



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
Author(s)	大塚, 亮
Description	配架番号 : 2444
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13430号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13430
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/76533
Type	doctoral thesis
File Information	Ryo_Otsuka.pdf



学 位 論 文

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

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

目次

論文発表目録および学会発表目録.....	1
要旨.....	2
略語表.....	5
緒言.....	7
方法.....	11
結果.....	23
1. iPS 細胞由来 TEC の分化誘導	23
2. Tet-On システムを用いた時期特異的 Foxn1 発現誘導.....	38
3. EF1 α プロモーターを用いた Foxn1 発現誘導	40
4. Foxn1 導入 iPS 細胞を用いた分化誘導と表現型解析	41
5. Foxn1 導入 iPS 細胞から分化誘導した TEC の遺伝子発現解析	42
6. Foxn1-iPSC 由来 TEC の機能解析-1	44
7. Foxn1-iPSC 由来 TEC の機能解析-2	46
8. Foxn1-iPSC 由来 TEC の機能解析-3	48
10. iPS-TEC 移植による拒絶反応制御.....	50
考察.....	52
結論.....	57
謝辞.....	58
利益相反.....	58
引用文献.....	59

論文発表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。

Ryo Otsuka, Haruka Wada, Hyuma Tsuji, Airi Sasaki, Tomoki Murata, Muhammad Baghdadi, and Ken-ichiro Seino

Efficient generation of thymic epithelium from induced pluripotent stem cells that prolongs allograft survival

Nature Biotechnology submitted

本研究の一部は、以下の学会に発表した。

1. 大塚亮、和田はるか、ムハンマド・バグダーディー、辻飛雄馬、前田葵、清野研一郎

転写因子導入を用いた iPS 細胞由来胸腺上皮細胞の新規分化誘導法

第 17 回 日本再生医療学会総会 2018 年 3 月 21-23 日 神奈川

2. 大塚亮、和田はるか、辻飛雄馬、佐々木愛里、村田智己、ムハンマド・バグダーディー、清野研一郎

遺伝子導入技術を用いた iPS 細胞由来胸腺上皮様組織の作製

第 28 回 Kyoto T Cell Conference 2018 年 6 月 15-16 日 京都

要旨

【背景・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ことが、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。

【実験モデル、材料および方法】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示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。

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

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 MHC 型遺伝子型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片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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AFE	Anterior foregut endoderm
APECED	Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovine serum albumin
CHIR	CHIR99021
CIAP	Calf intestinal alkaline phosphatase
CMV	Cytomegalo virus
CTLA4-Ig	Cytotoxic T lymphocyte antigen 4-immunoglobulin
Cyc	Cyclopamine
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DE	Definitive endoderm
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EF1a	Elongation factor 1a
EGFP	Enhanced green fluorescence protein
ES	Embryonic stem
FBS	Fetal bovine serum
FGF8	Fibroblast growth factor 8
FT	Fetal thymus
HLA	Human leukocyte antigen
iPS	induced Pluripotent stem
IRES	Internal ribosomal entry site
KGF	Keratinocyte growth factor
LDN	LDN193189
LIF	Human leukemia inhibitory factor
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MHC	Major histocompatibility complex
MST	Median survival time
NK	Natural killer
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PE	Pharyngeal endoderm
PEG	Polyethylene glycole

PI	Propidium iodide
RA	Retinoic acid
rtTA	Reverse tetracycline trans activator
SB	SB431542
SCD	Serum-containing differentiation medium
SFD	Serum-free differentiation medium
TBS-T	Tris-buffered saline-tween20
TCR	T-cell receptor
TEC	Thymic epithelial cell
TRE	Tetracycline responsive element
UTR	Untranslated region

緒言

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 (embryonic stem) 細胞や iPS (induced pluripotent stem) 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。本邦では、加齢黄斑変性患者、パーキンソン病患者に対して iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞、ドーパミン産生細胞の移植が行われ、今後の治療応用への期待がますます高まっている。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測される。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、現在想定されているのは iPS 細胞ストック事業である。当該事業では、予め保存された他人由来 iPS 細胞を用いて移植を行う。ストックされる iPS 細胞は、拒絶反応が起きる可能性が低いとされるホモ接合型の Human leukocyte antigen (HLA、ヒト白血球抗原) 遺伝子型をもつドナーの細胞から作製される (Okita et al., 2011)。すなわち、HLA-A、B、DRB1 遺伝子座がホモ接合型である iPS 細胞を多種類保存し、移植の際はレシピエントの HLA 型と少なくとも片アリルは同じ HLA 型をもつ iPS 細胞を用いることで、拒絶反応が起きる可能性の低い移植を目指すこととしている。京都大学 iPS 細胞研究所は、これまでに日本人の HLA ハプロタイプ頻度 1、2、3 位の HLA-A、B、DRB1 ハプロタイプを有する iPS 細胞を作製したこと報告している。

臓器移植後の生着成績には HLA-A、B および DR の 3 遺伝子座のドナー・レシピエント間の相同性が強く関与していることが知られている (Taylor et al., 2005)。ドナーの HLA 遺伝子型がホモ接合型であれば、これらの 3 遺伝子座がミスマッチである確率が低下するため、結果としてレシピエントに適応できる可能性が高まることとなる。ただし HLA のメジャーな遺伝子座が適合していたとしても、その他のタンパク質抗原、すなわちマイナー抗原などの不一致により拒絶反応が引き起こされうるとは十分に推察される。さらに、どのマイナー抗原が拒絶の原因となりうるかは、ドナー・レシピエントの組み合わせによってことなるため、正確に拒絶の程度を予測するのは困難である。

iPS 細胞ストックモデルに即した研究結果はこれまでにいくつかの研究グループから報告されている。大阪大学の Kawamura らのグループは、MHC (Major histocompatibility complex: 主要組織適合遺伝子複合体) がホモ接合型のカニクイザル由来 iPS 細胞から心筋細胞を作製し、MHC の片アリルをマッチさせたアロジェニック (同種異系、アロ) レシピエントへ移植する実験を行った (Kawamura et al.,

2016)。その結果、確かに iPS 細胞ストック事業が想定している通り、ドナー・レシピエント間で MHC が完全にミスマッチの場合よりも免疫原性が低く長期生着が達成できることが示されている。しかしながら、この報告では同時に、同じ移植モデルで免疫抑制剤を投与しない群では移植された組織が拒絶されることも示している。加えて、京都大学の Ichise らはヒト MHC ホモ接合型 iPS 細胞に対する免疫応答をヒト末梢血由来 NK 細胞を用いて検討し、MHC ヘテロ接合型由来の NK (natural killer) 細胞は MHC ホモ接合型の iPS 細胞由来組織に対して免疫応答を起こすことを報告した (Ichise et al., 2017)。これらの報告からも、MHC ホモドナーからヘテロレシピエントへの移植に際しても、免疫抑制の必要性が考察される。これまで優れた免疫抑制剤が多数開発され、拒絶反応を長期に制御する事が可能になってきた (Halloran, 2004)。ここで問題となるのは、長期の免疫抑制剤使用によって生じる様々な副作用である。その中には日和見感染症や悪性腫瘍の新規発生など免疫抑制状態の影響と思われる病態のみならず、薬剤の作用がインスリン分泌や応答性への影響も示唆されている (Øzbay et al., 2012)。

これらの問題を解決する手段として試みられてきたのが、レシピエント免疫系のドナー抗原に対する寛容誘導である。実際これまでに、制御性 T 細胞を始めとする免疫抑制性の細胞や、副刺激分子阻害により誘導された Anergic T 細胞などを用いて研究が行われてきた (Bashuda et al., 2005; Morelli and Thomson, 2007; Wood et al., 2012)。またドナー造血幹細胞をレシピエントへ移植することによって、骨髄のキメラ状態 (Mixed chimerism とよばれる) を誘導し、ドナーに対する免疫寛容が達成されることが報告されている (Ildstad and Sachs, 1984)。現在この手法は海外の一部の施設で臨床応用がなされ、免疫抑制剤からの離脱に成功した例がいくつか報告されている (Alexander et al., 2008; Kawai et al., 2008, 2014; Scandling et al., 2008)。一方で、前述の通り、iPS 細胞を用いた移植においても拒絶反応が予測されるが、その制御法や回避法についてはほとんど検討されてこなかった。

多能性幹細胞を用いた移植医療・細胞治療は、現行の臓器移植とは大きく異なり、技術上ドナーとなる細胞の遺伝子改変が可能である。この特性を利用し、PSC 由来組織に対する免疫応答を回避しようとする試みが報告されている。とくに、ドナーとなる多能性幹細胞に T 細胞を抑制する分子である CTLA4-Ig (Cytotoxic T lymphocyte antigen 4-immunoglobulin) や PD-L1 (Programmed death-ligand 1) を発現する機構を導入したもの、また多能性幹細胞の MHC に改変を加えることで、レシピエントの免疫系の標的となることを逃れさせる試みが行われている (Gornalusse et al., 2017; Szot et al., 2015)。しかし、これらの手法はレシピエントの免疫系へ介入するものではないため、抗移植片応答を起こす素地は残されたままである。したがって、

長期的な移植片の生着を達成するためには、多能性幹細胞を用いた移植医療においても、免疫寛容の誘導が期待される。

アロ移植における免疫寛容誘導に重要な役割を果たすと考えられる臓器の一つは、胸腺である。胸腺は、T細胞の産生に重要なリンパ組織である。胸腺内でT細胞が作られる過程においては、骨髄に由来するT前駆細胞から、自己・非自己にかかわらず様々な抗原を認識するT細胞受容体（T-cell Receptor、TCR）のレパトアおよびそれらTCRを有するT細胞が作られる（Takahama, 2006）。TCRは非常に多様性に富むという性質と引き換えに、自己反応性という危険性を併せ持って生み出される。未熟なT細胞はその分化の過程で、自己抗原とMHCとの組み合わせに強く反応するTCRを持つT細胞のほとんどが、Negative Selectionと呼ばれる機構によりアポトーシスに導かれ排除されること（Clonal deletion）は広く知られている。また一部の自己反応性のT細胞は胸腺内での選択により制御性T細胞へと誘導されることも知られている（Baldwin et al., 2004）。ごく一部の自己反応性T細胞は、Negative Selectionを受けることなく末梢へと出現するが、そのような細胞に対しては、アナジーやアポトーシス、または前述した制御性T細胞などにより末梢で寛容が誘導されていると考えられる。

胸腺内でこのような特異な細胞選択を担っているのは、胸腺上皮細胞（TEC, Thymic epithelial cell）をはじめとする抗原提示細胞である。胸腺内にはTEC以外にも抗原提示細胞として複数のフェノタイプ（Migratory, Resident, Plasmacytoid）の樹状細胞およびマクロファージが存在している。これらの細胞はT細胞に対して自己抗原-MHC複合体の提示を行い、自己反応性TCRを持つT細胞をClonal deletionさせるようにはたらく（Klein et al., 2014）。前述した骨髄移植によるドナーに対する免疫寛容誘導の機構は、ドナー骨髄細胞に由来する樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞が胸腺内でペプチド-MHC複合体の提示を行い、ドナー抗原反応性TCRレパトアのDeletionに寄与しているためと考えられている（Tomita et al., 1994）。

TECを移植することによる免疫寛容の誘導は、アロ胎仔マウス由来の胸腺を、ヌードマウスに移植する系などで報告されている。アロ胸腺組織を移植されたヌードマウスでは、レシピエントのT前駆細胞がドナー胸腺グラフト内で分化成熟し、末梢に出現する成熟T細胞はドナーのMHCに対して寛容であることが報告されている（Jordan et al., 1985; Suzuki et al., 1989）。一方でこの胎仔胸腺移植は、免疫機能が正常なマウスに対して全くの移植前処置をすることなく移植した場合であっても、移植片（胎仔胸腺）の生着が達成可能であるが、末梢血中に存在するT細胞はドナー抗原へ対して寛容ではないことも報告されている（Gaykema et al., 1984）。このことはすなわち、新しく生成されるT細胞はドナーに対して寛容であると予想される

が、もともと個体内に存在している T 細胞は、新たに胸腺が移植されてもドナーに対して寛容にはなれないということを示唆している。これらの報告を合わせて考察すると、免疫機能が正常なマウスにおいても一時的な成熟 T 細胞除去後の胸腺移植により、その後骨髄に由来する T 前駆細胞がレシピエントまたはドナーの胸腺へ移入し、選択を受け、ドナー非反応性 T 細胞およびドナー抗原を認識する TCR を有する制御性 T 細胞が末梢へと出現してくることが推測される。したがって、レシピエントすなわちアロ抗原に対する中枢性および末梢性免疫寛容を誘導できる可能性がある。また過去に行われたこれらの研究では、Deoxyguanosine を用いた処理によって胎仔胸腺内の血液系細胞を取り除いた胸腺組織、すなわち TEC を主体とする組織の移植によって行われている。したがって、アロ TEC の移植が寛容誘導に寄与したと考えられる。

このように、免疫寛容の誘導にあたって胸腺は非常に魅力的な臓器であるが、胸腺は加齢に伴って退縮する組織であることからドナーから得ることは難しく、免疫寛容源組織として用いるには障壁が大きい。しかしながら、多能性幹細胞を用いた移植医療においては、ドナーである多能性幹細胞の多分化能を前提とすると、*in vitro* で TEC を作出することが可能である。すなわち、移植片および TEC を同一の多能性幹細胞から分化誘導し、レシピエントへ移植するというアプローチが考えられる。このときレシピエントの体内で期待される現象は、レシピエント骨髄由来 T 前駆細胞がレシピエント TEC およびドナー多能性幹細胞由来 TEC 双方からの選択を受け、レシピエント・ドナーともに寛容な T 細胞もしくは制御性 T 細胞等が末梢へ出現してくることである。

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。TEC 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 (Inami et al., 2011; Lai and Jin, 2009; Parent et al., 2013; Sun et al., 2013)。また、TEC 移植によってアロ免疫応答の制御を試みた研究はこれまでなされてこなかった。以上の背景に基づき、本研究においては高効率な TEC 誘導法を確立し、多能性幹細胞とくに iPS 細胞由来胸腺組織による免疫制御能の検討を目的として研究を行うこととした。

方法

マウス

C57BL/6J (B6)、BALB/c、C3H/He (C3H)、129X1/SvJ Jms SLlc (129) および Balb/c^{nu/nu} は日本エスエルシーより購入した。C3129F1 マウスは C3H 雌と 129 雄の交配により得た。また本研究における動物実験は、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」のもと行った。(承認番号:17-0110)

iPS/ES 細胞培養

マウス iPS 細胞株は当研究室において樹立したものをを用いた (Wada et al., 2011)。iPS 細胞の維持培養はラミニン iMatrix-511 (ニッピ) をコートした細胞培養ディッシュを用いて行った。iPS 細胞の培養は、Non-feeder 培養液を用いた。

Non-feeder 培養液は、Advanced-DMEM (Advanced-Dulbecco's modified eagle medium, Thermo) と Nutrient mixture F12 Ham (F12, SIGMA) を 1:1 の割合で混合し、0.5×NeuroBrew21 (Miltenyi)、0.5×N2 サプリメント (富士フィルム和光純薬)、L-Glutamine を 0.6% (w/v)、非必須アミノ酸 (ナカライテスク) を 0.1 mM、ピルビン酸ナトリウム (ナカライテスク) を 1 mM、ペニシリン (ナカライテスク) を 10 U/ml、ストレプトマイシン (ナカライテスク) を 100 µg/ml の濃度で添加し、2-メルカプトエタノール (ナカライテスク) を 181 mM の最終濃度となるように添加した。また細胞の未分化性維持のため、Recombinant human leukemia inhibitory factor (LIF) 含有培養上清 (当研究室で作製) を 0.1% 加え作製した。

MEF の培養液は DMEM (和光純薬工業) に Fetal bovine serum (FBS) を 10% (v/v)、L-Glutamine を 0.6% (w/v)、非必須アミノ酸を 0.1 mM、ピルビン酸ナトリウムを 1 mM、ペニシリンを 10 U/ml、ストレプトマイシンを 100 µg/ml、2-メルカプトエタノールを 0.1 mM 添加し作製した。いずれの細胞培養も、CO₂ インキュベータ (37 °C, 5% CO₂/95% air) 内で行った。

培養細胞の継代は、次の手順で行った。まず培養液を除去し、PBS で洗浄した後、Trypsin (0.5 g/l-Trypsin 0.53 mmol/l-EDTA Solution、ナカライ) を加え 5 分間 CO₂ インキュベータ内に静置した。その後培養液を加え酵素反応の中和、およびピペッティングによる懸濁を行った。得られた細胞浮遊液を遠心用チューブへ回収し、400g で 5 分間遠心した。遠心後に上清を除去し、培養液を加え細胞を再浮遊した。この一部を細胞培養ディッシュに播種し再び培養を行った。

分化誘導培養

分化誘導の基礎培地は Serum-free differentiation medium (SFD) および Serum-containing differentiation medium (SCD) を用いた。SFD は Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) と F12 を 3:1 の割合で混合し、1×NeuroBrew21、1×N2 サプリメント、0.6% (w/v) L-Glutamine、0.1 mM NEAA、1 mM ピルビン酸ナトリウム、10 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、 4.5×10^{-4} M 1-Thioglycolate をそれぞれ示した最終濃度となるように加えて作製した。SCD は SFD の組成のうち NeuroBrew21 および N2 サプリメントの代替として 2% Fetal bovine serum を加えて作製した。

分化誘導は、下記の通り行なった。

- 誘導0日目
細胞培養ディッシュに 0.5% ゼラチン水溶液を加えてインキュベータ内に 30 分静置しコーティングを行った。その後、Trypsin を用いて剥離した ES または iPS 細胞を SFD で懸濁し播種した（細胞播種濃度：8000 個/cm²）。培養液へは 10 µM の最終濃度となるように Y-27632 (Adooq) を加えた。
- 誘導2日目
培養上清を除去し、PBS で洗浄した後 SCD を加えた。培養液へは Activin A (Biolegend) を 50 ng/ml、CHIR99021 (Adooq) を 3 µM の最終濃度となるように添加した。
- 誘導3日目および4日目
培養上清を除去し、PBS で洗浄した後 SFD を添加した。培養液へは Activin A を 50 ng/ml、LDN193189 (Adooq) を 0.1 µM の最終濃度となるように添加した。
- 誘導5日目
培養上清を除去し、PBS で洗浄した後、Trypsin を用いて細胞を剥離し、1/3 量の細胞を SFD で懸濁しラミニンでコーティングを行った培養ディッシュへ播種した。培養液へは FBS を 0.5%、SB431542 (Adooq) を 10 µM、LDN193189 を 0.1 µM、Y-27632 を 10 µM の最終濃度となるように添加した。また DE の分化誘導効率を解析するため、一部の細胞をフローサイトメトリーに付した。また遺伝子発現解析のため一部の細胞から RNA 抽出を行った。
- 誘導7日目、9日目および11日目
培養上清を除去し、PBS で洗浄した後、Trypsin を用いて細胞を剥離し、1/3 量の細胞を SFD で懸濁しラミニンでコーティングを行った培養ディッシュへ播種した。培養液へは FBS を 0.5%、Fibroblast growth factor 8 (FGF8) を 50 ng/ml、SB431542 を 10 µM、Retinoic acid (RA) を 0.1 µM、Y-27632 を 10 µM の最終濃度となるように添加した。遺伝子発現解析のため7日目、9日目、

