HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	他家iPS細胞由来組織移植を想定したドナー血液細胞を用いた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)	村田, 智己
Description	配架番号：2786
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15468号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90016
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	MURATA_Tomoki_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　村田　智己

学 位 論 文 題 名

他家 iPS 細胞由来組織移植を想定したドナー血液細胞を用いた免疫制御法の開発に関する研究
（Development of methods for immune regulation using donor hematopoietic cells for allogeneic induced pluripotent stem cell-based transplantation）

背景と目的

近年、iPS 細胞に代表される多能性幹細胞を用いた移植医療（再生医療）が発展を続けている。iPS 細胞を用いた移植は、コストの観点から他家 iPS 細胞を利用することが計画されているため結果的に他家移植であり、レシピエント免疫系による拒絶が問題となる。この問題に対して、iPS 細胞の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）に着目した対策が中心的に検討されているが、臓器移植における知見から MHC 以外にも遺伝的差異に由来するマイナー抗原不一致が拒絶の原因となることが想定される。しかし、他家 iPS 細胞を用いた移植、すなわち MHC 一致・マイナー抗原不一致の関係の組織移植において、どの程度拒絶が問題となるか、および有効な免疫制御法については明らかにされていない。

臓器移植では、ドナー由来血液細胞を用いて免疫制御が可能であることが報告されている。代表的な手法として、ドナー特異的輸血（donor-specific blood transfusion : DST）、あるいはドナー由来造血幹・前駆細胞（hematopoietic stem and progenitor cells : HSPCs）を用いた mixed chimerism による免疫寛容誘導法が知られている。しかし、これらの手法が他家 iPS 細胞を用いた移植に応用可能であるかは不明である。以上から本研究では、ドナー血液細胞を用いた免疫制御法が MHC 一致・マイナー抗原不一致の関係の移植における免疫制御に応用可能であるか明らかにすることを目的とした。

材料と方法

他家 iPS 細胞を用いた移植は主に組織移植であることが想定されるため、組織移植であるマウス皮膚移植を実験モデルとして用いた。また、実際の iPS 細胞を用いた移植を想定して、MHC 一致・マイナー抗原不一致の関係かつ MHC ホモドナーからヘテロレシピエントへの組み合わせで皮膚移植実験を行った。検討した組み合わせの中で、特に拒絶の強かった組み合わせ（B6 から C3129F1 への移植）について、皮膚移植後における T 細胞応答および抗ドナー抗体産生について解析し、一般的な免疫抑制剤の拒絶制御効果について検証した。

臓器移植における知見にもとづいて、ドナー由来血液細胞を用いた DST または mixed chimerism 誘導によって MHC 一致・マイナー抗原不一致の関係の移植における拒絶を制御できるか検証した。DST による免疫制御の試みでは、血液細胞の中で拒絶制御に十分な細胞種の同定を行った。iPS 細胞を用いて mixed chimerism を誘導するために、まず iPS 細胞由来 HSPCs（iHSPCs）の分化誘導法について検討した。具体的には、2 種類の転写因子（HoxB4/Lhx2）を用いて iHSPCs の誘導効率および造血能が向上するか解析した。最後に作製した iHSPCs がアロジェニックレシピエントに生着し mixed chimerism を形成するか、およびドナーに対して免疫寛容を誘導するか検証した。

結果

はじめに実験モデルを用いて MHC 一致・マイナー抗原不一致の関係の皮膚移植において生じる免

疫応答を解析した。実施した組み合わせの中で、C3129F1 レシピエントに移植した B6 移植片が最も早期に拒絶されることが明らかになり、C3129F1 脾臓中に B6 反応性 T 細胞が存在することが明らかになった。一方で、皮膚移植レシピエントでは、移植前と比較してレシピエント血清中の B6 反応性 IgG 抗体量の増加は見られなかった。これらの結果から、MHC 一致・マイナー抗原不一致の関係となる移植では、T 細胞応答は生じるが、抗体関連型拒絶のリスクは低減されることが明らかになった。したがって、他家 iPS 細胞を用いた移植では、MHC 一致の iPS 細胞を用いたとしても T 細胞応答制御が課題となることが示唆された。

MHC 一致・マイナー抗原不一致の関係の移植における拒絶制御法として、ドナー由来血液細胞を用いた DST の有効性を検証した。前処置を施した C3129F1 レシピエントに対して B6 脾臓細胞を投与し、B6 および BALB/c 皮膚を移植した。その結果、BALB/c 皮膚は全レシピエントで拒絶されたが、B6 皮膚は一部の個体において 100 日以上生着した。したがって、DST によってドナーに対して選択的に拒絶が制御され、免疫寛容が誘導されたことが示唆された。次に、脾臓中の免疫制御効果を有する細胞種の同定を行った結果、B6 脾臓から単離した B 細胞を用いて B6 皮膚移植片および B6 由来 iPS 細胞に対する拒絶を制御できることが明らかになった。以上より、iPS 細胞由来の B 細胞を用いた DST が免疫制御法として有用である可能性が示唆された。

分化誘導プロトコル検討の結果、iHSPCs 分化誘導過程で Lhx2 と HoxB4 の作用を組み合わせることで、未分化な血液細胞である c-Kit^{+}Sca-1^{+}Lineage^{-}細胞の収量が増加することが明らかになった。また、上記分化誘導プロトコルで作製した iHSPCs はシンジェニックレシピエントに 20 週以上生着し、長期的な造血能を有していた。さらに、作製した iHSPCs は MHC 一致・マイナー抗原不一致の C3129F1 レシピエントにおいて mixed chimerism を形成し、iPS 細胞と同一ドナー（B6）由来皮膚移植片および iPS 細胞の生着を維持できることが示された。また、前処置に副刺激分子阻害（costimulatory blockade）を併用することで、iHSPCs は MHC 不一致レシピエントにも生着し、皮膚移植片の生着期間を延長できることが明らかになった。iHSPCs による免疫制御メカニズムとして iHSPCs から分化した骨髄由来抑制性細胞（myeloid-derived suppressor cell：MDSC）の寄与が示唆された。以上から、iHSPCs を用いてドナーに対して免疫寛容を誘導できることが示された。

考察

これまで他家 iPS 細胞を用いた移植において免疫制御の必要性が認識されており、低免疫原性 iPS 細胞の利用が中心的に検討されてきた。一方で、移植後の免疫制御法に関してはあまり検討されておらず、効果的なプロトコルは明らかにされていない。本研究によって、免疫抑制剤の効果が限定的であることが示され、薬剤の併用や増量の必要性が示唆された。しかし、免疫抑制剤の長期使用では重篤な副作用が問題となることから、免疫寛容誘導法の開発が重要であると考えられた。現状では、他家 iPS 細胞を用いた移植における免疫寛容誘導法は確立されていないが、本研究によって iPS 細胞由来 B 細胞あるいは HSPC が免疫寛容の誘導に有用である可能性が示された。以上から、他家 iPS 細胞を用いた移植における免疫寛容誘導法の確立に向けて基礎的なコンセプトを実証することができた。

結論

ドナーとレシピエントの MHC が一致した移植であっても、マイナー抗原の不一致を原因として拒絶が生じることが示された。しかし、免疫抑制剤単剤では拒絶制御効果が限定的であったため、免疫寛容誘導法の確立が必要である。本研究によって、ドナー血液細胞を用いて免疫寛容誘導が可能であり、脾臓由来 B 細胞および iPS 細胞由来造血幹・前駆細胞が有用であることが示された。したがって、iPS 細胞を用いた移植における免疫寛容誘導法の開発に向けてドナー血液細胞を用いた手法に関するコンセプトが実証された。