



Title	iPS細胞に対するアロ免疫反応の解析と同細胞が持つ免疫寛容誘導能の発見 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	鎌谷, 智紀
Description	配架番号 : 2934
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16543号
Issue Date	2025-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95840
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KAMATANI_Tomoki_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 鎌谷 智紀

学 位 論 文 題 名

iPS 細胞に対するアロ免疫反応の解析と同細胞が持つ免疫寛容誘導能の発見
(Analysis of alloimmune responses to iPS cells and the discovery of their immunotolerance-inducing potential)

背景と目的

Induced pluripotent stem cell (iPSC) を用いた移植医療では、予め安全性・有効性が保証された他家 iPSC の使用が検討されている。これは、患者ごとに iPSC 樹立・iPSC 由来治療用細胞の分化誘導・安全性評価・有効性評価を臨床グレードで行うには多くのコストがかかる為である。一方で、他家 iPSC を使用する場合、拒絶反応の制御が必要になる。そこで低免疫原性他家 iPSC の使用が検討されている。具体的には、ストックする他家 iPSC に HLA 遺伝子をホモ接合体で持つ体細胞を用いることで、HLA 型一致の移植を可能にする、HLA ホモ接合体 iPSC スtock などである。確かに HLA 型一致の移植は拒絶反応を低減させることが可能であるものの、他家移植である以上、HLA 抗原以外の抗原である、マイナー抗原による拒絶反応が引き起こされうる。したがって、MHC 型一致・マイナー抗原不一致の関係にある、他家 iPSC を用いた移植医療において生じえる免疫反応とその制御方法の検討は重要な課題と言える。

これまでにこの課題に対して、MHC 型一致・マイナー抗原不一致の他家 iPSC 移植のモデルとして、MHC 型一致・マイナー抗原不一致のマウス皮膚移植モデルの作成と免疫応答の評価を実施してきた。その結果、MHC 型が一致していたとしても、免疫抑制剤単剤では拒絶反応制御が困難であることが明らかになった。したがって本研究では、MHC 型一致・マイナー抗原不一致の他家 iPSC 移植における免疫抑制方法の検討として、適切な免疫抑制剤併用プロトコルの検討及び、このドナー抗原に対して免疫学的に不応答な状態である、免疫寛容の誘導法とそのメカニズム解析を実施した。

材料と方法

iPSC 由来移植は臓器ではなく組織であることを想定し、MHC 型一致・マイナー抗原不一致のマウス皮膚移植モデルを使用した。具体的には、MHC 遺伝子をホモ接合体でもつ CBA/N (MHC ハプロタイプ: H-2^{k/k}) や C57BL/6 (H-2^{b/b})、129x1 (H-2^{b/b})、BALB/c (H-2^{d/d}) をドナーに使用し、レシピエントには C312F1 (H-2^{b/k}) や B6C3F1 (H-2^{b/k})、B6D2F1 (H-2^{b/d}) を用いた。第 1 章では、これらの組み合わせでの移植における拒絶反応を、臨床の移植医療において使用されている 3 剤併用 (triple drugs combination; TDC; タクロリムス、メチルプレドニゾロン、ミコフェノール酸モフェチル) 療法および TDC に加えて移植前の T 細胞除去を実施する群 (TDC+mAb) または共刺激性分子阻害 (co-stimulatory molecule blockade; CB; 抗 CD40L 抗体、CTLA4-Ig) 療法および CB の維持療法としてラパマイシンの持続投与を行う群 (CB+rapa) で検証した。また、第 2 章では、第 1 章の研究の中で見出した現象に基づいて、MHC 型一致・マイナー抗原不一致のマウスにドナー由来 iPSC を移植することで免疫寛容を誘導した。それぞれの免疫制御能について、移植組織の生着評価に加え、ドナー免疫細胞の評価 (ドナー反応性 T 細胞や抗体の有無、シングルセル RNA-seq による単細胞レベルでの評価) を実施した。また、臨床への応用性について検討する目的で、免疫系ヒト化マウスを用いたヒト iPSC 由来肝オルガノイド移植における免疫制御能力についても評価した。

