



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16543
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95980
Type	doctoral thesis
File Information	KAMATANI_Tomoki.pdf



学位論文

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)

2025 年 6 月

北海道大学

鎌谷 智紀

学位論文

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)

2025 年 6 月

北海道大学

鎌谷 智紀

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	4 頁
略語表	7 頁
諸言	8 頁

第 1 章：マウス皮膚移植モデルを用いた MHC 型一致マイナー抗原不一致

iPSC 由来組織移植に有効な免疫抑制剤併用プロトコールの検討

緒言	11 頁
材料と方法	12 頁
結果	17 頁
考察	27 頁

第 2 章：iPSC 移植が誘導するドナー抗原特異的免疫寛容のメカニズム解析

緒言	30 頁
材料と方法	31 頁
結果	37 頁
考察	66 頁

結論	68 頁
謝辞	70 頁
利益相反	71 頁
引用文献	72 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表または投稿した。

1. Tomoki Kamatani, Ryo Otsuka, Tomoki Murata, Haruka Wada, Takeshi Takahashi, Akihiro Mori, Soichiro Murata, Hideki Taniguchi, Ken-ichiro Seino
“Evaluation of immunosuppression protocols for MHC-matched allogeneic iPS cell-based transplantation using a mouse skin transplantation model”
Inflammation and Regeneration, 2022 Feb 2;42(1):4.
2. 鎌谷智紀、清野研一郎
「MHC 型一致他家 iPSC 由来組織移植に有効な免疫抑制剤併用プロトコールの構築」
Organ Biology, 2022 年 29 巻 2 号 p. 133-137
3. Tomoki Kamatani, Reiko Kimura, Satoshi Ikeda, Makoto Inoue, Ken-ichiro Seino
“iPSCs engrafted in allogeneic hosts without immunosuppression induce donor-specific tolerance to secondary allografts”
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2025 Mar 18;122(11):e2413398122.

本研究の一部は以下の学会に発表した

1. 鎌谷智紀、村田智己、大塚亮、和田はるか、清野研一郎
「iPSC 由来組織移植に有効な免疫抑制剤併用プロトコルの構築」
第 85 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2021 年 5 月、
オンライン
2. 鎌谷智紀、大塚亮、村田智己、和田はるか、高橋武司、森淳祐、村田聡一郎、
谷口 英樹、清野研一郎
「MHC 型一致他家 iPSC 由来組織移植に有効な免疫抑制剤併用プロトコ
ルの構築」
第 47 回日本臓器保存生物医学会学術集会、2021 年 11 月、オンライン
3. Tomoki Kamatani, Ryo Otsuka, Tomoki Murata, Haruka Wada, Takeshi Takahashi,
Ken-ichiro Seino
“Optimized immunosuppression strategy in MHC-matched allogeneic iPS cell-based
transplantation”
The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, December 2021,
online
4. 鎌谷智紀、大塚亮、村田智己、和田はるか、高橋武司、森淳祐、村田聡一郎、
谷口 英樹、清野研一郎
「マウス皮膚移植モデルを用いた MHC 型一致マイナー抗原不一致 iPSC 移
植の免疫抑制プロトコルの構築」
第 19 回日本免疫治療学会学術集会、2022 年 5 月、東京
5. Tomoki kamatani, Ken-ichiro Seino
“Induction Of “Spontaneous” Allograft Tolerance By Pluripotent Stem Cells”
American transplantation congress, June 2023, San Diego, CA, USA

6. 鎌谷智紀、木村礼子、清野研一郎

「iPSC が誘導する移植免疫寛容のメカニズム解明」

第 49 回日本臓器保存生物医学会学術集会、2023 年 10 月、旭川

7. 鎌谷智紀、清野研一郎

「iPSC が持つ移植免疫寛容誘導能の発見とメカニズム解析」

第 21 回日本免疫治療学会学術集会、2024 年 5 月、福島

8. 鎌谷智紀、池田聡史、井上誠、清野研一郎

「ドナー由来多能性幹細胞の同種異系マウスへの生着はドナー抗原特異的免疫寛容を誘導する」

第 50 回日本臓器保存生物医学会学術集会、2024 年 11 月、愛知

9. Tomoki Kamatani, Satoshi Ikeda, Makoto Inoue, Ken-ichiro Seino

“iPSCs engrafted in allogeneic hosts without immunosuppression induce donor-specific tolerance to secondary allografts”

The 53rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, December 2024, Nagasaki

要旨

背景と目的

再生医療分野において embryonic stem cell (ESC) や induced pluripotent stem cell (iPSC) に代表される多能性幹細胞は、ドナー臓器の不足を解決しうる資源として注目を集めている。

自己 iPSC 由来組織を用いた移植では、患者ごとに iPSC および iPSC 由来治療用細胞の安全性および有効性評価が必要になるため、多くの時間的・経済的コストが生じる。したがって、予め安全性・有効性が保証された他家 iPSC を作製・保存し、必要時に iPSC 由来組織の作製元として使用する iPSC ストックの作成が世界的になされている。しかし、他家 iPSC ストックを用いた移植医療における免疫制御法に関する検討はこれまで十分に行われていない。

そこで、先行研究において、iPSC ストックを利用した移植を想定したマウス皮膚移植モデルを構築し、iPSC 由来組織移植時にも免疫応答が生じうる可能性があること、その際に生じる拒絶反応は免疫抑制剤単剤では制御が難しいことが明らかになっていた。

そこで、本研究においては、他家 iPSC 由来組織移植を行う際に有効な免疫制御方法を検討することを目的とした。第 1 章では免疫抑制剤の併用法による免疫制御方法について検討した。第 2 章では、第 1 章に関する研究を遂行する中で発見した、ドナー由来 iPSC 移植が誘導する免疫寛容誘導現象についてメカニズム解析を実施し、他家 iPSC を用いた同種移植における新規の免疫制御方法の可能性について検討した。

材料と方法

本研究では、MHC 型一致・マイナー抗原不一致のマウス皮膚モデルを使用した。第 1 章では臨床臓器移植において一般的に使用されている 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い (CB+rapa) 免疫を制御した。第 2 章では、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。解析手法は、移植組織の生着評価に加え、免疫細胞の評価を実施した。

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 が有効である可能性が示唆された。

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^{DTR} 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-β2 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 の重要性と Treg 増加への TGF-β2 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可能性を示唆している。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。このことは、ヒト iPSC 由来肝オルガノイド移植実験においても示され、ヒトにおいても CB 療法が有効である可能性が示唆された。

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。

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。

BLI	bioluminescent imaging
CB	co-stimulatory molecule blockade
CD40L	CD40 ligand
CFSE	carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
DAB	3,3'-Diaminobenzidine,tetrahydrochloride
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ESC	embryonic stem cell
FBS	fetal bovine serum
HE	hematoxylin and eosin
HLA	human leukocyte antigen
HSD	honestly significant difference
LIF	leukemia inhibitory factor
Luc	luciferase
MHC	major histocompatibility complex
MLR	mixed lymphocyte reaction
MMF	mycophenolate mofetil
MP	methylprednisolone
MST	median survival time
NOG	nonobese diabetic/Shi-scid, IL-2R γ KO Jic
PI	propidium iodide
POD	post-operative day
Rapa	rapamycin
TDC	triple drugs combination
Tac	tacrolimus
iPSC	induced pluripotent stem cell
mAb	monoclonal antibodies

緒言

移植医療の分野では、ドナー臓器の提供数に制限があるため、限られた移植臓器の生存期間を延長することは重要な試みである。移植臓器に対する拒絶反応は臓器廃絶の主な原因であり、数十年にわたり多くの研究が拒絶反応制御に焦点を当てて行われてきた (Goldfarb, 2005)。ドナー細胞表面に発現する major histocompatibility complex (MHC ; 主要組織適合遺伝子複合体)、ヒトでは human leukocyte antigen (HLA ; ヒト白血球型抗原) は、レシピエントの免疫細胞、特に T 細胞による監視を受けるため、同種移植後の免疫反応に重要な役割を果たしている (De Wolf and Sykes, 2017)。ゆえに、臨床臓器移植および骨髄移植では拒絶反応を低減させるために、ドナー・レシピエント間の HLA 型を一致させる努力がなされてきた (Opelz and Döhler, 2007, 2010; Sheldon and Poulton, 2006)。

臨床的知見より、同種移植において HLA 型の不一致が拒絶反応を引き起こすことは明白であるが、HLA タンパク質以外のマイナー抗原も拒絶反応を引き起こしうることが報告されている (Zhang and Reed, 2016)。独立した登録データを用いた 2 つの大規模多施設共同研究では、HLA 型が一致した兄弟間で行われた腎移植であっても、マイナー抗原が原因となって、長期生存率が低下することが示されている (Opelz, 2005; Terasaki, 2003)。さらに近年では、LIMS1 遺伝子座がマイナー抗原をコードしている遺伝子座の一つであることが明らかになり、この分子の不一致がヒト腎移植における拒絶反応のリスクを高めることが明らかになっている (Steers et al., 2019)。以上のことより、HLA 型一致他家移植において、マイナー抗原が誘発する拒絶反応制御は重要な課題である。

2006 年に高橋と山中が induced pluripotent stem cell (iPSC) を樹立したことにより、幹細胞生物学、創薬、再生医療の分野に新しい時代が訪れた (Shi et al., 2017)。再生医療の分野では、iPSC を目的とする細胞に分化誘導し治療に用いる試みがなされており、移植医療におけるドナー臓器不足の解決策として期待されている (Orlando et al., 2019)。しかし、患者ごとに iPSC を樹立し、iPSC 由来治療用細胞を作製・移植する医療には、臨床グレードの品質保証を満たした自己 iPSC が必要であり、その安全性・有効性を保障するために多くの費用と時間を要するため、これが標準的な治療法になるための制限となり得る (Turner et al., 2013; Yamanaka, 2020)。

そこで、免疫学的拒絶反応を軽減または回避する点で有効と考えられる、HLA ホモ接合体 iPSC ストックを確立するプロジェクトが開始された (Nakatsuji et al., 2008; Taylor et al., 2012)。このプロジェクトでは、HLA 遺伝子をホモ接合体で持つ複数人の健康なボランティアの体細胞から iPSC を作製・ストックし、使用時に患者の HLA 型と一致する株を選択することで、他家 iPSC を使用する際に生じる拒絶反応を低減させることが計画されている。しかしながら HLA を一致させることは可能であるものの、マイナー抗原は不一致の移植となることから、

マイナー抗原によって誘発される拒絶反応の制御が必要となる可能性が存在する。

我々は以前の研究において、本邦における iPSC ストックを用いた再生医療を想定したマウス皮膚移植モデルの構築および引き起こされる免疫応答についての検討を行なった (Murata et al., 2020)。その研究において、iPSC 由来組織移植時にも免疫応答が生じうる可能性があることを明らかにした。また、MHC 型一致・マイナー抗原不一致組織移植では免疫抑制剤である tacrolimus (Tac) 単剤を高用量用いても拒絶反応の制御は難しく、適切な薬剤の併用が必要であることを示した。また、非ヒト霊長類における研究では、MHC 型一致ドナー iPSC 由来の心筋細胞の生着の維持には、長期的な免疫抑制剤の使用が必要であったことが報告されているが、適切な免疫抑制剤併用プロトコルは検討されていない (Shiba et al., 2016)。

これらの背景より、MHC 型一致マイナー抗原不一致 iPSC を用いた同種移植における最適な免疫抑制戦略について検討する必要があると考えた。そこで本研究では、iPSC 由来組織移植を想定した移植実験モデルを用いて、以下の検討を行い、それぞれの結果を 2 章に分けて示した。第 1 章では MHC 型一致他家移植における有効な免疫抑制剤併用プロトコルを構築することを目的として、臓器移植において最も実施件数の多い臨床腎移植において、90%以上の症例 (Hart et al., 2021) で使用されている免疫抑制剤併用法の有効性および、T 細胞共刺激分子に対する標的治療による免疫制御効果を検討した。第 2 章では、第 1 章に関する研究を遂行する中で発見した、ドナー由来 iPSC 移植が誘導する免疫寛容誘導現象のメカニズム解析を実施し、MHC 型一致マイナー抗原不一致 iPSC を用いた同種移植における新規の免疫寛容誘導方法について検討した。

第 1 章

マウス皮膚移植モデルを用いた MHC 型一致マイナー抗原不一致 iPSC 由来組織移植に有効な免疫抑制剤併用プロトコルの検討

緒言

他家 iPSC を用いた移植医療は、自家 iPSC と比較して iPSC 樹立や安全性評価にかかるコストの低減が可能になる一方、拒絶反応の制御が必要となる。これまでに、HLA に着目した低免疫原性 iPSC の作成が検討されてきたが (Nakatsuji et al., 2008; Taylor et al., 2012)、他家移植である以上、マイナー抗原の不一致による拒絶反応が生じることから拒絶反応制御は依然として必要となる。

MHC ホモ接合体他家 iPSC を用いた組織移植において生じえる拒絶反応評価モデルとして、MHC 型一致他家マウス皮膚移植モデル (Murata et al., 2020) を用いた既報では、MHC 型が一致していたとしても、タクロリムスやラパマイシンといった薬剤単剤では拒絶反応制御が困難である可能性が示されている。

そこで、本研究では MHC 型一致他家マウス皮膚移植モデル (Murata et al., 2020) を用いて、MHC ホモ接合体他家 iPSC を用いた組織移植における拒絶反応制御に有効な免疫抑制剤併用法を検討することとした。

臨床における移植において最も実施件数の多い腎移植において一般的に使用されている、タクロリムスおよびメチルプレドニゾロン、ミコフェノール酸モフェチルからなる 3 剤併用療法、T 細胞の共刺激分子 (CD28 および CD40L) に対する抗体療法について主に検討し、最後に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対する免疫制御法についても検討した。

材料と方法

マウス

雄の BALB/c (MHC ハプロタイプ : H-2^{d/d})、C57BL/6J (H-2^{b/b})、CBA/N (H-2^{k/k})、129X1/SvJ (H-2^{b/b}) および雌の C3H/He (H-2^{k/k}) は日本エスエルシーより購入した。C3129F1 (H-2^{b/k}) マウスは雌の C3H/He と雄の 129X1/SvJ を交配することにより得た。また、Nonobese diabetic/Shi-scid, IL-2R γ KO Jic (NOG) マウスは In-Vivo Science Inc.より購入した。NOG マウスは X 線照射 (1.6 Gy) (MBR-1520R-4) とヒト臍帯血 CD34⁺細胞 (5×10^4 細胞, StemExpress, Folsom, CA, USA) の静脈内投与によって免疫系をヒト免疫に再構築し免疫系ヒト化マウスとして以降の実験に使用した。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」(承認番号: 18-0004) および、「公益財団法人実験動物中央研究所 動物実験等に関する規定」、「横浜市立大学における動物実験の実施に関する規定」(承認番号: F-A-17-025, F-A-20-021) に基づいて実施した。

iPSC 培養

iMatrix-511 (Takara Korea Biomedical Inc.) をコートした細胞培養ディッシュを用いて培養した。培養液は、advanced-DMEM/F-12 (ThermoFisher) に 1% (v/v) Neuro Brew-21 (Miltenyi)、0.5% (v/v) N2 サプリメント (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation.)、0.03% (w/v) L-Glutamine、0.1 mM 非必須アミノ酸 (NACALAI TESQUE, INC.)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (NACALAI TESQUE, INC.)、100 U/ml ペニシリン、100 g/ml ストレプトマイシン、181 mM 2-メルカプトエタノール (NACALAI TESQUE, INC.)、3 μ M CHIR99021 (Aadooq)、1 μ M PD0325901 (Tocris)、および組換えヒト leukemia inhibitory factor (LIF、研究室内で作製) を添加し使用した。

ヒト iPSC 由来肝オルガノイドの作製

ヒト iPSC 由来肝オルガノイドは、既報 (Takebe et al., 2017) に従って作製した。ヒト iPSC 由来肝内胚葉細胞、ヒト血管内皮細胞、ヒト間葉系細胞を Elplasia 6 well plates (Corning, Corning, NY, USA) 上で共培養した。播種細胞数は、1 well あたり、 2.5×10^6 個 (肝内胚葉細胞)、 1×10^6 個 (血管内皮細胞)、 1×10^6 個 (間葉系細胞) とした。培養液は既報 (Tsuchida et al., 2020) と同様に、endothelial cell media と hepatocyte culture medium (Cambrex, Baltimore, MD, United States) の混合液に、0.1 mM dexamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States)、10 ng/mL oncostatin M (R&D Systems, Minneapolis, MN, United States)、および SingleQuots (Lonza Walkersville, Inc. Walkersville, MD, United States) を添加し使用した。1 日目に Y-27632 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation.) を添加

し、2 日目に肝オルガノイドの回収と Cell culture insert (Corning Inc.) への再播種を行った。なお、培地の交換は 1 日おきに行った。

移植実験

- 皮膚移植

レシピエントマウスに 3.5% medetomidine (Domitor Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.) および、10% Midazolam (midazolam injection, TEVA, Takeda Pharmaceutical Co., Ltd.)、12% Butorphanol (Vetorphale, Meiji Seika) からなる麻酔薬 (以降、三種混合麻酔薬) を腹腔内注射し麻酔した。その後、背部皮膚の一部を円形上に切除し移植床を作成した。皮膚移植片はドナーマウス (BALB/c、C57BL/6、CBA/N または C3129F1) の背側の耳介皮膚を円形状に切除し作成した。移植後、移植片の直径を測定し、レシピエントマウスの皮膚移植片を絆創膏で保護した後、覚醒まで加温した。その後経時的に移植片の直径を測定し、移植片直径が移植直後の 30% 以下になったとき拒絶と判断した。

