である抗原提示細胞と出会ったT細胞はアナジーに陥るため、ドナー抗原を直性認識できるT細胞は活性化できなかった可能性があり、グラフト生着に寄与したと推察する。また投与したドナー細胞のうちアポトーシスに陥った細胞は、全身のレシピエント抗原提示細胞にアロ抗原として取り込まれ、間接認識もされる。しかし、このpathwayは、T細胞の副刺激分子阻害やリンパ球除去療法なしでは達成できないので可能性は低いと考える。また、グラフトの生着期間に関しては、長くはないため単回投与では不十分であったかもしれない。なお、活性化したB細胞の増殖を同じくNO依存性に抑制する事が示された一方でNK細胞の細胞傷害性は抑制できなかった。T細胞とB細胞のように分裂増殖を示す細胞に関しては、iNOSを介して増殖抑制に働いた可能性がある。HLAホモiPS細胞がグラフトソースとなる事で起こりうるhybrid resistanceによるグラフト傷害および拒絶、その制御を考えた。Hybrid resistanceとは、マウス骨髄移植においてMHCホモドナー(parent)からヘテロレシピエント(F1)への組み合わせにより、ドナー造血幹細胞に発現しているNK細胞の活性化リガンド(RAE-1)が、レシピエントNK細胞を活性化させた結果、造血幹細胞(F1)の生着を拒絶する現象である。NK細胞の活性化レセプターはNKG2Dであり、 そのリガンドは、ストレス誘導タンパク質であり、マウスではRae-1、Mult1、H-60、ヒトではMICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4-6 が知られている。ヒトiPSグラフト移植においてもNKG2Dリガンドによる NK細胞の活性化が起こり、グラフト傷害および拒絶に至る可能性を考慮して、iPS-SCsによる治療効果を検討したが、マウス骨髄移植の系では拒絶に対する抑制効果は認めなかった。最後にiPS-SCsのgeneralityに関して述べる。iPS-SCsの培養プロトコールは、マウスES細胞、他strainのiPS細胞でも同様に誘導可能であった。C57BL/6マウスは、マクロファージにおけるarginineトランスポーターをコードしている*slc7a2*プロモーターが欠損しているため、BALB/c由来のマクロファージとはArginineの利用において大きな違いが生まれる。結果としてC57BL/6由来マクロファージはM1、BALB/c由来マクロファージはM2である懸念があったが、M1 strainであるC57BL/6由来iPS細胞でも同様にiPS-SCsを誘導できた。またヒトiPS細胞では、プロトコールは若干異なるがiNOSを強く発現した付着性細胞を得た。iPS-SCsは、マウスだけではなくヒトでも誘導可能であり、多能性幹細胞の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る。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、CNI 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。また、ドナー多能性幹細胞由来の制御性マクロファージは、細胞生体ドナ

一由来よりも複数回の誘導や多量誘導が可能と思われ、繰り返し投与を考えた場合アドバンテージがあると考える。最終目標として、免疫抑制剤では実現困難なドナー特異的寛容の誘導を目指して更なる研究に期待したい。

【総括および結論】本研究全体からの新知見としては、①iPS 細胞から M2 様マクロファージ(CD11b, F4/80,CD206 陽性)を誘導した。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こと。②他マウス strain の iPS 細胞から M2 様マクロファージを誘導し、さらに human iPS 細胞から iNOS 陽性の接着細胞を誘導した。これにより iPS-SCS の generality を示唆した。③免疫学的に完全にアロレシピエントに対し、免疫抑制性細胞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こと、である。新知見の意義としては、iPS 細胞由来グラフトと同じ iPS 細胞由来の免疫抑制性細胞をグラフト移植と同時に用いるという新たな免疫制御の戦略を示した点にある。今後の研究・課題としては、①膵β細胞や運動神経細胞などに代表される機能的な iPS 細胞由来グラフトを用いて、グラフト生着延長効果を検討する事。②機能的な iPS 細胞由来グラフトに対し免疫抑制剤を用いない免疫寛容を誘導する事が究極のゴールと考える。