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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11669
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60826
Type	doctoral thesis
File Information	Hajime_Sasaki.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

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

学位論文

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

目次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 頁
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2 頁
略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5 頁
実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6 頁
実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 14 頁
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 30 頁
総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33 頁
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 34 頁
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 35 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は、以下の論文に投稿した。

1. Hajime Sasaki, Haruka Wada, Hyuma Tsuji, Ryo Otsuka, Muhammad Baghdadi, Ken Morita, Nobuo Shinohara, Ken-ichiro Seino
New immunosuppressive cell therapy to prolong survival of iPSCs-derived allografts
Transplantation in submission

本研究の一部は、以下の学会に発表した。

1. 佐々木元、和田はるか、工藤浩也、野々村克也、清野研一郎
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 MLR アロ T 細胞増殖抑制の検討
第 102 回　日本泌尿器科学会総会　2014 年 4 月 24-27 日　神戸

2.Hajime Sasaki, Haruka Wada, Hyuma Tsuji, Ryo Otsuka, Nobuo Shinohara, Ken-ichiro Seino
Induction of regulatory macrophage-like cells from mouse iPSCs that contribute to the suppression of allogeneic immune responses
World transplant congress, July 26-31, 2014. San Francisco

3.佐々木元、和田はるか、辻飛雄馬、大塚亮、篠原信雄、清野研一郎
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アロ移植片生着延長の検討
第 50 回　日本移植学会総会　2014 年 9 月 10-12 日　東京

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[1,2]、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[3]。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[4]。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[5]。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[6]。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[7]。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 [8]。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 [9]。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 [10]。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 [11] [12] [13]。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 [14]。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 [15]、アロ移植片に対する免疫寛容誘導の報告 [16] 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 [17] 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 [18]。

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。

略語表

APC Allophycocyanin

BMDCs bone marrow derived dendritic cells

BMM bone marrow macrophage

CKBMT combined kidney and bone marrow transplantation

ESCs embryonic stem cells

EB embryoid body

FITC fluorescein isothiocyanate

GM-CSF granulocyte macrophage-colony stimulating factor

iNOS induced Nitric Oxide Synthase

iPSCs induced pluripotent stem cells

iPS-SCs induced pluripotent stem cells derived suppressor cells

LIF leukemia inhibitory factor

LPS lipopolysaccharide

$_{L}$-NMMA L-NG-monomethyl Arginine citrate

MACS magnetic-activated cell sorting

M-CSF macrophage-colony stimulating factor

MEF mouse embryonic fibroblast

MLR mixed lymphocyte reaction

PE R-Phycoerythrin

RT-qPCR reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction

TLR4 toll-like receptor 4

材料と方法

マウス

実験動物は、BALB/c (H-2^d), C3H/He (H-2^k), C57BL/6 (H-2^b)、CB6F1(C57BL/6×BALB/c)の8-12週齢の雌マウスを使用した。NOD-SCIDは、雄マウスを使用した。全てのマウスは日本SLC社(Shizuoka, Japan)より購入した。

細胞培養

OP9は、minimum essential medium (αMEM: Invitrogen社, Carlsbad, CA)に20% fetal bovine serum (FBS: Hyclone, Life technologies社, Carlsbad, CA)、1% L-グルタミン、1% ペニシリン-ストレプトマイシン、1% 非必須アミノ酸、1% ピルビン酸、0.1% 2-Mercaptoethanol Solution (2ME)を加えて単層培養して使用した。MEF (mouse embryonic fibroblast)は、胎令14日目の胎児繊維芽細胞から作製した[19]。C57BL/6マウスB細胞由来のiPS細胞は、当研究室の和田講師より提供いただき、培養維持はDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM: Wako社, Osaka)に、20% knockout serum replacement (KSR: Life technologies社)、1% L-グルタミン、1% ペニシリン-ストレプトマイシン、1% 非必須アミノ酸、1% ピルビン酸、0.1% 2ME、0.01% human leukemia inhibitory factor (LIF: Wako社)を含有した培地を用いて、20 Gyの放射線照射したMEFをfeederとして培養した[20]。いずれの細胞も5% CO_2存在下、37℃で培養した。human由来のiPS細胞(HPS0076)は、理化学研究所より提供いただき、培養維持はDMEM/Ham's F-12(Wako社, Osaka)に、20% KSR、1% L-グルタミン、1% ペニシリン-ストレプトマイシン、1% 非必須アミノ酸、0.1% 2ME、Basic FGF (5 ng/ml)を含有した培地を用いて、35 Gyの放射線照射したSNLをfeederとして培養した[2]。

BALB/cマウスiPS細胞の作製

既報に従い作製した[21]。Day 0 に 6well plate に 6×10^5 個/well の PLAT-E 細胞を、10% FBS、1% L-グルタミン、1% ペニシリン-ストレプトマイシン、1% 非必須アミノ酸、1% ピルビン酸、0.1% 2ME 含有 DMEM 培地を用いて播種しておく。Day 1 に、OPTI-MEMI(Invitogen 社)100 μl/well に 3 μg/well の pMXs プラスミドベクター DNA(*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*、*Tal1 Ires GFP*)を入れ撹拌し、15 μl/well の Polyethyleneimine を入れ15分間室温で静置し、PLAT-E 細胞培養液中に添加した。Day 3 に PLAT-E 細胞の培養液交換を行い、Day 4 にそれぞれの PLAT-E 細胞培養上清を回収し、0.45 μm フィルターを通し、final 10 μg/ml の polybrene (Sigma-Aldrich 社, St. Louis, MO)を添加した。細切後にコラゲナーゼ処理し増

殖させたear tip fibroblastを予め6well plateに準備しておき、4因子(*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*) 及び感染効率モニター用に *Tal1 Ires GFP* を含む培養上清を添加し、室温1時間2000 rpmで遠心し、32℃で4時間静置した。静置後の培養上清を捨て、再度培養上清を添加し37℃で一晩培養した。24時間後に培養上清を除去し、新鮮な10% FBS培地と交換した。48時間後に再び新鮮な10% FBS培地と交換した。Day 8に、6 well plateの放射線照射済みMEF上に1.7×10^4/wellで細胞を移し、Day 21には1 Dishあたり1.7×10^5個を10 cm DishのMEF上へ継代した。Day 25にES様コロニーをiPS細胞cell lineとしてpick upし、新たに24 well plateのMEF上に移した。培養維持はDMEMに、20% KSR、1% L-グルタミン、1% ペニシリン-ストレプトマイシン、1% 非必須アミノ酸、1% ピルビン酸、0.1% 2Me、0.01% LIFを含有した培地を用いた。

アルカリフォスファターゼ染色と多能性幹細胞の転写因子解析

アルカリフォスファターゼ染色は、Leukocyte Alkaline Phosphatase kit (Sigma-Aldrich社)を用いて解析した。多能性幹細胞の転写因子解析は、mouse pluripotent stem cell transcription factor analysis kit (BD bioscience社, San Jose, CA)を用いて細胞内染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。

テラトーマ形成とHE染色

既報に従いテラトーマ解析を行った[20]。5×10^5個のiPS細胞をNOD-SCIDマウスの精巣被膜下に投与し、3週間後に形成された腫瘍を摘出した。組織学的解析として、形成されたテラトーマを4%ホルムアルデヒドで固定後に、切片を作製し、HE染色を行った。

iPS細胞由来免疫抑制性細胞の誘導

5×10^5個のiPS細胞を中胚葉誘導培地 (20% FBS: hyclone、1% L-グルタミン、1% ペニシリン-ストレプトマイシン、1% 非必須アミノ酸、1% ピルビン酸、0.1% 2Me、含有αMEM培地) にて5日間の浮遊培養を行い、胚葉体様のsphereを得た。このsphereを0.25% trypsinを用いて単一細胞まで分離し、5×10^5個/10cm dishをOP9上に播種した。培養液は、中胚葉誘導培地にgranulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)とmacrophage-colony stimulating factor (M-CSF)を(共に10 ng/ml; Peprotech社, Rocky Hill, NJ)を含有した培地を用いた。培養10日目に、球状で弱付着性の血球細胞を回収し、新たな非接着性皿に1×10^6個/10cm dishを播種した。培養液は、10% FBS (Gibco, life technology社)、1% L-グルタミン、1% ペニシリン-ストレプトマイシン、