1 1 日目の細胞のうち一部から RNA 抽出を行った。

● 誘導 14 日目

培養上清を除去し、PBS で洗浄した後、Trypsin を用いて細胞を剥離し、フローサイトメトリーによって TEC の分化誘導効率を解析した。また、*in vivo* への移植実験においてはセルソーターを用いて目的細胞集団を分取した。

その他詳細な分化誘導プロトコルの条件決定は結果にて示す。

RNA 抽出・cDNA 合成

培養細胞からの RNA 抽出は TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics GmbH) を用いて行った。また、cDNA 合成は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (東洋紡) を用いて行った。

Quantitative-PCR (qPCR)

培養細胞から抽出した RNA をもとに合成した cDNA を用いて、下記の手法により mRNA の発現を解析した。2×KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix

(KAPABIOSYSTEMS, Boston, MA) 、10 μM PCR プライマー (Forward および Reverse) 、cDNA を混合し、PCR (Step One Real-Time PCR System, Applied Biosystems) を行った。95°C で 10 分間の変性反応後、95°C で 15 秒間の変性反応、60°C で 1 分間の伸長反応を 40 サイクル行った。内部標準は *Gapdh* を使用した。qPCR に用いたプライマーの塩基配列を下に示す (表 1) 。

表 1 : qPCR に使用したプライマー配列

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Foxa2</i>	CATCCGACTGGAGCAGCTACTA	AGCGCCCACATAGGATGACAT
<i>Sox17</i>	AGAAACTGCAGACCAGAAGCTATCA	GCTCATTGTATCCATGAGGTGACA
<i>Cer1</i>	AGGAGGAAGCCAAGAGGTTC	CATTTGCCAAAGCAAAGGTT
<i>Oct4</i>	CTCGAACCACATCCTTCTCT	GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC
<i>Sox2</i>	GAGTGGAACCTTTTGTCCGAGA	GAAGCGTGACTTATCCTTCTTCAT
<i>Pax9</i>	TGGAACGTGGGGAACATTTCG	GCACGCAGTGAATGGATTGG
<i>Tbx1</i>	CAAGGCTCCGGTGAAGAAGA	TGGAACGTGGGGAACATTTCG
<i>Hoxa3</i>	GTCTCTCCCCCTCAAAGTGC	AGATCTTGATCTGGCGCTCG
<i>Foxn1</i>	CTTAAAGGTCAAAGAAGGAAAACACT	GGCTAACAAATAAGTTGGCTGAG
<i>Dll4</i>	GGAAGTACTGTGACCAGCCTAT	CACCATTTGACAGGGGTTG
<i>Ccl25</i>	TGCAACCTACGTGCTGTGAG	CATCACCATCCTGGGATGACC
<i>Gapdh</i>	TCAAATGGGGTGAGGCCGGT	TTGCTGACAATCTTGAGTGA

移植実験

● 腎被膜下移植

1×10⁵個のiPSC-TECと3×10⁴個のMEFを2 μlのSFDで懸濁し、SFD上に浮遊させた8 μmポアフィルター（ADVANTEC）上に添加し一晩培養を行った。形成された細胞塊をマウス腎臓皮膜下に5個/片腎となるように両腎に移植した。初期T前駆細胞を用いた実験では、1×10³個のT前駆細胞を上記iPSC-TECおよびMEFと混合後2 μlのSFDで懸濁し、SFD上に浮遊させた8 μmポアフィルター（ADVANTEC）上に添加し一晩培養を行った。移植完了後、腹膜および皮膚は針付縫合糸を用いて閉創した。

● 皮膚移植

ドナーマウス（B6、BALB/cまたはC3129F1）の耳介皮膚を移植片とした。移植床はレシピエントマウスの背部皮膚を一部円形状に切除し作製した。

すべての移植実験は、レシピエントとなるマウスの十分な麻酔下にて行った。麻酔は下記に示す三種混合薬を用いて行った。また麻酔下のマウスは体温が低下するため、処置後覚醒まで保温下においた。

三種混合薬：3.5% ドミツール（日本全薬工業）、10% ミダゾラム（武田薬品）、12.5% ベトルファール（明治製菓ファーマ）含有生理食塩水

免疫蛍光染色

培養細胞の染色は以下の方法で行った。培養上清を除去しPBSで洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドを用いて15分間室温で固定を行った。その後0.05% Tween20 / トリス塩酸緩衝液（Tris-buffered saline-tween20、TBS-T）により2回洗浄を行ったのち、ブロッキング液（1% Bovine serum albumin（BSA）/1% Block Ace/TBS-T）を用いてブロッキングを行った。1次抗体は抗体希釈液（1%BSA/TBS-T）を用いて200倍に希釈して添加し、4℃で一晩反応させた。1次抗体反応後、TBS-Tを用いて5分間×4回の洗浄を行った。抗体希釈液を用いて2次抗体を200倍希釈、核染色に用いたDAPIを2 μg/mlの濃度になるように希釈してサンプルに滴下し、4℃遮光下で60分間反応させた。2次抗体反応後、4回洗浄を行い、VECTASHIELD

（Vector Laboratories）を用いて封入を行った。蛍光観察は蛍光顕微鏡 Zeiss Observer Z1（Zeiss）を用いて行い、蛍光画像はAxioVisionソフトウェア（Zeiss）を用いて撮影した。免疫蛍光染色に用いた抗体を表2に示す。

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーはCytomics FC500 (Beckman Coulter、Brea、CA) またはFACS Canto II (BD Bioscience) を用いて行った。セルソーティングはFACS Aria II (BD Bioscience) を用いて行った。得られたデータの解析にはFlowJo (Tree Star) を用いた。フローサイトメトリーおよびセルソーティングに用いた抗体を (表 2) に示す。死細胞染色はPropidium iodide (PI) または4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) を用いて行った。

表 2：免疫蛍光染色およびフローサイトメトリーで用いた抗体

Antibody	Conjugation	Clone	Supplier
EpCAM	APC, Biotin	G8.8	Biolegend
Ly51	PE-Cy7, Biotin	6C3	Biolegend
DII4	APC, Biotin	HMD4-1	Biolegend (APC) , Miltenyi (Biotin)
c-Kit	APC	2B8	Biolegend
Cxcr4	PE	L276F12	Biolegend
CD3ε	PE	145-2C11	eBioscience
CD4	FITC, PE	RM4-5	Biolegend
CD8	FITC, PE	53-6.7	eBioscience
CD11b	FITC	M1/70	eBioscience
CD11c	FITC	HL3	BD Pharmingen
CD19	FITC	MB19-1	eBioscience
CD25	PE	3C7	Biolegend
CD45.2	FITC	104	Biolegend
Gr-1	FITC	RB6-8C5	eBioscience
NK1.1	FITC	PK136	eBioscience
Sox2	AlexaFluor488	245610	BD Bioscience
Foxa2	None	Rabbit polyclonal	MERCK
anti-mouse IgG	AlexaFluor488	Goat polyclonal	Molecular Probes
anti-Rabbit IgG	Alexafluor555	Goat polyclonal	Molecular Probes

Tet-On による Foxn1 発現 iPS 細胞株の作製

● マウス Foxn1 クローニング

Tet-On による Foxn1 発現システムを構築するに当たり、以下2つのプラスミドを Addgene より入手した

pTet-IRES-EGFP : Addgene Plasmid #64238

pLenti CMV rtTA3 Blast (w756-1) : Addgene Plasmid #26429

初めに、pTet-IRES-EGFP ヘマウス Foxn1 のクローニングを行った。pTet-IRES-EGFP を下記の反応液組成において 37°C で 4 時間制限酵素処理の後、フェノールクロロホルム抽出を行った。

TOYOB0 High Buffer (TOYOB0)	5 μ l	
Plasmid	2.1 μ l	(10 μ g)
BamH I (TOYOB0)	3 μ l	(36 units)
DW	39.9 μ l	
		50 μ l

制限酵素処理を行ったプラスミドを下記の反応液組成において 37°C で 4 5 分間、Calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) を用いて脱リン酸化処理の後、フェノールクロロホルム抽出を行った。

CIAP Buffer (TOYOB0)	10 μ l	
Plasmid (pTet)	20 μ l	(16 μ g)
CIAP (TOYOB0)	2 μ l	(5 units)
DW	68 μ l	
		100 μ l

次にマウス胸腺 cDNA から PCR により Foxn1 配列を増幅した (プライマー配列を表 3 へ示す)。PCR 産物は下記の反応液組成において 37°C で 60 分間制限酵素処理の後、フェノールクロロホルム抽出を行った。

TOYOB0 High Buffer	5 μ l	
BamH I	3 μ l	(36 units)
PCR product	42 μ l	(2.3 μ g)
		50 μ l

PCR 産物およびレンチウイルスベクター作製用プラスミドのライゲーションは下記の反応液組成において 16°C で 30 分間行った。

Ligation high ver.2 (TOYOBO)	3 μ l	
PCR product	2.5 μ l	(125 fmol)
Plasmid (pTet)	0.5 μ l	(25 fmol)
	6 μ l	

ライゲーション産物はコンピテントセル DH5 α へ形質導入し、シングルコロニーを増幅した後、FastGene Xpress Plasmid PLUS Kit (日本ジェネティクス) を用いてプラスミド抽出を行った。また Foxn1 配列の挿入は制限酵素処理による断片化 DNA のサイズおよびシーケンシングによって検出した (プライマー配列を表 3 へ示す)。下記に作製したプラスミド (pTet-Foxn1-IRES-EGFP) の概略を示す。水色の部分が Foxn1 配列。プラスミドマップは SnapGene Viewer (GSL Biotech) を用いて作製した。

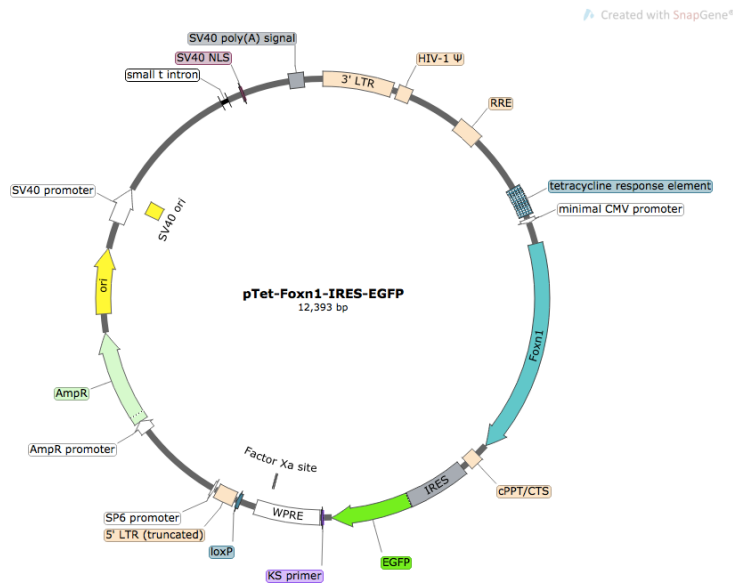


表 3：クローニング及びシーケンシングに使用したプライマー配列 - 1

Primer name	Primer sequence (5' → 3')	
BamHI-Foxn1-F	GCGGATCCAGCTGGCTTTCTTCGAGGC	Cloning
BamHI-Foxn1-R	GCGGATCCCAATATGGGGCAGCCAGCTA	Cloning
Foxn1-F	ACTCTTCCCAAAGCCCATCT	Sequencing
Foxn1-R	AGCAATGGGGTCTTTCCTCT	Sequencing
pCEP-F	AGAGCTCGTTTAGTGAACCG	Sequencing
IRES-R	AACGCACACCGGCCTTATTC	Sequencing

● レンチウイルスの作製

レンチウイルスは pLenti CMV rtTA3 Blast (w756-1) および作製した pTet-Foxn1-IRES-EGFP を Lenti-X293T 細胞株へトランスフェクションして作製した。パッケージングプラスミドは pMD2.G (Addgene) および psPAX2 (Addgene) を用いた。トランスフェクション試薬の組成は下記に示す。

pMD2.G	1.5 µg
psPAX2	3 µg
Virus Plasmid	6 µg
Polyethyleneimine MAX (Polysciences)	42 µg
OptiMEM (Gibco)	500 µl

Lenti-X293T へのトランスフェクション後 2 日目に培養上清を回収し、Polyethylene glycol (PEG) 溶液と 3:1 の割合で混合した。ウイルス:PEG 混合液は 4℃で一晩静置し、1500g で 30 分間遠心した。上清を除去した後、再び 1500g で 5 分間遠心し、残っている培養上清を除去した。形成されたペレットは血清不含細胞培養液を用いて懸濁し、細胞へ添加または-80℃で凍結保存した。

● iPS 細胞へのウイルス感染

維持培養下の iPS 細胞の培養上清を除去し、新たな培養上清を加えた。新鮮または解凍済みウイルス懸濁液を添加した。ウイルス添加翌日に培養上清を除去し、新たな培養液を加えた。ウイルス感染から 11 日後に 4 µg/ml Doxycycline を培養液に加え、48 時間培養後に EGFP の発現を解析した。

Foxn1 恒常発現 iPS 細胞株の作製

● マウス Foxn1 クローニング

マウス胸腺 cDNA から PCR により Foxn1 配列を増幅した（プライマー配列を表 3 へ示す）。PCR 産物は下記の反応液組成において 37°C で 60 分間制限酵素処理の後、フェノールクロロホルム抽出を行った。（NEB: New England Biolab）

Cut smart buffer (NEB)	6 μ l	
Not I -HF (NEB)	1.5 μ l	(30 units)
Asc I (NEB)	1.5 μ l	(15 units)
PCR product	45 μ l	(15 μ g)
	60 μ l	

レンチウイルスベクター作製用プラスミド pLenti-EF1 α -Myc-DDK-IRES-Puro (Origene) は下記の反応液組成において 37°C で 60 分間制限酵素処理の後、フェノールクロロホルム抽出を行った。

Cut smart buffer	5 μ l	
Not I -HF	2 μ l	(15 μ g)
Asc I	1 μ l	(10 units)
Lentivirus plasmid	10 μ l	(20 μ g)
	50 μ l	

PCR 産物およびレンチウイルスベクター作製用プラスミドのライゲーションは下記の反応液組成において 16°C で 30 分間行った。

Ligation high ver.2	3.5 μ l	
PCR product	2.6 μ l	(125 fmol)
Lentivirus plasmid	0.9 μ l	(25 fmol)
	7 μ l	

ライゲーション産物はコンピテントセル DH5 α へ形質導入し、シングルコロニーを増幅した後、FastGene Xpress Plasmid PLUS Kit（日本ジェネティクス）を用いてプラスミド抽出を行った。

Foxn1 配列の挿入は制限酵素処理による断片化 DNA のサイズおよびシーケンシングによって検出した（プライマー配列を表 3 へ示す）。

下記に作製したプラスミド（pLenti-EF1 α -Foxn1-IRES-Puro）の概略を示す。水色の部分が Foxn1 配列。プラスミドマップは SnapGene Viewer（GSL Biotech）を用いて作製した。

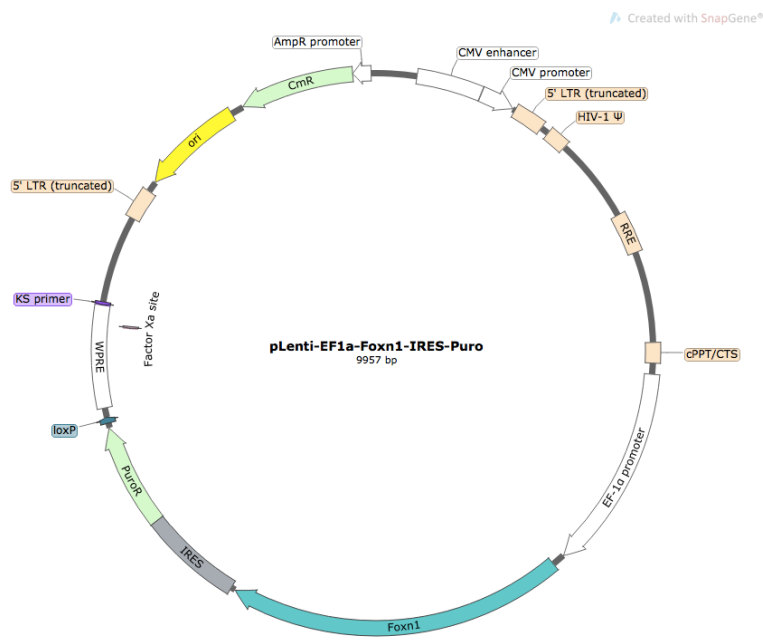


表 4：クローニング及びシーケンシングに使用したプライマー配列－ 2

Primer name	Primer sequence (5' → 3')	
Asc1-Foxn1-F	GCCGGCGCGCCATGGTGTCTGCTACTCCCTCCG	Cloning
Not1-Foxn1-R	GCGACGCGGCCGCTCACGCGTTCAAGCCAGAG- CCAATGGCTTTGA	Cloning
EF1 α -F	AGGAGGAAGCCAAGAGGTTC	Sequencing
IRES-R	AACGCACACCGGCCTTATTC	Sequencing

● レンチウイルスの作製

レンチウイルスはFoxn1 レンチウイルス作製用プラスミドベクターを Lenti-X293T 細胞株へトランスフェクションして作製した。パッケージングプラスミドは pMD2.G (Addgene) および psPAX2 (Addgene) を用いた。トランスフェクション試薬の組成は下記に示す。

pMD2.G	1.5 µg
psPAX2	3 µg
Virus Plasmid	6 µg
Polyethyleneimine MAX	42 µg
OptiMEM	500 µl

Lenti-X293T へのトランスフェクション後2日目に培養上清を回収し、Polyethylene glycol (PEG) 溶液と 3:1 の割合で混合した。ウイルス:PEG 混合液は 4℃で一晩静置し、1500g で 30 分間遠心した。上清を除去した後、再び 1500g で 5 分間遠心し、残っている培養上清を除去した。形成されたペレットは血清不含細胞培養液を用いて懸濁し、細胞へ添加または-80℃で凍結保存した。