- Luc-iPSC 移植

三種混合麻酔薬を用いてレシピエントに麻酔した後、 2.5×10^6 個の Luciferase (Luc) -iPSC を 20 μ l のマトリゲル (Corning Inc.) に懸濁し、腓腹筋内に注入した。ルシフェリン投与後における発光シグナルを IVIS Spectrum Imaging System (Caliper Life Sciences) を用いて検出することにより Luc-iPSC の生着を観察した。レシピエントに 6 mg の D-ルシフェリン (Cayman) を腹腔内投与し、20 分経過後に露出時間 20 秒の条件で画像を取得しシグナルを測定した。Luc-iPSC を移植した部位を中心とした領域における radiance (photons/sec/cm²/sr) および total flux (photons/sec) にもとづいて Luc-iPSC の生着を評価した。

- 肝オルガノイド移植

既報(Qiu et al., 2020)と同様に移植を行った。レシピエントマウスをイソフルランで麻酔し、腹部正中切開の後、肝臓左葉の被膜を剥離し、iPSC 由来肝オルガノイドを移植した。移植した細胞数は、ヒト iPSC 由来肝内胚葉細胞相当で 2×10^6 個であった。

免疫抑制剤

Tacrolimus (Tac, Astellas Pharma Inc.) (0.5 mg/kg/day) および、Methylprednisolone (MP, Cayman) (5 mg/kg/day)、Mycophenolate mofetil (MMF, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) (100 mg/kg/day) からなる 3 剤併用免疫抑制法を triple drugs combination (TDC) 療法として使用した。TDC は連日腹腔内投与した。また、抗 CD4 抗体 (clone : GK1.5) および抗 CD8 抗体 (clone : 53-6.72) (当研究室で作製) は、移植前 6 日および移植前 1 日に腹腔内投与した。また、抗 CD40 ligand (CD40L)

抗体 (clone : MR-1 (マウス)、#BE0292 (ヒト)、共に BioXcell) および CTLA4-Ig (オレンシア®、Bristol Myers Squibb (マウス)、#BE0099、BioXcell (ヒト)) を共刺激分子阻害剤 (co-stimulatory molecule blockade:CB) 療法として使用した。抗 CD40L 抗体 (500 µg) および CTLA4-Ig (400 µg) は移植日から 2 日に 1 回、計 4 回投与した。Rapamycin (Rapa) (R-5000, LC Laboratories) (2.0 mg/kg) は、移植前日から 3 日に 1 回腹腔内投与した。免疫抑制剤の投与量は、過去の報告 (Moffatt et al., 1999; Pearl et al., 2011a; Shimmura et al., 2006; Wang et al., 2001) を参考に決定した。

免疫組織染色

皮膚移植片を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンで包埋した。ブロックを 5 mm の薄切を作製し、一次抗体に抗マウス CD3 α 抗体 (A0452, Dako)、二次抗体に抗ウサギ IgG-horse radish peroxidase (K4003, Dako) を用いて染色した。抗体の結合は、DAB (3,3'-Diaminobenzidine,tetrahydrochloride ; ジアミノベンジジン) 法を用いて検出した。染色した切片はヘマトキシリン (メルク) とエオジン (メルク) で細胞核および細胞質を染色した。皮膚移植片のパラフィンブロック作製以降の過程、HE 染色および免疫染色は札幌総合病理研究所に依頼した。

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーは FACSCelesta (BD Biosciences) または FACS Aria II (BD Biosciences) を用いて行い、得られたデータの解析には FlowJo software V10.7.1 (Tree Star, Ashland, OR, USA) を用いた。フローサイトメトリーに用いた抗体を (表 1) に示す。死細胞染色は DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) を用いて行った。

表 1 : フローサイトメトリーで使用した抗体

Antibody	Conjugation	Clone	Supplier
anti-mouse CD3e	PE	145-2C11	Biolegend
anti-mouse CD3e	FITC	145-2C11	Biolegend
anti-human CD3e	PE	HIT3a	Biolegend
anti-mouse CD4	PE/Cyanine7	GK1.5	Biolegend
anti-mouse CD4	APC/Cyanine7	RM4-5	Biolegend
anti-human CD4	BV421	Polyclonal goat IgG	R&D Systems
anti-mouse CD8a	PerCP/Cyanine5.5	53-6.7	Biolegend
anti-mouse CD8a	PE/Cyanine7	53-6.7	Biolegend
anti-human CD8a	FITC	Clone # 37020	R&D Systems

anti-mouse/human CD15	Alexa Fluor 647	MC-480	Biolegend
anti-mouse CD16/32	Purified	93	Biolegend
anti-mouse CD19	PE	6D5	Biolegend
anti-human CD19	APC	SJ25C1	Biolegend
anti-human CD33	FITC	HIM3-4	Biolegend
anti-mouse/human CD44	APC	IM7	Biolegend
anti-mouse CD45	APC	30-F11	Biolegend
anti-human CD45	APC/Cyanine7	HI30	Biolegend
anti-mouse CD62L	PE	MEL-14	Biolegend
anti-rat IgG2b, k	APC	RTK4530	Biolegend
anti-mouse IgG	Alexa Fluor 488	Goat polyclonal goat IgG	Invitrogen

Mixed lymphocyte reaction (MLR : 混合リンパ球反応)

レシピエント T 細胞のドナーに対する反応を評価するために MLR 試験を行った。responder 細胞として、レシピエントマウスの新鮮な脾臓細胞を用いた。stimulator 細胞として、BALB/c、C57BL/6、CBA/N、C3129F1 の新鮮な脾臓細胞を 30 Gy で照射し使用した。Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)

(Dojindo Laboratories) で標識した responder 細胞 (2×10^5) と stimulator 細胞 (8×10^5) を 96-well 丸底培養プレートに入れ、RPMI-1640 high-glucose に 10% fetal bovine serum (FBS)、0.1 mM non-essential amino acids、1 mM sodium pyruvate、50 μ M 2-mercaptoethanol、100 U/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin を添加し (いずれも Life Technologies) 培養した。培養 4 日目に、CFSE の蛍光の減少をフローサイトメトリーで測定することで T 細胞の増殖を評価した。

ドナー反応性抗体の測定

レシピエントマウスのドナー反応性抗体の産生を既報 (Sasaki et al., 2015) の方法を用いて測定した。移植後 100 日後にレシピエントマウスから血清を採取した。BALB/c、C57BL/6、CBA/N、または C3129F1 マウスの胸腺細胞の Fc レセプターをブロックした後、10% レシピエント血清を加え、15 分間氷上で反応させた。3 回の洗浄の後、Alexa fluor-488 標識ヤギ抗マウス IgG および PE 標識抗マウス CD19 抗体を加え、15 分間氷上で反応させた。3 回の洗浄の後、FACSCelesta を用いてデータを取得し FlowJo で解析した。

ヒトアルブミンの定量

ヒトアルブミンの定量は既報 (Tsuchida et al., 2020) をもとに以下の方法で行なった。レシピエント血液を移植前から 1 週間毎に採取した。血液を 20 分間遠心分離 (2000 g、4°C) し血漿を得た。得られた血漿を希釈し、enzyme-linked

immunosorbent assay (Bethyl Laboratories) を用いて、ヒトアルブミン濃度を評価した。

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

MHC 型一致・マイナー抗原不一致マウス皮膚移植モデルにおける拒絶反応制御に有効な免疫抑制剤併用プロトコールの検討

初めに、本邦における iPSC ストックを用いた組織移植を模した MHC 型一致マウス皮膚移植モデル (Murata et al., 2020) を用いて、種々の免疫抑制剤併用プロトコールの有効性評価を実施した (図 1A)。免疫抑制剤併用プロトコールとして、臨床臓器移植において一般的な Tac および MMF、MP の 3 剤からなる免疫抑制方法 (TDC) (Lim et al., 2017) および TDC に移植前の T 細胞除去を実施する方法 (TDC+mAb)、これまでに動物試験で高い免疫抑制能力を発揮することが報告されており (Pearl et al., 2011a)、今後臨床での使用が期待される (Grace et al., 2023; Shuhei et al., 2023) CD28 や CD40L などの共刺激分子に対する阻害抗体を用いた免疫抑制方法 (CB) および CB に rapamycin (rapa) を維持療法として加える方法 (CB+rapa) ついて検討した (図 1B)。TDC における各免疫抑制剤の投与量および投与スケジュールは、過去の報告 (Moffatt et al., 1999; Shimmura et al., 2006; Wang et al., 2001) を参考にし、ヒトで使用されている量 (per Kg) よりも多く投与した。CB に用いる抗体の投与量および投与スケジュールは、既報 (Pearl et al., 2011b) を参考に決定した。

いずれの免疫抑制剤併用プロトコールにおいても、重篤な体重減少等の有害事象は認められなかった (図 1C)。C3129F1 (H-2^{b/k}) マウスに C57BL/6 (H-2^{b/b})、CBA/N (H-2^{k/k})、または BALB/c (H-2^{d/d}) マウスの皮膚を移植する MHC 型一致マウス皮膚移植モデルでは、異系統である C57BL/6 および CBA/N、BALB/c 由来皮膚のいずれも無処置群で 27 日以内に全て拒絶される (Murata et al., 2020) ことが明らかになっているが、TDC によって、MHC 型一致・マイナー抗原不一致である CBA/N 皮膚の 40% 以上 (4/9) が 100 日以上 of 長期生着が得られ、移植前の T 細胞除去を加えた TDC+mAb では全ての移植片が 100 日以上 of 生着が維持された (図 1D)。この時 100 日目に生存した CBA/N 皮膚移植片を肉眼で観察すると、TDC では自己である C3129F1 皮膚に比べて表皮の萎縮が認められ、HE 染色像からは皮膚移植片の肥厚が認められたものの、TDC+mAb では C3129F1 皮膚と同等の外観であった (図 1E)。一方で、同じく MHC 型一致・マイナー抗原不一致である C57BL/6 皮膚は、TDC で 25 日以内 (MST=21 日) に拒絶され、TDC+mAb でも 100 日目にける生着率は 10% (1/10) (MST=49 日) であったが、CB によって 8/9 が 100 日間生着を維持し、CB+rapa によって全ての移植片が 100 日以上 of 生着が維持された (図 1D)。この時 100 日目に生存した C57BL/6 皮膚移植片を肉眼で観察すると、CB では自己である C3129F1 皮膚に比べて表皮の萎縮が認められ、HE 染色像からは皮膚移植片の肥厚が認められたものの、CB+rapa では C3129F1 皮膚と同等の外観であった (図 1E)。

これらの結果から、MHC 型一致・マイナー抗原不一致マウス皮膚移植における拒絶反応の強さは、ドナーとレシピエントの組み合わせによって、軽度（ドナー：CBA/N）から重度（ドナー：C57BL/6）まで存在することが明らかになった。さらに、比較的拒絶反応が軽度である組み合わせであれば、臓器移植における一般的な免疫抑制剤の組み合わせである TDC 加え移植前 T 細胞除去を行うことで長期生着が得られること、比較的拒絶反応が軽度である組み合わせであれば CB+rapa によって長期生着が得られることが明らかになった。

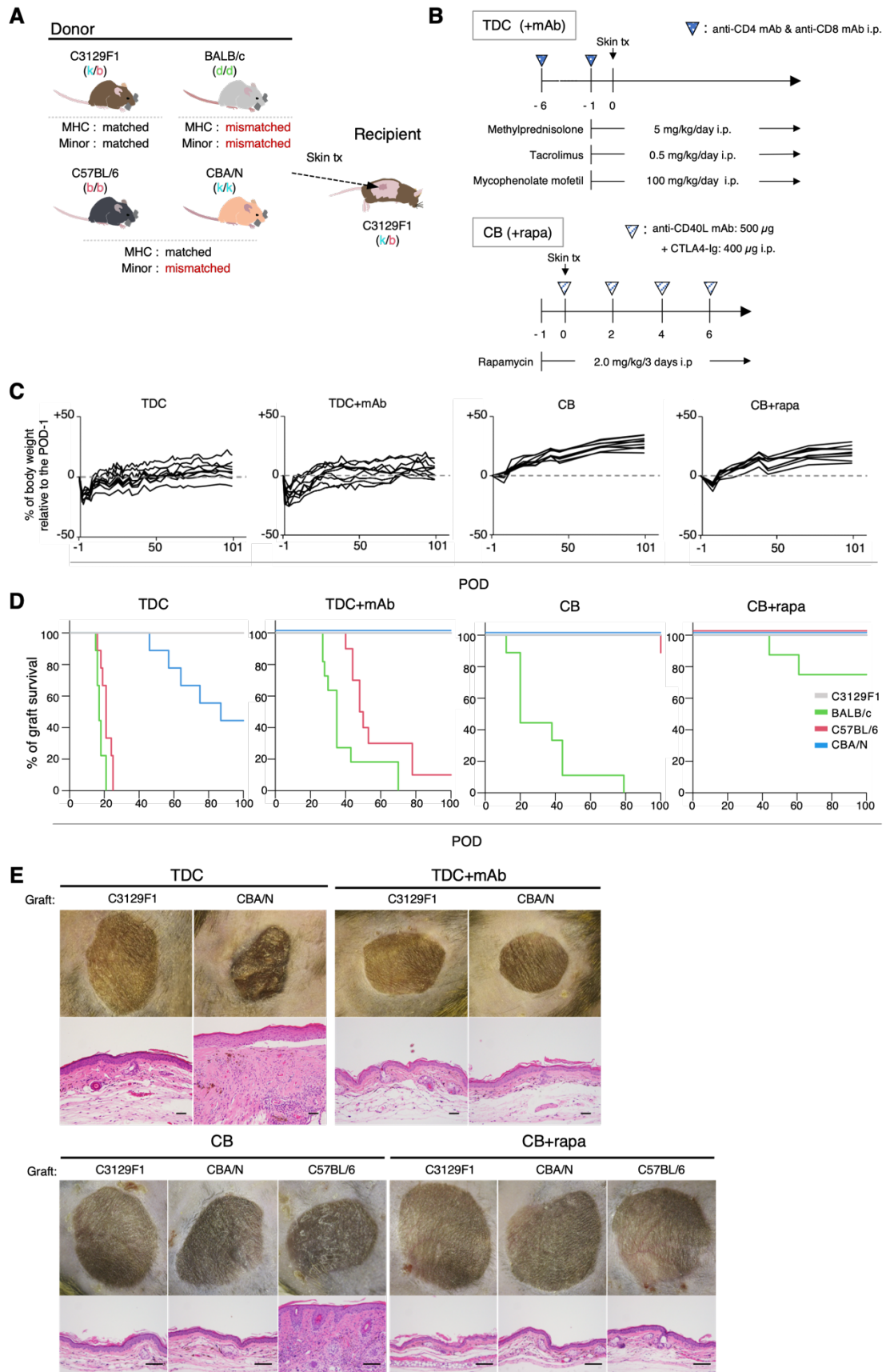


図 1. MHC 型一致・マイナー抗原不一致マウス皮膚移植モデルにおける拒絶反応制御に有効な免疫抑制剤併用プロトコルの検討

(A) マウス皮膚移植モデルの概念図。CBA/N と C57BL/6 を MHC 型一致のドナーとして使用した。(B) 各免疫抑制剤併用プロトコル。TDC では MP、Tac、および MMF を皮膚移植前日から観察期間終了まで連日投与した。TDC+mAb 療法では MP、Tac、および MMF を皮膚移植前日から観察期間終了まで連日投与し、移植の 6 日前および 1 日前に抗 CD4 抗体および抗 CD8 抗体からなる mAb を投与した。CB 療法では抗 CD40L 抗体と CTLA4-Ig を移植後 0、2、4、6 日目に投与した。CB+rapa 療法では抗 CD40L 抗体と CTLA4-Ig を移植後 0、2、4、6 日目に投与し、維持療法として rapa を移植前 1 日目から実験終了まで 3 日に一度投与した。(C) 各免疫抑制剤併用療法におけるレシピエントマウスの体重推移。移植前 1 日目の体重で標準化した（それぞれ n=9）。(D) 各免疫抑制剤併用療法における皮膚移植片の生存率（それぞれ n=9~11）。(E) 移植後 100 日目の C3129F1 または CBA/N、C57BL/6 皮膚移植片の観察像（上段）および HE 染色像（下段）。スケールバーは 100 μ m。

各免疫抑制剤併用プロトコールにおける免疫学的解析

次に各免疫抑制剤併用プロトコールの免疫制御能を評価する目的で、治療を行ったレシピエントマウスの免疫学的解析を行なった。

移植後 100 日目における CBA/N 皮膚を免疫染色したところ、TDC のみでは CD3⁺細胞の浸潤が認められたが、TDC+mAb によって CD3⁺細胞の浸潤が減少する傾向が認められた (図 2A)。また、C57BL/6 皮膚においては CB のみでは CD3⁺細胞の浸潤が認められたが、CB+rapa によって CD3⁺細胞の浸潤が減少する傾向が認められた (図 2A)。