1% 非必須アミノ酸、1% ピルビン酸、0.1% 2Me 含有 Roswell Park Memorial Institute medium 1640(RPMI1640: Wako 社)に GM-CSF (10 ng/ml; peprotech 社)存在下で 5 日間培養し培養皿に浮遊性と弱付着性細胞を観察した。さらに培養 15 日目に、同培養液に新たに GM-CSF (5 ng/ml)と IL-4 (10 ng/ml)を添加し、7 日間培養を継続し、培養 22 日目に LPS (1 μg/ml; Sigma Aldrich 社)を添加し 48 時間培養を継続し培養皿に強固に付着する細胞を観察した。これらは、10 mM EDTA を用いて 20 分間培養し、scraper にて回収し iPS-SCs(induced pluripotent stem cells derived suppressor cells)を得た。

マウス骨髄由来樹状細胞とマクロファージの誘導

マウス大腿骨と脛骨から骨髄細胞を採取し、10% FBS、1% L-グルタミン、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、1% 非必須アミノ酸、1% ピルビン酸、0.1% 2Me含有RPMI1640培養液にGM-CSF (10 ng/ml) 存在下で6日間培養し、骨髄由来樹状細胞(BMDCs)を誘導した[22]。また、同培養液にM-CSF (10 ng/ml) 存在下に5日間培養し、骨髄由来マクロファージ(BMM)を誘導した[23]。

iPS細胞由来の心筋細胞誘導

既報のプロトコールに従い誘導した[24]。Day 0に2.5×10^6 cells/DishのiPS細胞を放射線照射後のMEF上に播種し、10% FBS、1% L-グルタミン、1% ペニシリン-ストレプトマイシン、1% 非必須アミノ酸、1% ピルビン酸、0.1% 2Me、0.01% LIF、recombinant mouse Noggin(Noggin: R&D systems社, 150 ng/ml)含有αMEM培地を用いてDay 3まで誘導した。Day 3にiPS細胞は、0.25% trypsinにてsingle cellとし、LIFを抜いた同培養液で24時間浮遊培養を行い、Day 4にLIFとNogginを抜いた同培養液でDay 7まで培養を継続し、拍動心筋を得た。

T細胞、B細胞の細胞増殖解析

T細胞、B細胞増殖解析は、Mixed lymphocyte reaction(MLR)を行い、[^{3}H] thymidine incorporation assayにて判定した。T細胞増殖解析を先に述べる。Responderは、C3Hマウス脾臓より、CD4陽性T細胞をMACS beads (Miltenyi Biotec社, Bergisch Gladbach, Germany)にて分離した。一方で、BALB/cマウス由来のBMDCsを35 Gyの放射線照射後にstimulatorとした。さらに35 Gyの放射線照射したiPS-SCsまたは、iPS-precursor cellsを添加する事で、T細胞増殖抑制を検討した。1.0×10^5個のResponders と 2.0×10^4 個の stimulators に、2.0×10^4 個の iPS-SCs または、iPS-precursor cells を 4 日間共培養した。4 日目に各 well に[^{3}H]-methyl-thymidineを0.037 Mbq加え、8時間後にharvesterを使用しglass

fiber filters (PerkinElmer社, Waltham, MA)に回収し、scintillation countorを用いてβ線を測定した。培養液は10% FBS、1% L-グルタミン、1% ペニシリン-ストレプトマイシン、1% 非必須アミノ酸、1% ピルビン酸、0.1% 2Me含有RPMI 1640培地を使用し、培養皿は丸底96 well plateを使用した。次にB細胞増殖解析を述べる。C3Hマウス脾臓より、CD19陽性B細胞をMACS beads (Miltenyi Biotec社)にて分離し、IL-4(10 ng/ml)、LPS(1 μg/ml)存在下に24時間培養し、得られた活性化B細胞をResponderとした。1.0 × 10^5個のRespondersと35 Gyの放射線照射した2.0 × 10^4のiPS-SCsを4日間共培養し、上述した方法で、細胞増殖を検討した。培養液と培養皿はT細胞増殖解析と同じであった。T細胞、B細胞それぞれの解析で、iNOS阻害剤である$_L$-NMMA (L-NG-monomethyl Arginine citrate; Dojindo社, Kumamoto)を0.1 mM/well加えることで、各細胞の増殖抑制能の阻害効果を検討した。

NK細胞の細胞傷害解析

C3Hマウス脾臓より、DX5陽性NK細胞をMACS beads (Miltenyi Biotec社)にて分離し、IL-2(peprotech社, 10 ng/ml)存在下にover nightで培養し、得られたNK細胞をeffector cellsとした。Target cellsは、YAC-1とした。IL-2フリーとした、1×10^5個のEffector cellsと2×10^4個のiPS-SCsを3日間共培養した後に、予め[^{3}H]-methyl-thymidine(0.037 Mbq)で8時間ラベルされたYAC-1をeffector/target比が40及び20となる細胞数で、それぞれ4時間共培養した。細胞増殖は、[^{3}H] thymidine incorporation assayにて判定した。iPS-SCsと共培養しない群をコントロールとした。NK細胞傷害活性は次の方法で解析した。YAC-1単独のcounter per minute(CPM)を自然傷害値とし、それから1% tritonにより細胞膜を破壊したYAC-1のCPMを最大傷害値とした。自然傷害値-実験傷害値を自然傷害値-最大傷害値で除した値×100をNK細胞傷害活性(%)とした。実験で用いた培養液と培養皿はTまたはB細胞増殖解析と同じとした。

NO測定

iPS-SCsとiPS-precursor cellsのNO産生量を測定するために、各細胞培養上清を回収し、ELISAに基づきnitric oxide assay Kit (Promega社, Madison, WI)を用いて、NOの代謝産物であるNO_2 + NO_3を測定した。

フローサイトメトリー

iPS細胞から誘導した血液細胞は、Purified anti-mouse CD16/CD32(Tonbo biosciences社, San Diego, CA)によるFc receptor-blockを行い、以下の

anti-mouse抗体により染色した。Flow cytometryは、FC500®(Beckman Coulter社, Brea, CA)にて行われ、forward and side scatterにてゲートし、propidium iodide陽性細胞は除外した。解析はFlowJo® software (Tree Star社, Ashland, OR)を使用した。anti-CD45-FITC (Biolegend社, San Diego, CA)、anti-CD11c-FITC(BD biosciences社)、anti-CD86-FITC(Biolegend社)、anti-IE/IE-FITC(Biolegend社)、anti-CD11b-PE(eBioscience社, San Diego, CA)、anti-CD14-PE(Becton Dickinson社, Franklin Lakes, NJ)、anti-TLR4-PE(Biolegend社)、anti-CD274-PE(BD biosciences社)、anti-CD206-PE(Biolegend社)、anti-CD273-PE(Biolegend社)、anti-CD205-APC(Biolegend社)、anti-Gr-1-APC(Biolegend社)、anti-CD80-APC(Biolegend社)、anti-F4/80-APC(Biolegend社)、anti-CD115-APC(Biolegend社)、anti-H-2D^{d}-APC(Biolegend社)、anti-SSEA1-alexa fluor647(BD biosciences社)、anti-Flk1-PE(eBioscience社)。

RT-qPCR

各細胞のRNAはRNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherland)で抽出し、ReverTra® Ace qPCR 5× RT master mix(Toyob社, Osaka)とサーマルサイクラーを用いてcDNAを合成した。定量的Reverse transcription-PCRのため、Power SYBR® Green (Life Technologies社)と以下の各プライマーセットを用いた。

Hprt: QuantiTect primer assay (QIAGEN)