● iPS 細胞へのウイルス感染

維持培養下の iPS 細胞の培養上清を除去し、新たな培養上清を加えた。新鮮または解凍済みウイルス懸濁液を添加した。ウイルス添加翌日に培養上清を除去し、新たな培養液を加えた。Foxn1 発現レンチウイルスベクター感染細胞は、感染後2日目から Puromycin を最終濃度 1 µg/ml となるように培養液に添加し、安定発現株を選択した。

TCR レパトア多様性解析

脾臓 T 細胞の TCRVβレパトアは TCR Vβ Screening Panel (BD Bioscience) を使用し、CD4 または CD8 陽性細胞中の TCR Vβ 2, 3, 4, 5.1/5.2, 6, 7, 8.1/8.2, 8.3, 9, 10^b, 11, 12, 13, 14, 17^a の存在比率を解析した。TCR レパトアの多様性は Shannon のエントロピーを用いて解析した (Hill, 1973; Morris et al., 2015)。エントロピー (H) を求めた式は下記のとおりである。

$$H \equiv \sum_{i=1}^n p_i \log_2 p_i$$

p_i : Frequency of Vβ repertoire i

統計解析

統計学的解析は JMP 14 (SAS Institute Inc.) を用いて行った。本研究における有意水準は 5% とし、p 値が 5% を下回る場合に統計学的に有意差ありと判断した。各図内には、 $p < 0.05$ の場合にアスタリスク 1 つ (*)、 $p < 0.01$ の場合にアスタリスク 2 つ (**) を付与した。具体的な統計処理方法は各結果の欄に記載した。

結果

1. iPS 細胞由来 TEC の分化誘導

TEC を分化誘導するにあたっては、先行文献を精査し分化誘導条件に有用と考えられる分子等を用い、Definitive endoderm (DE)、Anterior foregut endoderm (AFE)、Pharyngeal endoderm (PE) および TEC の分化誘導を各段階で結果を解析しながら条件決定を行った。次にそれらの細胞群の誘導条件検討結果を示す。

1-1. DE の分化誘導

1-1-1. Activin 添加による DE 分化誘導

胸腺は内胚葉由来の組織であり、種々の消化管および肝臓、膵臓、肺、甲状腺などと前駆細胞を共有している (Zorn and Wells, 2009)。これらの臓器は DE (胚胎内胚葉) と呼ばれる細胞集団から発生し、それぞれの機能細胞へと分化する。したがって、TEC 分化誘導を行う第一の段階として、DE の分化誘導条件の探索を行った。内胚葉への分化は高濃度の Activin A に暴露することにより促進されることが知られている (Yasunaga et al., 2005)。したがって *in vitro* での分化誘導において Activin による影響を検討するため、高濃度 Activin を加えた条件で分化誘導を行った (図 1 A)。このとき、PSC より分化の進んだ細胞集団 (Epiblast stem cell) への Activin の影響を検討する目的で、分化誘導 2 日目より Activin を加える条件も行った (図 1 B)。フローサイトメトリーによる解析の結果、DE マーカーである c-Kit, EpCAM, および Cxcr4 を発現する細胞の割合は Activin を 2 日目より加えた群で大きい傾向が見られた。さらに、Activin を誘導 0 日目より加えた条件においては、未分化細胞マーカーである SSEA1 を発現する細胞が多く残存していた。以上のことから、誘導 0 日目からの Activin の添加は分化刺激に加えて未分化維持にたいしても効果がある可能性が考えられたため、Activin の添加は誘導 2 日目より行うことが望ましいと判断した。

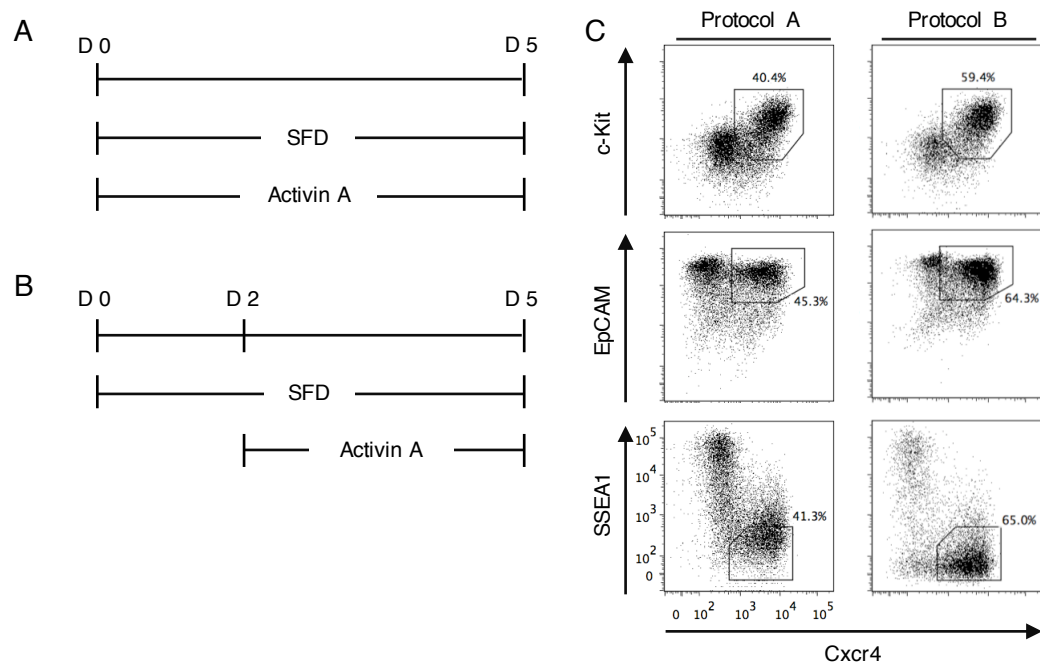


図 1. Activin 添加による DE 分化誘導

- A) B) 内胚葉誘導プロトコル。5 日間の分化誘導の期間のうち、Activin A を 5 日間作用させる群と、2 日目から添加する群を比較した。SFD (Serum free differentiation medium)。
- C) 培養 5 日に細胞を回収し行った内胚葉細胞のフローサイトメトリー。EpCAM、c-Kit、Cxcr4 を内胚葉細胞マーカー、SSEA1 を未分化細胞マーカーとして用いた。

1-1-2. Wnt/ β -catenin シグナル活性化による DE 分化誘導への影響の検討

ヒト ES 細胞および iPS 細胞を用いた DE 誘導において、Wnt/ β -catenin シグナルを活性化することによって誘導効率が向上することがこれまでに報告されている (Teo et al., 2014)。従って、本研究で用いるマウス iPS 細胞を用いた DE 分化誘導における Wnt/ β -catenin シグナル活性化の影響を検討するため、Activin に加えて Wnt/ β -catenin シグナルアゴニストである CHIR99021 (CHIR) を添加する実験を行った (図 2 A および B)。分化誘導 5 日目におけるフローサイトメトリーの結果、CHIR を添加した培養条件において c-Kit⁺Cxcr4⁺または EpCAM⁺Cxcr4⁺の DE 分画の割合が小さいという結果が認められた。一方で、SSEA1⁺細胞の割合は CHIR を加えた群で小さくなっていたことから、何らかの分化は促進していると考えられた (図 2 C)。このとき、中胚葉マーカー分子である Flk-1 の発現を解析したところ、CHIR 添加群で Flk1⁺Cxcr4⁺分画の割合が増大していた。この結果から、Activin とともに CHIR を 3 日間添加することにより未分化細胞の割合は低下するが、中胚葉系細胞への分化が促進されていることがわかった。

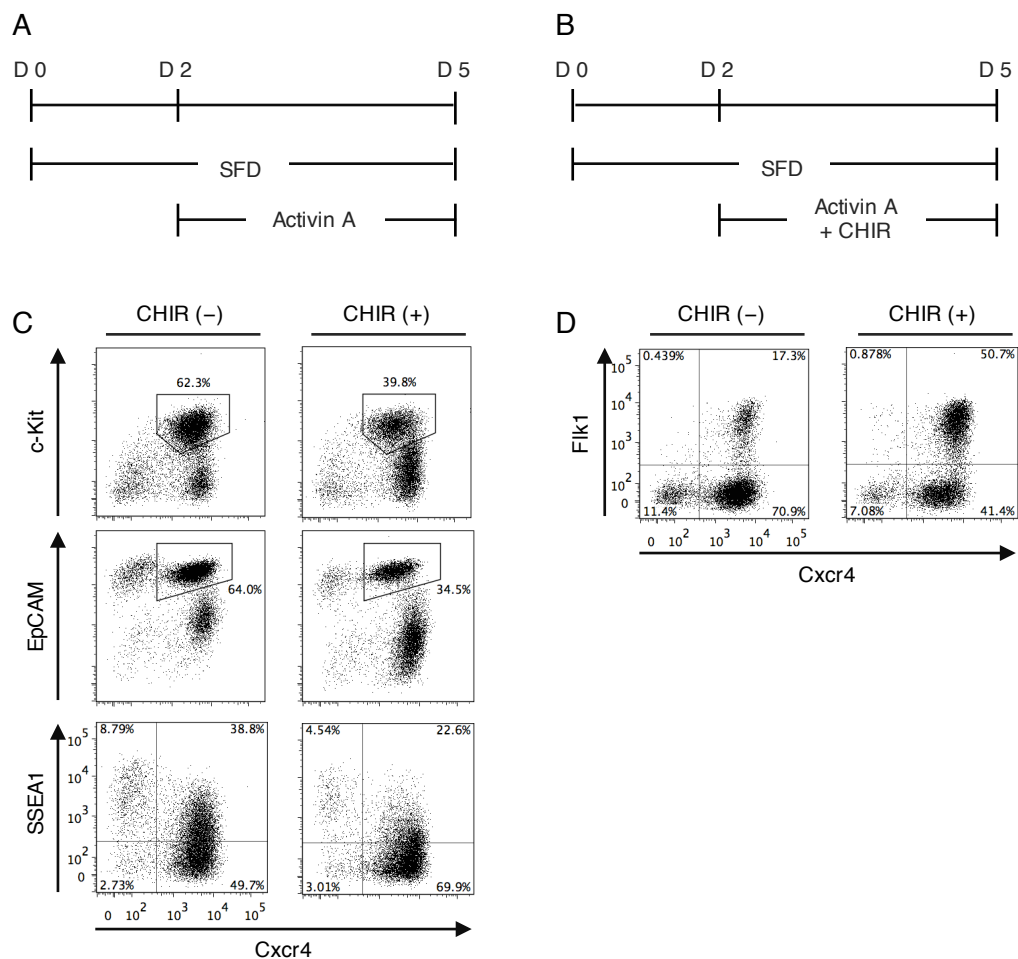


図2. Wnt/β-catenin シグナル活性化による DE 分化誘導への影響の検討

- A) B) 内胚葉誘導プロトコル。5 日間の分化誘導の期間のうち、CHIR99021 (CHIR) を誘導 2 日目から加える群と加えない群を比較した。
- C) 培養 5 日に細胞を回収し内胚葉細胞マーカーをフローサイトメトリーにて解析した。EpCAM、c-Kit、Cxcr4 を内胚葉細胞マーカー、SSEA1 を未分化細胞マーカーとして用いた。
- D) 培養 5 日の Flk-1 (中胚葉細胞マーカー) の発現をフローサイトメトリーにて解析した。

1-1-3. BMP シグナル阻害による DE 分化誘導への影響の検討

中胚葉系細胞への分化は、Bone morphogenetic protein (BMP) シグナルや、Wnt/ β -catenin シグナルによって活性化されることが知られている (Zorn and Wells, 2009)。CHIR を 3 日間培養条件に添加すると中胚葉系細胞への分化が促進されたことから、CHIR は分化のシグナルを与えるために 1 日間 (2 日目から 3 日目) 加え、培養 3 日目から BMP の機能を阻害するタンパク質である Noggin、または Wnt/ β -catenin シグナルアンタゴニストである IWR1 を添加して分化誘導を行った (図 3 A)。分化誘導 5 日目におけるフローサイトメトリーの結果、Noggin を添加した培養条件において高い割合で c-Kit⁺Cxcr4⁺ (Noggin : 88.3%、 IWR1 : 43.5%)、および EpCAM⁺Cxcr4⁺ (Noggin : 89.7%、 IWR1 : 33.9%) の分画の細胞が得られた (図 3 B)。このとき、両条件で得られた細胞の大部分は SSEA1⁻であった。また、中胚葉マーカーFlk1 を発現する細胞の割合は Noggin を添加した条件でより低下していた (Noggin : 0.44%、 IWR1 : 8.06%、図 3 B)。これらの結果から、CHIR による Wnt/ β -catenin シグナルの活性化ののち BMP シグナルを阻害することにより、DE への分化が促進されることがわかった。

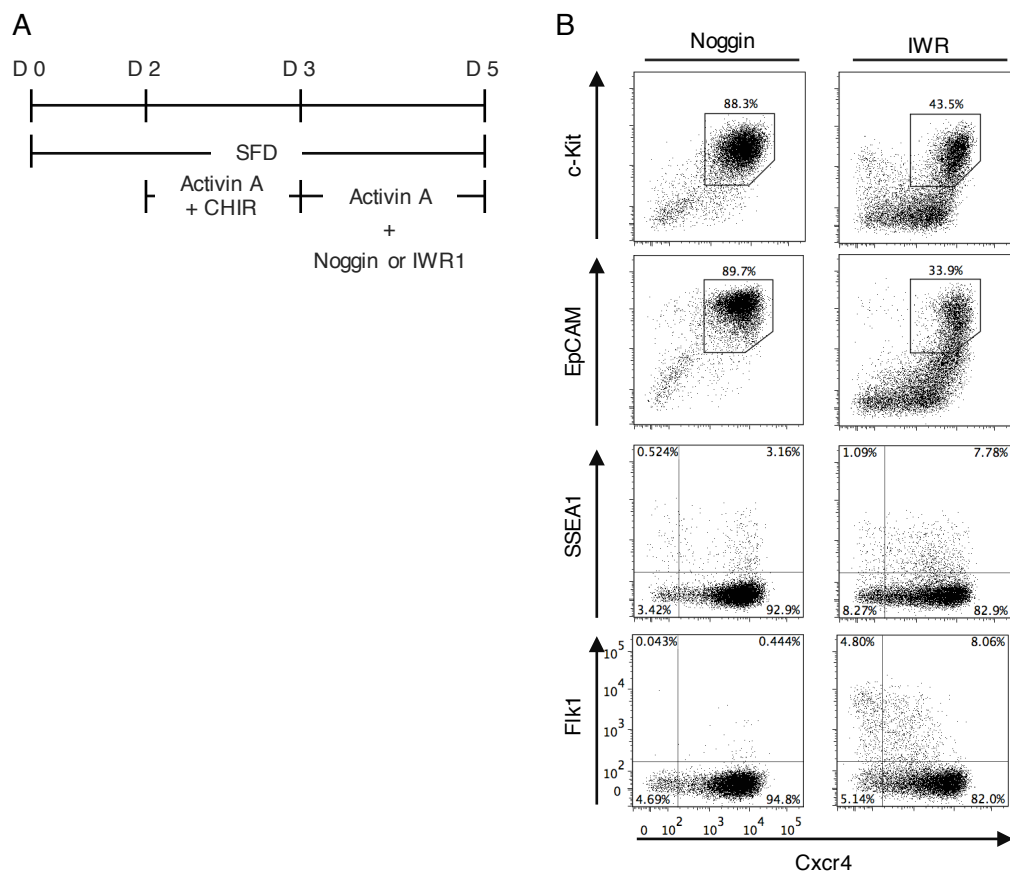


図3. BMP シグナル阻害による DE 分化誘導への影響の検討

- A) 内胚葉誘導プロトコル。5 日間の分化誘導の期間のうち、Noggin (BMP signal inhibitor) または IWR1 (Wnt signal inhibitor) を添加することによる内胚葉誘導への影響を検討した。
- B) 培養 5 日に細胞を回収し内胚葉細胞のフローサイトメトリー解析を行った。EpCAM、c-Kit、Cxcr4 を内胚葉細胞マーカー、SSEA1 を未分化細胞マーカー、Flk-1 を中胚葉細胞マーカーとして用いた。

1-1-4. LDN193189 を用いた BMP シグナル阻害による DE 分化誘導

誘導3日目から BMP シグナルを阻害することによって DE 分化誘導効率が上昇することがわかった。Noggin は BMP と直接会合しレセプターへの結合を阻害することで BMP アンタゴニストとして働く。そのため細胞が増殖するに従って BMP 分子に対する Noggin 分子の割合が小さくなると考えられる。したがって、BMP 分子ではなく、BMP レセプターのシグナル伝達そのものを阻害する事によってアンタゴニストとして機能する LDN193189 (LDN) を用いることとした。また、誘導2日目から3日目の間で死細胞が多く見られ、分化細胞が要求する栄養状態が満たされていないことが考えられたため、2%の FBS を添加し DE 分化誘導を行った。

2%FBS 添加培地 (SCD) および LDN を用いた内胚葉誘導プロトコルと、各細胞表面マーカーの発現変化を結果に示す (図4 A, B)。表面マーカーのカイネティクスをフローサイトメトリーにより解析したところ、c-Kit, EpCAM, Cxcr4 および SSEA1 の発現パターンは誘導3日目~4日目の間で大きく変化することが明らかになった (図4 B)。分化誘導中の細胞は誘導2日目~3日目の間で形態が大きく変化し、また3日目~4日目の間で活発な増殖を示した (図4 C)。同一プロトコルによる4回の誘導の結果、構築したプロトコルによって DE が高効率 (c-Kit⁺Cxcr4⁺: 86.7 ± 3.75%, EpCAM⁺Cxcr4⁺: 88.3 ± 3.39%) で誘導可能であることがわかった。また細胞数は誘導開始時より約36倍 (36.3 ± 6.8) に増加しており、細胞数も多く得ることが可能であることがわかった。