各免疫制御法を実施した際のドナー抗原反応性 T 細胞について検討するために、移植後 100 日目以降に採取した各治療群のレシピエントマウス脾臓細胞を用いて、MLR を行った。レシピエントの脾臓細胞を CFSE で標識し、放射線照射したドナーの脾臓細胞と共培養した。その結果、いずれの免疫抑制方法においても、CD8⁺T 細胞の増殖率低下傾向が認められた (図 2B)。一方で、CD4⁺T 細胞については、TDC+mAb 治療群において、無治療群と比べて全てのドナーに対する有意な増殖率向上が認められた (図 2B)。これは、一過性の T 細胞枯渇に伴って生じるアロ特異的メモリー T 細胞の *in vivo* での形成とメモリー T 細胞の増殖を効率的に制御する Tac が存在しなくなる *in vivo* における活性化を反映していると考えられる (Gurkan et al., 2010; Mai et al., 2014; Sener et al., 2009)。TDC+mAb 療法によって拒絶反応の軽度な CBA/N 皮膚が長期にわたって生存することができたが、これは Tac の継続的投与が拒絶反応を引き起こしうるメモリー T 細胞の活性化を効果的に抑制したためと考えている。

また、拒絶を引き起こす原因となることが報告されているドナー反応性抗体の産生抑制能についても検討した (Loupy and Lefaucheur, 2018; Valenzuela and Reed, 2017; Zeng et al., 2014)。その結果、MHC 型不一致の BALB/c 反応性抗体は無治療において産生が認められ、各免疫制御によって低下する傾向が認められた。一方で、MHC 型一致他家の CBA/N 及び C57BL/6 反応性抗体は以前の結果と一致して (Murata et al., 2020) 無治療においても認められなかった (図 2C)。また、興味深いことに、無治療では認められなかった CBA 反応性抗体が TDC 治療群で存在する傾向が認められ、TDC+mAb 治療群でこの傾向が見られなくなった (図 2C)。

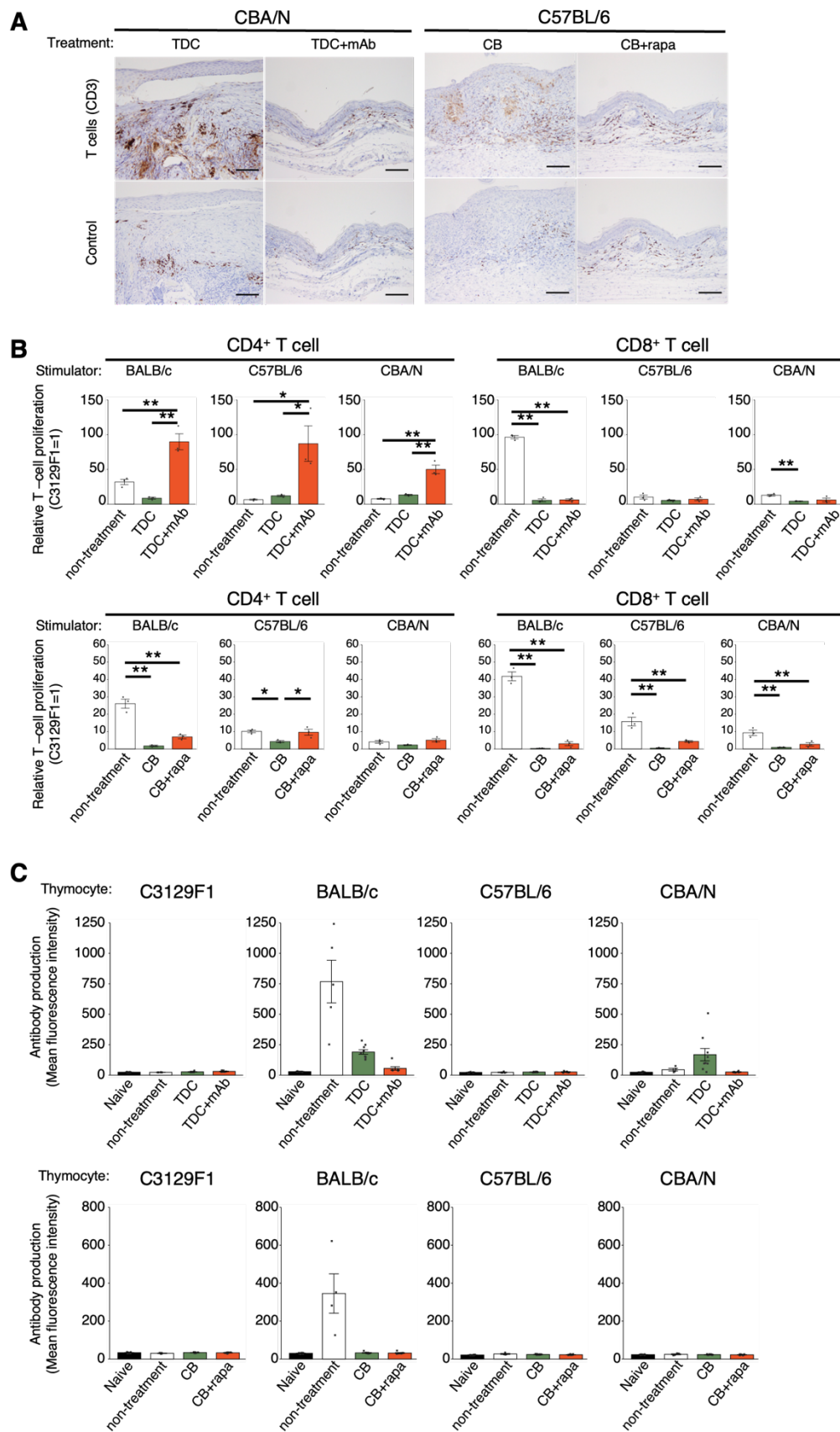


図 2. 各免疫抑制剤併用プロトコールにおける免疫学的解析

(A) 移植後 100 日目の TDC または TDC+mAb 投与群における CBA 皮膚移植片の免疫組織染色 (CD3) (左)。移植後 100 日目の CB または CB+rapa 投与群における C57BL/6 皮膚移植片の免疫組織染色 (CD3) (右)。スケールバーは 100 μm 。(B) MHC 型一致・マイナー抗原不一致皮膚移植におけるレシピエント T 細胞のドナー抗原に対する反応性試験。各治療群の T 細胞増殖率を自己脾臓細胞で刺激したレシピエントマウスの T 細胞増殖率で標準化した。エラーバーは実験内誤差を示す。独立した 2 回の実験で同様の結果が得られている。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Tukey's HSD test)。(C) レシピエントにおけるドナー反応性抗体の検出 (それぞれ $n=4\sim 11$)。

他家 iPSC 由来治療用細胞移植を想定した iPSC 移植実験

これまで MHC 型一致他家 iPSC 由来組織移植における免疫制御法についてマウス皮膚移植モデルを用いて検討してきた。次に、MHC 型一致他家 iPSC 移植モデルで同様の検討を実施した。Luc-CBA/N-iPSC または Luc-C57BL/6-iPSC を C3129F1 マウスの腓腹筋に移植し、iPSC の生着を Luc シグナルで評価した。その結果、TDC+mAb および CB+rapa による免疫制御はともに、C3129F1 マウスにおける Luc-CBA/N-iPSC 及び Luc-C57BL/6-iPSC の生着を促進した (図 3A, B)。

3 胚性の組織からなる iPSC 由来奇形腫に対する免疫応答制御にも TDC+mAb および CB+rapa が有効であるというこの知見は、MHC 型一致・マイナー抗原不一致 iPSC 由来治療用細胞を用いた移植医療における TDC+mAb および CB+rapa の有効性を裏付けるものである。

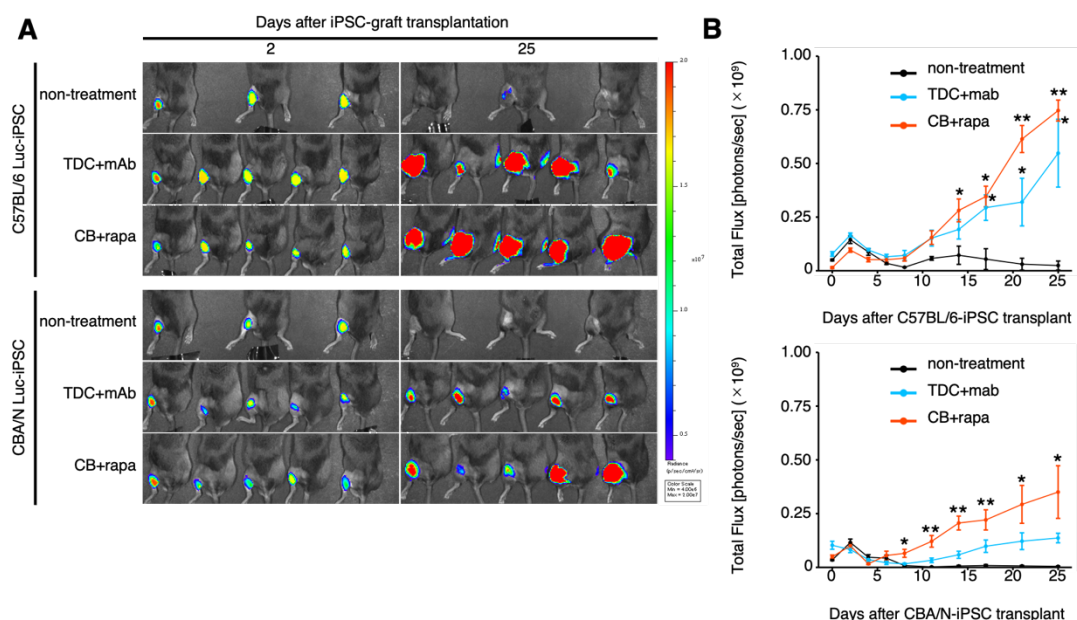


図 3. 他家 iPSC 由来治療用細胞移植を想定した iPSC 移植実験

(A, B) Luc-C57BL/6-iPSC (上段) または Luc-CBA/N-iPSC (下段) を移植した C3129F1 マウス (無治療または TDC+mAb か CB+rapa を投与) の Luc シグナルを検出し (A)、定量的に比較した (B) (それぞれ $n=3\sim5$)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Tukey's HSD test)。

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 CB の有効性評価

拒絶反応の比較的強い MHC 型一致・マイナー抗原不一致マウス皮膚移植における免疫制御にも有効であることが認められた、CB+rapa について、免疫系ヒト化マウスにおけるヒト iPSC 由来肝オルガノイド移植における免疫制御能について検討した。免疫系ヒト化マウスの作製および iPSC 由来肝オルガノイドの誘導及び移植実験は、既報のように (Mori et al., 2021) 実施した。免疫系ヒト化マウスモデルは、リンパ節の発達不全からリンパ球系の免疫反応を十分に再現することが困難であるため (Shultz et al., 2007, 2012)、本実験では免疫反応を誘導しやすい、HLA ハプロタイプ A が不一致となる組み合わせの移植を実施した。ヒト iPSC 由来肝オルガノイド移植後、CB または CB+rapa で免疫制御を実施し、iPSC 由来肝オルガノイドの生着は、レシピエント血清中のヒトアルブミンをもとに評価した (図 4A)。免疫系ヒト化マウスは NOG マウスにヒト HLA-A2⁺造血幹細胞を移植することで作成し、末梢血の FACS 解析によりヒト免疫が構築されていることを確認した (図 4B)。

その結果、ヒト造血幹細胞を移植していないコントロール群と比較して、免疫系ヒト化マウスでは、血中のヒトアルブミン濃度が徐々に低下し、CB の投与によって、血中ヒトアルブミン濃度が維持された (図 4C)。一方、CB に加えて rapa を投与すると (CB+rapa)、皮膚移植の結果と異なり、血中ヒトアルブミン濃度が低下することが明らかになった (図 4C)。この rapa による肝オルガノイドの生存率低下は、mTOR1 阻害が肝臓へダメージを与えるという既報から (Umemura et al., 2014)、rapa による mTOR 阻害が肝オルガノイドの生着を阻害した結果ではないかと考えられる。

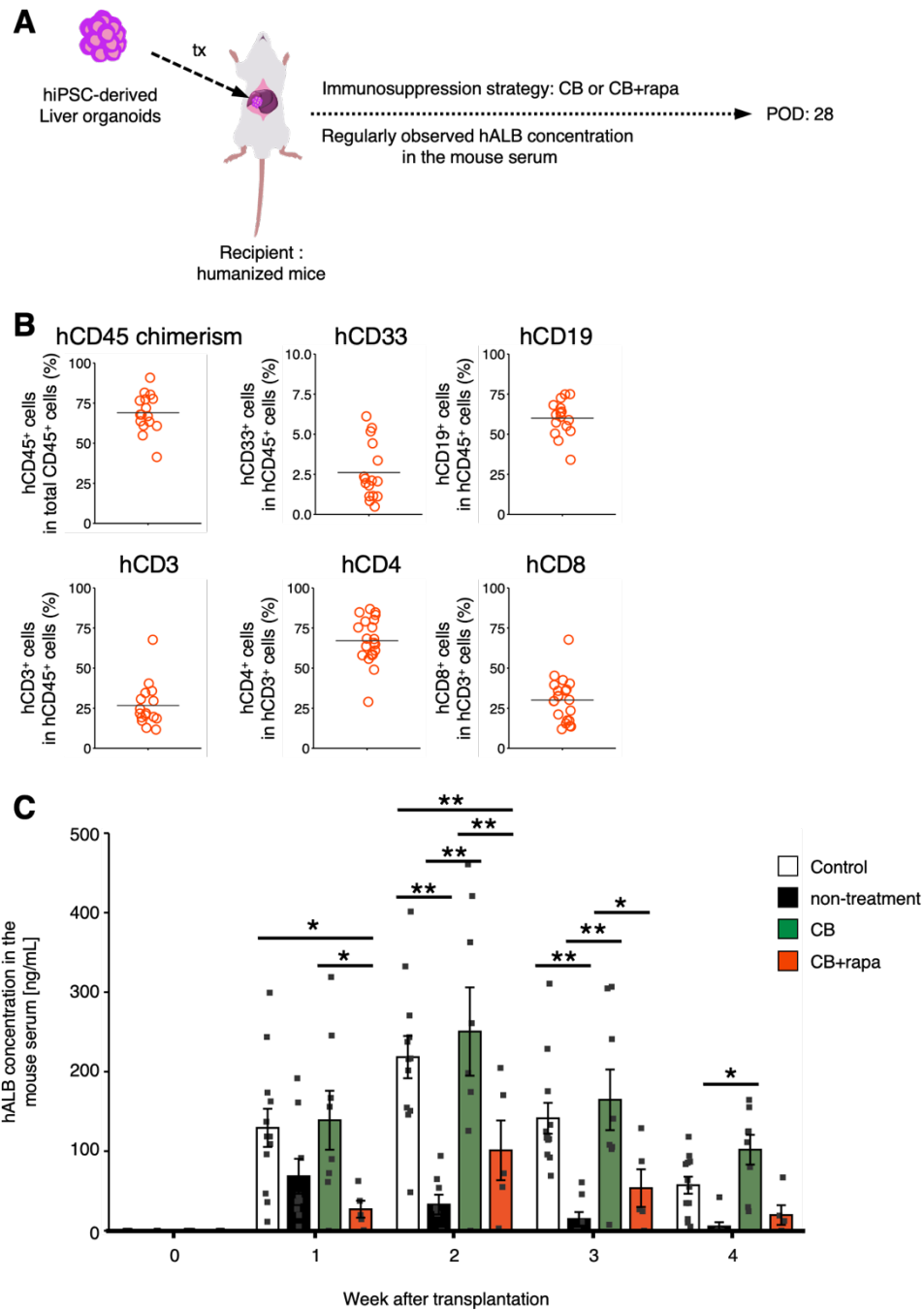


図 4. 免疫系ヒト化マウスを用いたヒト iPSC 由来肝オルガノイド移植における CB の有効性評価

(A) 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実験の概念図。(B) NOG マウス末梢血中のヒト血液細胞 (n=16~21)。(C) ヒト iPSC 由来肝オルガノイド移植マウスに血清中ヒトアルブミン濃度 (n=5~12)。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (Tukey's HSD 検定)。

考察

先行研究より、MHC 型一致・マイナー抗原不一致マウス皮膚移植では、ドナーとレシピエントの組み合わせによって、拒絶反応が異なることが明らかになっていた (Murata et al., 2020)。本研究では本モデルを用いて、臨床臓器移植で一般的に使用されている TDC または TDC+mAb による免疫制御を検討したところ、本研究で CBA/N に代表される拒絶反応が軽度の組み合わせの場合、TDC+mAb を用いれば移植片が拒絶されることなく、100 日以上生着することが明らかになった。一方で、TDC を中心とした免疫制御法では、ドナー反応性抗体が産生される傾向が認められるとともに、*in vitro* においてドナー反応性 CD4⁺T 細胞の増殖が認められ、ドナーに対する免疫学的反応を十分に制御できていないものと考えられた。その上、TDC を用いた免疫制御法では、本研究で C57BL/6 に代表される拒絶反応の重度の組み合わせの場合では、皮膚移植片の拒絶反応を抑制できないことが明らかになったため、特に、拒絶反応の重度の組み合わせの場合、TDC を用いた治療以外の、別のアプローチが必要となるものと考えられた。

本研究では CB 療法の有効性についても検討を行なった。CB 治療、特に rapa との併用を行うことによって、軽度のみならず重度の拒絶反応を示すドナー由来皮膚や iPSC に対する免疫反応を制御が可能であることが明らかになった。また、ヒト iPSC 由来肝オルガノイド移植実験では、CB 治療を行うことによって、アロ免疫によるヒトアルブミン値の低下が抑制され、ヒト免疫環境におけるヒト iPSC 由来組織移植片の拒絶に対して、CB が有効な免疫制御法である可能性が示唆された。

