



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 [全文の要約]
Author(s)	村田, 智己
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：2786 他
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/2115/90037
Type	doctoral thesis
File Information	MURATA_Tomoki_summary.pdf



学位論文（要約）

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)

2023 年 3 月

北海道大学

村田 智己

学位論文（要約）

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)

2023 年 3 月

北海道大学

村田 智己

【 緒言 】

近年、iPS 細胞を用いた移植医療（再生医療）が発展を続けており、iPS 細胞由来治療用細胞の開発が進行している。再生医療では、コストおよび移植までの時間を削減するために他家 iPS 細胞株の使用が計画されており、レシピエント免疫系による治療用細胞拒絶の制御が課題となっている。現状では、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、MHC 以外にもマイナー抗原の不一致が拒絶の原因となる。したがって、他家 iPS 細胞を用いた移植では MHC について対策を施したとしても、免疫制御は重要な課題である。しかし、他家 iPS 細胞を用いた移植、すなわち MHC 一致 (0 ミスマッチ) ・マイナー抗原不一致の関係の組織移植において有効な免疫制御法についてはこれまで十分に検討されていない。

臓器移植では、ドナー由来血液細胞を用いた免疫制御法の有効性が報告されている。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) を用いた血液キメラ法により免疫寛容の誘導が可能であることが報告されているが、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明らかにされていない。以上から本研究では、他家 iPS 細胞を用いた移植に応用可能な免疫制御法の検討として、ドナー由来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いて有効であるか明らかにすることを目的とした。第一章では、マウス移植実験モデルの構築および DST の有効性について検証した結果を示した。第二章では、iPS 細胞由来 HSPCs (iHSPCs) が移植免疫応答の制御に応用可能であるか検証した。

【 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。本研究では、代表的な組織移植モデルであるマウス皮膚移植実験系を用いて MHC 一致・マイナー抗原不一致の組み合わせの移植において生じる免疫応答を解析し、免疫制御法について検討を行った。第一章では、レシピエントマウスに対して DST (ドナー由来血液細胞投与) を施し、拒絶制御効果について検証した。第二章では、iHSPCs 分化誘導プロトコルを検討し、拒絶制御効果について検証した。

【 第一章 】

結果

まず、免疫制御法の有効性検証に用いる実験モデルについて検討した。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は、C3129F1 (MHC ハプロタイプ : H-2^{k/b}) に B6 (H-2^{b/b}) 皮膚組織を移植した場合に最も早期に移植片が拒絶され、MHC 不一致ドナーである BALB/c (H-2^{d/d}) と比較して生着期間に有意な差は認められなかった。以降、拒絶の強かった B6 から C3129F1 への移植の組み合わせを実験モデルとして用いて MHC 一致・マイナー抗原不一致の移植における免疫学的解析を行った。C3129F1 に移植した B6 移植片には T 細胞浸潤が認められ、レシピエント C3129F1 には 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、レシピエント血清中に抗 B6 抗体は検出されず、MHC 一致・マイナー抗原不一致の移植では抗ドナー抗体産生が促進されにくいことが示された。したがって他家 iPS 細胞を用いた移植では抗体関連型拒絶のリスクが低減されるが、T 細胞応答が生じる可能性が示唆された。また、臓器移植で一般的に用いられる免疫抑制剤を用いたとしても拒絶制御の効果は限定的であり、移植片生着を長期間維持することは困難であった。

次に、DST による拒絶制御効果を検証するために、B6 脾臓細胞をレシピエント C3129F1 に投与し、皮膚移植を行った。第三者である BALB/c (H-2^{d/d}) 移植片はすべて拒絶されたが、B6 移植片は長期に生着を維持した。この結果から DST が他家 iPS 細胞を用いた移植においても有効である可能性が示唆されたが、iPS 細胞から全脾臓細胞に相当する細胞を作製することは経済的に困難であると想定される。そこで、iPS 細胞から作製する免疫制御細胞の候補を選定するために、脾臓細胞中の拒絶制御に十分な細胞種の同定を試みた。B6 脾臓から単離した B 細胞を投与したレシピエント C3129F1 では、B6 移植片が長期に生着を維持したが、BALB/c 移植片は早期に拒絶された。また、B 細胞を投与したレシピエント C3129F1 では、コントロール群と比較して B6 に対する T 細胞反応性が低下しており、B6 に対して免疫寛容が誘導されたことが示唆された。B6 由来 B 細胞を投与したレシピエント C3129F1 では制御性 T 細胞の増加は認められず、B6 反応性 T 細胞クローンの出現頻度低下が認められなかったことから、ドナー B 細胞投与による免疫制御メカニズムとして T 細胞が不応答に誘導されたと考えられた。最後に、iPS 細胞を用いた移植医療への応用可能性を検証するために、B6 脾臓由来 B 細胞を投与したレシピエント C3129F1 に対して B6 由来 iPS 細胞を移植した。その結果、コントロール群と比較して B 細胞投与群において iPS 細胞の生着およびテラトーマ形成が促進された。