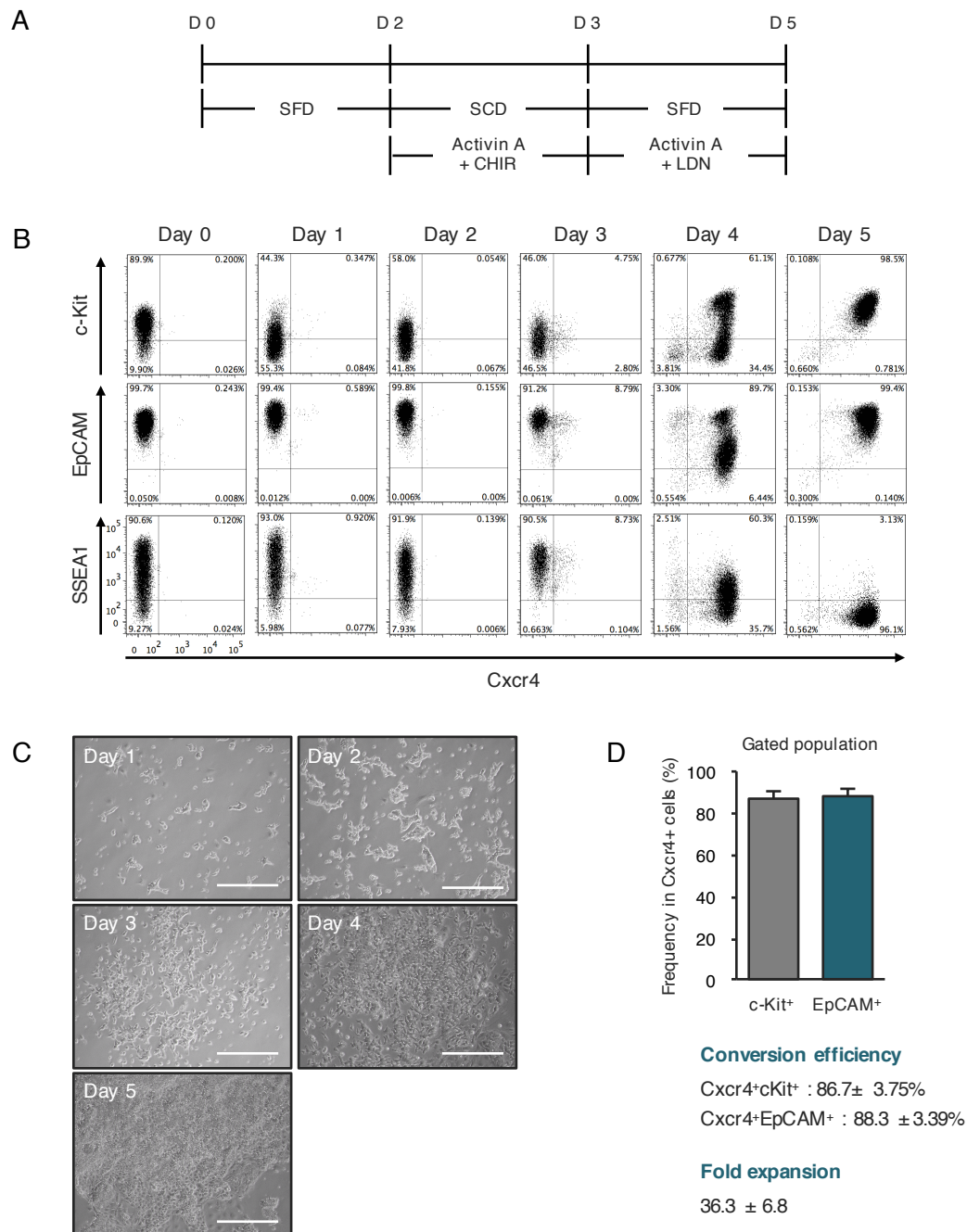


図4. LDN193189 を用いた BMP シグナル阻害による DE 分化誘導

- A) 2%血清添加 (SCD)、LDN193189 (LDN) を用いた DE 誘導プロトコル。
- B) DE 分化誘導期間内における内胚葉細胞マーカー、未分化細胞マーカーの発現変化の解析。
- C) 内胚葉分化誘導における細胞の形態変化。スケールバーは 100 μ m を示す。
- D) 分化誘導 5 日目における Cxcr4⁺EpCAM⁺または Cxcr4⁺c-Kit⁺細胞の存在割合 (n=4)。グラフは平均値と標準誤差を示す。

1-2. 分化誘導によって得られた DE の表現型解析

分化誘導 5 日目に得られた細胞の遺伝子発現を解析した。DE マーカーとして知られる Foxa2、Sox17、Cer1 は誘導 5 日目の細胞において、分化誘導前と比較して有意に高く発現しており、未分化細胞マーカーである Oct4 の発現は有意に低下していた（図 5 A）。次に、免疫蛍光染色により Foxa2 および未分化細胞マーカーである Sox2 のタンパク質発現を解析した。Foxa2 は分化誘導 5 日目において大部分の細胞で発現が認められ、一方で Sox2 のタンパク質発現は誘導 5 日目の細胞においては認められなかった（図 5 B、C）。これらの結果から、フローサイトメトリーの結果と一致して、得られた細胞は均一な内胚葉細胞集団であり、未分化細胞はほとんど含まれていないことが示唆された。

以上の条件検討から、マウス iPS 細胞を用いて高効率に DE を分化誘導可能な条件を決定した。

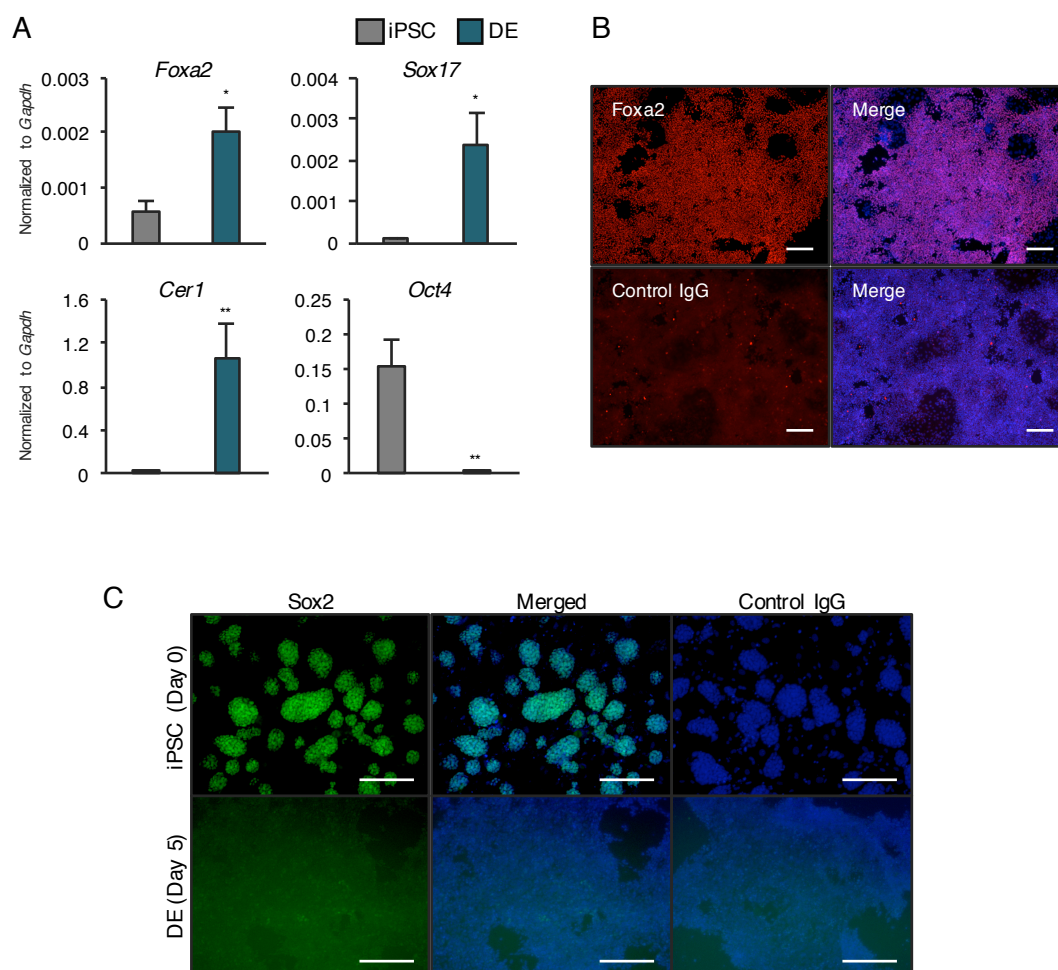


図5. 分化誘導によって得られた DE の表現型解析

- A) 内胚葉マーカー遺伝子 (*Foxa2*、*Sox17*、*Cer1*) および未分化細胞マーカー遺伝子 (*Oct4*) の遺伝子発現解析 (*Foxa2*: 各群 n=8、*Sox17*: 各群 n=7、*Cer1*: 各群 n=6、*Oct4*: 各群 n=8)。グラフは平均値と標準誤差を示す。
- B) *Foxa2* (赤: AlexaFluor555) のタンパク質発現解析。上段は抗 *Foxa2* 抗体による染色、下段はコントロール IgG による染色像を示す。核は DAPI を用いて染色した。
- C) *Sox2* (緑: AlexaFluor488) のタンパク質発現解析。上段は分化誘導前の iPSC 細胞 (Day 0)、下段は分化誘導後の内胚葉細胞 (DE、Day 5) の染色像を示す。スケールバーは 200 μm を示す。

1-3. DE から AFE への分化誘導と表現型解析

ここまでの検討から DE の分化誘導系を確立できたと考え、つぎに DE から AFE (前側前腸内胚葉) への分化誘導を行った。

初期内胚葉組織発生における前後のパターン形成は前側での *Sfrp5* などの Wnt antagonist の発現と、後側での Wnt/FGF4/BMP の発現によって行われる。ヒト ES 細胞を用いた先行研究では、TGF シグナル阻害分子である SB431542 (SB) に加え、生理的な BMP シグナル阻害分子である Noggin の添加で AFE の分化が促進されることが報告されている (Green et al., 2011)。したがって、次に、DE から AFE への分化誘導においては、SB および BMP シグナルアンタゴニストとして LDN を用いて分化誘導を行った (図 6 A)。誘導 7 日目にマーカー遺伝子の発現を解析すると、AFE のマーカーとして知られる *Sox2*、*Pax9* の発現が誘導 5 日目の DE と比較して有意に上昇していた。また *Foxa2*、*Sox2* の免疫蛍光染色によって、これらのタンパク質の共発現が認められた (図 6 C)。内胚葉マーカーである *Foxa2* に加え、DE ではほぼ発現がみられなかった *Sox2* のタンパク質発現 (図 5 C) が AFE において認められたことから、目的とする AFE が誘導されていると考えた。

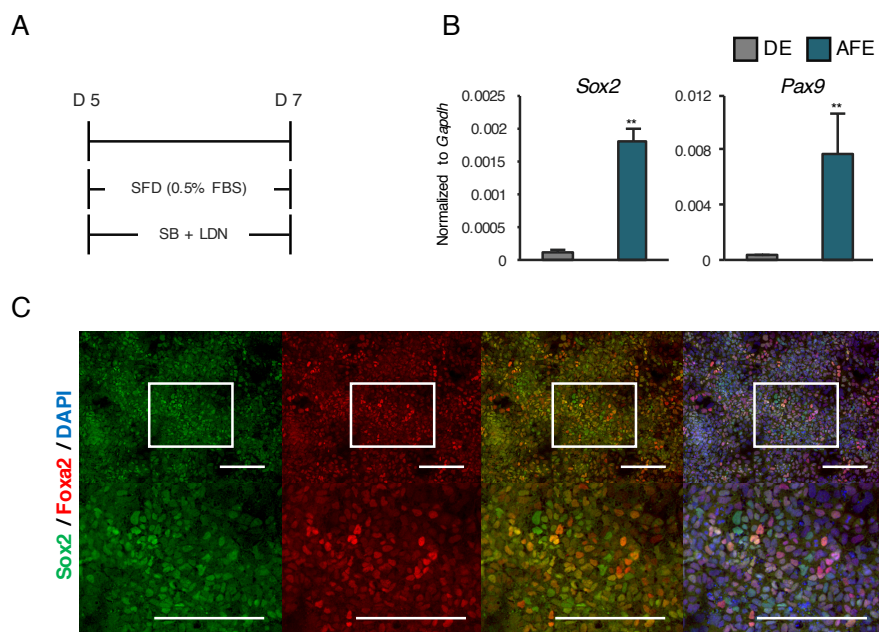


図 6. DE から AFE への分化誘導と表現型解析

- A) 前側内胚葉分化誘導プロトコルを示す。
- B) 前側内胚葉マーカー遺伝子 (*Sox2*、*Pax9*) の遺伝子発現解析 (ともに $n=3$)。グラフは平均値と標準誤差を示す。
- C) *Sox2* (緑: Alexa Fluor488) および *Foxa2* (赤: Alexa Fluor555) のタンパク質発現解析。上段の白枠内の拡大像を下段に示す。核は DAPI を用いて染色した。スケールバーは 200 μm を示す。

1-4. AFE から PE の分化誘導と表現型解析

PE（咽頭内胚葉）誘導はこれまでに TEC を含む PE 由来組織の分化誘導において種々の因子を用いた誘導が報告されており（Green et al., 2011; Huang et al., 2014; Longmire et al., 2012）、本研究で使用するマウス iPS 細胞において最適な条件の探索を行った。

初めに、図 7 A に示す 3 つの条件にしたがって分化誘導を行った。誘導 9 日目に前側内胚葉マーカーである *Sox2*、*Pax9* および咽頭内胚葉マーカーである *Pax1*、*Tbx1*、*Hoxa3* の遺伝子発現を比較したところ、とくに *Tbx1* および *Hoxa3* の遺伝子発現は Condition #1 においてその他 2 つの条件と比較して有意に高かった（図 7 B）。TEC の分化は第 3 咽頭嚢における *Hoxa3* 高発現領域から生じることから（Chojnowski et al., 2014; Manley and Capecchi, 1995）、*Tbx1* に加えて特に *Hoxa3* の発現が高く見られた Condition #1 が最適と考えられた。

上記の分化誘導では 6 つの因子を培養環境に加えたが、条件を簡略化・最適化する目的で、いくつかの因子を条件から除いて培養を行った（図 7 C）。その結果、Bone morphogenetic protein 4（BMP4）、CHIR、Cyclopamine（Cyc）はこれらを単独もしくは全てを除いた条件であっても、*Tbx1* および *Hoxa3* の発現に有意な変化がないことがわかった（図 7 D）。したがって、本研究で用いたマウス iPS 細胞の AFE 誘導条件においては Fibroblast growth factor 8（FGF8）、SB、Retinoic acid（RA）の添加が最適であると考えた。

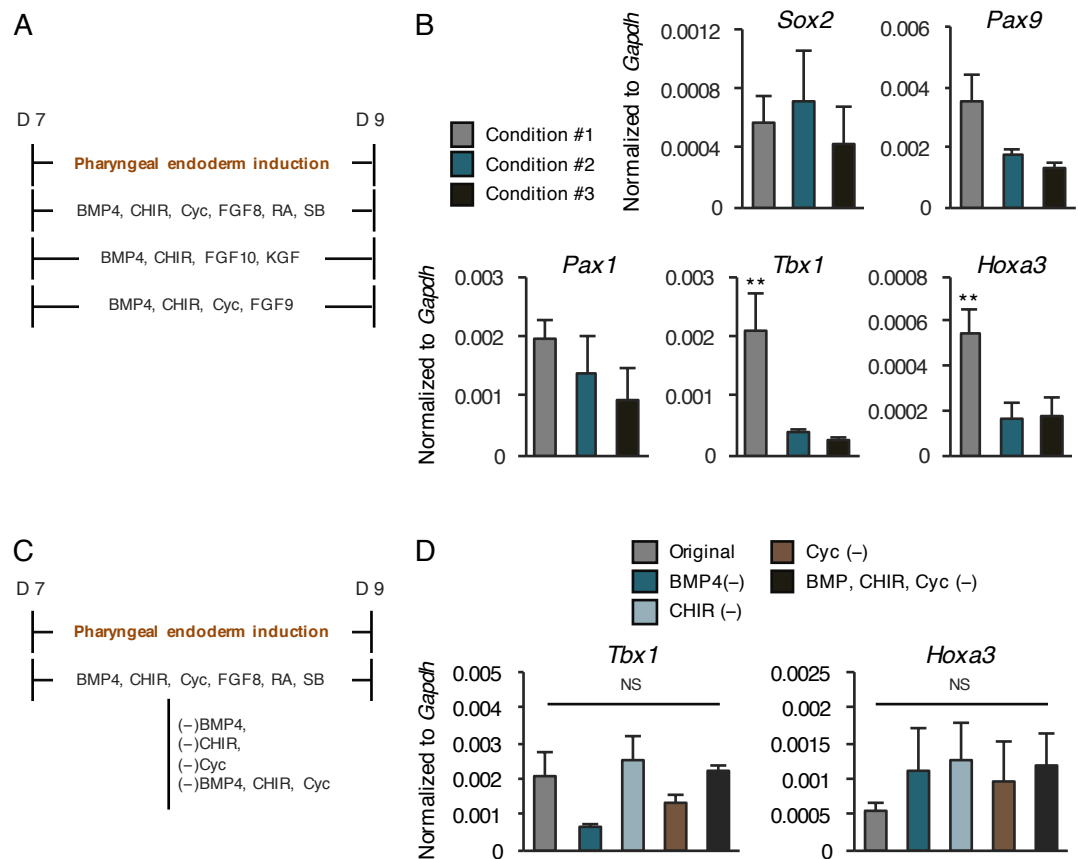


図7. AFE から PE の分化誘導と表現型解析

- A) 初めに行った咽頭内胚葉分化誘導プロトコルを示す。Bone morphonegetic protein 4 (BMP4)、Cyclopamine (Cyc)、Fibroblast growth factor 8 (FGF8)、Retinoic acid (RA)、Keratinocyte growth factor (KGF)。
- B) 前側内胚葉内マーカー遺伝子 (*Sox2*) および咽頭内胚葉マーカー遺伝子 (*Pax9*, *Pax1*, *Tbx1*, *Hoxa3*) の遺伝子発現解析 (すべて n=4)。グラフは平均値と標準誤差を示す。**p<0.01、Tukey の HSD 検定。
- C) 咽頭内胚葉分化誘導プロトコルの最適化。BMP4、CHIR、Cyc それぞれ単独またはすべてを除外した培養条件にて分化誘導を行った。
- D) 咽頭内胚葉マーカー遺伝子 (Original, n=4; その他は n=3) の遺伝子発現解析。グラフは平均値と標準誤差を示す。NS (Not significant、Tukey の HSD 検定)。