このように、今回の研究では、MHC 型一致・マイナー抗原不一致マウス皮膚移植において、TDC 療法の効果は限定的であるのに対して、CB 療法の有効であるとともに、iPSC 由来移植片の拒絶反応を抑制することが明らかになった。

抗 CD40L 抗体はこれまで、臨床試験において、血栓症の副作用を示しており (Kawai et al., 2000)、CB 療法の臨床応用の妨げとなっていた。しかしながら近年、Viela Bio、AstraZeneca、MedImmune の共同研究により、CD40L を標的とした新規の scaffold protein が開発され、*in vitro* において血小板凝集を誘発せず、合併症を伴わずに自己免疫疾患患者の予後を改善することが可能であったとの報告がなされた (Karnell et al., 2019)。このような技術的進歩は、将来、CB 療法を臨床に応用する際の支えとなるものと考えられる。

また本研究より、iPSC ストックを使用した移植を行う際、ドナーとなる iPSC とレシピエントの組み合わせが、重度の拒絶反応を起こしうるか事前に調べる方法を確認することの重要性が示唆された。事前のスクリーニングが可能となれば、拒絶反応の軽度な組み合わせの iPSC を選択し、TDC を中心とした治療法を選択することも可能となる。

また、iPSC 由来治療用細胞はその細胞毎に引き起こす拒絶反応の程度が異なるものと考えられる。例えば、生体組織において、齧歯類の皮膚や小腸、肺は同種移植において深刻な拒絶反応を引き起こすものの、心臓や腎臓、肝臓が惹起する免疫反応は比較的小さいことが報告されている (Davis et al., 1980; Mason et al., 1988; Nash et al., 1977; Steinmuller, 1998; Zhang et al., 1996)。このため、iPSC 由来治療用細胞を用いた移植医療では、その細胞種毎に、事前の免疫学的特性評価と使用する免疫制御法の慎重な選択が必要になると考えられる。

本研究によって得られた知見は、MHC 型一致・マイナー抗原不一致組織移植において、ドナー・レシピエント間の拒絶反応は組み合わせによって異なり、適切な免疫制御プロトコルを選択する必要があること、そして、CB をベースとした免疫制御方法の有効性である。

第 2 章

iPSC 移植が誘導するドナー抗原特異的免疫寛容のメカニズム解析

緒言

第1章ではMHC型一致・マイナー抗原不一致の関係のマウス皮膚移植をMHCホモ接合体iPSC由来組織移植のモデルとして使用し、有効な免疫抑制剤の併用方法について検討を行った。その結果、MHC型が一致していたとしても、現在臨床において一般的に使用されている併用療法十分に制御できない可能性が示唆された。この問題を解決する手段としてこれまで検討されてきたのが、レシピエント免疫系のドナー抗原に対する免疫寛容の誘導である。

臓器移植では、ドナー造血幹・前駆細胞移植による免疫寛容誘導法が数多く研究されており（Sachs et al., 2014）、臨床応用にまで到達している（Busque et al., 2020; Kawai et al., 2014; Lee et al., 2020; Leventhal et al., 2018）。しかし、他家iPSCストック由来治療用細胞移植においては、ドナー由来造血幹・前駆細胞の永続的な入手が困難であることに加え、iPSCからの完全な造血幹・前駆細胞の作成は極めて困難であり、生体由来HSCと同等の細胞を誘導するプロトコルは確立されていない（Daniel et al., 2016）。

そのような背景の中、第1章の研究を行う中でMHC型が一致した他家マウスに皮下接種したiPSCが、非免疫抑制下で生着し奇形腫を形成するという現象、そして、この他家iPSC由来奇形腫が生着したマウスにiPSC移植から40日後にiPSCと同種同系統由来皮膚と第三者由来皮膚を移植した場合、iPSCと同系の皮膚のみが生着するという興味深い現象を見出した。すなわち、ドナー由来iPSC移植が誘導するドナー抗原特異的免疫寛容現象の発見である。

このような現象はこれまでに報告されておらず初めての知見である上、本現象は、他家iPSCストック由来治療用細胞移植を含む、移植医療における新たな免疫制御方法の創出に発展する可能性があるものと考えられたため、本現象の特徴およびメカニズム解析を実施することとした。

材料と方法

マウス

雄の B6C3F1 (MHC ハプロタイプ H2^{b/k}) (雌 C57BL/6N と雄 C3H/He の交配)、B6D2F1 (H-2^{b/d}) (雌 C57BL/6N と雄 DBA/2 の交配)、CBA/N (H-2^{k/k})、BALB/c (H2^{d/d}) および 129X1/SvJ (H-2^{b/b}) マウスは、日本エスエルシー株式会社（日本、静岡）から購入した。Foxp3.eGFP-2A-DTR-2A-Luciferase (Foxp3^{DTR}) C57BL/6N は作製者である Günter Hämmerling 博士 (German Cancer Research Center (DKFZ)) から使用を許可され、堀 昌平 博士 (東京大学) および河部 剛史 博士 (東北大学) より提供された。すべての動物実験は国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認を得た (承認番号：18-0004)。

iPSC の作製

CBA/N および BALB/c、129X1/SvJ 由来の iPSC は既報 (Takahashi et al., 2007) に従って作製した。レトロウイルスベクターを用いて初期化に必要な *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* を Plat-E 細胞を用いてパッケージングし、各系統由来の線維芽細胞に感染し作製した。SSEA-1 陽性細胞をフローサイトメトリーで分取し iPSC とした。作製した iPSC はアルカリホスファターゼ染色、SSEA-1、*Nanog* および *Oct3/4*, *Sox4* の発現と、ヌードマウスへの皮下接種による奇形腫形成試験を実施し未分化性と分化多能性を評価した。

ES 細胞の作成

CBA/N 由来の ES 細胞株は既報のように作製した (Vila-Cejudo et al., 2017)。PMSG (あすかアニマルヘルス株式会社) および hCG (あすかアニマルヘルス株式会社) それぞれ 7.5IU の腹腔内投与によって過排卵を誘導した雌の CBA/N マウスを、雄の CBA/N マウスと交配させ、膣栓確認の 3 日後に屠殺し、子宮から受精卵を回収した。回収した受精卵は x 線照射によって不活化した CBA/N 由来線維芽細胞上で培養し、顕微鏡下で内部細胞塊を回収し培養した。SSEA-1 陽性細胞をフローサイトメトリーで分取し ES 細胞とした。作製した ES 細胞は iPSC と同様の手法で未分化性と分化多能性を評価した。

Luc-iPSC の作製

pCAG-HIVgp (理研 BRC、RDB04394) および pCMV-VSV-G-RSV-Rev (理研 BRC、RDB04393)、pHIV-Luc-ZsGreen (Addgene、#39196) を Polyethylenimine “MAX” (PSI) を用いて、Lenti-X 293 T 細胞にトランスフェクトし作製したレンチウイルスを iPSC に感染させ作製した。ZeGreen 陽性細胞をフローサイトメトリーで分取し Luc-iPSC とした。

GFP-iPSC の作製

pPyCAG-EGFP-IP (理研 BRC、RDB08525) を NEPA 21 Type II (Nepa Gene Co., Ltd.) を用いて iPSC にトランスフェクトした。GFP 陽性細胞をフローサイトメトリーで分取し GFP-iPSC とした。

iPS および ES 細胞の培養

iMatrix-511 (Takara Korea Biomedical Inc.) をコートした細胞培養ディッシュを用いて培養した。培養液は、advanced-DMEM/F-12 (ThermoFisher) に 1% (v/v) Neuro Brew-21 (Miltenyi)、0.5% (v/v) N2 サプリメント (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)、0.03% (w/v) L-Glutamine、0.1 mM 非必須アミノ酸 (NACALAI TESQUE, INC.)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (NACALAI TESQUE, INC.)、100 U/ml ペニシリン、100 g/ml ストレプトマイシン、181 mM 2-メルカプトエタノール (NACALAI TESQUE, INC.)、3 μ M CHIR99021 (Adooq)、1 μ M PD0325901 (Tocris)、および組換えヒト leukemia inhibitory factor (LIF、研究室内で作製) を添加し使用した (以降、多能性幹細胞培養培地)。

多能性幹細胞移植

iPSC および ES 細胞を iMatrix-511 コートした 6cm 細胞培養ディッシュに 2.5×10^5 細胞播種し、多能性幹細胞培養培地で培養した。2 日目に培地を交換し、4 日目にトリプシン処理によって細胞を回収し、PBS で 2 回洗浄し、 2.5×10^6 個/50 μ l のマトリゲル (Corning) に懸濁し、マウス皮下に接種した。

皮膚移植

レシピエントマウスに 3.5% medetomidine (Domitor Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.) および、10% Midazolam (midazolam injection, TEVA, Takeda Pharmaceutical Co., Ltd.)、12% Butorphanol (Vetorphale, Meiji Seika) からなる麻酔薬 (以降、三種混合麻酔薬) を腹腔内注射し麻酔した。その後、背部皮膚の一部を円形上に切除し移植床を作成した。皮膚移植片はドナーマウスの背側の耳介皮膚を円形状に切除し作成した。移植後、移植片の直径を測定し、レシピエントマウスの皮膚移植片を絆創膏で保護した後、覚醒まで加温した。その後経時的に移植片の直径を測定し、移植片直径が移植直後の 30% 以下になったとき拒絶と判断した。移植片の生存期間は以下の式で計算した：

$$Graft\ survival = \left(\frac{total\ number\ of\ transplanted\ grafts - number\ of\ rejected\ grafts}{total\ number\ of\ transplanted\ grafts} \right) \times 100.$$

生体内生物発光イメージング (BLI)

ルシフェリン投与後における発光シグナルを IVIS Spectrum Imaging System (Caliper Life Sciences) を用いて検出した。マウスに 6 mg の D-ルシフェリン (Cayman) を腹腔内投与し、20 分後に露出時間 20 秒の条件でシグナルを測定した。Luc-iPSC を移植した部位を中心とした領域における radiance (photons/sec/cm²/sr) および total flux (photons/sec) にもとづいて Luc-iPSC の生着を評価した。

ALP 染色

多能性幹細胞培養培地で 4 日間培養した PSC を染色した。培地を吸引し、細胞をクエン酸緩衝アセトンで 30 秒間固定した後、TBS-T で 45 秒間洗浄し、Naphthol/Fast Red Violet Solution (Sigma-Aldrich) を加え、暗所、室温で 15 分間染色した。その後 PBS で置換し画像を取得した。

Quantitative-PCR (qPCR)

TRIsure 試薬 (NIPPON Genetics) を用いて全 RNA を抽出し、抽出した RNA をもとに ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (東洋紡) を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA に KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) ABI Prism™ (NIPPON Genetics)、10μM PCR プライマー (Forward および Reverse) を混合し、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて PCR を行った。内部標準は *Actb* を使用した。PCR に使用したプライマーを以下に示す (表 2)。

表 2 : PCR に使用したプライマー

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Nanog</i>	GAACGCCTCATCAATGCCTGCA	GAATCAGGGCTGCCTTGAAGAG
<i>Oct3/4</i>	CAGCAGATCACTCACATCGCCA	GCCTCATACTCTTCTCGTTGGG
<i>Sox2</i>	GAGTGGAACCTTTTGTCCGAGA	GAAGCGTGACTTATCCTTCTTCAT
<i>Tgfb1</i>	TGATACGCCTGAGTGGCTGTCT	CACAAGAGCAGTGAGCGCTGAA
<i>Tgfb2</i>	TTGTTGCCCTCCTACAGACTGG	GTAAAGAGGGCGAAGGCAGCAA
<i>Tgfb3</i>	AAGCAGCGCTACATAGGTGGCA	GGCTGAAAGGTGTGACATGGAC
<i>Actb</i>	AGATTACTGCTCTGGCTCCTAG	TGCTTGCTGATCCACATCTG

免疫組織化学

組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定したのちパラフィンに包埋した。パラフィンブロックは 5μm 厚に薄切した。一次抗体として抗マウス CD3ε (A0452、Dako)、抗マウス Foxp3 (#12653、Cell Signaling Technology, Inc.)、抗マウス CD19 (ab245235、abcam) または抗マウス／ヒト Tgfb2 で染色し、二次抗体として抗

ウサギ IgG-HRP (K4003, Dako) で染色した。抗体の結合は、DAB (3,3'-Diaminobenzidine,tetrahydrochloride ; ジアミノベンジジン) 法を用いて検出した。染色した切片はヘマトキシリン (メルク) とエオジン (メルク) で細胞核および細胞質を染色した。皮膚移植片のパラフィンプロック作製以降の過程、HE 染色および免疫染色は札幌総合病理研究所に依頼した。病理画像の定量化には BZ-X800 (KEYENCE) を用いて取得した病理画像全体像を、ImageJ を用いて解析した。各サンプルの陽性面積を各サンプルの総面積で割ることで細胞の浸潤率を算出した。

ELISA

iPSC および iPSC 由来奇形腫における Tgfb2 発現を測定するため、Cell Lysis Buffer (R&DSYSTEMS、#890713) 中でホモジナイズした。得られた細胞溶解液の総タンパク質濃度を BCA アッセイ (Thermo Scientific、23225) で測定し、すべてのサンプルのタンパク質濃度が等しくなるよう希釈した。ELISA を行う直前に、サンプルを 1N HCl と 1N NaOH で処理し、Tgfb2 ELISA kit (R&D、MB200) の手順に従って Tgfb2 濃度を測定した。

抗体投与

CD25⁺細胞枯渇のために、iPSC 移植から 60 日間、3 日毎に抗 CD25 Ab (PC61、BioLegend) を腹腔内投与 (30μg/マウス) した。また、iPSC 移植から 40 日間、4 日毎に、抗-pan Tgfb Ab (1D11.16.8、BioXCell 社製) を腹腔内投与 (400μg/マウス) して Tgfb の阻害を行なった。

フローサイトメトリーと細胞分画

フローサイトメトリーは、FACSCelesta (BD Biosciences) または SH800S (SONY)、FACS Aria II (BD Biosciences) を用いて行い、データは FlowJo ソフトウェア V10.7.1 (Tree Star, Ashland, OR, USA) を用いて解析した。FACS 解析に用いた抗体を下図に示す (表 3)。

表 3 : フローサイトメトリーで使用した抗体

Antibody	Conjugation	Clone	Supplier
anti-mouse CD3e	PE	145-2C11	BioLegend
anti-mouse CD3e	APC/Cyanine7	145-2C11	BioLegend
anti-mouse CD4	APC/Cyanine7	RM4-5	BioLegend
anti-mouse CD4	PerCP/Cyanine5.5	RM4-5	BioLegend
anti-mouse CD4	APC	GK1.5	BioLegend
anti-mouse CD8a	PE/Cyanine7	53-6.7	BioLegend

anti-mouse CD8a	FITC	53-6.7	BioLegend
anti-mouse/human CD11b	FITC	M1/70	BioLegend
anti-mouse/human CD15	Alexa Fluor 647	MC-480	BioLegend
anti-mouse CD16/32	Purified	2.4G2	BioXCell
anti-mouse CD25	PE/Cyanine7	3C7	BioLegend
anti-mouse CD45	PE	30-F11	BioLegend
anti-mouse CD45	PerCP/Cyanine5.5	30-F11	BioLegend
anti-mouse CD45	FITC	30-F11	BioLegend
anti-mouse CD45	PE/Cyanine7	30-F11	BioLegend
anti-mouse CD45	APC/Cyanine7	30-F11	BioLegend
anti-mouse CD69	APC/Cyanine7	H1.2F3	BioLegend
anti-mouse CD103	FITC	W19396D	BioLegend
anti-mouse CD279	PE	RMP1-30	BioLegend
anti-mouse CD366	APC	B8.2C12	BioLegend
anti-mouse Ly-6G/Ly-6C	PerCP/Cyanine5.5	RB6-8C5	BioLegend
anti-mouse/rat/human FOXP3	Alexa Fluor 647	150D	BioLegend
anti-mouse/rat/human phospho-SMAD2	Alexa Fluor 647	E8F3R	Cell Signaling Technology

シングルセル RNA-seq 解析

CBA/N-iPSC を B6C3F1 マウスに皮下投与して 10 日後 (n=33) および 20 日後 (n=20)、40 日後 (n=20) に各マウスから iPSC 由来奇形腫を回収し、各時点でまとめて以降の処理を行なった。細断した奇形腫を BD Horizon™ Dri Tumor & Tissue Dissociation Reagent (BD Biosciences) を用いて酵素処理し、単細胞懸濁液を得た。その後、FACSAria II (BD Biosciences) を用いて CD45 陽性細胞を分画し、奇形腫浸潤免疫細胞を得た。この細胞を手順書 (Next GEM Single Cell 3' Gene Expression v3.1, 10XGenomics) に従い、cDNA を作製し、シングルセル RNA-seq ライブラリーを調製した。ライブラリーは、Illumina NovaSeq 6000 (タカラバイオ株式会社、日本) を用いてシーケンスした。生のシーケンスデータは、Loupe Cell Browser (10x Genomics) を用いて処理し、さらに R パッケージ Seurat (v4.0.1) を用いて処理し、低品質細胞をフィルターした。正規化、スケーリング、可変遺伝子の選択は Seurat の SCTransform 関数を用いて行い、得られた遺伝子発現行列に対して主成分分析を行った。各クラスターの差次的発現遺伝子を Findmarker で同定し、CellKB と R パッケージ Celldex (Aran et al., 2019; Patil et al., 2022) を参考に手作業でアノテーションした。得られたデータは R (v4.0.1) および Seurat、ggplot2、dplyr パッケージを用いて描出した。

