HOKKAIDO UNIVERSITY

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［全文の要約］
Author(s)	辻, 飛雄馬
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：2470 他
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/2115/74719
Type	doctoral thesis
File Information	Hyuma_Tsuji_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文　（要約）

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)

2019 年 3 月

北海道大学

辻　飛雄馬

学　位　論　文　（要約）

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）

2019 年 3 月

北海道大学

辻　飛雄馬

学位論文の要約

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。

これまで、拒絶反応の問題を克服するためにカルシニューリン阻害薬やステロイド、ミコフェノール酸モフェチル、リツキシマブなどのモノクローナル抗体等様々な免疫抑制剤が開発されてきた。先人たちの研究により開発されてきた免疫抑制剤により移植臓器の生着率はその黎明期に比べ格段に向上したものの、その長期間の服用により、感染症や新規腫瘍発生のリスク、カルシニューリン阻害薬の内服においては腎機能障害などの副作用の問題が浮き彫りとなってきている。また、現在の免疫抑制剤では超長期的には慢性拒絶反応による移植片の欠落に至ることもある。そのため、移植された臓器に対する長期かつ特異的な免疫抑制、つまりは免疫寛容の誘導が求められている。細胞療法は免疫寛容を誘導することが可能性となりうる、有望な戦略の 1 つである。基礎研究においては、抑制性マクロファージや制御性 T 細胞、NKT 細胞など様々な種類の細胞療法が免疫寛容の促進に効果的であることが報告されている。そこで我々は、着実に現実のものとなってきている多能性幹細胞を用いた移植医療において、細胞療法を用いた新しい免疫制御法の開発が重要であると考えた。

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発案した。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。

本研究は 2 部構成となっている。第 1 部において、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。第 2 部においては、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】

第 1 部

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細胞が得られた。この細胞は形態観察やフローサイトメトリーの解析により、単球様の細胞であることがわかった。

この単球様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。簡便な系として、マウスの T 細胞を用いた混合リンパ球試験で M(IL-4)が免疫抑制能を有するか調べたところ、免疫を抑制するような機能は有していなかった。近年、マクロファージの細胞株である RAW264.7 や、骨髄細胞由来マクロファージにエピジェネティックな変化を誘発する低分子化合物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が誘導されることが報告されている。そこで、上記のような化合物がコモンマーモセット ES 細胞から誘導したマクロファージにも同様の効果を及ぼすのか検討した。分化誘導 20 日目より、GM-CSF、CSF-1 および IL-4 と同時にエピジェネティックな変化を誘発する低分子化合 3-deazaneplanocin A（DZNep）を培養系に添加したところ、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者で 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 *tgfβ1* 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、アロジェニックなコモンマーモセット末梢血単核球による MLR で検討した。M(DZNep)を PBMC 同士の混合培養に加えた場合、末梢血単核球および 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。

第 2 部

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ェニッ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複数あり、cell cycle が亢進していない集団がより生着能力が高いことが報告されている。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(Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator)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。一般的に幹細胞ほど多分化能が高いこと、そして、造血幹細胞は cell cycle が亢進していないほうが幹細胞としての特徴を有していることから、cell cycle が亢進していない細胞の方がより多分化能が高いと推測していたが、異なる結果となった。

【考察】

第 1 部

本研究では、コモンマーモセットの 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。

第 2 部

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】

コモンマーモセット 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。コモンマーモセット 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 細胞由から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。