1-5. AFE から TEC への分化誘導と表現型解析

TEC の生体内での分化・成熟は、転写因子 *Foxn1* に依存的であることが知られている (Coffer and Burgering, 2004; Nehls et al., 1994)。そこで、咽頭内胚葉マーカーである *Hoxa3* に加え *Foxn1* を分化の指標として誘導を行った。前項で述べたとおり、TEC の発生は第 3 咽頭嚢に分布する *Hoxa3* 高発現領域から起こることが報告されている。咽頭内胚葉分化誘導プロトコル (図 7 C) に従って誘導したところ、FGF8, RA, SB の添加が *Hoxa3* の発現を強く誘導することが明らかとなったため、継続してこれらの因子を誘導条件に加え、長期に培養し遺伝子発現を解析した (図 8 A)。誘導 14 日目に得られた細胞の *Hoxa3*, *Foxn1* の発現を qPCR で解析したところ、両遺伝子とも誘導開始時と比較して有意な発現上昇を認めた (図 8 B)。また、胸腺内での T 細胞分化における機能分子である *Delta-like ligand 4* (*Dll4*) の遺伝子発現も有意に上昇していた (図 8 B)。

TEC は、上皮細胞のマーカー分子である EpCAM を発現している。誘導 14 日目のフローサイトメトリーから、5 %程度の細胞が EpCAM を発現していることがわかった ($5.77 \pm 2.33\%$, $n=3$)。TEC は、UEA-1 を細胞表面に発現する髄質上皮細胞と、Ly51 を発現する皮質上皮細胞に細分化されるが、これらの表面分子を発現する細胞の割合は平均してそれぞれ約 2% ($2.44 \pm 1.11\%$) および約 0.7% ($0.75 \pm 0.33\%$) 程度であった (図 8 C)。

TEC は、T 細胞との相互作用により髄質および皮質上皮細胞への終末分化が誘導される (Takahama, 2006)。しかしながら、分化誘導後の解析において、T 細胞が存在しない *in vitro* の条件ではあるが、髄質および皮質細胞フェノタイプが観察された。これらの結果は、分化誘導の環境に存在する何らかの因子が分化を促進したことが考えられる。

ここまでに構築した分化誘導方によって TEC 様表現型を有する細胞を得ることができた。しかしながら、*in vivo* において種々の機能解析を行うために十分量の細胞を得ることが難しかったため、分化誘導系を更に改善し、高効率に TEC を作製する誘導系の開発が必要と考えた。

2. Tet-On システムを用いた時期特異的 Foxn1 発現誘導

Foxn1 は胸腺発生のマスター因子として知られている。*Foxn1* の機能欠損変異は、胸腺の欠損および毛包細胞の発育不全により体毛を欠損する（ヌード）という表現型を示す（Nehls et al., 1994）。したがって *Foxn1* は単一遺伝子の機能不全により胸腺欠損にいたるが、この転写因子を分化誘導中の細胞で強制発現させることによる分化誘導効率の改善をはかることを考案した。

Foxn1 を分化誘導した細胞へ発現させる手法として、AFE から PE への分化誘導後に時期特異的発現を誘導する手法の開発を試みた。

Tet-On システムは Tetracycline responsive element (TRE) に reverse tetracycline trans activator (rtTA) が結合することによって、TRE の下流に挿入した遺伝子の発現が誘導される。rtTA は Tetracycline 系抗菌薬（Tetracycline、Doxycycline など）と会合することによって TRE に結合するため、これらの遺伝子コンストラクトが導入された細胞では、これらの薬剤の添加依存的に任意の遺伝子を発現させることが可能である。

Foxn1 の時期特異的発現を誘導するため、TRE 下流に Mouse Foxn1 を挿入したウイルスベクター（Tet-Foxn1）を作製し（図9A）、rtTA 発現ウイルスベクター（rtTA）とともに iPS 細胞へ導入した（iPSC-rtTA/Tet-Foxn1）。次に、これらの遺伝子を導入した iPS 細胞の Genomic DNA を抽出し、特異的プライマーを用いて遺伝子の挿入を解析した。Tet-Foxn1 および rtTA を導入した iPS 細胞において、これらのベクター上の配列の増幅が認められたことから、iPS 細胞へ目的の遺伝子導入が行われたと考えた（図9B）。

Tet-Foxn1 ウイルスベクターは、Foxn1 配列の下流に internal ribosomal entry site (IRES) および enhanced green fluorescence protein (EGFP) を含むため、このベクターが挿入された細胞は Doxycycline 依存的に Foxn1 および EGFP を発現する。したがって、EGFP の発現を Tet-on システムのマーカーとして用いた。iPSC-rtTA/Tet-Foxn1 に対し、Doxycycline を 4 ug/ml の濃度で 4 8 時間作用させたところ、フローサイトメトリーにおいては EGFP 陽性細胞がほとんど検出されなかった（図9C）。また蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、EGFP 陽性細胞は iPS 細胞コロニーのうち一部の細胞で発現しているのみであった（図9D）。

上記の結果から、iPS 細胞へ対して Tet-On システムによる Foxn1 発現機構は導入されていると考えられるが、ほとんどの iPS 細胞で機能が見られなかった。この結果はおそらく iPS 細胞など多能性幹細胞がウイルス由来プロモーターの活性化を高度に抑制する（サイレンシング）性質によると考えられた（Hoffmann et al., 2017）。したがって、次にウイルス由来プロモーターを用いない Foxn1 導入法を検討することとした。

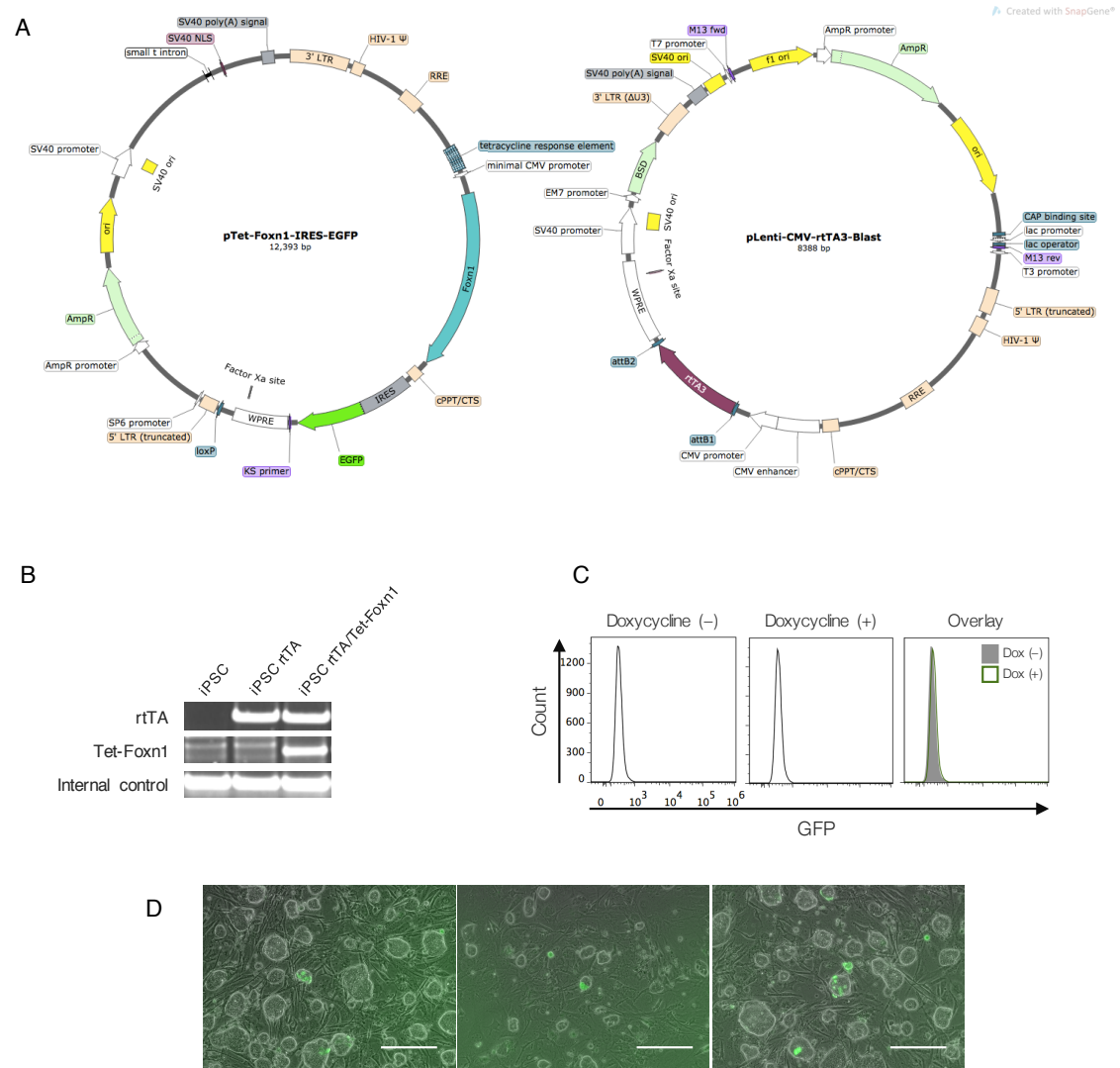


図9. Tet-On システムを用いた時期特異的 Foxn1 発現誘導

- A) Doxycycline 依存的 Foxn1 発現システムの導入に使用した2種のベクターのマップを示す。マップは SnapGene Viewer (GSL Biotech) を用いて作製した。
- B) PCR による導入遺伝子の解析。pTet-Foxn1-IRES-EGFP (pTet-Foxn1)、pLenti-CMV-rtTA3-Blast (rtTA)。内部標準 (Internal control) としては *IL-2* 遺伝子を用いた。
- C) フローサイトメトリーによる Doxycycline 誘導性 EGFP の発現解析。
- D) iPSC-rtTA/Tet-Foxn1 維持培養中に Doxycycline を加え 48 時間後の蛍光顕微鏡像。スケールバーは 100 μm を示す。

3. EF1 α プロモーターを用いた Foxn1 発現誘導

ウイルス由来プロモーターを介した遺伝子発現誘導が効果的に行われなかったことから、次に非ウイルス性プロモーターの使用を検討した。Elongation factor 1 α (EF1 α) プロモーターはヒト由来のポリペプチド鎖伸長遺伝子プロモーターであり、iPS 細胞などのサイレンシングの起きやすい細胞において安定した発現が得られることが知られている (Hong et al., 2007)。したがって、次に EF1 α プロモーター下に Mouse Foxn1 をクローニングしたレンチウイルスベクターを作製した (図 10A、EF1 α -Foxn1)。レンチウイルスを用いて iPS 細胞へ遺伝子導入を行った後、Puromycin を用いて判定発現株を選別し、導入した Foxn1 のタンパク質発現を免疫蛍光染色によって解析した (図 10B)。免疫蛍光染色の結果、Puromycin 耐性を示した細胞は DAPI で染色した核とマージする Foxn1 の染色像が認められ、遺伝子導入した iPS 細胞において Foxn1 がタンパク質として発現していることがわった。またこのとき、Foxn1 を強制発現させたことによる明らかな細胞増殖活性の低下や、死細胞の増加などは認めなかった (data not shown)。

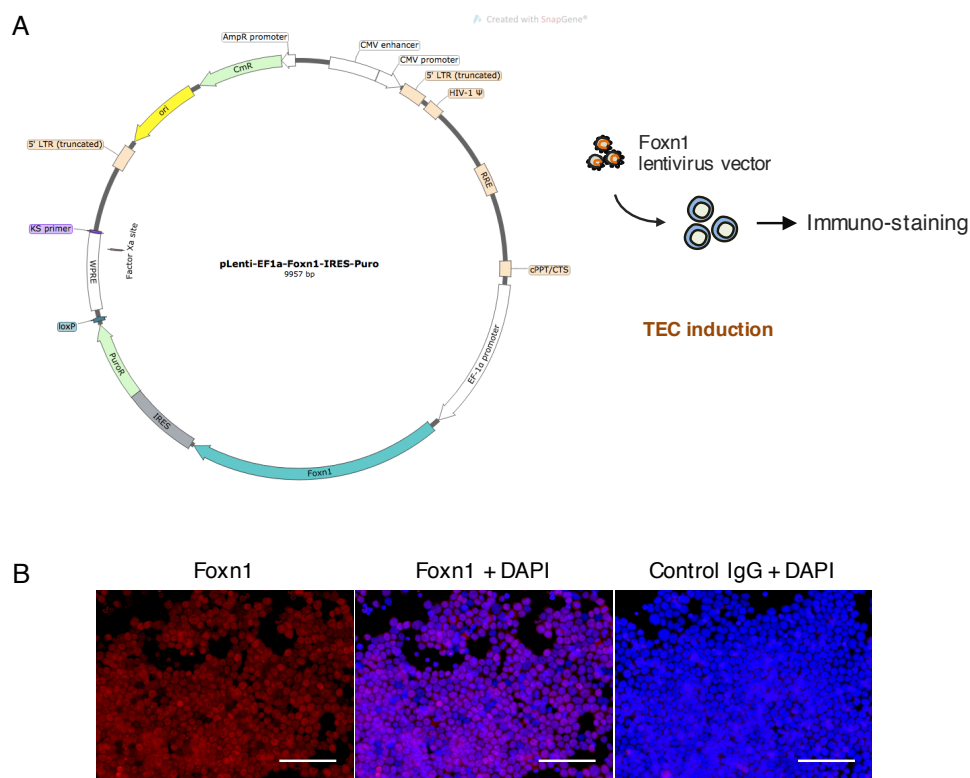


図 10. EF1 α プロモーターを用いた Foxn1 発現誘導

- A) Foxn1 恒常発現株の作製に使用したベクターのマップを示す。プラスミドマップは SnapGene Viewer (GSL Biotech) を用いて作製した。
- B) 遺伝子導入した Foxn1 (赤: AlexaFluor555) のタンパク質発現解析。核は DAPI を用いて染色した。スケールバーは 100 μ m を示す。

4. Foxn1 導入 iPS 細胞を用いた分化誘導と表現型解析

次に、Foxn1 導入 iPS 細胞 (Foxn1-iPSC) を用いて、TEC への分化誘導を行った。分化誘導はこれまでに構築した分化誘導法に沿って行った (図 1 1 A)。分化誘導 14 日目の細胞表面分子をフローサイトメトリーによって解析したところ、EpCAM、Ly51、UEA-1、Dll4 を発現する細胞の割合は平均して EpCAM 24.2% ($\pm 5.8\%$, n=13)、Ly51 4.2% ($\pm 4.2\%$, n=13)、UEA-1 11.7% ($\pm 5.7\%$, n=13)、Dll4 0.8% ($\pm 0.3\%$, n=13) であった (図 1 1 B)。また、Foxn1 を導入していない iPS 細胞と比較して分化誘導したところ、EpCAM、Ly51、UEA-1、Dll4、MHC II を発現する細胞の割合は、Foxn1 を導入した iPS 細胞を用いた場合において有意な増大、もしくは増大傾向にあった (図 1 1 B)。この結果から、Foxn1 を iPS 細胞に導入することにより、TEC への分化誘導効率が向上するという新たな知見を得た。

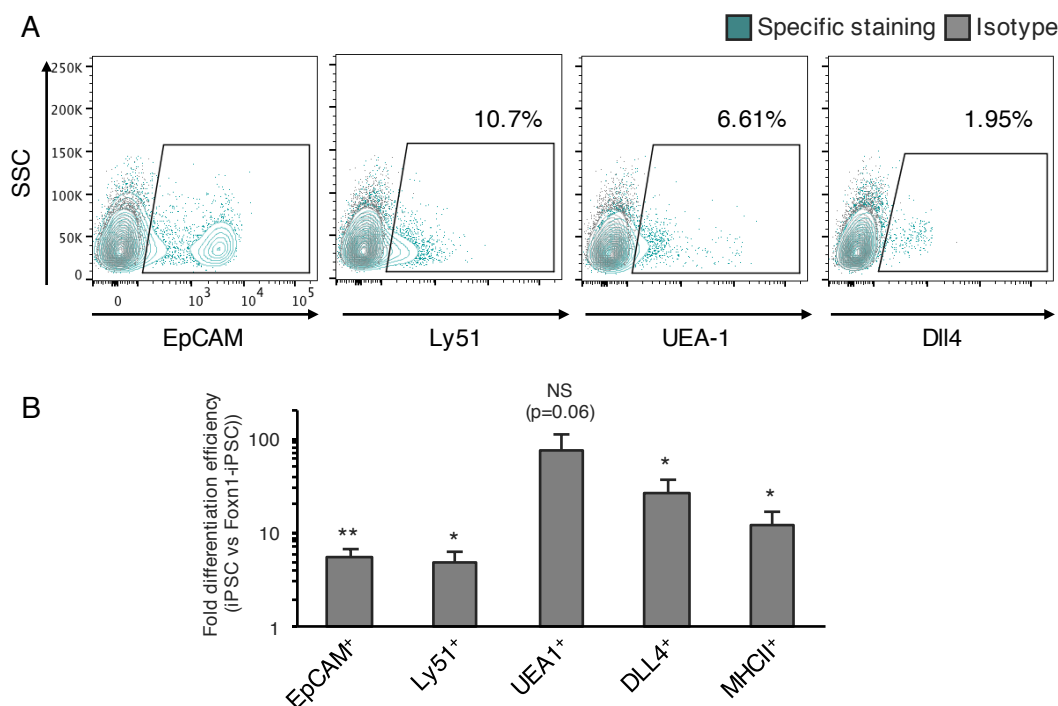


図 1 1. Foxn1 導入 iPS 細胞を用いた分化誘導と表現型解析

- A) 分化誘導 14 日目における細胞表面分子のフローサイトメトリー。プロットは代表的な解析結果を示す。
- B) Foxn1 非導入 iPS 細胞 (iPSC, n=3) に対する Foxn1 導入 iPS 細胞 (Foxn1-iPSC, n=13) の各種細胞表面分子発現細胞の分化誘導効率の比較。グラフは平均値と標準誤差を示す。 *p<0.05、**p<0.01、NS (Not significant, two-tailed Student's t-test)

5. Foxn1 導入 iPS 細胞から分化誘導した TEC の遺伝子発現解析

Foxn1-iPSC から、図 1 2 A のプロトコルに従って TEC を分化誘導し、誘導 1 4 日目に EpCAM、Ly51、UEA-1 を発現する細胞をセルソーターによって分取した (iPSC-TEC)。分取した細胞と分化誘導前の iPS 細胞を用いて、胸腺形成に関わる遺伝子である *Hoxa3*、*Tbx1*、*Pax9*、*Pax1* の発現を解析したところ、すべての遺伝子において分化誘導前と比較して有意な発現上昇を認めた (図 1 2 A)。また、T 前駆細胞の胸腺へのホーミングに重要なケモカインである *Ccl25* の遺伝子発現に加え、*Dll4* の遺伝子発現も有意な発現上昇を示した (図 1 2 A)。