Retnlα

forward 5′-CCATAGAGAGATTATCGTGGA-3′

reverse 5′-TGGTCGAGTCAACGAGTAAG-3′

Arginase1

forward 5′-GTATGACGTGAGAGACCACG-3′

reverse 5′-CTCGCAAGCCAATGTACACG-3′

Ym-1

forward 5′-CTAACGACTTGGGGAACGTAGA-3′

reverse 5′-GTAAGAGATCAGTGTTCACGACC-3′

Il-10

forward 5′-GCTATGCCTGCTCTTACT-3′

reverse 5′-CCTGCTGACCTCATGATGCCA-3′

Ho-1: Heme oxygenase-1

forward 5′ -GATAGAGCGCAACAAGCAGAA-3′

reverse 5′ -CAGTGAGGCCCATACCAGAAG-3′

Nos2

forward 5′ - ACATCGACCCGTCCACAGTAT-3′

reverse 5′ - CAGAGGGGTAGGCTTGTCTC-3′

Il-12

forward 5′ -TGGTTTGCCATCGTTTTGCTG-3′

reverse 5′ - ACAGGTGAGGTTCACTGTTTCT-3′

Tgfβ1: QuantiTect primer assay (QIAGEN)

GAPDH

forward 5′ -GAGAGGCCCTATCCCAACTC-3′

reverse 5′ -GCGAACTTTATTGATGGTATTCAA-3′

Mef2c: muscle enhancement factor 2C

forward 5′ - AGCAAGAATACGATGCCATC-3′

reverse 5′ - GAAGGGGTGGTGGTACGGTC-3′

Tef1: transcription enhancement factor-1

forward 5′ - AAGACGTCAAGCCCTTTGTG-3′

reverse 5′ - AAAGGAGCACACTTTGGTGG-3′

Tbx5

forward 5′ - GGAGCCTGATTCCAAAGACA-3′

reverse 5′ - TTCAGCCACAGTTCACGTTC-3′

Nkx2.5

forward 5′ - CAGTGGAGCTGGACAAAGCC-3′

reverse 5′ - TAGCGACGGTTCTGGAACCA-3′

Gata4
forward 5′ - CTGTCATCTCACTATGGGCA-3′
reverse 5′ - CCAAGTCCGAGCAGGAATTT-3′

Mlc2v: myosin light chain 2v
forward 5′ - GCCAAGAAGCGGATAGAAGG-3′
reverse 5′ - CTGTGGTTCAGGGCTCAGTC-3′

αMhc: α myosin heavy chain
forward 5′ - GGAAGAGTGAGCGGCCATCAAGG-3′
reverse 5′ - CTGCTGGAGAGGTTATTCCTCG-3′

βMhc: β myosin heavy chain
forward 5′ - GCCAACACCAACCTGTCCAAGTTC-3′
reverse 5′ - TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGGGC-3′

グラフト移植
レシピエントマウスは、BALB/c (MHC-haplotype: H-2^d)とC3H (MHC-haplotype: H-2^k)を用いた。治療細胞の投与と同時にBALB/cマウス由来の胚葉体を３個、腎被膜下に移植した。治療群として、C3Hへ1 × 10^6個のiPS-SCsまたはiPS-precursor cellsを経腹膜的(IP)、腎被膜下(Local)、経静脈的(IV)に投与した。無治療群として、BALB/cとC3Hへ同様にグラフト移植が行われた。3rd partyグラフトとして、C57BL/6 (MHC-haplotype: H-2^b)由来の胚葉体をC3Hへ治療細胞投与と同時に移植した。グラフトの生着は、テラトーマ形成を肉眼的に確認する方法で行った。グラフトが肉眼的に消失した日を拒絶と判定した。

骨髄移植
既報に従い、骨髄移植を行った[25]。レシピエントマウスにCB6F1 (MHC-haplotype: H-$2^{b/d}$)、ドナー骨髄細胞はCB6F1またはBALB/cを用いた。骨髄細胞は、前述の如く回収した。レシピエントには、骨髄移植前日にPoly;IC(Sigma-Aldrich社: 200 μg/body)を腹膜内投与し、当日に9 Gyの全身放射線照射を行い、1×10^6個の骨髄細胞を経尾静脈的に投与した。iPS-SCs 投与群は、骨髄細胞と同数を同時に投与した。骨髄移植6日後にレシピエントの脾臓を摘出し、ブアン液にて固定後にColony forming unit数を計測した。

統計学的解析

統計解析は、Prism 5 software (GraphPad Software, San Diego, CA)を用いて行った。データは、平均値±標準誤差で示した。2群間の平均値の解析は、Student t検定を行った。生存曲線の解析は、Kaplan-Meier法にてlog-rank検定を行った。P値は、0.05以下を統計学的有意差ありと判定した。

実験結果

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(図 1B)。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(図 1C)。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(図 1D)。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(図 1A)。

図 1

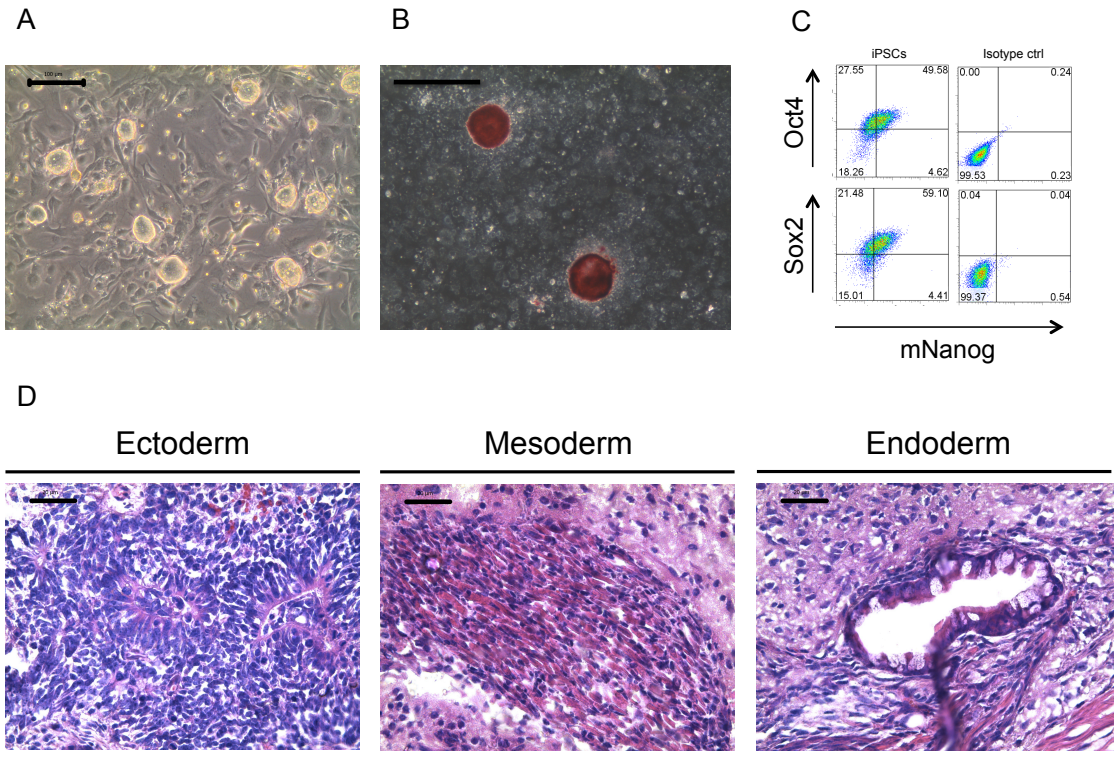


図 1 (A)ES 細胞様の形態を示し自己複製にて増殖する樹立した iPS 細胞。(B) Alkaline phosphatase 染色により赤く染まった iPS コロニー。(C)ES 細胞の細胞内転写因子である *mNanog, Sox2, Oct4* をフローサイトメトリーにて解析し陽性となることを確認した。(D)形成したテラトーマを HE 染色にて解析すると、神経様細胞(左)、筋肉組織(中)、線毛上皮様細胞(右)へと分化したことが確認できる。図中のスケールバーは全て 100 μm

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(図 2B 左上)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(図 2C)。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(図 2D)。培養 15 日目の血液細胞(図 2B 左下)は、CD45、MHC class Ⅰ、F4/80 陽性の他に CD11b が high となった(図 2E)。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(図 2B 右下)。