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

同種異系マウスへの iPSC 移植実験

Luciferase (Luc) 導入 CBA/N-iPSC (Luc-CBA/N-iPSC) を、同種同系である CBA/N マウスまたは、MHC 型一致・マイナー抗原不一致の同種異系である B6C3F1 マウスの脇腹に皮下接種し、Luc 活性を元にその生着を評価した。その結果、Luc-CBA/N-iPSC は CBA/N マウスのみならず B6C3F1 マウスにも生着することが明らかになった (図 5A, B)。この時 B6C3F1 マウスに生着した CBA/N-iPSC 由来腫瘍の重量を経時的に計測したところ、増大傾向にあることが明らかになった (図 5C, D)。CBA/N-iPSC 由来腫瘍は少なくとも 200 日間は生着が維持され (図 5E)、神経組織、筋組織、軟骨組織、腸管組織といった三胚葉性の組織からなる奇形腫を形成した (図 5F)。

以上のことから、CBA/N-iPSC は同種異系の B6C3F1 マウスから拒絶されず奇形腫を形成し、長期生着することが示された。

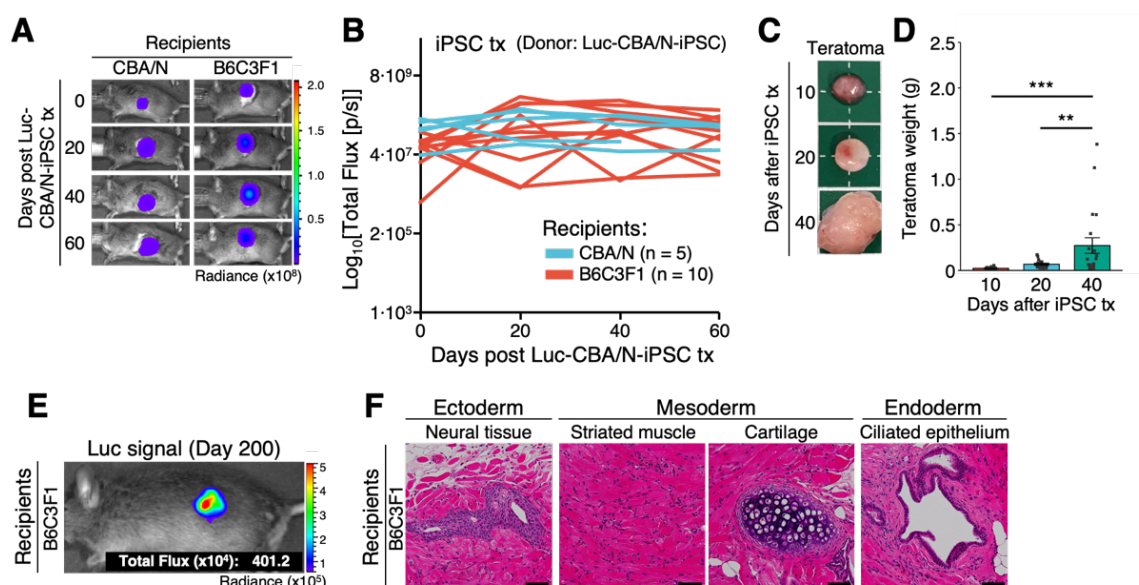


図 5. 同種異系マウスへの iPSC 移植実験

(A, B) Luc-CBA/N-iPSC を CBA/N マウスまたは B6C3F1 マウスに皮下移植し Luc シグナルを経時的に検出した。(A) 代表的な Luc シグナル画像。(B) Luc シグナル強度の経時的推移。(C, D) CBA/N-iPSC を B6C3F1 マウスに皮下接種して形成された腫瘍の経時的な外観の変化 (C) と重量の変化 (D)。(E, F) Luc-CBA/N-iPSC を B6C3F1 マウスに移植し 200 日目の代表的な Luc シグナル画像 (E) と形成された腫瘍の病理学的解析 (F)。

(D) **p < 0.01, ***p < 0.001 (Tukey's HSD 検定)。(F) スケールバー: 25 μ m。

同種異系マウスへの皮膚移植実験

次に、B6C3F1 マウスの CBA/N マウスに対する免疫応答の有無を確認する目的で、同マウス間における皮膚移植実験を実施した。その結果、B6C3F1 マウスに移植した CBA/N 皮膚移植片は、移植後 30 日で表皮の萎縮や過形成、CD3⁺細胞の浸潤といった拒絶反応の徴候が認められ（図 6A）、50 日以内にすべての移植片が拒絶され（Median survival time : MST=39）（図 6B）、CBA/N 由来組織が B6C3F1 マウスに対して抗原性を有していることが明らかになった。

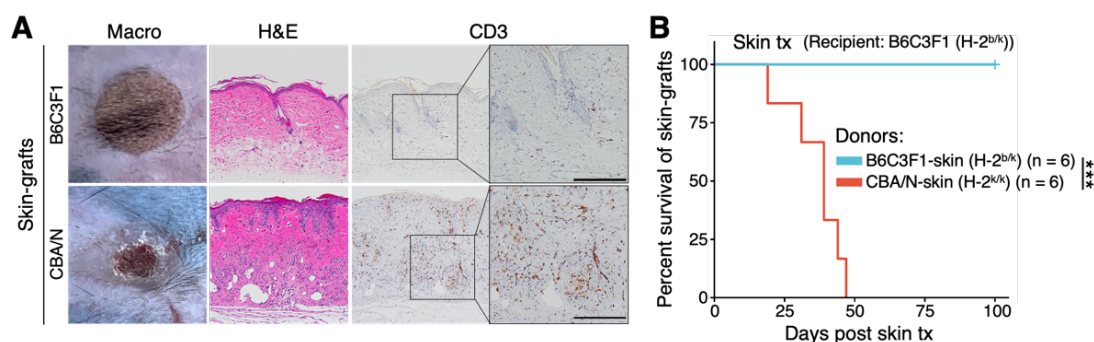


図 6. 同種異系マウスへの皮膚移植実験

(A, B) B6C3F1 マウスに B6C3F1 皮膚及び CBA/N 皮膚を移植した。(A) 移植後 30 日目の B6C3F1 皮膚（上段）と CBA/N 皮膚（下段の）代表的な病理画像（HE および免疫染色）。(B) 皮膚移植片の生存曲線。

(B) *** $p < 0.001$ (log-rank 検定)。(A) スケールバー : 25 μ m。

多能性幹細胞の作成

CBA/N-iPSC の B6C3F1 マウスへの生着のような、多能性幹細胞の同種異系への生着という現象が、他系統間の iPSC 移植や embryonic stem cell (ESC) 移植でも引き起こされるのか検証するために BALB/c-iPSC および 129x1-iPSC、CBA/N-ESC を新たに作製した。これらの細胞における未分化能について、アルカリホスファターゼ染色 (図 7A)、SSEA-1 の発現解析 (図 7B)、*Nanog*、*Oct3/4*、*Sox2* の発現解析を実施した (図 7C)。また、多分化能を有していること teratoma formation assay によって評価した (図 7D)。その結果、作成した細胞はいずれも未分化であり多分化能を有する多能性幹細胞であることが認められた。

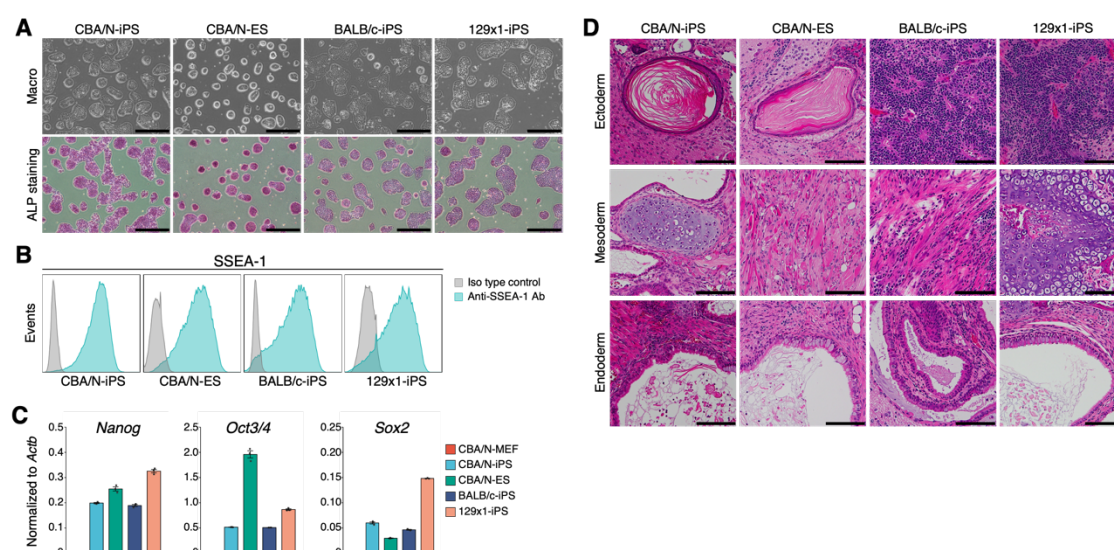


図 7. 多能性幹細胞の作成

(A-D) 作成した多能性幹細胞の評価。(A) 多能性幹細胞は *in vitro* 培養でコロニーを形成し (上段)、アルカリフォスファターゼ陽性であった (下段)。(B) FACS 解析。各多能性幹細胞は未分化マーカーである SSEA-1 を発現していた。(C) qPCR 解析。各多能性幹細胞は未分化マーカーである *Nanog*、*Oct3/4*、*Sox2* を発現していた。(D) 奇形腫形成試験。各多能性幹細胞を免疫不全マウスに皮下移植し形成された奇形腫を病理学的に評価した。

(A, D) スケールバー : A と D はそれぞれ 250 μ m と 50 μ m)。

MHC 型一致異系マウスへの組織移植実験

新たに作成した Luc-CBA/N-ESC の B6C3F1 マウスへの生着について Luc 活性をもとに評価したところ、少なくとも 60 日間は Luc 活性が維持され(図 8A, B)、ESC であっても同種異系マウスに奇形腫を形成することが明らかになった(図 8C)。次に、CBA/N→B6C3F1 と同じく MHC 型一致・マイナー抗原不一致の組み合わせである、BALB→B6D2F1 の組み合わせで移植を行なった。その結果、この組み合わせにおいても、同種異系の皮膚移植片は拒絶されるものの(図 8D, E)、iPSC であれば生着し奇形腫が形成されることが明らかになった(図 8F-H)。

以上のことより、多能性幹細胞が MHC 型一致・マイナー抗原不一致の同種異系マウスに生着する可能性が示唆された。

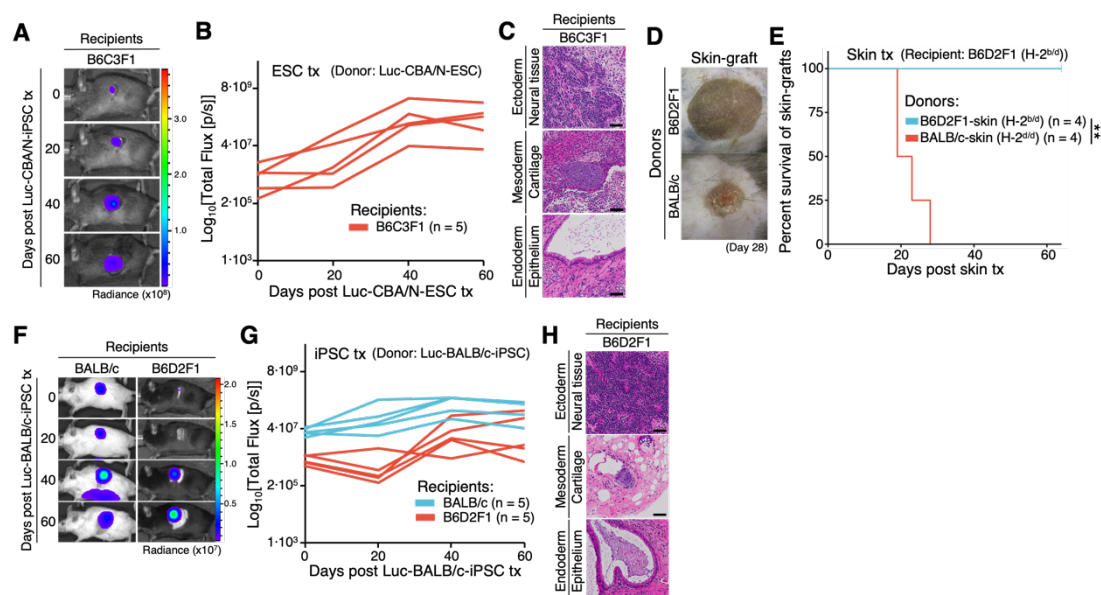


図 8. MHC 型一致異系マウスへの組織移植実験

(A, B) Luc-CBA/N-ESC を B6C3F1 マウスに皮下移植し Luc シグナルを経時的に検出した。(A) 代表的な Luc シグナル画像。(B) Luc シグナル強度の経時的推移。(C) CBA/N-ESC を B6C3F1 マウスに皮下移植し 40 日目の奇形腫の HE 染色像。(D) B6D2F1 マウスに移植した B6D2F1 皮膚(上段)及び BALB/c/c 皮膚(下段)の代表的な画像。(E) B6D2F1 マウスに移植した B6D2F1 皮膚及び BALB/c 皮膚の生存曲線。(F, G) Luc-BALB/c-iPSC を B6D2F1 マウスに皮下移植し Luc シグナルを経時的に検出した。(F) 代表的な Luc シグナル画像。(G) Luc シグナル強度の経時的推移。(H) BALB/c-iPSC を B6D2F1 マウスに皮下移植し 40 日目の奇形腫の HE 染色像。

(E) $**p < 0.01$ (log-rank 検定)。(C, H) スケールバー: 25 μ m)。

MHC 型不一致マウスへの iPSC 移植実験

次に、MHC 型不適合の組み合わせの iPSC 移植における生着を評価する目的で、Luc-CBA/N-iPSC または Luc-BALB/c-iPSC を C57BL6/N マウスに移植した。iPSC の生着の有無について Luc 活性をもとに評価したところ、いずれの iPSC を移植した場合においても 20 日以内に Luc 活性が検出されなくなり (図 9A, B)、移植から 60 日後に iPSC 移植箇所から得られた組織を病理学的に評価したところ、脂肪組織のみが形成されており奇形腫の形成は認められなかった (図 9C)。

以上のことより、多能性幹細胞の同種異系マウスへの生着における MHC 型の一致の重要性が示唆された。

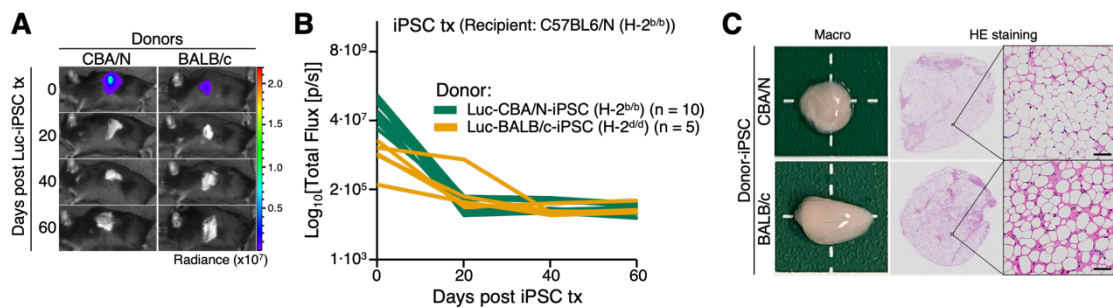


図 9. MHC 型不一致マウスへの iPSC 移植実験

(A, B) Luc-CBA/N-iPSC (左) または Luc-BALB/c-iPSC (右) を C57BL/6 マウスに皮下移植し Luc シグナルを経時的に検出した。(A) 代表的な Luc シグナル画像。(B) Luc シグナル強度の経時的推移。(C) CBA/N-iPSC (上段) または BALB/c-iPSC (下段) を C57BL/6 マウスに皮下移植し 40 日目に形成された腫瘤の HE 染色像。

(C) スケールバー : 25 μ m。

MHC 型一致他家 iPSC に対する免疫応答評価

次に MHC 型一致同種異系マウスへの iPSC 移植時の免疫応答について評価した。CBA/N-iPSC を CBA/N マウスまたは B6C3F1 マウスに移植し、20 日後に iPSC 由来奇形腫に浸潤した CD3⁺細胞を病理組織学的に評価した。その結果、同種異系の B6C3F1 において形成された iPSC 由来奇形腫に浸潤する CD3⁺細胞は同種同系の CBA/N マウスにおいて形成された iPSC 由来奇形腫への浸潤と同程度であった (図 10A, B)。さらに、CBA/N 由来皮膚移植片または CBA/N-iPSC を移植した B6C3F1 レシピエントのリンパ節における活性化 T 細胞 (CD25⁺または CD69⁺) を移植 20 日目に評価したところ、iPSC の移植では皮膚移植で見られた T 細胞の活性化傾向は認められなかった (図 10C)。このことは、MHC 型が一致した同種異系 iPSC に対する免疫応答は大きくなく、比較的生着が容易である可能性が考えられた。