分化誘導に用いた iPS 細胞はウイルスベクターを用いて *Foxn1* coding sequence を導入しているため、coding sequence 上に設計した PCR プライマーをもちいて qPCR を行くと、非常に高いレベルで発現量の検出が予想された。したがって、単に導入した *Foxn1* 遺伝子が発現しているのではなく、*Foxn1* の導入によって分化が促進されたかどうかを区別するために、*Foxn1* mRNA 上には存在するが、*Foxn1* coding sequence ではない領域 *Foxn1*-3'Untranslated region (UTR) に特異的に設計されたプライマー (Bredenkamp et al., 2014) を用いて内因性 *Foxn1* の発現解析を行った (図 1 2 B)。*Foxn1*-3'UTR 特異的プライマーによる解析の結果、iPSC-TEC では内因性 *Foxn1* の発現が分化誘導前と比較して有意に上昇していることがわかった (図 1 2 B)。

ここまでの結果から、*Foxn1* の遺伝子導入によって TEC マーカーを発現する細胞の分化誘導効率が向上し、さらにこの結果は遺伝子導入による単なる表現型の獲得ではなく、TEC への分化が促進された結果であることが示唆された。

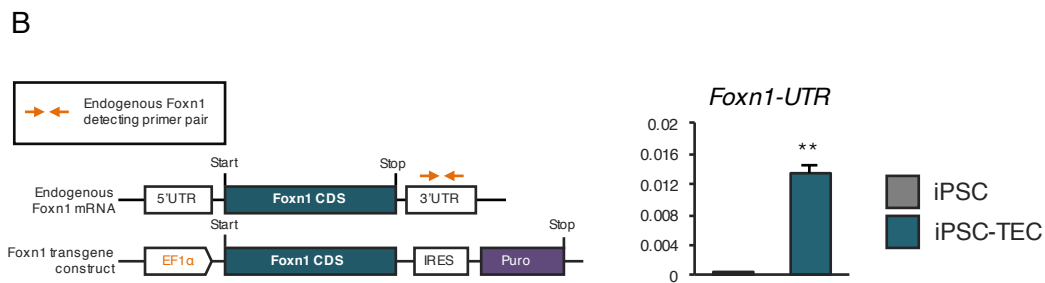
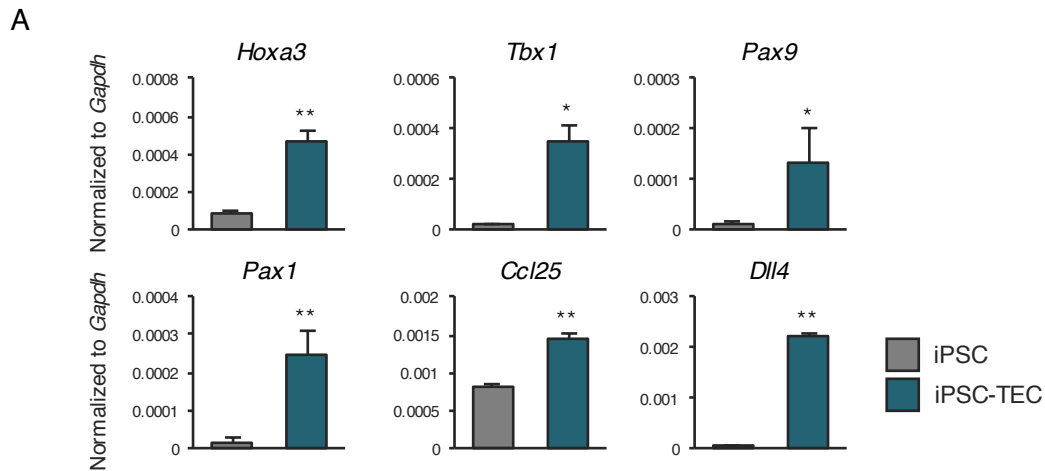


図 1 2. Foxn1 導入 iPSC 細胞から分化誘導した TEC の遺伝子発現解析

- A) 分化誘導 1 4 日目における遺伝子発現解析。iPSC (誘導 0 日目、n=8)、iPSC-TEC (誘導 1 4 日目、n=8) * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ (two-tailed Student's t-test)
- B) Foxn1-3'UTR 特異的 PCR プライマーを用いた内在性 Foxn1 の発現解析。左図は設計したプライマーの概要を示す。iPSC (誘導 0 日目、n=8)、iPSC-TEC (誘導 1 4 日目、n=8)。 * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ (two-tailed Student's t-test)。

6. Foxn1-iPSC 由来 TEC の機能解析-1

分化誘導した TEC の機能解析、すなわち T 細胞の分化を支持する機能の検討を行った (図 1 3 A)。具体的には、誘導 14 日目に TEC マーカーである EpCAM、UEA-1 および Ly51 を発現する細胞を分取し (iPSC-TEC)、同時に、14 日齢のマウス胎仔胸腺から DN1 細胞 (Double negative 1, Lineage⁻CD4⁻CD8 α ⁻c-Kit⁺CD25⁻) を分取し、8 μ m-pore filter 上で 24 時間 iPSC-TEC と混合培養することで細胞塊 (Aggregate) を作製した。作製した Aggregate を BALB/c ノードマウスの腎臓被膜下へ移植し、17 日後に移植した Aggregate を回収しフローサイトメトリーをおこなった。このとき、Aggregate の形成を目的として Mouse embryonic fibroblast (MEF) を加えたため、コントロール群としては MEF と DN1 細胞を混合して作製した Aggregate を用いた。

Aggregate を移植した腎臓を移植 17 日後に摘出したところ、iPSC-TEC 群では 4 個の細胞塊を移植したうち、3 個が腎臓被膜下から回収された。一方でコントロール群においては 6 個のうち 1 個の Aggregate のみ回収された (図 1 3 B)。次に、回収した Aggregate 中の T 細胞をフローサイトメトリーによって解析した。抗 CD4 および抗 CD8 α 抗体を用いた解析の結果、iPSC-TEC 群では生体胸腺で観察されるようなプロットが認められ、CD4 または CD8 α single positive 細胞への分化が認められた (図 1 3 C 上段)。また CD3 ϵ ⁺TCR β ⁺細胞が生体胸腺に類似する割合で存在していた (図 1 3 C 下段)。一方でコントロール群ではこれら T 細胞表面マーカーを発現する細胞は認められなかった。以上の結果から、iPS-TEC は T 前駆細胞と混合することにより T 前駆細胞から成熟 T 細胞の分化を支持する機能を有することが示唆された。

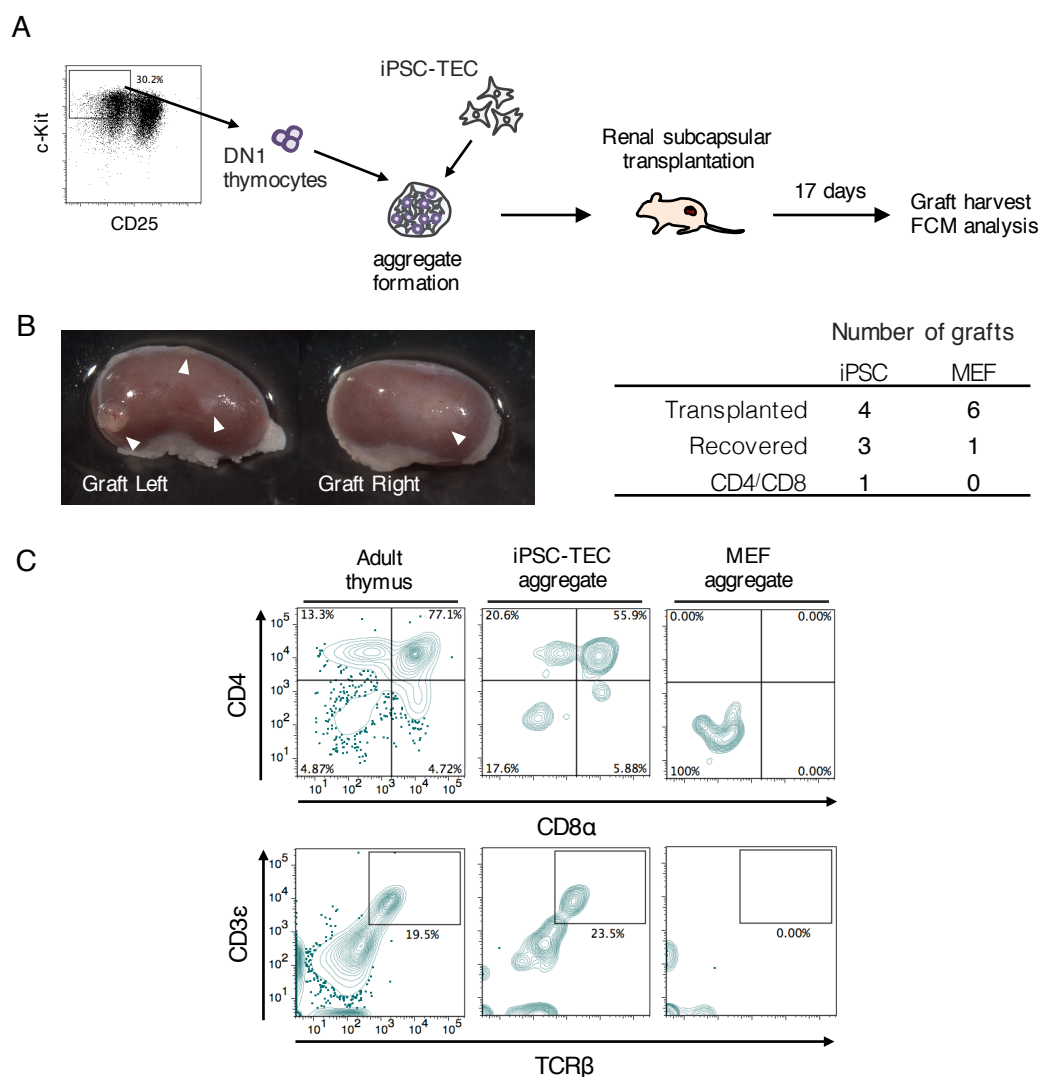


図 1 3. Foxn1-iPSC 由来 TEC の機能解析-1

- A) 実験概要図。B6 胎仔マウス胸腺由来 DN1 細胞を EpCAM⁺ Foxn1-iPS 細胞由来 TEC (iPSC-TEC) または線維芽細胞 (MEF) と混合し、作製した Aggregate をヌードマウス腎臓被膜へ移植した。左腎：iPSC-TEC+DN1、右腎：MEF+DN1。
- B) 腎被膜下移植後 17 日目の移植した Aggregate の様子。腎臓皮膜下に認めた Aggregate を矢印で示す。
- C) 回収した Aggregate のフローサイトメトリー解析。DAPI で死細胞染色をし、DAPI 陰性の細胞分画をプロットに示した。移植および回収した Aggregate、CD4、CD8α 陽性細胞を認めた Aggregate の数を B) 右表に示す。

7. Foxn1-iPSC 由来 TEC の機能解析-2

これまでの検討から、*in vitro* で作製した TEC は T 前駆細胞と混合することによって成熟 T 細胞への分化を支持することがわかった。次に、iPSC-TEC のみで作製した Aggregate を BLAB/c ノードマウス腎臓皮膜下へ移植し、移植から 6 週間後に末梢血中の T 細胞の解析を行った (図 1 5 A)。本実験では iPSC-TEC は上皮細胞マーカーである EpCAM⁺の発現によって分取し、EpCAM⁻の細胞を用いた細胞塊をコントロールとした。

末梢血中の T 細胞分画をフローサイトメトリーにて解析した結果、EpCAM⁻の Aggregate を移植したマウスと比較して、EpCAM⁺の Aggregate を移植したマウスにおいて、T 細胞マーカーである CD3ε⁺または CD3ε⁺TCRβ⁺細胞の割合が有意に大きかった (図 1 5 B)。ノードマウスは胸腺を欠損するため通常機能的 T 細胞が存在していないが、加齢にともなって末梢に T 細胞様フェノタイプを示す細胞が出現することが知られている。したがって、末梢血中の T 細胞マーカーの解析ではこれらの T 細胞が出現した結果を反映している可能性が考えられた。したがって次に、移植した Aggregate を回収し、フローサイトメトリーを行った。このとき、使用した iPS 細胞は B6 コンジェニック系統である B6 Ly5.1 から作製したため、フローサイトメトリーを行うにあたってはレシピエントであるノードマウス骨髓由来細胞のみで発現する CD45.2 が陽性の分画をゲーティングした。T 細胞は分化の過程で CD4⁻CD8α⁻のダブルポジティブから CD4⁺CD8α⁺のダブルポジティブ細胞へと分化する。移植した Aggregate を解析した結果、EpCAM⁺の細胞を用いた Aggregate でのみ CD4⁺CD8α⁺の細胞が認められた (図 1 5 C)。これらの結果から、移植した EpCAM⁺の Aggregate は T 前駆細胞を移植した場に誘導し、成熟 T 細胞へと分化させる機能を有することが示唆された。

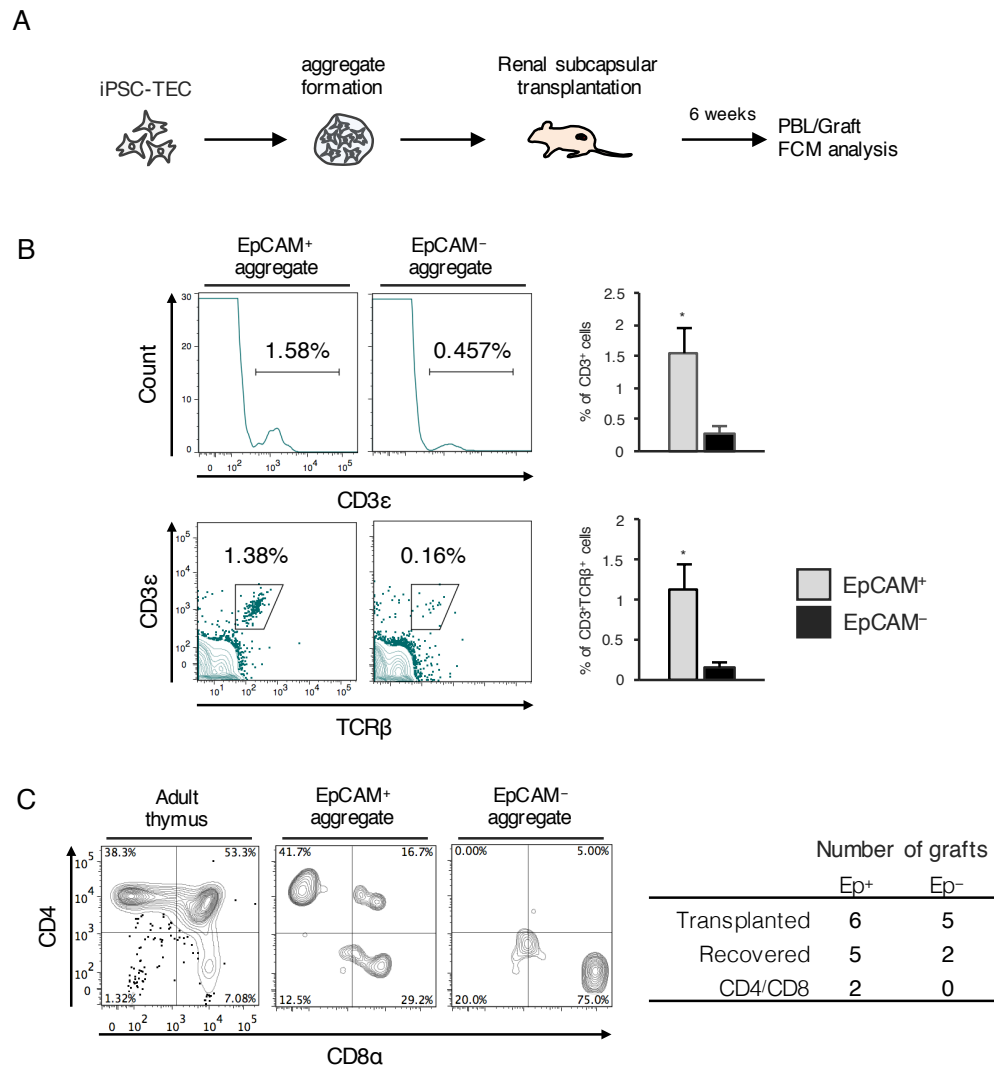


図 1 4. Foxn1-iPSC 由来 TEC の機能解析-2

- A) 実験概要図。分化誘導 1 4 日目の細胞を、上皮細胞マーカーである EpCAM の陽性または陰性分画をソーティング後、Aggregate を作製しヌードマウス腎臓被膜下へ移植した。
- B) 腎被膜下移植後 6 週目の EpCAM⁺ または EpCAM⁻ 細胞の Aggregate を移植されたヌードマウスの末梢血をフローサイトメトリーにて解析した結果。プロットは EpCAM⁺ または EpCAM⁻ 移植各群の代表例を示す。グラフは平均値と標準誤差を示す (EpCAM⁺ : n=5, EpCAM⁻ : n=3)。*p<0.05、**p<0.01 (two-tailed Student's t-test)。
- C) 腎被膜下から回収した Aggregate のフローサイトメトリー解析。DAPI で死細胞染色をし、CD45.2⁺DAPI⁻の細胞分画をプロットに示した。移植および回収した Aggregate 数、CD4⁺CD8α⁺陽性細胞を認めた Aggregate の数を表に示す。

8. Foxn1-iPSC 由来 TEC の機能解析-3

ヌードマウスへの細胞塊移植実験から、iPSC-TEC が *in vivo* において T 細胞分化に寄与することが示された。次に、iPSC-TEC 移植によってヌードマウス体内で産生された T 細胞の多様性の解析を行った (図 1 5 A)。実験方法としては、iPSC-TEC を移植したヌードマウス (iPSC-TEC Recipient) または、Deoxyguanosine 処理によって血液系細胞を除去した胎齢 1 5 日目の B6 胎仔胸腺組織を移植したヌードマウス

(Fetal thymus Recipient : FT Recipient) の脾臓を用いて Mouse V β TCR Screening Panel を用いてローサイトメトリーで解析した。同時に、野生型 B6 および BALB/c マウスの脾臓を染色のコントロールとして解析した。

