



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	遺伝子導入技術を用いたiPS細胞由来胸腺上皮細胞の作製と移植免疫応答制御に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	大塚, 亮
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：2444 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13430号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74374
Type	doctoral thesis
File Information	Ryo_Otsuka_summary.pdf



学 位 論 文 (要 約)

遺伝子導入技術を用いた iPS 細胞由来胸腺上皮
細胞の作製と移植免疫応答制御に関する研究

(Studies on the regulation of immunological
reaction in transplantation by thymic epithelial cells
derived from induced pluripotent stem cells)

2 0 1 9 年 3 月

北 海 道 大 学

大 塚 亮

学 位 論 文 (要 約)

遺伝子導入技術を用いた iPS 細胞由来胸腺上皮
細胞の作製と移植免疫応答制御に関する研究

(Studies on the regulation of immunological
reaction in transplantation by thymic epithelial cells
derived from induced pluripotent stem cells)

2 0 1 9 年 3 月

北 海 道 大 学

大 塚 亮

【背景と目的】

近年、人工的に臓器を作製する再生医療がめざましい進歩を遂げ、特に ES 細胞や iPS 細胞に代表される多能性幹細胞を用いた新たな移植医療が注目されている。ES 細胞由来組織を移植する場合、他人由来の細胞であるため拒絶反応は避けられない。一方で、患者自身の末梢血等の体細胞から作製可能な iPS 細胞は自己由来であるため拒絶反応が起きないと予想される。しかし、患者の体細胞から iPS 細胞を作製し、移植可能な組織を作り出すことは、そのコスト、または早急な治療を要する場合の時間的問題から現実的ではない。そのような問題に際し、予め安全性・品質が保証された iPS 細胞を保存し、必要に応じて迅速に提供することを目的として現在行われているのが iPS 細胞ストック事業である。ストックされる iPS 細胞として、拒絶反応が起きる可能性が低いとされるホモ接合型の HLA（ヒト白血球抗原）遺伝子型をもつ iPS 細胞が想定されている。しかしながら、HLA 以外のタンパク質抗原の不一致により拒絶反応が引き起こされうるのは、これまでの臨床的な知見から十分に予想される。

拒絶反応を回避するため、これまで様々な免疫抑制剤が開発され、臓器移植の分野で用いられてきた。しかしその長期使用は日和見感染症や悪性腫瘍の新規発生などの重篤な副作用をもたらし、免疫抑制剤の中止を余儀なくされた場合、移植片喪失に至る可能性が存在する。これらの問題を解決する手段として提案されるのが、レシピエント免疫系のドナー抗原に対する免疫寛容の誘導である。免疫寛容を達する手段として、本研究では次に述べる理由から「胸腺」に着目することとした。一般的に免疫寛容とは、免疫系のうち特に T 細胞が自己を攻撃しないことを指し、T 細胞の発生成熟過程では胸腺において成立する。またその過程で胸腺構成細胞の一つである「胸腺上皮細胞」が重要な役割を担っている。移植における免疫寛容とは、拒絶の主体である T 細胞がドナー臓器を攻撃しないことを意味し、これまでにマウス他家、および異種間（マウス×ブタ）で胸腺移植を用いた免疫寛容誘導の成功報告がある。このような生体胸腺移植による免疫寛容を、iPS 細胞を用いた移植への応用を考えたとき、iPS 細胞のドナーから胸腺を採取することは困難であるが、作製した iPS 細胞から寛容誘導に資する胸腺上皮細胞および胸腺組織を分化誘導することは可能と考えられる。iPS 細胞の多能性を活かすことで、生体移植では困難な胸腺組織移植が可能になり、iPS 細胞を用いた移植医療における免疫寛容誘導の手法として有用な選択肢となり得る。

多能性幹細胞を用いた機能細胞の作製においては、その分化誘導効率が問題となる。胸腺上皮細胞の作製プロトコルはこれまでに少なからず報告があるが、その誘導効率は解決すべき重要な課題となっている。以上の背景に基づき、本研究においては高効率な胸腺上皮細胞誘導法を確立し、iPS 細胞由来胸腺組織による移植免疫制御能を検討することを目的として研究を行った。

【材料と方法】

本研究ではマウス iPS 細胞を用いて、他家 iPS 細胞移植モデルを構築することとした。iPS

細胞は当研究室で過去に樹立し、多能性をもつことが確認されている細胞株を用いた。胸腺上皮細胞の分化誘導においては、過去の誘導報告および胸腺発生に関する発生生物学な知見から、*in vitro* でその発生環境を模倣する条件を探索し、qPCR や免疫組織化学などによる表現型解析の結果をもとに条件検討を行った。さらに、iPS 細胞へ転写因子 Foxn1 を導入し、分化誘導効率への影響を検討した。また、iPS 細胞を用いた移植医療・細胞治療を想定したマウス移植モデルを用いて、iPS 細胞由来胸腺上皮細胞の移植免疫制御能を検討した。