以上のことより、iPSC はマイナー抗原という免疫学的障壁を乗り越えて、MHC 型が一致した異系個体に生着することが明らかになった。

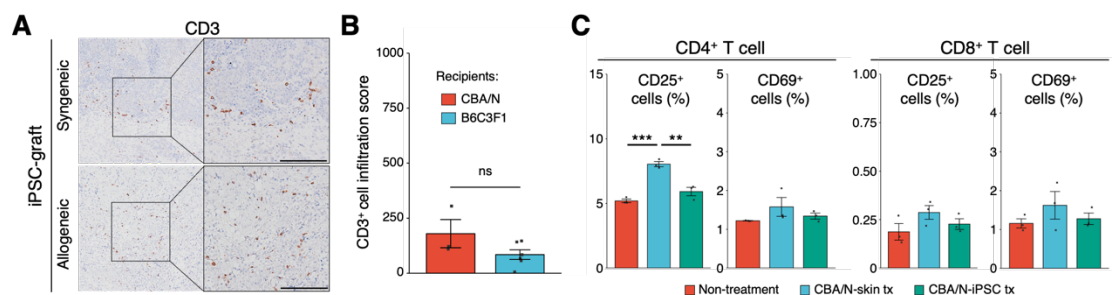


図 10. MHC 型一致他家 iPSC に対する免疫応答評価

(A, B) CBA/N-iPSC を CBA/N マウス (上段) または B6C3F1 マウス (下段) に移植し形成された 20 日目の奇形腫の代表的な免疫染色像 (A) と定量的な浸潤スコア (B)。 (C) CBA/N-iPSC または CBA/N 皮膚を移植し 20 日後の B6C3F1 リンパ節の CD4⁺T 細胞 (左) と CD8⁺T 細胞の FACS 解析。

(B, C) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Student's t-test (B) Tukey の HSD 検定 (C))。 (A) スケールバー : 25 μ m。

他家 iPSC 由来奇形腫形成によるドナーに対する免疫応答変化

次に、同種異系マウスに多能性幹細胞が生着した際の免疫応答の変化について明らかにするために、2次移植実験を行なった(図 11A)。その結果、B6C3F1 マウスに CBA/N-iPSC し、その 10 日目に移植した CBA/N 皮膚移植片は無処置の場合と同様にすべて拒絶された(MST=38)(図 11B)。その一方で、興味深いことに、iPSC 移植後 20 日目に移植した CBA/N 由来皮膚移植片はその 40%が生着し、さらに、iPSC 移植後 40 日目に移植した CBA/N 由来皮膚移植片の 83%が 100 日以上生着した(図 11B)。B6C3F1 マウスに 40 日前に CBA/N-iPSC を移植し、その後移植した CBA/N 由来皮膚移植片を皮膚移植から 30 日目に病理組織学的に評価したところ、無治療群で認められる表皮の萎縮、肥厚、CD3⁺細胞の浸潤といった拒絶の兆候は認められなかった(図 11C, D)。また、皮膚移植後 100 日目にも同様の指標について病理学的評価を行なったが、依然として拒絶の兆候は認められなかった(図 11E, F)。

したがって、MHC 型一致の同種異系マウスへのドナー由来 iPSC 移植によってドナーに対する免疫寛容が誘導される可能性が示唆された。

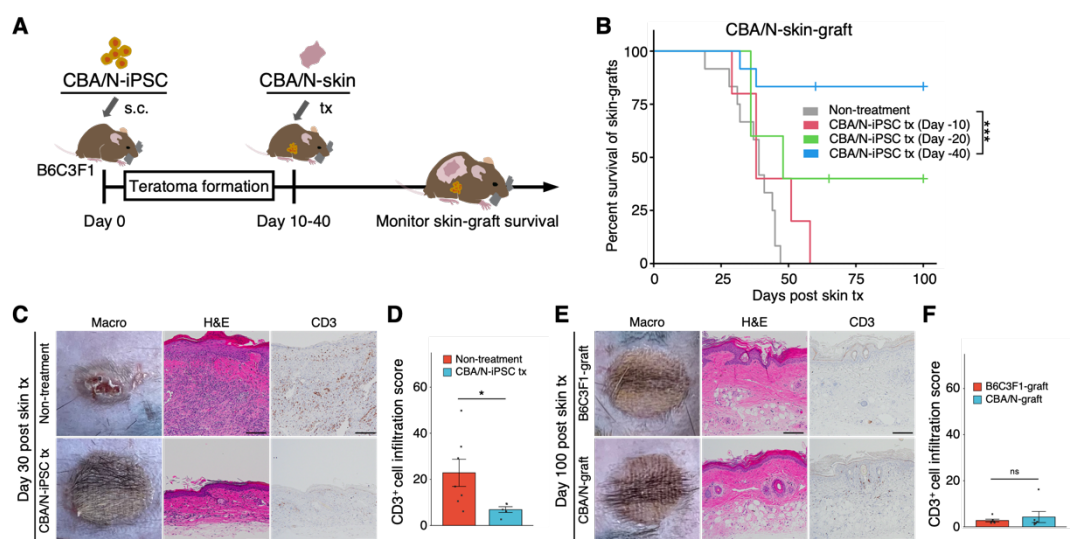


図 11. 他家 iPSC 由来奇形腫形成によるドナーに対する免疫応答変化

(A) 実験概念図。iPSC 移植の 10、20、40 日後に皮膚を追加で移植した。(B) B6C3F1 マウスにおける CBA/N 皮膚の生存曲線。(C, D) 移植後 30 日目の CBA/N 皮膚移植片の病理画像 (C) と CD3⁺細胞の定量的浸潤スコア (D)。CBA/N 皮膚は CBA/N-iPSC 移植から 40 日後に移植した。(E, F) 移植後 100 日目の B6C3F1 皮膚移植片 (上段) と CBA/N 皮膚移植片 (下段) の病理画像 (E) と CD3⁺細胞の定量的浸潤スコア (F)。CBA/N 皮膚は CBA/N-iPSC 移植から 40 日後に移植した。

(B) ***p < 0.001 (log-rank 検定)。(D, F) スケールバー: 25μm。

他家 iPSC 移植による免疫寛容誘導のドナー抗原特異性

次に、ドナー由来 iPSC 移植が誘導する免疫寛容にドナー抗原特異性があるのか明らかにするために、第三者由来 iPSC および皮膚移植片を用いた移植実験を行なった。B6C3F1 マウスに CBA/N-iPSC を接種し、その 10 日後および 20 日後、40 日後に 129x1 由来皮膚移植片または BALB/c 由来皮膚移植片を移植した。その結果、いずれのタイムコースで移植した皮膚移植片においても生着延長は認められなかった (図 12A)。また、129x1-iPSC または BALB/c-iPSC の移植後 40 日目に移植した CBA/N 由来皮膚移植片についても生着期間が延長することはなかった (図 12B)。

以上のことは、ドナー由来 iPSC 移植が誘導する免疫寛容にドナー抗原特異性があることを示唆している。

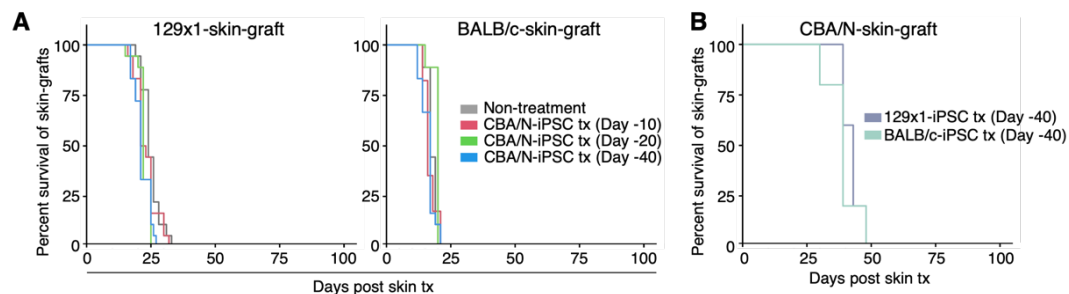


図 12. 他家 iPSC 移植による免疫寛容誘導のドナー抗原特異性

(A) B6C3F1 マウスにおける 129x1 (左) または BALB/c (右) 由来皮膚の生存曲線。(B) B6C3F1 マウスにおける CBA/N 皮膚の生存曲線。

他家 ESC 移植によるドナーに対する免疫応答変化

ドナー由来 iPSC 移植が誘導する免疫寛容誘導現象が使用する iPSC に依存しないことを評価するために、CBA/N-ESC を用いて同様の 2 次移植実験を行なった。その結果、B6C3F1 マウスに CBA/N-ESC を移植し 40 日目に移植した CBA/N 皮膚移植片は 100 日以上生着することが認められた（図 13A-C）。

したがって、ドナー由来多能性幹細胞移植がドナー抗原特異的免疫寛容を誘導することが示唆された。

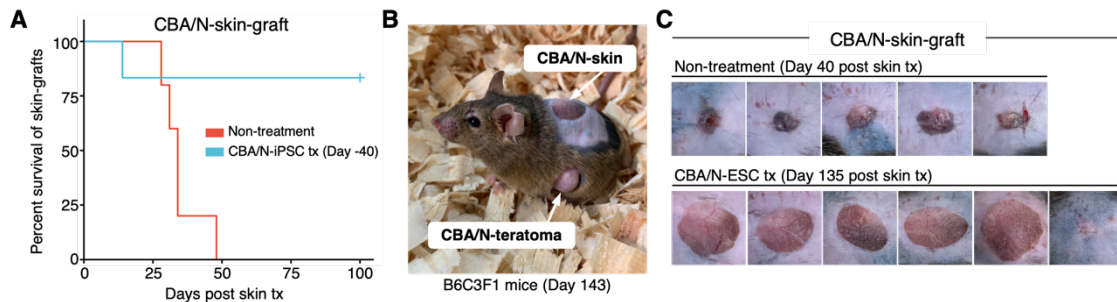


図 13. 他家 ESC 移植によるドナーに対する免疫応答変化

(A) B6C3F1 マウスにおける CBA/N 皮膚の生存曲線。(B) CBA/N-ESC 移植によって CBA/N-ESC 由来奇形腫および CBA/N 皮膚が共に生着する B6C3F1 マウスの代表的な画像。(C) B6C3F1 マウスにおける無治療（上段）または CBA/N-ESC 移植を行った CBA/N 皮膚（下段）の画像。

他家 iPSC 移植後のレシピエントリンパ組織の免疫細胞の変化

ドナー由来多能性幹細胞移植が誘導するドナー抗原特異的免疫寛容の機序解析を実施した。まず、既報において免疫寛容に寄与することが報告されている制御性 T 細胞 (Treg)、疲弊 T 細胞、骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) の 2 次リンパ組織における存在割合を評価した。B6C3F1 に CBA/N-iPSC を移植し、10 日目および 20 日目、40 日目に FACS を実施し評価したが、いずれの細胞集団についても経時的な変化が認められなかった (図 14A-D)。

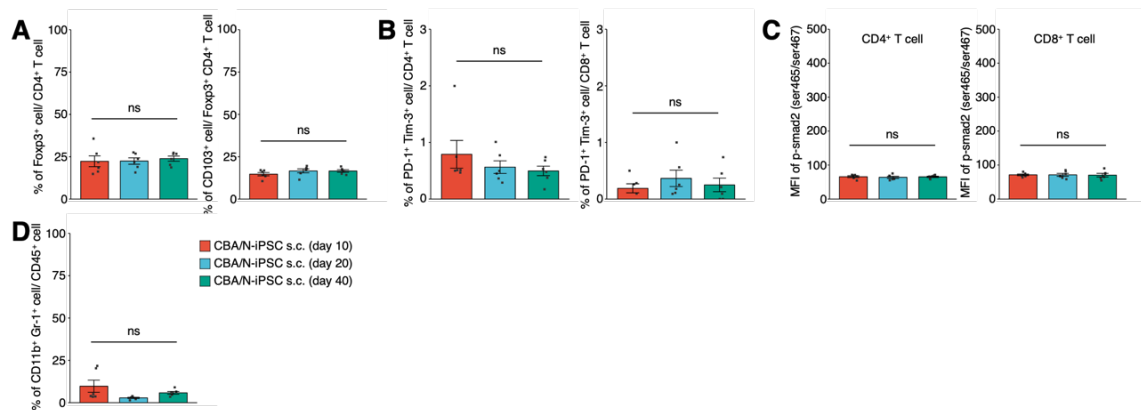


図 14. 他家 iPSC 移植後のレシピエントリンパ組織の免疫細胞の変化

(A-D) CBA/N-iPSC 移植後の B6C3F1 脾臓細胞の FACS 解析。CD4⁺T 細胞における Foxp3⁺細胞の割合 (左) および Foxp3⁺CD4⁺T 細胞における CD103⁺CD25⁺細胞の割合 (右) (A)、CD4⁺T 細胞における PD1⁺Tim3⁺細胞の割合 (左) および CD8⁺T 細胞における PD1⁺Tim3⁺細胞の割合 (右) (B)、CD4⁺T 細胞 (左) および CD8⁺T 細胞 (右) における p-smad2 の MFI (C)、CD45⁺細胞における CD11b⁺Gr-1⁺細胞の割合 (D)。

(A-D) * $p < 0.05$ (Tukey の HSD 検定)。

iPSC 移植が誘導する免疫寛容の末梢リンパ組織免疫細胞の寄与

さらに、末梢 2 次リンパ組織中の免疫細胞の重要性を評価する目的で、adoptive transfer 実験を行なった。野生型の B6C3F1 マウスまたは、CBA/N 皮膚移植片を移植した B6C3F1 マウスまたは、CBA/N-iPSC 移植の 40 日後に CBA/N 皮膚移植片を移植し免疫寛容が誘導されていることが認められたマウス由来の脾臓細胞を B6C3F1 マウスに adoptive transfer し、その翌日に B6C3F1 皮膚および 129x1 皮膚、BALB/c 皮膚、CBA/N 皮膚を移植した。その結果、CBA/N 皮膚移植片を移植した B6C3F1 マウス由来脾臓細胞の adoptive transfer は野生型マウス由来の脾臓細胞の adoptive transfer と比較して CBA/B 皮膚移植片の生着期間を有意に短縮したが、CBA/N-iPSC 移植の 40 日後に CBA/N 皮膚移植片を移植し免疫寛容が誘導されていることが認められたマウス由来の脾臓細胞の adoptive transfer は野生型マウス由来脾臓細胞の adoptive transfer と比較して生着期間の有意な短縮・延長を誘導することはなかった（図 15A）。さらに、CBA/N-iPSC 移植の 40 日後に CBA/N 皮膚移植片を移植し免疫寛容が誘導されていることが認められたマウス由来の脾臓細胞中の CD4⁺細胞を磁気分離し、CD4⁺細胞濃縮細胞懸濁液または、CD4⁺細胞濃縮細胞懸濁液の adoptive transfer を行なったが、いずれにおいても生着期間を延長することはなかった（図 15B, C）。

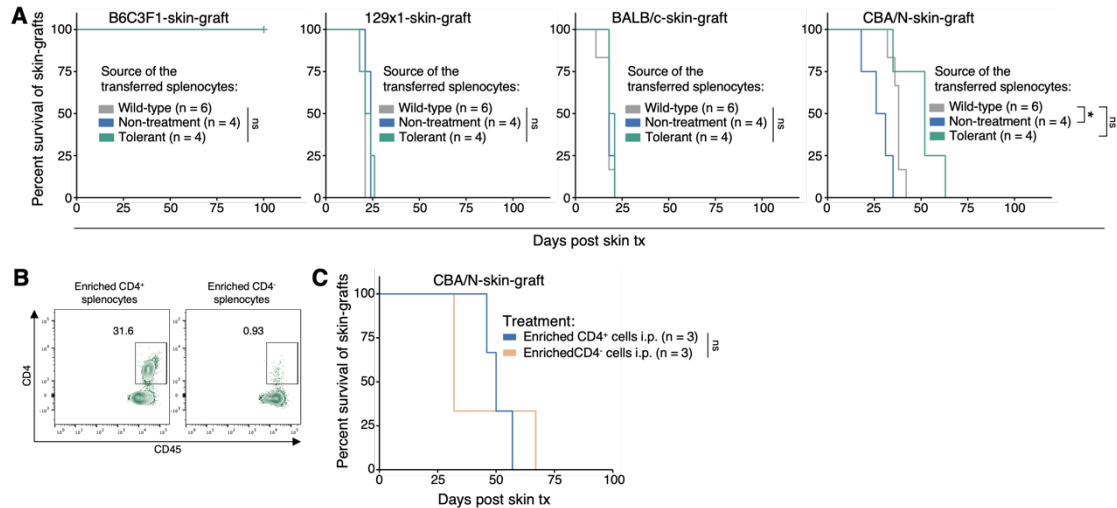


図 15. iPSC 移植が誘導する免疫寛容の末梢リンパ組織免疫細胞の寄与

(A) B6C3F1 マウスに移植した B6C3F1 及び 129x1、BALB/c、CBA/N 由来皮膚の生存曲線。
 1×10^7 の脾臓細胞を B6C3F1 に静脈内投与し翌日皮膚移植を実施した。(B, C) CD4⁺細胞濃縮細胞懸濁液は磁気ビーズを用いて調製し (B)、B6C3F1 マウスに 1×10^7 個静脈内投与した。翌日 CBA/N 皮膚を移植しその生存曲線を示す (C)。