図 2

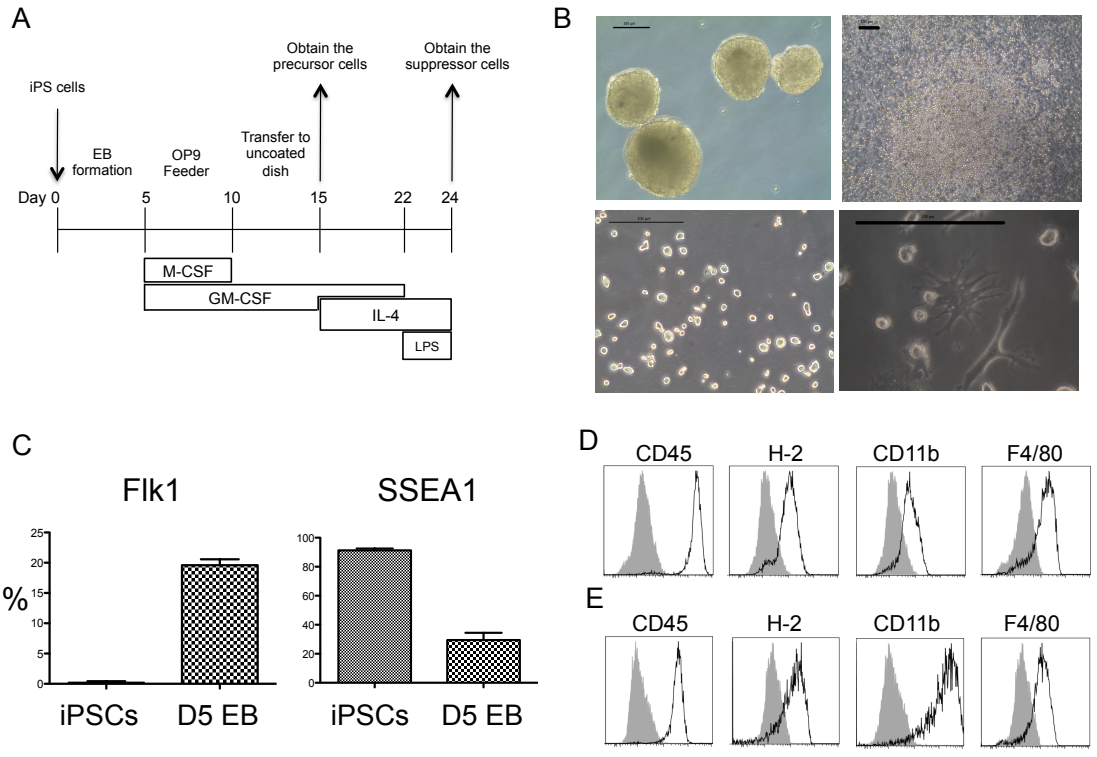


図 2 (A)iPS 細胞から免疫抑制性細胞への分化プロトコール。(B)胚葉体から免疫抑制性細胞を誘導する過程の形態学的変化を示す。左上が Day5 の胚葉体、右上が

Day10 の OP9 feeder 上の血液細胞、左下が Day15 の iPS-precursor cells、右下が Day24 の iPS-SCs を示す。図中のスケールバーは全て 100μm (C)Flk1 と SSEA1 の発現をフローサイトメトリーで解析し統計学的に解析した。中胚葉マーカーである Flk1 は、Day5 の胚葉体で平均 19.4%まで発現し、未分化マーカーである SSEA1 は iPS 細胞よりも平均 61%発現が減少した。(D)培養 Day10 での血液細胞をフローサイトメトリーで解析した。汎血球マーカーである CD45 陽性、MHC class Ⅰである H-2 陽性、ミエロイド系細胞のマーカーである CD11b 陽性、マクロファージマーカーである F4/80 が陽性であった。(E)培養 Day15 での iPS-precursor cells をフローサイトメトリーで解析した。CD45、MHC class Ⅰ、F4/80 陽性であるが CD11b がより強く発現した。フローサイトメトリーの図の縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。白色ヒストグラムが特定の抗体における染色パターンを示し、灰色ヒストグラムがアイソタイプコントロールを示した。

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(図 3A)。
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(図 3B)。

図 3A

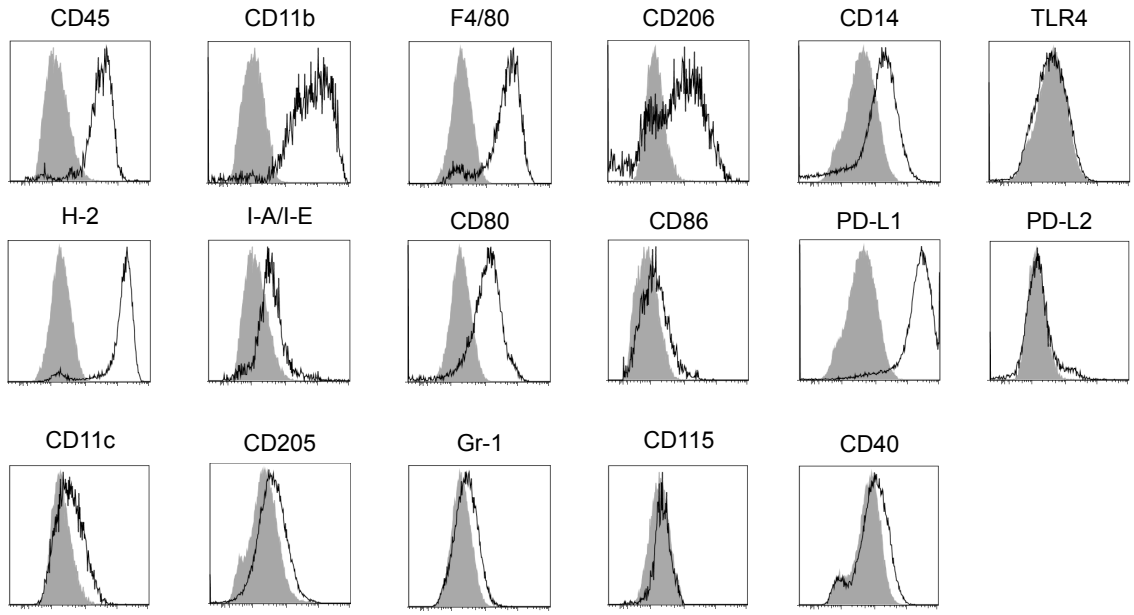


図 3A　培養 Day24 での iPS-SCs をフローサイトメトリーで解析した。CD45、CD11b、MHC class Ⅰ、MHC class Ⅱ、F4/80、CD206 陽性で M2 マクロファージ様である。CD11c、CD205 (樹状細胞マーカー)と Gr-1(骨髄由来抑制細胞マーカー)は陰性。CD115 (MCSF レセプター)陰性、CD14 (LPS レセプター)陽性、TLR4(LPS 認識に重要な CD14 複合体)陰性、CD80 陽性、CD86 と CD40 陰性(T 細胞刺激に必須な副刺激分子)、PDL1 陽性、PDL2 陰性 (免疫抑制性分子) であった。フローサイトメトリーの図の縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。白色ヒストグラムが特定の抗体における染色パターンを示し、灰色ヒストグラムがアイソタイプコントロールを示した。