考察

MHC 一致・マイナー抗原不一致の皮膚移植では、早期に移植片が拒絶され、免疫抑制剤の効果が限定的な組み合わせがあることが明らかになった。したがって、他家 iPS 細胞を用いた移植においては、免疫抑制剤の併用や増量が必要な

可能性が想定される。しかし、免疫抑制剤の長期使用は副作用の問題を伴うため、免疫寛容誘導法の開発が必要である。本研究により、DST が MHC 一致・マイナー抗原不一致の皮膚移植の拒絶制御に有効であることが示され、特に単離した B 細胞を用いても拒絶制御には十分であった。したがって、他家 iPS 細胞から作製した B 細胞に相当する細胞が免疫制御に有用であることが示唆された。

【 第二章 】

結果

まず、転写因子導入による iHSPCs 分化誘導プロトコルを検討し、2 因子を併用することで細胞収量が増加することが明らかになった。また、2 因子を併用することで最も未分化な血液細胞である c-Kit 陽性 Sca-1 陽性 Lineage マーカー陰性細胞が拡大され、効率よく iHSPCs を作製できることが示された。シンジエニックレシピエントへの移植実験の結果から、2 因子併用により作製した iHSPCs は、1 因子導入で作製した iHSPCs よりも長期造血能が高いことが明らかになった。前処置を施した C3129F1 に B6 由来 iHSPCs を移植したところ、16 週間以上末梢血中に iHSPCs 由来の血液細胞が検出され、血液キメラの形成が認められた。iHSPCs を投与したレシピエント C3129F1 では、B6 移植片の生着期間がコントロール群と比較して有意に延長され、100 日以上生着を維持した個体が認められた。また、iHSPCs を投与したレシピエント C3129F1 では、末梢血中に iHSPCs 由来の骨髄由来抑制性細胞 (MDSC) が検出され、制御性 T 細胞の増加が認められた。これらの結果から iHSPCs による免疫制御メカニズムとして MDSC あるいは制御性 T 細胞が寄与した可能性が示唆された。

次に、iHSPCs を用いた免疫制御法が MHC 不一致の組み合わせの移植にも有効であるか検証した。前処置を施した C3H (H-2^{k/k}) マウスに共刺激分子阻害剤を投与し B6 由来 iHSPCs を投与した結果、16 週以上末梢血中に iHSPCs 由来の血液細胞が検出された。また、iHSPCs を投与したレシピエント C3H に対して皮膚移植を実施したところ、B6 移植片はコントロール群と比較して生着期間が延長した。これらの結果から、iHSPCs は MHC 不一致レシピエントにも生着し、拒絶を制御可能であることが示された。

考察

本研究により、iHSPCs を効率よく拡大できる転写因子の新規組み合わせが同定され、iHSPCs が免疫制御に応用できることが示された。今後の課題として、免疫制御に寄与する分子メカニズムの解明が挙げられる。また、iHSPCs を用いた免疫制御法を臨床応用するにあたってヒト iHSPCs の分化誘導プロトコルを構築することが重要である。

【 結論 】

MHCが一致した移植であってもマイナー抗原不適合による移植片拒絶のリスクがある。したがって、レシピエントに対して MHC が一致した他家 iPS 細胞を移植に用いた場合においても免疫制御は重要な課題である。本研究によって、MHC 一致・マイナー抗原不一致の組み合わせの移植における免疫制御法としてドナー由来血液細胞を用いた手法が有効であることが示された。具体的には、iPS 細胞由来の B 細胞に相当する細胞が有用である可能性、および iHSPCs を用いて免疫寛容誘導が可能であることが示された。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。