(A, C) *p < 0.05 (log-rank 検定)。

iPSC 移植が誘導する免疫寛容における iPSC 由来奇形腫の寄与

次に、iPSC 由来奇形腫の免疫寛容への寄与を明らかにする目的で、iPSC 移植後に移植する皮膚移植の前後で iPSC 由来奇形腫の摘出を行なった（図 16A）。B6C3F1 マウスに CBA/N-iPSC を移植し、20 日後に CBA/N-iPSC 由来奇形腫を除去し、40 日目に CBA/N 皮膚移植片を移植したところ皮膚移植後 30 日以内に全例が拒絶された。また、B6C3F1 マウスに CBA/N-iPSC を移植し、40 日後に CBA/N 皮膚移植片を移植し、60 日目に CBA/N-iPSC 由来奇形腫を除去したところ、CBA/N 皮膚移植片の生着期間延長は認められたものの、皮膚移植後 120 日目までにそのほとんどが拒絶された（図 16B）。

これらの結果より、ドナー由来 iPSC 移植が誘導する免疫寛容において、iPSC 由来奇形腫がその誘導と維持に必須であることが推察された。

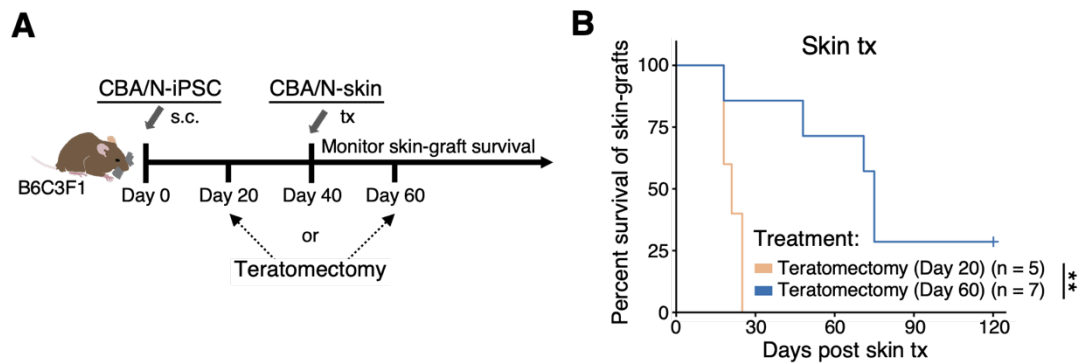


図 16. iPSC 移植が誘導する免疫寛容における iPSC 由来奇形腫の寄与

(A) 実験概念図。B6C3F1 マウスに CBA/N-iPSC を移植し 40 日後に CBA/N 皮膚を移植した。この時皮膚移植の前後 20 日で iPSC 由来奇形腫の除去を行った。(B) B6C3F1 マウスに移植した CBA/N 皮膚の生存曲線。

(B) ** $p < 0.01$ (log-rank 検定)。

iPSC 由来細胞の末梢リンパ組織への移行の有無についての検討

iPSC 移植が誘導する免疫寛容誘導において iPSC 由来奇形腫がその誘導と維持に重要であることが明らかになったが、iPSC 由来奇形腫そのものが重要であるのか、iPSC 由来奇形腫が末梢リンパ組織等に移行し重要な役割を果たしているのか不明であったため、iPSC 由来細胞の末梢リンパ組織への移行の有無について検討した。Luc-CBA/N-iPSC を B6C3F1 マウスの皮下に移植し、その 40 日後に様々な末梢リンパ組織における Luc シグナルを評価した。Luc-CBA/N-iPSC は細胞数に応じて検出可能な Luc シグナルは増強するものの（図 17A）、いずれの組織においても Luc シグナルは検出されなかった（図 17B, C）。また、Luc-CBA/N-iPSC 移植後 200 日目にも様々な末梢リンパ組織において Luc シグナルを評価したが、近傍のリンパ節で検出されるのみであった（図 17D）。

次に、GFP-CBA/N-iPSC（図 17E）を移植し FACS で GFP⁺細胞を検出することで単一細胞レベルでの評価を行なった。GFP-CBA/N-iPSC を B6C3F1 に皮下移植し、40 日目に様々なリンパ組織における GFP⁺細胞を FACS で解析したが、GFP⁺細胞の割合はどの組織においても有意な増加は認められなかった（図 17F, G）。

以上のことより、iPSC 由来細胞の全身性のキメラ状態は否定的であることが推察された。

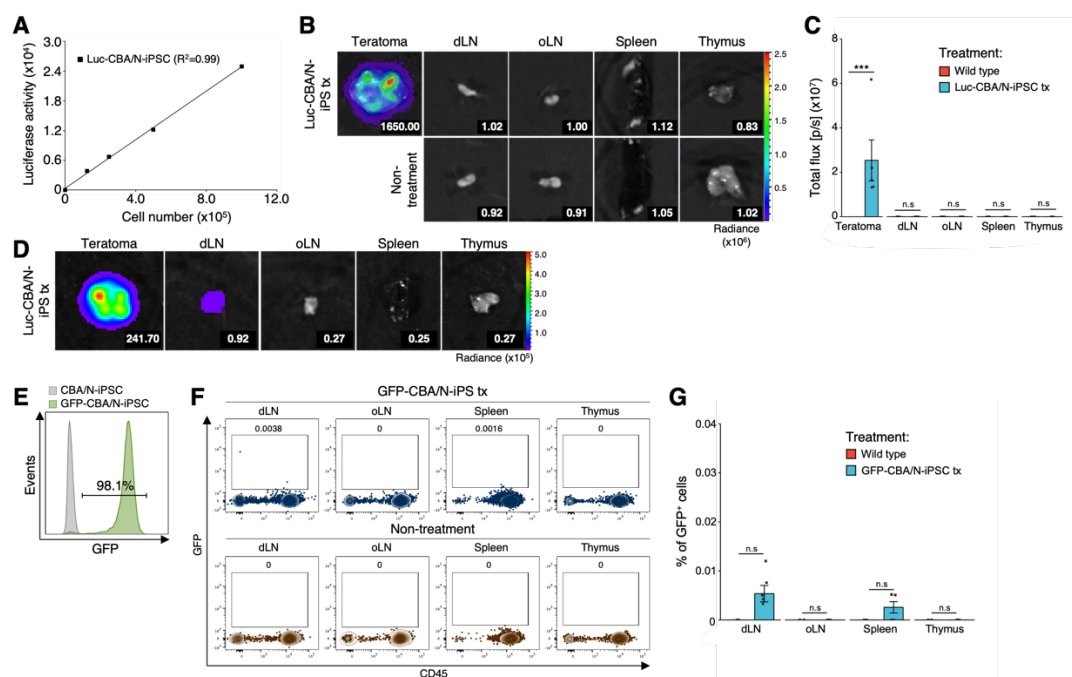


図 17. iPSC 由来細胞の末梢リンパ組織への移行の有無についての検討

(A) Luc-CBA/N-iPSC の Luc シグナル。(B, C) Luc-CBA/N-iPSC を移植した B6C3F1 (上段) または野生型 B6C3F1 (下段) の奇形腫と末梢リンパ組織における Luc シグナル (B) と定量的な Luc シグナル (C)。(D) Luc-CBA/N-iPSC を移植して 200 日目の B6C3F1 の Luc シグナル。(E) GFP-CBA/N-iPSC における GFP の蛍光強度。(F, G) GFP-CBA/N-iPSC を移植後 40 日目における末梢リンパ組織の FACS 解析。

(C, G) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Student's t-test)

他家 iPSC 由来奇形腫への免疫細胞の浸潤

これまでの実験より、iPSC 移植が誘導する免疫寛容に iPSC 由来奇形腫そのものが重要であることが推察されたため、B6C3F1 マウスに生着した CBA/N-iPSC 由来奇形腫に浸潤する免疫細胞を病理学的に評価した。

B6C3F1 に CBA/N-iPSC を移植し 10 日目および 20 日目、40 日目に形成された奇形腫について、CD3⁺細胞、Foxp3⁺細胞、CD19⁺細胞の免疫染色を行った（図 18A）。その結果、それぞれの陽性面積は経時的に変化することはなかったものの（図 18B）、それぞれ経時的に局在する傾向があり、40 日目には CD3⁺細胞、Foxp3⁺細胞、CD19⁺細胞が共局在し、三次リンパ節様の構造を形成していた（図 18C）。

以上の結果より、iPSC 由来奇形腫内における免疫応答の変化が、iPSC 移植が誘導する免疫寛容において重要な役割を持つことが推察された。

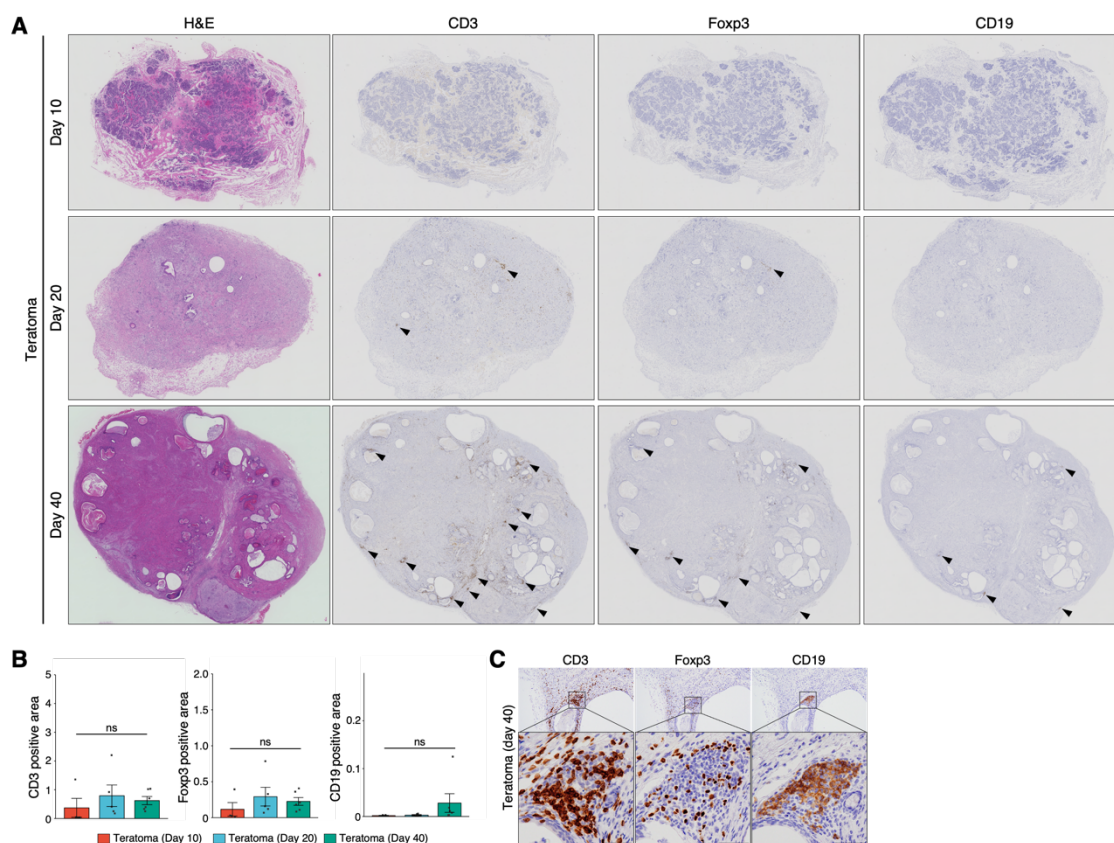


図 18. 他家 iPSC 由来奇形腫への免疫細胞の浸潤

(A, B) B6C3F1 マウスに移植した CBA/N-iPSC 由来奇形腫に浸潤した CD3、Foxp3、CD19 陽性細胞の代表的免疫染色像 (A) および定量的浸潤面積 (B)。矢印は細胞の集積を示す。(C) 形成後 40 日目の CBA/N-iPSC 由来奇形腫に浸潤した CD3、Foxp3、および CD19 陽性細胞の代表的な免疫染色像。

(B) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Tukey's HSD 検定)。(C) スケールバー：50 μ m。

他家 iPSC 由来奇形腫浸潤免疫細胞の scRNA-seq

これまでの検討より、iPSC 由来奇形腫内における経時的な免疫応答の変化が、iPSC 移植が誘導する免疫寛容において重要な役割を持つことが考えられたため、これらの免疫細胞についてシングルセル RNA sequence (scRNA-seq) 解析を行った。CBA/N-iPSC を B6C3F1 マウスに皮下に移植し、10 日目および 20 日目、40 日目に iPSC 由来奇形腫を回収した。タイムコース毎に奇形腫の細断、酵素処理および、FACS 用いた CD45⁺細胞の分画を行ない、得られた iPSC 由来奇形腫内 CD45⁺細胞について、scRNA-seq を行った (図 19A, B)。その後、クオリティコントロールを実施し、死細胞やマルチプレット、空のドロップレットである可能性の高い細胞を除去した (図 19C)。次に、CD45⁺細胞からなる細胞集団を除去し、移行の解析に進んだ (図 19D)。

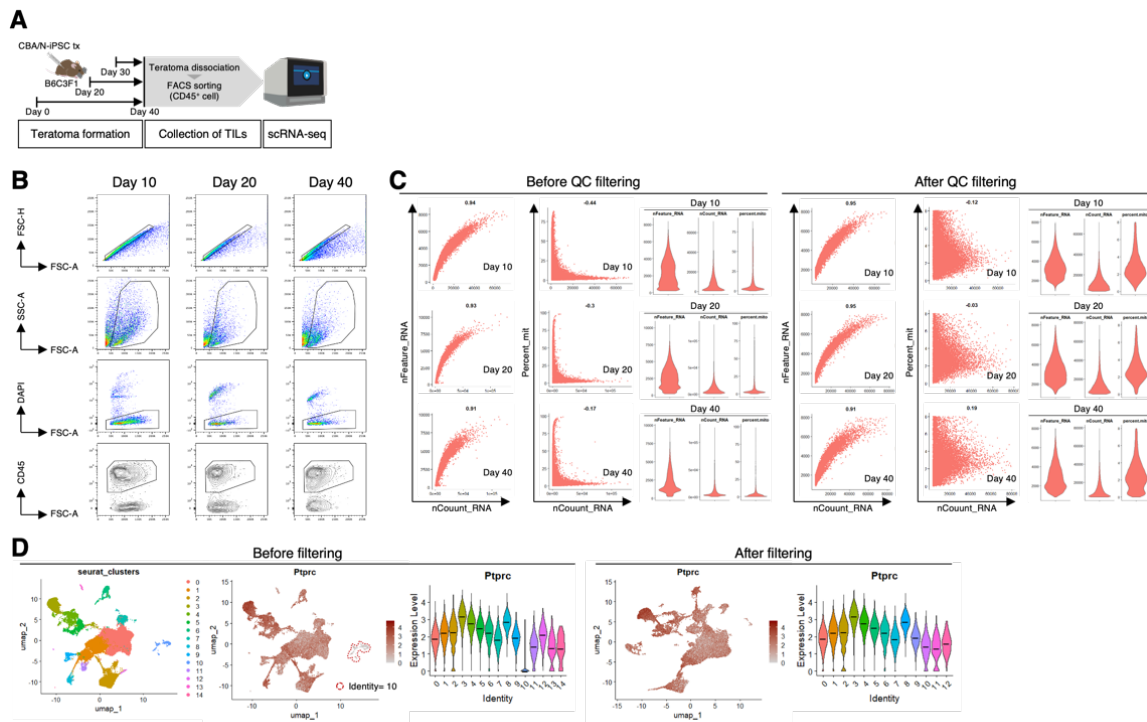


図 19. 他家 iPSC 由来奇形腫浸潤免疫細胞の scRNA-seq

(A) 実験概念図。B6C3F1 に移植した CBA/N-iPSC から形成された奇形腫を 10 日目及び 20 日目、40 日目に回収し CD45⁺細胞を分画し scRNA-seq を実施した。(B) iPSC 由来奇形異種から CD45⁺細胞を分画した gating strategy。(C) クオリティコントロール。700<nFeature_RNA<8000、3800<nCount_RNA<80000、percent.mito<8 を移行の解析に用いた。(D) *Ptpcr* 細胞の除外。*Ptpcr* である ident=10 のクラスターを除外し、再度クラスタリングを実施した。

iPSC 由来奇形腫浸潤免疫細胞の細胞種同定と経時的な割合の変化

クラスタリングした iPSC 由来奇形腫内 CD45⁺細胞について、各クラスターの差次的遺伝子発現および、これまでに報告されてきた各細胞種特徴的に発現する遺伝子の発現レベルを元に細胞種の同定を行なった（図 20A, B）。各クラスターの割合についてタイムポイント毎に比較したところ、好中球や B 細胞の割合が増加していることが認められた（図 20C）。