TCR V β はマウスの系統により特定のレパトアの存在割合が異なることが知られている (Braun et al., 2018)。これは、マウスのゲノム上に存在するプロウイルスタンパク質の遺伝子等によるものであり、例えば BLAB/c マウスは CD4⁺T 細胞において TCRV β 3/5.1-5.2/11/12 を発現する細胞の割合が B6 マウスと比較して著しく小さい (図 1 5 B)。FT Recipient 脾臓中の T 細胞では、胸腺は B6 胎仔マウス由来であるが、前述の TCR レパトアのうち TCR V β 3、11 は BLAB/c に類似する存在割合を示していた。これは、BALB/c ヌードマウスの骨髄由来の抗原提示細胞 (樹状細胞、マクロファージなど) が胸腺内へ移入し、T 細胞レパトアの選択に寄与した結果であると考えられる。一方で、同じく FT Recipient であっても、B6 に近い存在割合を示したレパトア (CD4⁺TCR V β 5.1/5.2、CD8⁺TCR V β 14 など) や、野生型 B6 とともに BALB/c と異なる割合を示すレパトアも観察された (CD4⁺TCR V β 9/12/13/14、CD8⁺TCR V β 8.3/10^b など)。これらのことは、2 種の系統のマウス由来の抗原提示細胞が存在する場合、レパトアによって選択に関わる抗原提示細胞が異なっていることが原因の一つとして考えられた。

iPSC-TEC Recipient の脾臓を解析した結果、FT Recipient と同様に、B6 に近い傾向を示すレパトア (CD4⁺TCR V β 7/11、CD8⁺TCR V β 5.1-5.2/11)、BALB/c に近い傾向を示すレパトア (CD4⁺TCR V β 3/8.3、CD8⁺TCR V β 3/12/13)、どちらも異なるレパトア (CD4⁺TCR V β 2/4/8.1-8.2/14、CD8⁺TCR V β 2/6/7/13) が認められた。また、FT Recipient と iPSC-TEC Recipient で近い傾向を示すレパトアもみられた (CD4⁺TCR V β 12、CD8⁺TCR V β 10^b)。

また、産生された TCR V β の多様性を Entropy として求めた (図 1 5 C)。iPSC-TEC Recipient と FT Recipient の Entropy は 2 群間で類似した傾向を示し、iPSC-TEC のヌードマウスへの移植は、偏ったレパトアではなく多様性を有する TCR V β レパトアの産生に寄与することがわかった。

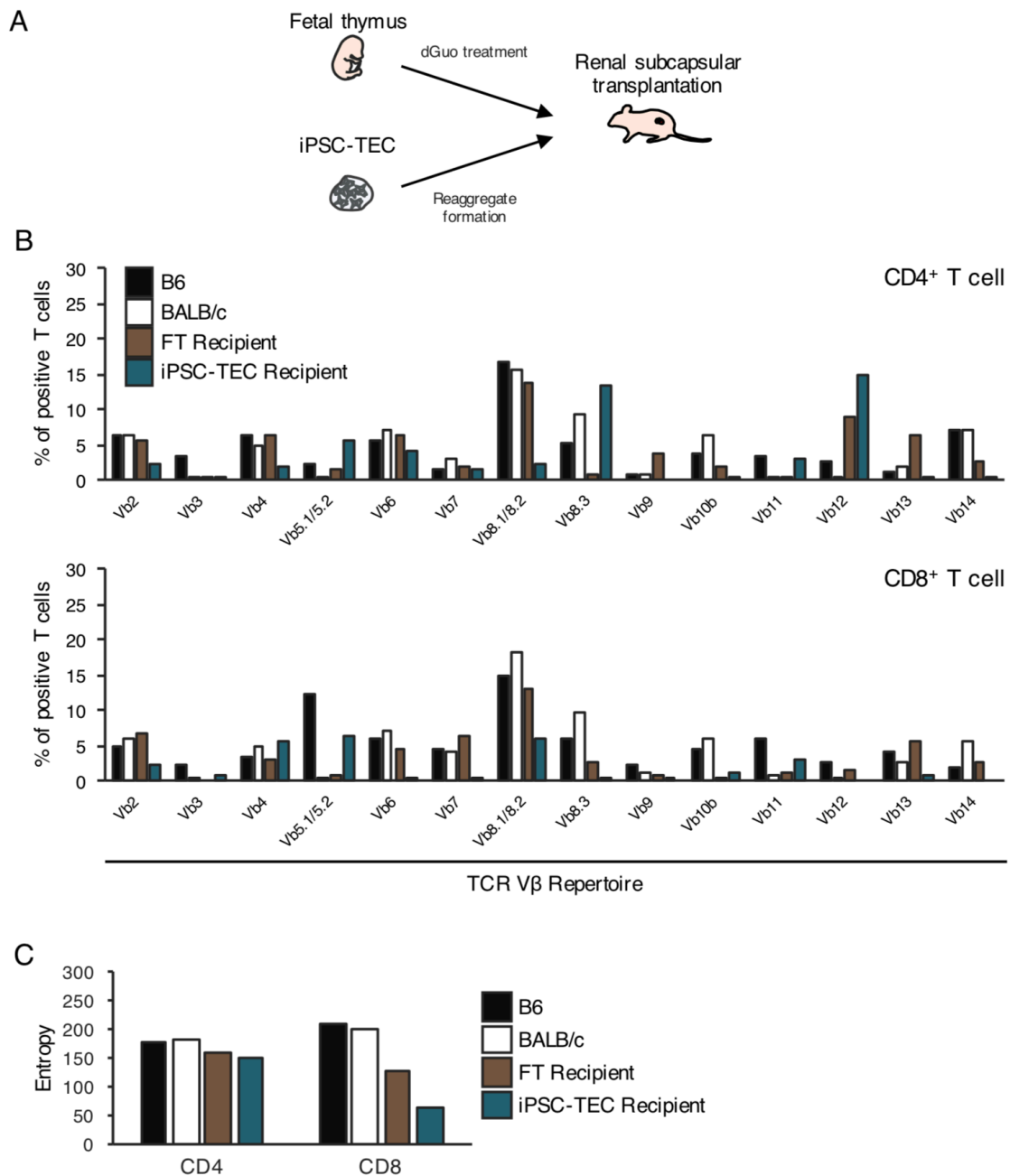


図 15. Foxn1-iPSC 由来 TEC の機能解析-3

- A) 実験概要図。B6 マウス胎仔胸腺または iPSC-TEC をヌードマウス腎臓被膜下へ移植した。
- B) 野生型 B6、BALB/c および移植されたヌードマウス脾臓中の CD4⁺または CD8⁺T 細胞の TCR V β レパトア解析（上段：CD4⁺T 細胞、下段：CD8⁺T 細胞）。グラフは平均値と標準誤差を示す（n=3）。
- C) B) で示した CD4⁺および CD8⁺T 細胞の TCR V β レパトアのエン트로ピー解析。（B6：n=3、BALB/c：n=3、FT：n=3、iPSC-TEC：n=2）

10. iPSC-TEC 移植による拒絶反応制御

最後に、iPSC-TEC の移植による拒絶反応制御の検討を行った (図 1 7 A) 。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、iPSC-TEC 移植 6 日前および 1 日前に、抗 CD4、CD8a 抗体を含むマウス腹水を腹腔内投与した。移植当日に 3 Gy の全身放射線照射を行ったのち、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。

移植後の各ドナーの皮膚移植片生着期間をカプラン・マイヤー曲線によって示す (図 1 6 B) 。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 MHC ハプロタイプ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。

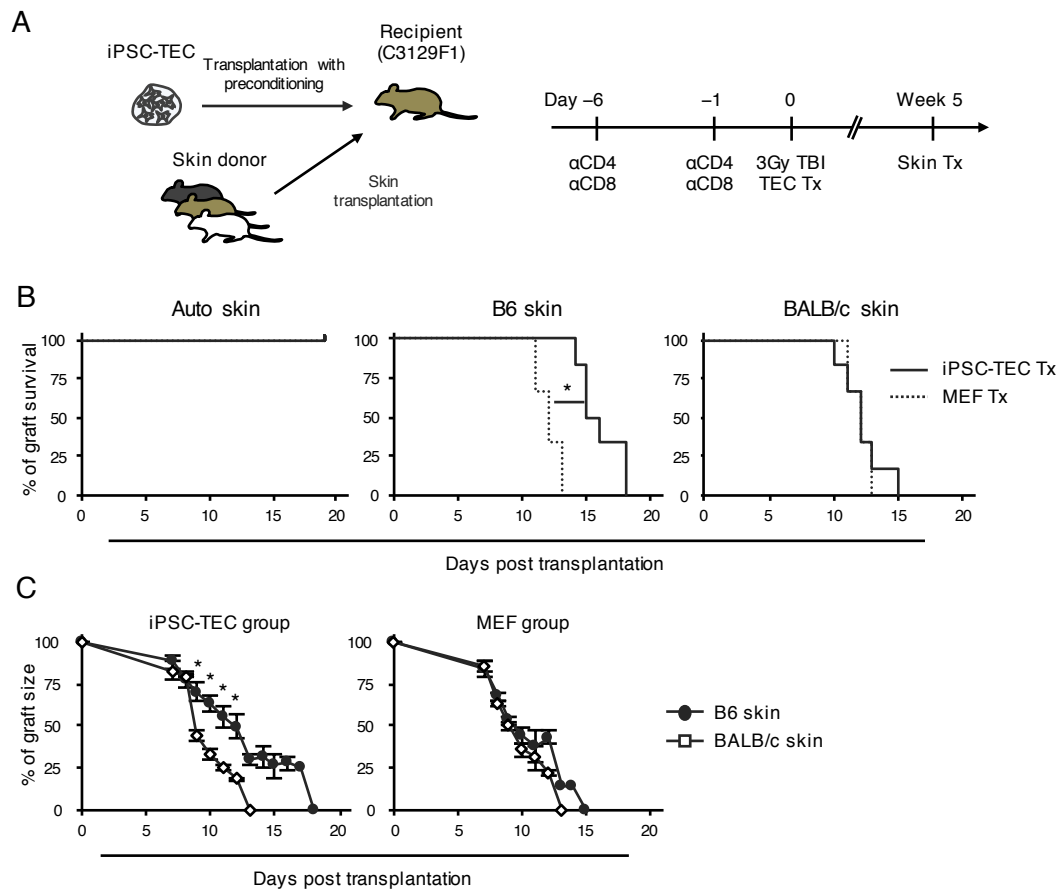


図 1 6. iPSC-TEC 移植による拒絶反応制御

- A) 実験概要図。iPSC-TEC Aggregate (n=6) または MEF Aggregate (n=6) を前処置を行った C3129F1 マウスの腎臓被膜下へ移植し、5 週後に C3129F1、B6 または BALB/c マウスの皮膚を移植した。
- B) 移植された C3129F1、B6 および BALB/c 皮膚移植片の生着を Kaplan・マイヤー曲線によって示す。* $p < 0.05$ (Generalized Wilcoxon test)。
- C) B6 および BALB/c 皮膚移植片のサイズ変化。統計学的有意差は各計測時点で $n \geq 3$ であるときに検定を行った。* $p < 0.05$ (two-tailed Student's t-test)。

考察

胸腺移植による免疫寛容誘導は古くから試みられており、アロジェニックマウス間および異種間移植においても一定の成果が報告されている (Salaün et al., 1990; Yamada et al., 2000)。一方で、移植医療への応用という観点から考察すると、胸腺は加齢に伴って退縮する組織であることから、成人ドナーから胸腺を得ることは困難である (Boehm and Swann, 2013)。同様に、iPS 細胞を用いた移植医療においても、ドナー (すなわち iPS 細胞作製のもととなる末梢血などの提供者) から胸腺を入手することは現実的にほぼ不可能である。しかしながら、iPS 細胞をドナーソースとする移植医療においては、同一の iPS 細胞から胸腺組織を作出することが可能であれば、移植免疫制御への応用が期待される。このような観点から、本研究では iPS 細胞由来胸腺組織の作製、およびそれを用いた移植免疫制御に関する検討を、遺伝子導入技術やマウス移植モデルを用いて行った。

初めに PSC 由来 TEC 作製法の開発を試みた。多能性幹細胞から細胞または組織を分化誘導する際に重要なのは、いかに生体の発生環境を模倣し、適切な時期に適切な因子を作用させる事ができるかということである。また用いる細胞種によっては同一の分化誘導プロトコルでも誘導効率に差が生じることもしばしば問題となっており、実際過去の報告の再現実験を行ったが、目的とする細胞を得ることは難しかった。したがって、TEC 分化誘導にあたっては当分野が所有する多能性幹細胞、とくに iPS 細胞を用いた分化誘導系において適切な誘導条件を決定する必要があると考えた。加えて、効率的な分化誘導のステップをより細分化し、生体の発生環境により近づけることが有用と考えられる。したがって、TEC の誘導においては生体内での分化段階に従って、DE、AFE、PE、TEC の各分化段階において誘導条件を精査し、フローサイトメトリー、免疫染色、qPCR 等によって評価し条件決定した。

胸腺は内胚葉性の組織であり、胃、膵臓、肝臓、腸など各種消化器官、また肺などの呼吸器官と前駆細胞である DE を共有している。したがって、初めに DE を高効率に、また安定して分化誘導する系の確立を目指した。DE の分化誘導は高濃度 Activin (50 ng/ml) の存在下で行い、分化誘導 2 日目における Wnt/ β -catenin シグナルの一時的な活性化と、その後 Activin の添加に加えて BMP シグナルを阻害することによって、約 90% の細胞が DE マーカー分子を発現するプロトコルの構築に成功した。個体の初期発生における原条の形成が Wnt の発現に依存していること、また BMP シグナルが内胚葉分化に抑制的に働くことなどから (Zorn and Wells, 2009)、内胚葉組織発生を模倣した環境であると考察された。

DE から AFE への分化誘導においては、Activin を培養環境から除去し、BMP シグナル阻害分子 (LDN) に加え、TGF シグナル阻害分子 (SB) を作用させること

によって分化が促進された。初期内胚葉組織発生における前後のパターン形成は前側での *Sfrp5* などの Wnt antagonist の発現と、後側での Wnt/FGF4/BMP の発現によって行われる (Zorn and Wells, 2009)。Green らは生理的 BMP 阻害タンパク質である Noggin を用いたが (Green et al., 2011)、低分子化合物のみを用いても AFE の誘導が可能であった。同様に、Mou らは低分子化合物を用いて、A-83-01 (TGF シグナル阻害分子) を Dorsomorphin (BMP 阻害分子) と組み合わせることで、AFE 誘導が可能であることを示しており、本研究で得た知見と一致している (Longmire et al., 2012)。

次に、AFE から PE の分化誘導条件の探索を行った。過去に報告のある分子のうち、PE の誘導においては特に BMP4、CHIR、Cyc、FGF8、RA、SB を組み合わせる事によりマーカー分子の発現上昇が認められたが、同時に FGF8、RA、SB のみの添加でマーカー転写因子としての *Tbx1*、*Hoxa3* の発現が同程度得られることがわかった。RA が咽頭内胚葉形成に与える影響は RA レセプターインヒビターを用いた研究において報告されており (Dessimoz et al., 2006)、RA は PE 誘導に必須の因子であると考えられた。この報告と一致して、PE 誘導条件から RA を除いた際には *Hoxa3* の発現が著減するという結果を得た (data not shown)。また胸腺が発生する第 3 咽頭嚢における FGF8 の発現は RA 依存的 (Wendling et al., 2000) であり、FGF8 の機能不全型は第 3、第 4 咽頭嚢の形成不全に陥ることが報告されていることから (Abu-Issa et al., 2002) FGF8 の添加も必要であると考えられた。

さらに、TEC への分化方向づけを行うにあたっては転写因子 *Hoxa3*、*Foxn1* をマーカーとして誘導を行ったところ、これら 3 因子の存在下で継続して培養することによって発現が上昇することがわかった。一方で上皮細胞マーカーである EpCAM や胸腺皮質上皮で発現する Ly51 や髄質上皮細胞で発現する UEA-1 などの分子を発現する細胞は少なかった。また *Foxn1* 発現は有意な発現上昇を示したものの、内部標準として用いた *Gapdh* に対する発現量はごく僅かであり、得られた細胞中の目的細胞が非常に少ないことが示唆された。

In vitro での TEC 誘導効率を向上させる手段として、転写因子 *Foxn1* を強制発現させることを考案し、2つの手法を用いて行った。Tet-On システムを用いた時期特異的な *Foxn1* 発現系は、遺伝子導入のマーカーとしての EGFP の発現が観察されなかった。本実験で導入した遺伝子はサイトメガロウイルス由来プロモーター (CMV promoter) によって発現が誘導される。EGFP 発現が認められなかった結果は、iPS 細胞が外的に挿入されたウイルス由来プロモーターを高度にサイレンシングする傾向にあることが原因と考察された。実際、iPS 細胞の樹立において、初期化に必要な 4 因子 (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) とともに蛍光タンパク質をウイルスベクターによって導入し、導入された蛍光の消失を初期化マーカーの一つとして用いる事がある。これら

のことから、ウイルス由来プロモーターを用いずに iPS 細胞へ *Foxn1* 遺伝子を導入する必要性が考えられた (図 1 1)。

ウイルス由来プロモーターを用いない遺伝子導入法として、ヒト EF1 α プロモーター下にマウス *Foxn1* を挿入したレンチウイルスベクターを作製し、iPS 細胞へ遺伝子導入を行った。EF1 α プロモーター下に挿入した *Foxn1* は iPS 細胞において高発現しており、さらに *Foxn1* 導入 iPS 細胞を用いた TEC 分化誘導の結果、*Foxn1* 非導入時と比べて誘導効率が上昇することが示された。

過去に行われた多能性幹細胞由来 TEC 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。Su らは、胸腺形成に寄与する転写因子である HOXA3 および FOXN1 をリコンビナントタンパク質として分化誘導環境に加える手法を報告している。この手法により、ヒト ES 細胞から TEC の分化誘導効率が向上することを示している (Su et al., 2015a)。また、Bredenkamp らは、*Foxn1* をマウス胎児線維芽細胞において恒常的に発現させる事によって、これら線維芽細胞が TEC 様表現型および機能を獲得することを報告している

(Bredenkamp et al., 2014)。これら先行研究と本研究で得られた知見から、多能性幹細胞や胎生期の体細胞を用いた TEC の誘導において、外因性の *Foxn1* の発現が促進的に寄与することが示唆された。また、同じく内胚葉由来細胞の分化誘導研究として、マウス ES 細胞を用いたインスリン産生細胞分化誘導系において、転写因子 Pax4 を遺伝子導入する手法が報告されている (Blyszczuk et al., 2002)。この報告において Blyszczuk らは、膵内分泌細胞の分化に関わる転写因子である Pax4 を誘導 0 日目に電気穿孔法にて遺伝子導入し、分化誘導することでインスリン産生細胞の誘導効率が向上することを示している。その他にも造血幹細胞の分化誘導などでも遺伝子導入が試みされており、一定の成果が報告されている (Sugimura et al., 2017)。これらの知見も合わせて考えると、目的細胞を効率よく産生するために、生体内での分化発生に関わる転写因子の導入が一つの有用な手段として考えられる。そのためには、分化誘導の目的となる細胞がどのような遺伝子の働きによってその分化方向付けがなされているのか、より詳細な発生生物学的知見が必要となってくるであろう。

iPS 細胞由来 TEC の機能解析を行うにあたっては、初めに胸腺を欠損するヌードマウスを用いた。すなわち、胸腺を欠損するマウスへ *in vitro* で作製した胸腺組織を移植することで機能が代替されるかを評価した。移植後のヌードマウス末梢血の解析から、iPSC-TEC (EpCAM⁺) 移植群は Control 群 (EpCAM⁻) 移植群よりも T 細胞分画の細胞が多く認められた。また、回収した移植片内で CD4/CD8 ダブルポジティブ細胞が検出されたことから、移植した iPSC-TEC 組織が T 細胞の分化の場として機能したことが示唆された。一方で、末梢で検出できた T 細胞の数は多くはなく、また回収してフローサイトメトリーに付することができた iPSC-TEC 組織の数