図 3B

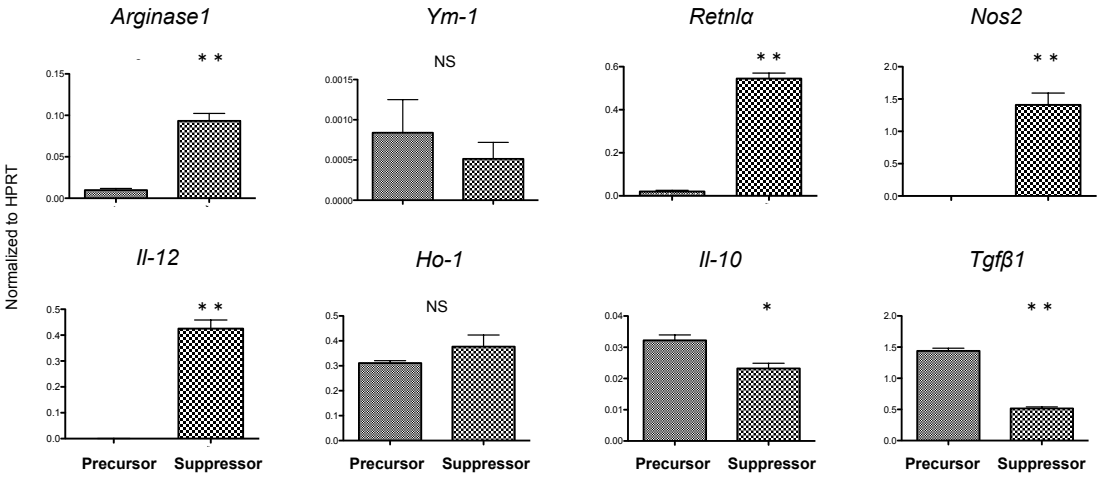


図 3B　iPS-SCs における M2 および M1 マクロファージ関連遺伝子と免疫抑制性分子の mRNA の発現を precursor cells を比較対象として RT-qPCR で確認した。HPRT で標準化した数値を平均±標準誤差で示している。検討した M2 マーカーのうち *Arginase*、*Retnl α* で高い発現を認めた。また M1 マーカーでは *Nos2*、*IL12* で高い発現を認めた。免疫抑制性分子は precursor cells で *Il10*、*Tgf β 1* が高値であった。

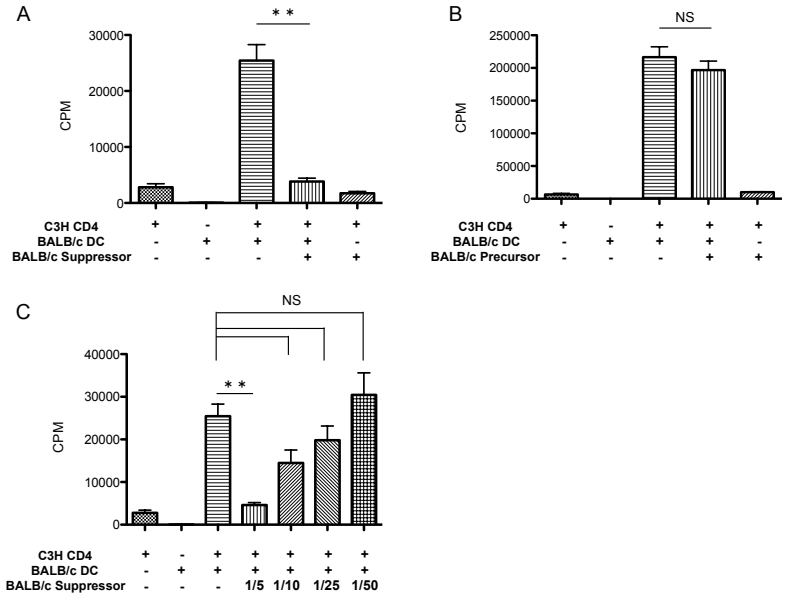
誘導した免疫抑制性細胞の in vitro における機能

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(図 4A)。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(図 4B)。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(図 4D)。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(図 4E)。

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(図 4F)。

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(図 4G)。

図 4



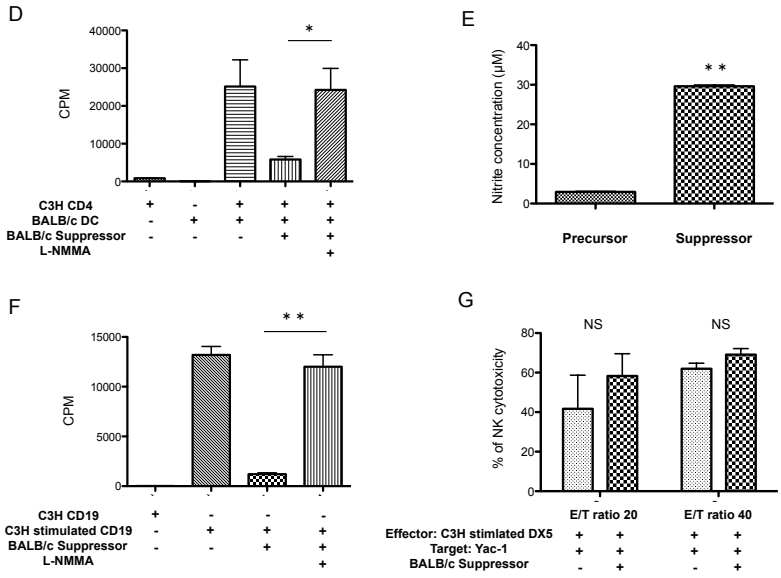


図 4 (A)MLR において iPS-SCs が、アロ抗原による T 細胞増殖を抑制する効果を示す。(B)iPS-precursor cells には、T 細胞増殖抑制効果を認めなかった。(C)iPS-SCs は、投与量依存的に T 細胞増殖抑制効果を示す。(D)iPS-SCs の T 細胞増殖抑制効果は、iNOS 阻害剤である L-NMMA により打ち消される。(E)iPS-SCs の培養上清中には、iPS-precursor cells と比較し NO が多く含まれる。(F)iPS-SCs は、IL-4 と LPS で刺激された B 細胞の増殖抑制効果を示し、iNOS 阻害剤である L-NMMA によりその効果は打ち消される。(G)NK 細胞による細胞障害性は、iPS-SCs の存在下では抑制されなかった。

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(図 5A)。また human iPS 細胞からは、図 5B に示すプロトコールで、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(図 5C)。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(図 5D)。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。

図 5

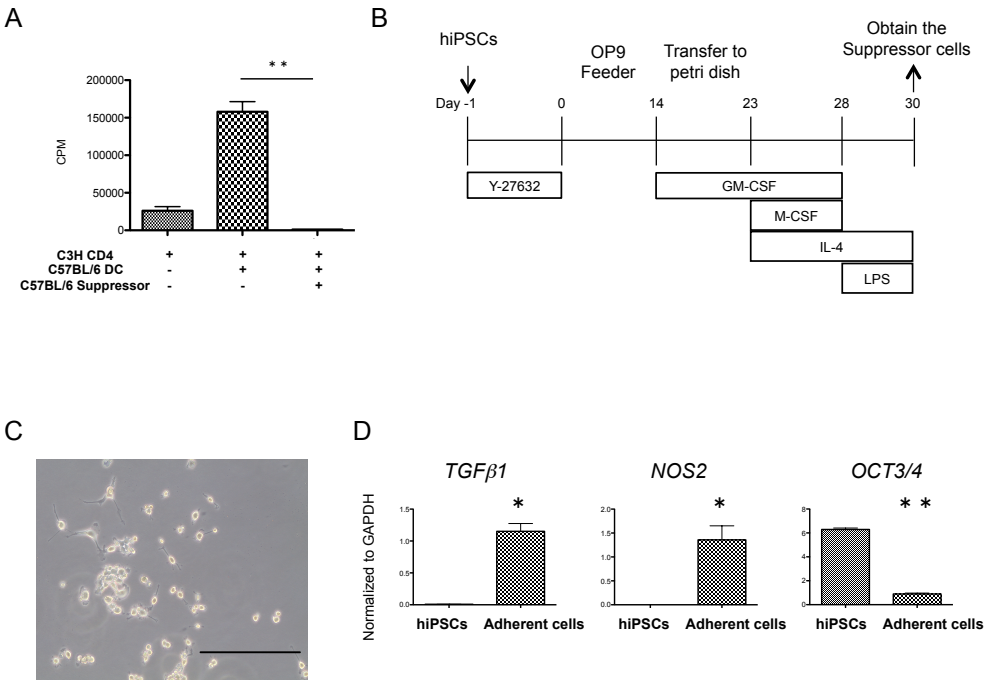


図 5 (A)MLR において C57BL/6 由来の iPS-SCs が、アロ抗原による T 細胞増殖を抑制する効果を示す。(B)human iPS 細胞から免疫抑制性細胞への分化を試みるプロトコール。(C) human iPS 細胞から誘導した紡錘状の接着性細胞。図中のスケールバーは 100μm。(D) human iPS 細胞と誘導した接着性細胞における *TGFb1*、*NOS2*、*OCT3/4* の発現を RT-qPCR にて比較した。*GAPDH* で正常化した数値を平均±標準誤差で示している。

iPS-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[26]、M2 と定義する報告もあり[27,28]、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。(図 6A)。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*、*Retnl*α、*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。(図 6B)。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(図 6C)。一方で NO 産生量は低かった(図 6D)。

