



Title	多能性幹細胞を用いた組織・細胞移植医療における免疫制御法の開発に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	辻, 飛雄馬
Description	配架番号 : 2470
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13456号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74718
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hyuma_Tsuji_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 辻 飛雄馬

学 位 論 文 題 名

多能性幹細胞を用いた組織・細胞移植医療における免疫制御法の開発に関する研究
(Development of an immune-regulation
in the era of regenerative medicine using pluripotent stem cell)

【背景と目的】

現在想定されている多能性幹細胞を用いた再生医療では、HLA ホモの iPS 細胞を使用することが計画されている。しかしながら、この iPS 細胞ではカバーできない HLA 型保持者やマイナー抗原による拒絶反応が危惧され、移植時には免疫抑制が必要になる可能性が示唆されている。我々は、移植医療に多能性幹細胞を用いる時代を想定し、多能性幹細胞から移植片および拒絶反応抑止に資する免疫抑制性細胞を同時に作製し、アロ移植系に適用するというモデルを提案した。これまでに、マウス ES/iPS 細胞から誘導したマクロファージ様免疫抑制性細胞を拒絶反応抑止目的の細胞として用いることにより、同 ES/iPS 細胞から誘導した心筋細胞のアロ移植における拒絶反応を抑えることに成功している。

上記モデルの前臨床試験として、小型霊長類コモンマーモセットの ES 細胞よりマクロファージ様免疫抑制細胞が誘導可能かどうか検討した。コモンマーモセットは新世界ザルに分類される小型の霊長類であり、ヒトに近縁なことや、体サイズが実験上の取り扱いに適していることなど、医学研究において有用な形質をもつことから近年新たな実験動物として注目されている。

また、上記モデルをさらに発展させるため、マウス iPS 細胞より造血幹細胞の誘導を試みた。造血幹細胞を用いた mixed chimerism は現時点では最も安定した免疫寛容誘導法であり、再生医療時代の免疫制御においても適応可能と考え、mixed chimerism の誘導に必要な iPS 細胞由来造血幹細胞の作製を目的として研究を行った。

【方法と結果】

コモンマーモセット ES 細胞よりミエロイド系の血球を誘導するため BMP4、VEGF、SCF、GM-CSF を添加して培養した。分化誘導後 20 日目には培養ディッシュに弱く付着する単球様の細胞が得られた。この細胞をマクロファージに成熟させるため CSF-1 を、抑制性の機能を獲得させるため IL-4 を添加してさらに 5 日間培養した。その結果、培養ディッシュに強く付着するマクロファージ様の細胞 (M(IL-4)) が得られたが、免疫を抑制するような機能は有していなかった。しかし、エピジェネティックな変化を誘発する低分子化合物 DZNep を添加することにより抑制型の表現型を示すマクロファージを誘導することに成功した (M(DZNep))。M(IL-4) と M(DZNep) の細胞表面抗原をフローサイトメトリーで比較すると両方で CD45、CD14、CD11b が発現しており、マクロファージ様の細胞であることが示唆された。また、抑制性の因子である PD-L1 の発現が M (DZNep) でのみ認められた。次に qPCR で遺伝子発現を比較すると *tgfb1* が M(IL-4) に比べ M(DZNep) で有意に高く、*il-10* の発現が M(DZNep) でのみ見られた。M(DZNep) が抑制性の因子を発現していることがわかったため、コモンマーモセットの細胞に抑制能を発揮出来るかどうか、アロジェニック

な PBMC 同士による MLR で検討した。M(DZNep)を PBMC 同士の混合培養に加えた場合、PBMC 同士および M(IL-4)を加えた混合培養に比べ、有意に増殖を抑制することが示された。

マウスの iPS 細胞を用いた先行研究や発生学の知見を参考に、BMP4 や VEGF 等のサイトカインの添加により血球を誘導した。誘導した細胞は、汎血球マーカーである CD45、造血幹細胞の細胞表面マーカーである cKit や Sca1 を示す集団を含んでいた。この細胞集団はストローマ細胞との共培養により造血幹細胞の特徴である血球多系列への分化能を有していることが認められた。この誘導した細胞を、放射線照射で前処置したコンジュニクマウスへの移植実験を行い、生体への生着能力を検討した。移植から 1 カ月後に末梢血を解析したところ、移植した iPS 細胞由来の血球が検出された。しかし、chimera 率は著しく低く、免疫寛容を誘導しうるほどの生着は見られなかった。造血幹細胞はその cell cycle の差異により生体への生着能力に違いがあるという報告がある。そのため、生着能力の低さを改善するため、cell cycle に着目した。Cell cycle の観察を簡便化するため、Fucci システムが遺伝子導入されているマウスより iPS 細胞を作製した。Fucci-iPS 細胞より造血幹細胞を分化誘導した所、S/G2/M 期の割合が高く、cell cycle が亢進していることが認められた。Cell cycle の違いで細胞を分取した所、cell cycle が亢進している細胞と cell cycle が亢進していない細胞では T 細胞への分化能と各種ミエロイド系列への多分化能に差異があることがわかった。

【考察】

本研究では、コモンマーマセットの ES 細胞から抑制性マクロファージの作製にエピジェネティックな変化を誘発する低分子化合物 DZNep を使用した。DZNep はマクロファージの細胞株を抑制型へ傾けるだけではなく、効率的な iPS 細胞の作製に有用であることが報告されている。DZNep の機能はユークロマチン化を引き起こし、様々な遺伝子の活性化を促進するものである。これらの報告を考慮すると、本研究で確立した IL-4 と DZNep を共に添加するプロトコルは、IL-4 で誘導される抑制型を特徴づけるクロマチン構造を、DZNep がユークロマチン化を促進することによって、より抑制型の表現型を増強したと考えられる。また、なぜ DZNep の添加により種々の抑制因子が発現・産生されるようになるのか解明する必要がある。今後、ヒト多能性幹細胞からも同様の誘導プロトコルで免疫抑制性マクロファージが産生可能か検討する必要がある。

マウス iPS 細胞由来造血幹細胞を作製したところ、cell cycle が亢進しているがわかった。造血幹細胞はその stemness の維持に quiescence が重要であると報告されているため、誘導時の培地に添加した血清やサプリメント、サイトカインなどの増殖因子により cell cycle が亢進し、生着能力が低下している可能性が指摘される。そのため、この部分を調節出来れば生着能力が上昇する可能性がある。さらに、なぜ cell cycle 動態により分化能に差異が生まれるのか、機序の解明が望まれる。また、ヒト多能性幹細胞でも同様の現象が見られるのか検討する必要がある。

【結 論】

コモンマーマセット ES 細胞から、アロジェニック刺激を受けた PBMC の増殖を抑制可能な、免疫抑制性マクロファージを分化誘導した。コモンマーマセット ES 細胞から免疫抑制性マクロファージを分化誘導出来るようになったことにより、多能性幹細胞を用いた再生医療における、細胞移植による免疫制御法の研究が非ヒト霊長類モデルで検討できるようになった。

マウス iPS 細胞由来造血幹細胞に近い表現型を持つ細胞を作製したがマウス生体には生着しなかった。また、この細胞が cell cycle 動態により T 細胞への分化能とミエロイド系列への多分化能に差異があることがわかった。この知見により効率的な iPS 細胞由来血液製剤の産生に繋がる可能性がある。