結果

まず、MHC 型一致・マイナー抗原不一致のマウス皮膚移植モデルを用いて、種々の免疫抑制剤併用による拒絶反応制御能について検証した。その結果、MHC 型が一致していても、臨床臓器移植において一般的な TDC では長期の免疫制御が困難であることが明らかになった。移植前の T 細胞除去を併用した TDC+mAb では、マウス皮膚移植モデルのうち CBA/N→C3129F1 の移植で長期生着が可能になるものの、C57BL/6→C3129F1 の移植では拒絶反応制御が困難であることが明らかになった。一方で、共刺激分子阻害の CB をベースとした方法では C57BL/6→C3129F1 の移植における拒絶反応の制御も可能になることが明らかになった。免疫系ヒト化マウスへのヒト iPSC 由来肝オルガノイド移植における CB 療法の免疫制御能力の検討では、CB 治療群においてヒト免疫細胞を移入しないコントロールマウスと同等の生着が認められ、ヒト免疫においても CB が有効であることが示唆された。

また、上記検討を行う中で見出した、MHC 型一致・マイナー抗原不一致マウスへの iPSC の生着現象について、その特徴と機序を解析したところ以下のことが明らかになった。まず、この他家 iPSC が生着したマウスにおけるドナー抗原に対する免疫応答の変化を検討する目的で、iPSC 移植後に iPSC と同系統の皮膚移植片および第三者の皮膚移植片を移植したところ、本来拒絶される皮膚移植片が事前の iPSC 移植によって、iPSC と同系統の皮膚移植片のみ生着するようになることが明らかになった。すなわち、ドナー由来 iPSC 移植がドナー抗原特異的免疫寛容を誘導するという現象を発見した。iPSC 移植後の免疫寛容誘導効率について経時的に比較したところ、時間の経過と共にその効率が向上することが明らかになったことから、経時的に宿主免疫細胞のシングルセル RNA-seq を実施した。その結果、制御性 T 細胞 (Treg) 中の CD25⁺CD103⁺エフェクター Treg が iPSC 由来奇形腫内で経時的に増加していることが明らかになった。抗 CD25 抗体投与や Foxp3^{TR} マウスへのジフテリア毒素 (DT) 投与は Treg の増加を阻害し、免疫寛容誘導効率を有意に低下させた。さらに、iPSC 由来奇形腫において TGF- β 2 の経時的な発現増加と、抗 Tgfb 抗体投与によるエフェクター Treg の減少・2 次移植皮膚への CD3⁺細胞の浸潤増加が認められた。以上のことより本現象における Treg の重要性和 Treg 増加への TGF- β 2 の寄与が推察された。

考察

本研究に用いた皮膚移植モデルにおいて、臨床臓器移植において使用されている TDC では拒絶反応の強い組み合わせの免疫反応を十分に制御することができなかった。このことは、iPSC 由来組織を用いた移植においても TDC で拒絶反応制御が困難なドナー・レシピエントの組み合わせが存在することを示唆している。このため、拒絶反応の強い組み合わせであっても制御可能な手法が必要となるものと考えられた。その一例として CB 治療が考えられる。CB 療法、特にラパマイシンとの併用は、軽度のみならず重度の拒絶反応を示すドナー由来皮膚に対する免疫反応を、制御可能であることが明らかになった。

また本研究では、ドナー由来 iPSC 移植誘導するドナー抗原特異的免疫寛容誘導現象について、その特性やメカニズム解析を実施した。iPSC 移植による免疫寛容誘導効率は経時的に向上すること、そして本現象の誘導と維持に iPSC 由来奇形腫が不可欠であるという特性に加えて、本現象のメカニズムの一端として Treg 依存的な寛容誘導メカニズムがあることを示した。本現象についてより詳細に機序解析を行うことによって、本現象を活用した新規の免疫寛容誘導方法の創出に発展する可能性が考えられる。

結論

本研究では MHC 型一致・マイナー抗原不一致の組織移植における免疫制御方法として、適切な免疫抑制剤の併用療法の検討と新規の免疫寛容誘導方法について検討した。免疫抑制剤併用療法では CB を中心とした免疫制御法が有効であることが示された。一方、TDC を用いた免疫制御法も組み合わせによっては有効であるが、その場合には移植前のスクリーニングが必要になるものと考えられた。また、本研究で見出した免疫寛容誘導現象についてより詳細な解析を行うことによって、免疫抑制剤の必要としない、新規の免疫寛容誘導方法が創出されることが期待された。