も僅かだった。これらのことから、*in vivo* へ組織を移入する際のダメージ、また移植箇所、さらに移植前の誘導及び細胞調整過程に改善の余地があると考察された。

本研究の目的である「多能性幹細胞を用いた移植医療における免疫制御」を検討するため、C3129F1 マウスをレシピエント、B6 マウスを iPSC-TEC および皮膚移植ドナーとしたマウス移植モデルを用い、iPSC-TEC 移植による免疫制御能の検討を行った。B6 マウス iPSC-TEC を移植されたレシピエントでは、B6 皮膚移植片の生着期間が Control 群にくらべて有意に延長していた。またこの時、BALB/c 皮膚移植片は iPSC-TEC 移植群および Control 群ともに早期の拒絶を認めた。また iPSC-TEC 移植群で B6 皮膚移植片と BALB/c 皮膚移植片のサイズ変化を比べると、移植後初期から BALB/c 皮膚は有意に移植片サイズが小さいことがわかった。またいずれの群においても自己の皮膚は 100% の生着を維持していた。これらのことから、B6 由来 iPSC-TEC の移植はレシピエントが本来有していた自己への寛容に加え、B6 特異的に反応が抑えられたことが示唆された。一方で、皮膚移植片の生着延長効果は短い期間に限られていたことから、前述のヌードマウスを用いた検討と同様に iPSC-TEC の移植方法等の検討が必要と考えられた。また、移植片の種類によって拒絶応答の強さが違うとの報告がこれまでになされており、皮膚は拒絶の応答の強い組織として位置づけられている (Jones et al., 2001)。したがって、iPSC-TEC 移植時におけるレシピエントの前処置方法なども最適化することで、長期間に渡って非皮膚移植片の生着期間が延長できる可能性がある。

以上、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、TEC 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 TEC 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、現在までにマウス多能性幹細胞からの TEC 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。これらの報告では、ヒト ES 細胞由来 TEC の移植によってヌードマウス体内で機能的な T 細胞が産生され、アロ皮膚移植片を拒絶する能力があること (Parent et al., 2013)、また MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) 遺伝子を導入したヒト ES 細胞から TEC を誘導し移植することで、MOG 抗原特異的な T 細胞を *in vivo* で除去し、実験的脳脊髄炎の発症を抑制可能であるという報告がなされている (Su et al., 2015b)。一方で、*Foxn1* 導入を用いた分化誘導法ならびに作製した TEC 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。

多能性幹細胞を用いた移植医療・細胞治療は、今後更に発展していくことが予測される。また現行の移植医療と異なり、ドナーとなる細胞に任意の遺伝子改変などを行えることから、今後も様々な「ドナー改変型」のアプローチで拒絶反応を回避する手

法が開発されるであろう。一方でマイナー抗原の差異などはレシピエントの MHC などを改変する手法では解決できない場合もおこりうるため、レシピエントの免疫系を変化させるアプローチが重要であると考えられる。本研究はこのような「レシピエント改変型」のコンセプトを示したものであり、今後のさらなる研究開発の一助となることが期待される。

結論

1. 本研究全体からの新知見

- マウス iPS 細胞由来 TEC の新規分化誘導法を開発した。
- マウス iPS 細胞から TEC を分化誘導するにあたって、転写因子 *Foxn1* を遺伝子導入することによってその分化誘導効率が上昇することを示した。
- iPS 細胞を用いた移植医療・細胞治療を想定したドナー・レシピエント間での皮膚移植において、iPS 細胞由来 TEC を事前に移植することによって、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が延長することを示した。

2. 新知見の意義

iPS 細胞から TEC を誘導するにあたって、*Foxn1* の遺伝子導入によって分化誘導効率が上昇すること、また iPS 細胞由来 TEC を用いて、同一の MHC 遺伝子型を持つ組織の拒絶応答を制御できるという新たな可能性を示した。

3. 今後展開されうる研究

iPS 細胞を用いて TEC を *in vitro* で高効率に作製可能であることが示された。胸腺は加齢に伴って退縮する臓器であるため、本研究で示した移植免疫応答のみならず個体の免疫老化（すなわち胸腺の退縮）への応用が考えられる。さらに他家 iPS 細胞または遺伝子治療を組み合わせた自家 iPS 細胞を用いることで、先天的な胸腺低形成または欠損による免疫不全症への応用、さらに胸腺機能不全を原因とした APECED（autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy）を始めとする自己免疫疾患等への応用研究が考えられる。

4. 今後の課題

- 分化誘導した TEC の網羅的遺伝子発現プロファイルなどによる生体 TEC との比較検討を行うこと
- 移植後の TEC の表現型、機能の変化などを解析すること
- 膵β細胞、心筋細胞、運動神経細胞などに代表される機能的 iPS 細胞由来移植片を用いて、移植片の生着延長効果を検討すること

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて下さいました北海道大学 遺伝子病制御研究所 病態研究部門 免疫生物分野 清野研一郎教授に深甚なる謝意を表します。さらに本研究遂行から論文作成に至るまで多大なるご指導ご鞭撻を賜りました同 和田はるか講師、ムハンマド・バグダーディー講師に心より感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたりご協力いただきました北海道大学 遺伝子病制御研究所 病態研究部門 免疫生物分野の皆様には感謝致します。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Abu-Issa, R., Smyth, G., Smoak, I., Yamamura, K., and Meyers, E.N. (2002). Fgf8 is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse. *Development* 129, 4613–4625.
- Alexander, S.I., Smith, N., Hu, M., Verran, D., Shun, A., Dorney, S., Smith, A., Webster, B., Shaw, P.J., Lammi, A., et al. (2008). Chimerism and Tolerance in a Recipient of a Deceased-Donor Liver Transplant. *N. Engl. J. Med.* 358, 369–374.
- Baldwin, T.A., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2004). The fourth way? Harnessing aggressive tendencies in the thymus. *J. Immunol.* 173, 6515–6520.
- Bashuda, H., Kimikawa, M., Seino, K., Kato, Y., Ono, F., Shimizu, A., Yagita, H., Teraoka, S., and Okumura, K. (2005). Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates. *J. Clin. Invest.* 115, 1896–1902.
- Blyszczuk, P., Czyz, J., Kania, G., Wagner, M., Roll, U., St-onge, L., and Wobus, A.M. (2002). Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. 2–7.
- Boehm, T., and Swann, J.B. (2013). Thymus involution and regeneration: two sides of the same coin? *Nat. Rev. Immunol.* 13, 831–838.
- Braun, M.Y., Jouvin-Marche, E., Marche, P.N., MacDonald, H.R., and Acha-Orbea, H. (2018). T cell receptor V β repertoire in mice lacking endogenous mouse mammary tumor provirus. *Eur. J. Immunol.* 25, 857–862.
- Bredenkamp, N., Ulyanchenko, S., O'Neill, K.E., Manley, N.R., Vaidya, H.J., and Blackburn, C.C. (2014). An organized and functional thymus generated from FOXN1-reprogrammed fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* 16, 1–7.
- Chojnowski, J.L., Masuda, K., Trau, H. a, Thomas, K., Capecchi, M., and Manley, N.R. (2014). Multiple roles for HOXA3 in regulating thymus and parathyroid differentiation and morphogenesis in mouse. *Development* 141, 3697–3708.
- Coffèr, P.J., and Burgering, B.M.T. (2004). Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 889–899.

- Dessimoz, J., Opoka, R., Kordich, J.J., Grapin-Botton, A., and Wells, J.M. (2006). FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis in vivo. *Mech. Dev.* 123, 42–55.
- Gomalusse, G.G., Hirata, R.K., Funk, S.E., Riobobos, L., Lopes, V.S., Manske, G., Prunkard, D., Colunga, A.G., Hanafi, L., Clegg, D.O., et al. (2017). HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells. *Nat. Publ. Gr.* 35, 765–772.
- Green, M.D., Chen, A., Nostro, M.-C., d’Souza, S.L., Schaniel, C., Lemischka, I.R., Gouon-Evans, V., Keller, G., and Snoeck, H.-W. (2011). Generation of anterior foregut endoderm from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 267–272.
- Halloran, P.F. (2004). Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 351, 2715–2729.
- Hill, M.O. (1973). Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences. *Ecology* 54, 427–432.
- Hoffmann, D., Schott, J.W., Geis, F.K., Lange, L., Müller, F.J., Lenz, D., Zychlinski, D., Steinemann, D., Morgan, M., Moritz, T., et al. (2017). Detailed comparison of retroviral vectors and promoter configurations for stable and high transgene expression in human induced pluripotent stem cells. *Gene Ther.* 24, 298–307.
- Hong, S., Hwang, D.-Y., Yoon, S., Isacson, O., Ramezani, A., Hawley, R.G., and Kim, K.-S. (2007). Functional analysis of various promoters in lentiviral vectors at different stages of in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Mol. Ther.* 15, 1630–1639.
- Huang, S.X.L., Islam, M.N., O’Neill, J., Hu, Z., Yang, Y.-G., Chen, Y.-W., Mumau, M., Green, M.D., Vunjak-Novakovic, G., Bhattacharya, J., et al. (2014). Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 32, 84–91.
- Ichise, H., Nagano, S., Maeda, T., Miyazaki, M., Miyazaki, Y., Kojima, H., Yawata, N., Yawata, M., Tanaka, H., Saji, H., et al. (2017). NK Cell Alloreactivity against KIR-Ligand-Mismatched HLA-Haploidentical Tissue Derived from HLA Haplotype-Homozygous iPSCs. *Stem Cell Reports* 9, 853–867.
- Ildstad, S.T., and Sachs, D.H. (1984). Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts. *Nature* 307, 168–170.

Inami, Y., Yoshikai, T., Ito, S., Nishio, N., Suzuki, H., Sakurai, H., and Isobe, K.-I. (2011). Differentiation of induced pluripotent stem cells to thymic epithelial cells by phenotype. *Immunol. Cell Biol.* 89, 314–321.

Jones, N.D., Turvey, S.E., Van Maurik, A., Hara, M., Kingsley, C.I., Smith, C.H., Mellor, a L., Morris, P.J., and Wood, K.J. (2001). Differential susceptibility of heart, skin, and islet allografts to T cell-mediated rejection. *J. Immunol.* 166, 2824–2830.

Jordan, R.K., Robinson, J.H., Hopkinson, N.A., House, K.C., and Bentley, A.L. (1985). Thymic epithelium and the induction of transplantation tolerance in nude mice. *Nature* 314, 454.

Kawai, T., Cosimi, A.B., Spitzer, T.R., Tolkoff-Rubin, N., Suthanthiran, M., Saidman, S.L., Shaffer, J., Preffer, F.I., Ding, R., Sharma, V., et al. (2008). HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N. Engl. J. Med.* 358, 353–361.

Kawai, T., Sachs, D.H., Sprangers, B., Spitzer, T.R., Saidman, S.L., Zorn, E., Tolkoff-Rubin, N., Preffer, F., Crisalli, K., Gao, B., et al. (2014). Long-term results in recipients of combined HLA-mismatched kidney and bone marrow transplantation without maintenance immunosuppression. *Am. J. Transplant.* 14, 1599–1611.

Kawamura, T., Miyagawa, S., Fukushima, S., Maeda, A., Kashiwara, N., Kawamura, A., Miki, K., Okita, K., Yoshida, Y., Shiina, T., et al. (2016). Cardiomyocytes Derived from MHC-Homozygous Induced Pluripotent Stem Cells Exhibit Reduced Allogeneic Immunogenicity in MHC-Matched Non-human Primates. *Stem Cell Reports* 6.

Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., and Hogquist, K. a (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* 14, 377–391.

Lai, L., and Jin, J. (2009). Generation of thymic epithelial cell progenitors by mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 27, 3012–3020.

Longmire, T.A., Ikonomou, L., Hawkins, F., Christodoulou, C., Cao, Y., Jean, J.C., Kwok, L.W., Mou, H., Rajagopal, J., Shen, S.S., et al. (2012). Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 10, 398–411.

Manley, N.R., and Capecchi, M.R. (1995). The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development. *Development* 121, 1989–2003.

Morelli, A.E., and Thomson, A.W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 610.

Morris, H., DeWolf, S., Robins, H., Sprangers, B., LoCascio, S. a, Shonts, B. a, Kawai, T., Wong, W., Yang, S., Zuber, J., et al. (2015). Tracking donor-reactive T cells: Evidence for clonal deletion in tolerant kidney transplant patients. *Sci. Transl. Med.* 7, 272ra10.

Nehls, M., Pfeifer, D., Schorpp, M., Hedrich, H., and Boehm, T. (1994). New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature* 372, 103.

Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., et al. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat. Methods* 8, 409–412.

Øzbay, L.A., Møller, N., Juhl, C., Bjerre, M., Carstens, J., Rungby, J., and Jørgensen, K.A. (2012). The impact of calcineurin inhibitors on insulin sensitivity and insulin secretion: a randomized crossover trial in uraemic patients. *Diabet. Med.* 29, e440–e444.

Parent, A. V., Russ, H.A., Khan, I.S., Laflam, T.N., Metzger, T.C., Anderson, M.S., and Hebrok, M. (2013). Generation of functional thymic epithelium from human embryonic stem cells that supports host T cell development. *Cell Stem Cell* 13, 219–229.

Ready, A.R., Jenkinson, E.J., Kingston, R., and Owen, J.J. (1984). Successful transplantation across major histocompatibility barrier of deoxyguanosine-treated embryonic thymus expressing class II antigens. *Nature* 310, 231–233.

Salaün, J., Bandeira, a, Khazaal, I., Calman, F., Coltey, M., Coutinho, a, and Le Douarin, N.M. (1990). Thymic epithelium tolerizes for histocompatibility antigens. *Science* 247, 1471–1474.

Scandling, J.D., Busque, S., Dejbakhsh-Jones, S., Benike, C., Millan, M.T., Shizuru, J.A., Hoppe, R.T., Lowsky, R., Engleman, E.G., and Strober, S. (2008). Tolerance and Chimerism after Renal and Hematopoietic-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 358, 362–368.

Su, M., Hu, R., Jin, J., Yan, Y., Song, Y., Sullivan, R., and Lai, L. (2015a). Efficient in vitro generation of functional thymic epithelial progenitors from human embryonic stem cells. *Sci. Rep.* 5, 9882.

Su, M., Song, Y., He, Z., Hu, R., Rood, D., and Lai, L. (2015b). Administration of embryonic stem cell-derived thymic epithelial progenitors expressing MOG induces antigen-specific tolerance and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Autoimmun.* 58, 36–47.

Sugimura, R., Jha, D.K., Han, A., Soria-Valles, C., da Rocha, E.L., Lu, Y.-F., Goettel, J.A., Serrao, E., Rowe, R.G., Malleshaiah, M., et al. (2017). Haematopoietic stem and progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Nature* 545, 432.

Sun, X., Xu, J., Lu, H., Liu, W., Miao, Z., Sui, X., Liu, H., Su, L., Du, W., He, Q., et al. (2013). Directed differentiation of human embryonic stem cells into thymic epithelial progenitor-like cells reconstitutes the thymic microenvironment in vivo. *Cell Stem Cell* 13, 230–236.

Suzuki, G., Moriyama, T., Takeuchi, Y., Kawase, Y., and Habu, S. (1989). Split tolerance in nude mice transplanted with 2'-deoxyguanosine-treated allogeneic thymus lobes. *J. Immunol.* 142, 1463–1469.

Szot, G.L., Yadav, M., Lang, J., Kroon, E., Kerr, J., Kadoya, K., Brandon, E.P., Baetge, E.E., Bour-Jordan, H., and Bluestone, J.A. (2015). Tolerance induction and reversal of diabetes in mice transplanted with human embryonic stem cell-derived pancreatic endoderm. *Cell Stem Cell* 16, 148–157.

Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 127–135.

Taylor, C.J., Bolton, E.M., Pocock, S., Sharples, L.D., Pedersen, R.A., and Bradley, J.A. (2005). Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. *Lancet* 366, 2019–2025.

Teo, A.K.K., Valdez, I.A., Dirice, E., and Kulkarni, R.N. (2014). Comparable generation of activin-induced definitive endoderm via additive Wnt or BMP signaling in absence of serum. *Stem Cell Reports* 3, 5–14.

Tomita, Y., Khan, A., and Sykes, M. (1994). Role of intrathymic clonal deletion and peripheral anergy in transplantation tolerance induced by bone marrow transplantation in mice conditioned with a nonmyeloablative regimen. *J. Immunol.* 153, 1087 LP-1098.

Wada, H., Kojo, S., Kusama, C., Okamoto, N., Sato, Y., Ishizuka, B., and Seino, K.I. (2011). Successful differentiation to T cells, but unsuccessful B-cell generation, from B-cell-derived induced pluripotent stem cells. *Int. Immunol.* 23, 65–74.

Wendling, O., Dennefeld, C., Chambon, P., and Mark, M. (2000). Retinoid signaling is essential for patterning the endoderm of the third and fourth pharyngeal arches. *Development* 127, 1553 LP-1562.

Wood, K.J., Bushell, A., and Hester, J. (2012). Regulatory immune cells in transplantation. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 417–430.

Yamada, K., Shimizu, A., Utsugi, R., Ierino, F.L., Gargollo, P., Haller, G.W., Colvin, R.B., and Sachs, D.H. (2000). Thymic Transplantation in Miniature Swine: II. Induction of Tolerance by Transplantation of Composite Thymokidneys To Thymectomized Recipients. *J. Immunol.* 164, 3079–3086.

Yasunaga, M., Tada, S., Torikai-Nishikawa, S., Nakano, Y., Okada, M., Jakt, L.M., Nishikawa, S., Chiba, T., Era, T., and Nishikawa, S.-I. (2005). Induction and monitoring of definitive and visceral endoderm differentiation of mouse ES cells. *Nat. Biotechnol.* 23, 1542–1550.

Zom, A.M., and Wells, J.M. (2009). Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 221–251.