図 6

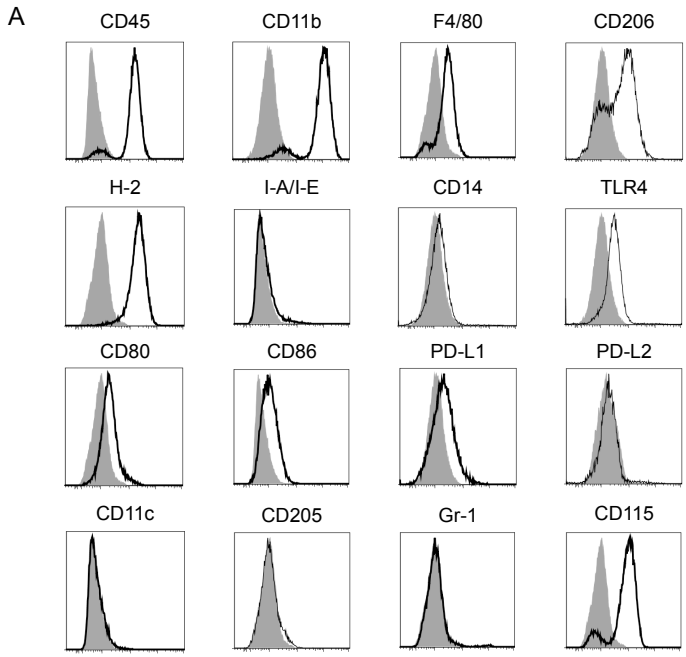


図 6 (A)BMM をフローサイトメトリーで解析した。CD45、CD11b、MHC classⅠ、F4/80、CD206、CD115 陽性で M2 マクロファージ様である。CD11c、CD205、Gr-1 は陰性。CD14 陰性、TLR4 陽性、CD80/CD86 弱陽性、PDL1 弱陽性、PDL2 陰性。フローサイトメトリーの図の縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。白色ヒストグラムが特定の抗体における染色パターンを示し、灰色ヒストグラムがアイソタイプコントロールを示した。

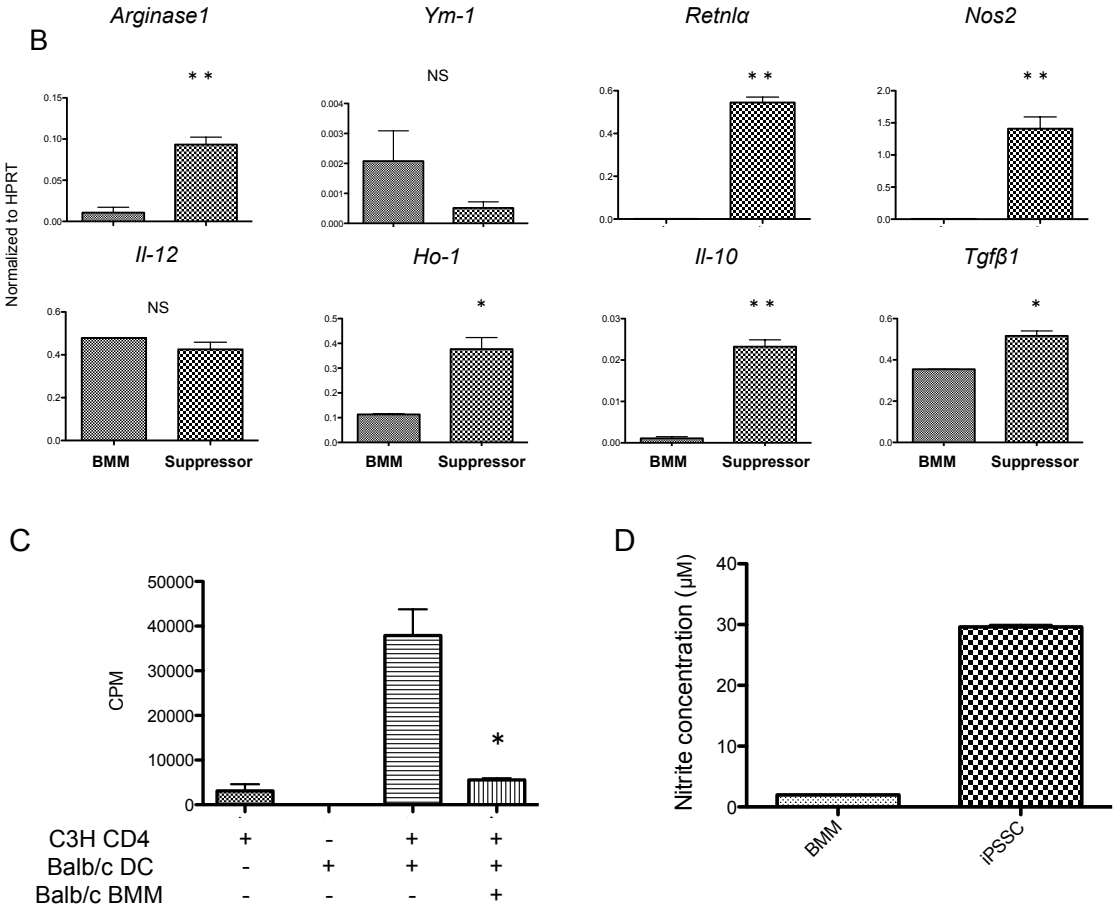


図 6 (B)BMM における M2 および M1 マクロファージ関連遺伝子と免疫抑制性分子の mRNA の発現を、iPS-SCs を比較対象として RT-qPCR で確認した。HRPT で正常化した数値を平均±標準誤差で示している。iPS-SCs は BMM と比較したところ M2 マーカーのうち *Arginase*、*Retnl*α で高い発現を認めた。また M1 マーカーでは *Nos2*、で高い発現を認めた。免疫抑制性分子は precursor cells で *IL10*、*Tgf*β*1* が高値であった。(C) MLR において BMM が、アロ抗原による T 細胞増殖を抑制する効果を示す。(D) iPS-SCs の培養上清中には、BMM と比較し NO が多く含まれる。

iPS 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(図 7A)。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(図 7B)。