【結果】

胸腺は内胚葉由来の組織であり、種々の内胚葉由来組織の前駆細胞である胚体内胚葉の分化誘導を行った。種々の培養条件を検討し、フローサイトメトリーで評価した結果、85%以上の高効率で目的細胞が得られる培養条件を見出した。また得られた細胞は、内胚葉マーカー因子として知られる Foxa2 や Sox17 などの転写因子を発現していた。さらに段階的な分化誘導条件の検討と表現型解析による評価で、前側内胚葉および咽頭内胚葉を経て胸腺上皮細胞を作製するプロトコルを構築した。これらの各段階では特異的なマーカーが少ないため、主に qPCR や免疫蛍光染色を用いた複数の遺伝子やタンパク質の解析により評価した。その結果、前側内胚葉での発現が知られている Sox2 や、咽頭形成に重要な役割を果たす Tbx1、Hoxa3 などを発現する細胞が得られる培養条件を確立した。胸腺発生のマスター因子として知られる Foxn1 を発現する細胞を得ることができたが、フローサイトメトリーによる解析の結果、胸腺上皮細胞で発現する EpCAM 等を発現している細胞は僅かであることが分かった。

分化誘導効率の改善をはかるため、レンチウイルスベクターを用いて転写因子 Foxn1 の遺伝子導入を行った。Foxn1 を導入した iPS 細胞株を用いて、当研究室において独自に開発したプロトコルに従って分化誘導を行った。誘導後の解析の結果、胸腺上皮細胞（または前駆細胞）で発現が知られている複数の細胞表面分子（EpCAM、UEA1、Ly51、DLL4、MHC II）を発現する細胞を得ることに成功した。これらの分子を発現する細胞の分化誘導効率は、Foxn1 遺伝子を導入しない誘導法と比較して有意な上昇を認めた。分化誘導によって得られた細胞をヌードマウスへ移植したところ、末梢血中に T 細胞が出現し、さらに移植胸腺組織内で CD4/CD8 double positive 細胞の存在を認めた。

最後に、iPSC-TEC の移植による拒絶反応制御の検討を行った。本研究における目的である「多能性幹細胞を用いた移植医療における免疫制御」の構想に基づき、iPSC-TEC および皮膚移植レシピエントとして H-2 ハプロタイプが b/k のヘテロ接合型である C3129F1 マウス、皮膚ドナーとして H-2 ハプロタイプが b/b の B6 マウス、第3者皮膚ドナー (3rd party) として H-2 ハプロタイプが d/d の BLAB/c を用いた。また、iPS 細胞は B6 (H-2 ハプロタイプ b/b) 由来である。この時、C3129F1 マウスの雄親である 129 と皮膚ドナーの B6 はともに H-2 ハプロタイプが b/b であるが、マイナー抗原が異なっており、iPS 細胞ストックを使用した移植医療を想定したドナー・レシピエントの組み合わせである。

初めに、レシピエントである雄 C3129F1 マウスに対し、雄 B6 マウス由来 iPS 細胞から作製した iPSC-TEC Aggregate を腎臓被膜下へ移植した。腎臓被膜下移植 5 週間後に C3129F1 (自己)、B6 (iPSC-TEC と同一系統)、BALB/c (第 3 者、3rd party) の皮膚移植を行った。コントロール群としては、MEF Aggregate を移植したレシピエントを使用した。

コントロールマウスに移植された B6 皮膚移植片は早期に拒絶が生じ、移植片喪失に至った (Median survival time : MST=12)。一方で、iPSC-TEC 移植群においては B6 皮膚片の生着期間がコントロール群に対して有意に延長していた (MST=15.5)。このとき、BLAB/c マウス皮膚移植片はコントロール群および iPSC-TEC 移植群ともに早期に拒絶された (Control : MST=12、iPSC-TEC : MST=12)。また自己の皮膚移植片はどちらの群においても前例生着を認めた (MST>20)。これらの結果から、iPSC-TEC 移植によって B6 皮膚移植片特異的に生着期間が延長し、iPS 細胞と同一の遺伝的背景を有する皮膚移植片の生着期間延長に寄与したことが示唆された。

以上の機能解析から、分化誘導によって得られた細胞は in vivo において T 細胞の分化成熟に寄与することが示唆された。また、他家マウスへ iPS 細胞由来胸腺上皮細胞を移植した後、皮膚移植を行ったところ、iPS 細胞を同一の遺伝的背景を持つ皮膚移植片の生着期間が有意に延長するという結果を得た。

【考察】

過去に行われた多能性幹細胞由来胸腺上皮細胞誘導に関する研究においても、その分化誘導効率は克服すべき課題として考えられてきた。本研究では遺伝子導入を用いることで分化誘導効率の向上を示した。これは分化誘導中の細胞の分化運命決定を Foxn1 の導入によって胸腺上皮細胞へ方向付けした結果と考えられた。一方で作製した胸腺上皮細胞の移植は、同一 MHC 遺伝子型の皮膚移植編の生着期間を延長させたが、長期に渡る免疫制御は困難であった。したがって、iPS 細胞由来胸腺上皮細胞の移植時または皮膚移植時におけるレシピエントの前処置方法などを最適化することで、長期間に渡って皮膚移植片の生着期間が延長できる可能性が考察された。

【結論】

本研究では、転写因子 Foxn1 を遺伝子導入したマウス iPS 細胞を用いて、胸腺上皮細胞の分化誘導効率が上昇することが明らかとなり、また iPS 細胞由来胸腺上皮細胞の移植によって、iPS 細胞由来 MHC 特異的に皮膚移植片の生着期間が延長されることを示した。前述した通り、これまでに多能性幹細胞から胸腺上皮細胞の誘導は ES 細胞および iPS 細胞を用いた手法で報告されているが、Foxn1 導入を用いた分化誘導法ならびに作製した胸腺上皮細胞による移植免疫制御、とくに免疫学的に正常な個体を用いて、「多能性幹細胞を用いた移植医療における免疫制御」の検討はこれまで行われておらず、本研究によって初めて示された。