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(図 7C)。

移植後 14 日後の代表的なグラフトの肉眼的所見を図 7D に示す。

図 7

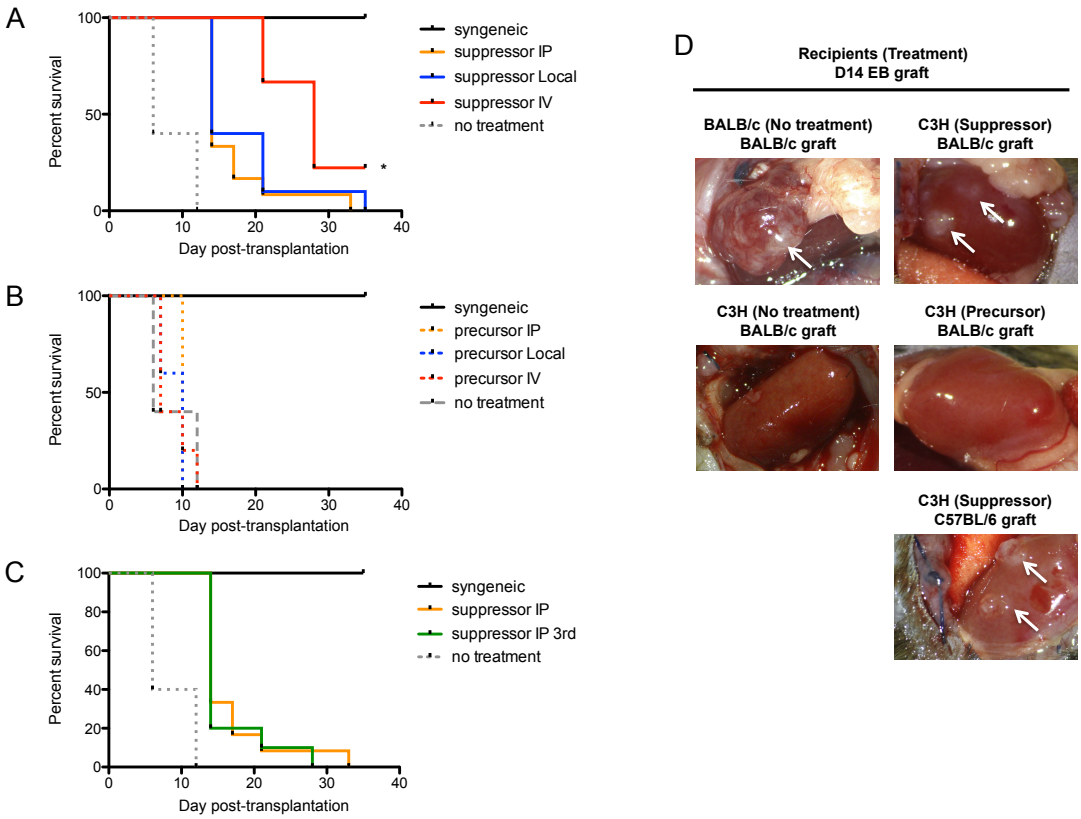


図 7 C3H(Haplotype: H-2^k)に 1×10^6個の iPS-SCs または iPS-precursor cells を 3 経路(IP、Local、IV)別に投与し、BALB/c(Haplotype: H-2^d)由来の胚葉体を移

植し、グラフト生着日数を観察した。無治療のシンジェニック群(N=12、BALB/c グラフト➡BALB/c)と無治療のアロ群(N=5、BALB/c グラフト➡C3H)をコントロールとした。(A)iPS-SCs 投与群は、IV 群(N=6)、Local 群(N=10)、IP 群(N=12)の 3 群全てにおいて、無治療のアロ群と比較し有意にグラフトの生着日数を延長させた。特に IV 群で最も生着日数が延長した。(B)iPS-precursor cells 投与群は、IV 群(N=5)、Local 群(N=5)、IP 群(N=6)の 3 群全てにおいて、グラフトの生着日数を延長できなかった。(C) グラフトを C57BL/6(Haplotype: H-2^b)由来の胚葉体とし iPS-SCs を IP 投与(3^{rd} party 群、N=10)したが、グラフトの生着日数は、BALB/c 由来の胚葉体と比べて有意な差を認めなかった。(D)無治療のシンジェニック群では、グラフト(テラトーマ)を確認できる(左上)。一方で、無治療の同種異系群においては、グラフトは拒絶により消失した(左下)。また iPS-SCs 投与により生着したグラフト(右上)および iPS-precursor cells 投与により拒絶したグラフト(右中)、iPS-SCs 投与により生着した 3^{rd} party グラフト(右下)を示す。

iPS 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(図 8A)。
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(図 8B)。

図 8

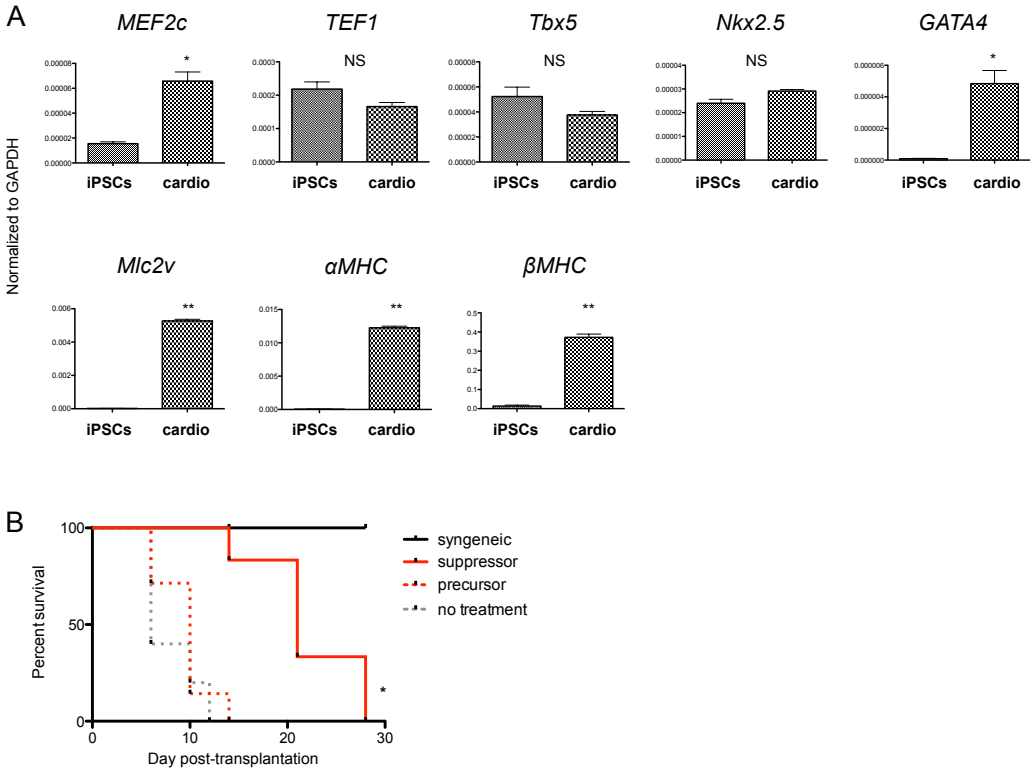


図 8 (A)iPS 細胞から誘導した拍動心筋の心筋特異的転写因子とタンパク質の mRNA の発現を、iPS 細胞をコントロールとして RT-qPCR で確認した。GAPDH で正常化した数値を平均±標準誤差で示している。検討した心筋特異的転写因子のうち MEF2c、GATA4 で高い発現を認めた。また心筋タンパク質では、Mlc2v、αMHC、βMHC で高い発現を認めた。(B) C3H(Haplotype: H-2^k)をレシピエントとし、治療群として、1×10^6個の iPS-SCs または iPS-precursor cells の IV 投与を行ない、拍動心筋を腎被膜下に 3 個移植した。無治療群として同種同系群(N=5)と同種異系群(N=5)をコントロールとした。グラフトの観察は胚葉体グラフトに準じて行った。

iPS-SCs 投与群(N=6)は、iPS-precursor cells 投与群(N=7)および、無治療群と比較し有意にグラフトの生着日数を延長させた。

Hybrid 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[29] [30]。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[31]。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。

図 9

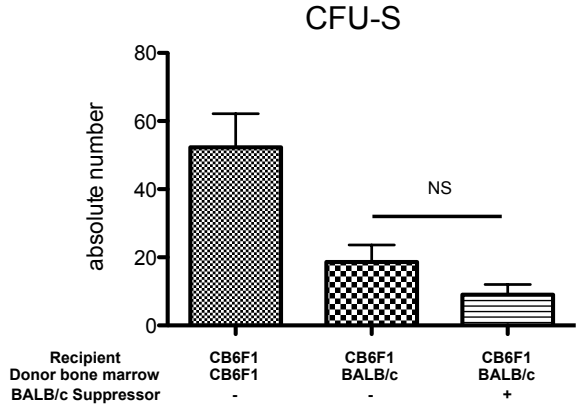


図 9 レシピエントマウスに CB6F1、ドナー骨髄細胞は CB6F1 または BALB/c を用いた。レシピエントには、骨髄移植前日に Poly;IC(200 μg/body)を腹膜内投与し、当日に致死量放射線照射を行い、1×10^6 個の骨髄細胞を経静脈的に投与した。iPS-SCs 投与群は、骨髄細胞と同数を同時に投与した。骨髄移植 6 日後に CFU-S を計測した。生着群(N=3、CB6F1➡CB6F1)をコントロールとして拒絶群(N=5、BALB/c➡CB6F1)と iPS-SCs 投与群 (N=2、BALB/c➡CB6F1) を比較したが、CFU-S 数に差を認めなかった。

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 [7]。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 [32]、CKBMT ではトレランスを誘導している [11,12,13]。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 [33]。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 [34]。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 [35]。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 [26]、T 細胞増殖抑制能を有する [36]。一方で、LPS により誘導される iNOS の発現は M1 の側面をもつ [26]。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 [23]、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 [37]。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 [38] 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[39]。

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[40]、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[41][42]。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[25]。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[43]。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[44]。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[45]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、細胞生体ドナー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

① 本研究全体からの新知見

- iPS 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。
- 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。
- 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。

② 新知見の意義

- 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。

③ 今後の研究・課題

- 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。
- 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。

謝辞

本研究は、著者が北海道大学大学院医学研究科医学専攻博士課程在籍中の研究成果をまとめたものである。稿を終えるにあたり本研究の機会を賜りました同大学院医学研究科腎泌尿器外科学分野　野々村克也前教授、篠原信雄教授に深甚なる謝意を表します。さらに実際の研究の場となった同大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野　清野研一郎教授にアイデアから論文作成に至るまで、多大なるご協力を頂き、心より感謝申し上げます。ならびに研究技法をご指導いただきました同教室の和田はるか講師に心からお礼申し上げます。

引用文献

1 Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147, (1998).

2 Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872, (2007).

3 Araki, R. *et al.* Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature* **494**, 100-104, (2013).

4 Nakatsuji, N., Nakajima, F. & Tokunaga, K. HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nat. Biotechnol.* **26**, 739-740, (2008).

5 Okita, K. *et al.* A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* **8**, 409-412, (2011).

6 Morizane, A. *et al.* Direct Comparison of Autologous and Allogeneic Transplantation of iPSC-Derived Neural Cells in the Brain of a Nonhuman Primate. *Stem Cell Reports* **1**, 283-292, (2013).

7 Halloran, P. F. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2715-2729, (2004).

8 Lombardi, G., Sidhu, S., Batchelor, R. & Lechler, R. Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *Science* **264**, 1587-1589, (1994).

9 Bashuda, H. *et al.* Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates. *J. Clin. Invest.* **115**, 1896-1902, (2005).

10 Hutchinson, J. A. *et al.* Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. *J. Immunol.* **187**, 2072-2078, (2011).

11 Scandling, J. D. *et al.* Tolerance and withdrawal of immunosuppressive drugs in patients given kidney and hematopoietic cell transplants. *Am. J. Transplant.* **12**, 1133-1145, (2012).

12 Leventhal, J. *et al.* Tolerance induction in HLA disparate living donor kidney transplantation by donor stem cell infusion: durable chimerism predicts outcome. *Transplantation* **95**, 169-176, (2013).

13 Kawai, T. *et al.* HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N. Engl. J. Med.* **358**, 353-361, (2008).

14 Fandrich, F. *et al.* Preimplantation-stage stem cells induce long-term

allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat. Med.* **8**, 171-178, (2002).

15 Bonde, S. & Zavazava, N. Immunogenicity and engraftment of mouse embryonic stem cells in allogeneic recipients. *Stem Cells* **24**, 2192-2201, (2006).

16 Bonde, S., Chan, K. M. & Zavazava, N. ES-cell derived hematopoietic cells induce transplantation tolerance. *PLoS One* **3**, e3212, (2008).

17 Senju, S. *et al.* Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* **27**, 1021-1031, (2009).

18 Kudo, H. *et al.* Induction of Macrophage-Like Immunosuppressive Cells from Mouse ES Cells That Contribute to Prolong Allogeneic Graft Survival. *PLoS One* **9**, e111826, (2014).

19 Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676, (2006).

20 Wada, H. *et al.* Successful differentiation to T cells, but unsuccessful B-cell generation, from B-cell-derived induced pluripotent stem cells. *Int. Immunol.* **23**, 65-74, (2011).

21 Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat. Protoc.* **2**, 3081-3089, (2007).

22 Inaba, K. *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* **176**, 1693-1702, (1992).

23 Brem-Exner, B. G. *et al.* Macrophages Driven to a Novel State of Activation Have Anti-Inflammatory Properties in Mice. *The Journal of Immunology* **180**, 335-349, (2007).

24 Yuasa, S. *et al.* Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **23**, 607-611, (2005).

25 Ogasawara, K., Benjamin, J., Takaki, R., Phillips, J. H. & Lanier, L. L. Function of NKG2D in natural killer cell-mediated rejection of mouse bone marrow grafts. *Nat. Immunol.* **6**, 938-945, (2005).

26 Murray, P. J. *et al.* Macrophage Activation and Polarization:

Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* **41**, 14-20, (2014).

27 Fleetwood, A. J., Dinh, H., Cook, A. D., Hertzog, P. J. & Hamilton, J. A. GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 411-421, (2009).

28 Joshi, S. *et al.* Rac2 controls tumor growth, metastasis and M1-M2 macrophage differentiation in vivo. *PLoS One* **9**, e95893, (2014).

29 Cudkowicz, G. & Stimpfling, J. H. Induction of Immunity and of Unresponsiveness to Parental Marrow Grafts in Adult F-1 Hybrid Mice. *Nature* **204**, 450-453, (1964).

30 Cudkowicz, G. & Bennett, M. Peculiar immunobiology of bone marrow allografts. II. Rejection of parental grafts by resistant F 1 hybrid mice. *J. Exp. Med.* **134**, 1513-1528, (1971).

31 Uehara, S. *et al.* NK cells can trigger allograft vasculopathy: the role of hybrid resistance in solid organ allografts. *J. Immunol.* **175**, 3424-3430, (2005).

32 Hutchinson, J. A. *et al.* Transplant acceptance-inducing cells as an immune-conditioning therapy in renal transplantation. *Transpl. Int.* **21**, 728-741, (2008).

33 Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 723-737, (2011).

34 Devey, L. *et al.* Tissue-resident macrophages protect the liver from ischemia reperfusion injury via a heme oxygenase-1-dependent mechanism. *Mol. Ther.* **17**, 65-72, (2009).

35 Broichhausen, C., Riquelme, P., Geissler, E. K. & Hutchinson, J. A. Regulatory macrophages as therapeutic targets and therapeutic agents in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* **17**, 332-342, (2012).

36 Huber, S., Hoffmann, R., Muskens, F. & Voehringer, D. Alternatively activated macrophages inhibit T-cell proliferation by Stat6-dependent expression of PD-L2. *Blood* **116**, 3311-3320, (2010).

37 Riquelme, P. *et al.* IFN-gamma-induced iNOS expression in mouse regulatory macrophages prolongs allograft survival in fully immunocompetent recipients. *Mol. Ther.* **21**, 409-422, (2013).

38 Dalton, D. K. *et al.* Multiple defects of immune cell function in mice with

disrupted interferon-gamma genes. *Science* **259**, 1739-1742, (1993).

39 Pacher, P., Beckman, J. S. & Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* **87**, 315-424, (2007).

40 Davies, J. K. Costimulatory blockade with monoclonal antibodies to induce alloanergy in donor lymphocytes. *Int. J. Hematol.* **93**, 594-601, (2011).

41 Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I. & Inaba, K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* **191**, 411-416, (2000).

42 Morelli, A. E. & Larregina, A. T. Apoptotic cell-based therapies against transplant rejection: role of recipient's dendritic cells. *Apoptosis* **15**, 1083-1097, (2010).

43 Raulet, D. H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 781-790, (2003).

44 Sans-Fons, M. G. *et al.* Arginine transport is impaired in C57Bl/6 mouse macrophages as a result of a deletion in the promoter of Slc7a2 (CAT2), and susceptibility to Leishmania infection is reduced. *J. Infect. Dis.* **207**, 1684-1693, (2013).

45 Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* **164**, 6166-6173, (2000).