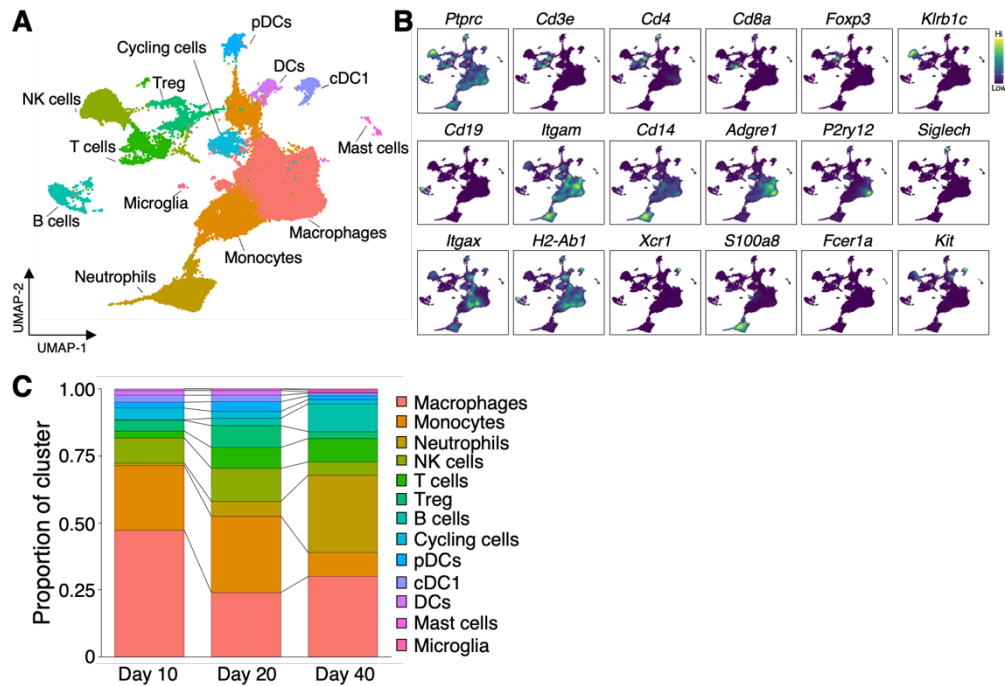


図 20. iPSC 由来奇形腫浸潤免疫細胞の細胞種同定と経時的な割合の変化

(A-C) iPSC 由来奇形腫浸潤免疫細胞 (A) は CellKB や celldex、SingleR といった自動註釈アプリケーションや既報の細胞マーカー (B) を元に細胞種の同定を行い UMAP で示した。また、これらのクラスターの経時的な割合の変化を barplot で示した (C)。

iPSC 由来奇形腫浸潤制御性 T 細胞の経時的変化

iPSC 由来奇形腫内 CD45⁺細胞の各クラスターについて比較検討した。iPSC 移植後 40 日目と 10 日目の奇形腫に含まれる制御性 T 細胞 (Treg) について、差次的発現遺伝子を gene ontology 解析した結果、リンパ球の活性化等を示す term が多く抽出されたことから、Treg に着目した検討を実施することとした(図 21A)。Treg をさらにサブクラスターに分類したところ、大きく 3 つのクラスターに分けることができ(図 21B)、中でも Treg-1 の割合が経時的に増加していることが明らかになった(図 21C)。Treg サブクラスター間における Treg-1 の差次的発現遺伝子には *Lrig1* や *Itgae* といった、Treg の中でも免疫抑制能力の高い effector Treg で高発現することが報告されている遺伝子があり(図 21D)、effector Treg が増加したことが推察された。また、Treg-1 は *Foxp3* や *Il25ra* や、免疫抑制因子である *Ctla4* が高度に発現していた(図 21E)。

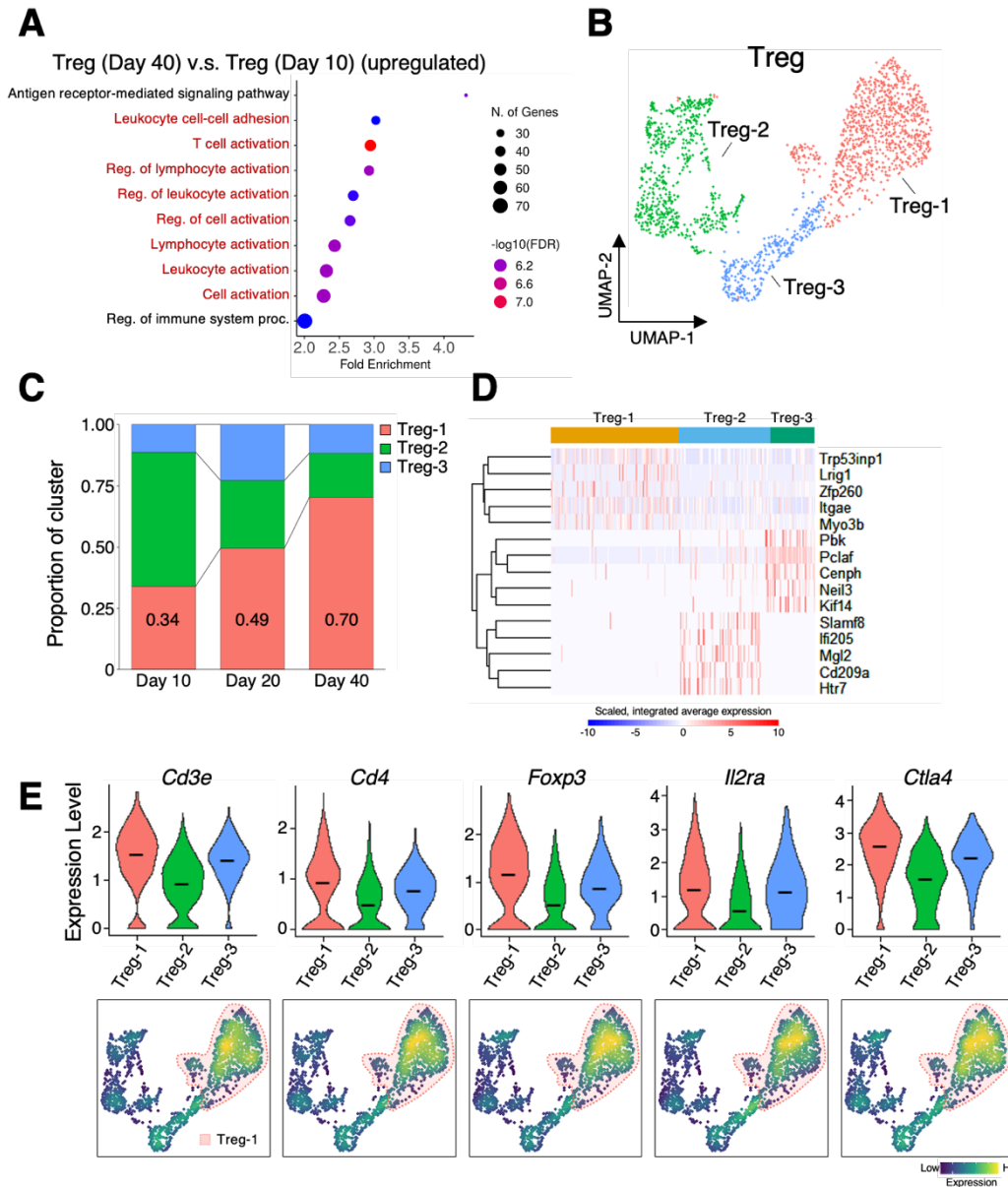


図 21. iPS 由来奇形腫浸潤制御性 T 細胞の経時的変化

(A) iPS 由来奇形腫浸潤 Treg において 10 日目と比較して 40 日目で発現が増強した遺伝子セットの gene ontology 解析。(B, C) Treg サブクラスターの UMAP (B) と経時的な bar plot (C)。(D) 各 Treg サブクラスターに特徴的に発現する遺伝子のヒートマップ。(E) Treg サブクラスターにおける *Cd3e* 及び *Cd4*, *Foxp3*, *Il2ra*, *Ctla4* の violin plot (上) と density plot (下)。

iPSC 由来奇形腫浸潤 Treg の FACS 解析

次に、シングルセル RNA-sequence で認められた奇形腫内 effector Treg 増加について FACS でも評価を行った。その結果、iPSC 移植後 20 日目及び 40 日目における、iPSC 由来奇形腫内 $CD4^+T$ 細胞中の $Foxp3^+$ 細胞の割合は変わらなかったが、 $Foxp3^+CD4^+$ T 細胞中の $CD103^+CD25^+$ 細胞の増加が認められた (図 22A-D)。

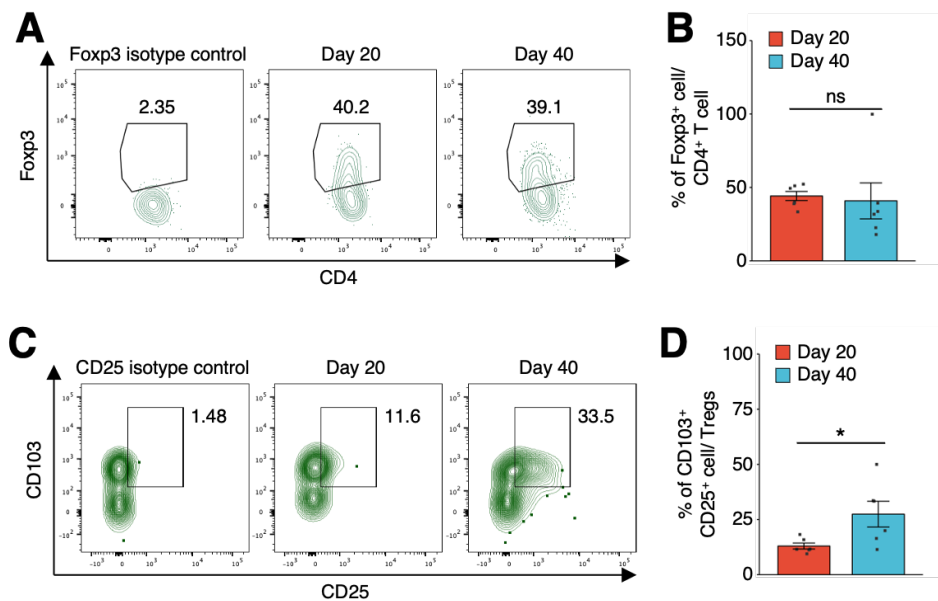


図 22. iPSC 由来奇形腫浸潤 Treg の FACS 解析

(A, B) 経時的な iPSC 由来奇形腫中の $Foxp3^+CD4^+T$ 細胞の割合の代表的なプロットパターン (A) と定量的な bar plot (B)。(C, D) 経時的な iPSC 由来奇形腫中の $CD103^+CD25^+Foxp3^+CD4^+T$ 細胞の割合の代表的なプロットパターン (C) と定量的な bar plot (D)。

(B, D) * $p < 0.05$ (Student's t-test)。

他家 iPSC 移植が誘導する免疫寛容への CD25⁺細胞の寄与

そこで、iPSC 誘導免疫寛容における CD25⁺細胞の寄与を明らかにするために、抗 CD25 抗体を用いた CD25⁺細胞の枯渇実験を行った（図 23A）。抗 CD25 抗体を iPSC の移植から 60 日間、3 日に一度投与したところ、末梢血および iPSC 由来奇形腫浸潤 Treg が有意に減少した（図 23B-E）。またこの時、iPSC 由来奇形腫は抗 CD25 抗体の投与の有無に関わらず、同等の奇形腫が形成された（図 23F, G）。この条件下で、CBA/N 由来皮膚を 2 次移植した結果、抗 CD25 抗体投与群における皮膚移植片の生着期間は有意に低下した（図 23H）。

このことから、iPSC 移植が誘導する免疫寛容における CD25⁺細胞の寄与が示唆された。

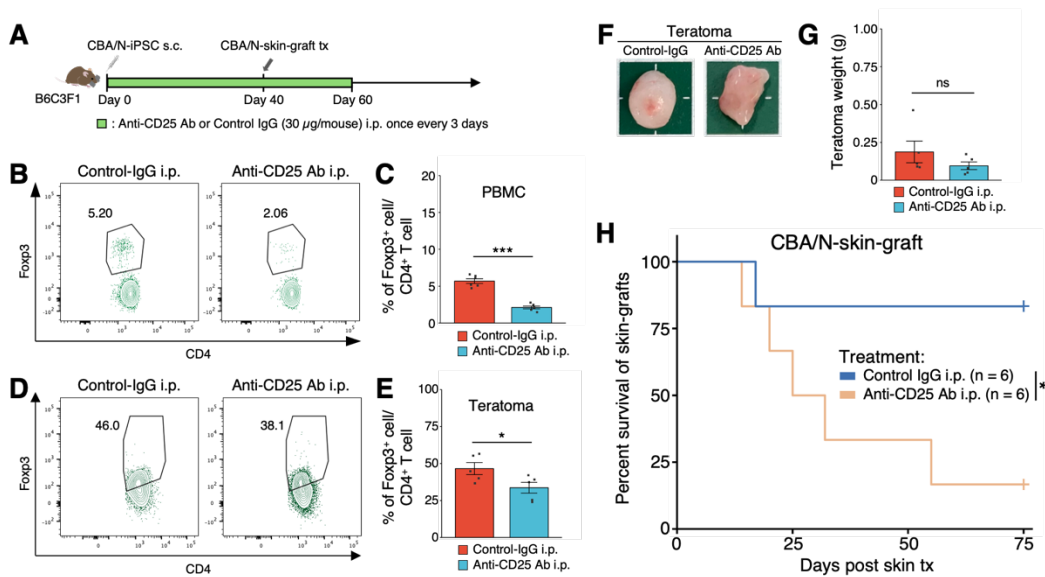


図 23. 他家 iPSC 移植が誘導する免疫寛容への CD25⁺細胞の寄与

(A) 実験概念図。B6C3F1 マウスに CBA-iPSC を移植し 40 日後に CBA/N 皮膚を移植した。CBA/N-iPSC の移植から 60 日間 3 日に一度抗 CD25 抗体またはコントロール抗体を投与した。

(B, C) CBA/N-iPSC 移植から 40 日目の PBMC 中 Foxp3⁺CD4⁺T 細胞の割合。代表的なプロットパターン (B) および定量的 bar plot (C)。(D, E) CBA/N-iPSC 移植から 40 日目の iPSC 由来奇形腫中 Foxp3⁺CD4⁺T 細胞の割合。代表的なプロットパターン (D) および定量的 bar plot (E)。(F, G) CBA/N-iPSC を B6C3F1 に移植して 40 日後の iPSC 由来奇形腫の形成。代表的な画像 (F) および定量的 bar plot (G)。(H) コントロール IgG (青) または抗 CD25 抗体 (オレンジ) を投与した CBA/N-iPSC 移植-B6C3F1 マウスにおける CBA/N-皮膚の生存曲線。

(C, E, G, H) *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (Student's t-test (C, E, G), log-rank 検定 (H))。

他家 iPSC 移植が誘導する免疫寛容への Treg 細胞の寄与

前実験によって、CD25⁺細胞、Treg の寄与が推察されたが、より強固に Treg の関与について明らかにする目的で、Foxp3^{DTR} マウスを用いた Treg の枯渇実験を行った。iPSC の移植から 38 日目と 40 日目にジフテリア毒素 (DT) を投与し、Treg の枯渇を行った (図 24A)。その結果、DT 投与から 4 日目には PBMC 中および奇形腫浸潤する Treg が枯渇した (図 24B-E)。DT 投与から 4 日目における奇形腫の重量は DT 投与の有無で有意な変化はなかった (図 24F, G)。この条件下で、CBA/N 由来皮膚を 2 次移植した結果、抗 Foxp3^{DTR} マウスにおいて、DT 投与によって、CD25 抗体投与群における皮膚移植片の生着期間は有意に低下した (図 24H)。

このことから、iPSC 移植が誘導する免疫寛容における Treg の寄与が強く示唆された。

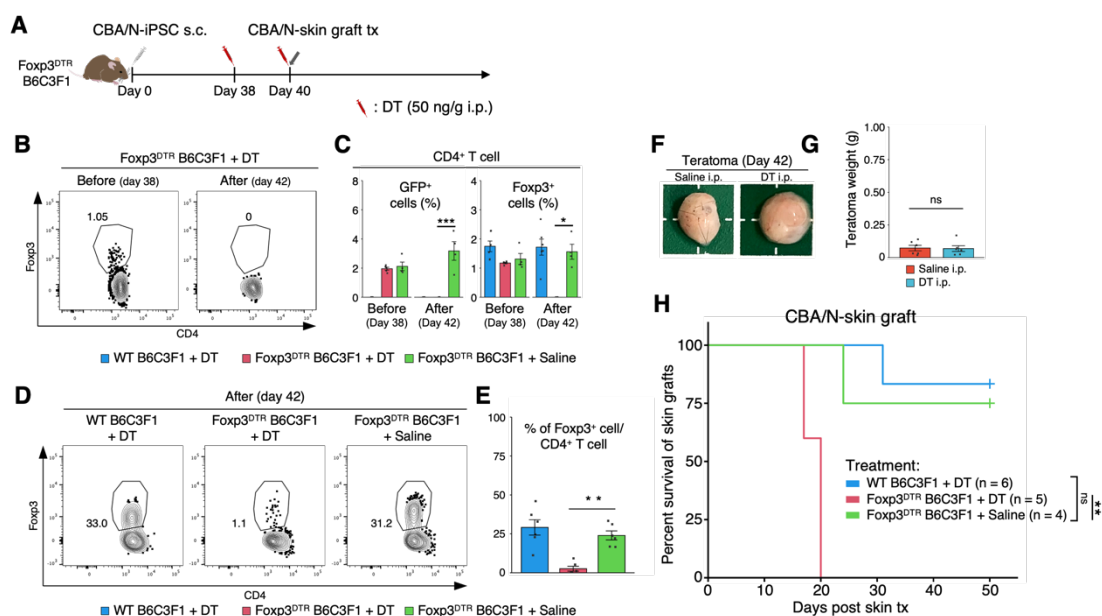


図 24. 他家 iPSC 移植が誘導する免疫寛容への Treg 細胞の寄与

(A) 実験概念図。B6C3F1 マウスに CBA-iPSC を移植し 40 日後に CBA/N 皮膚を移植した。CBA/N-iPSC の移植から 38 日目と 40 日目に DT を投与した。(B, C) CBA/N-iPSC 移植後 40 日目の PBMC における Foxp3⁺CD4⁺T 細胞の代表的なプロットパターン (B) と定量的棒グラフ (C)。(D, E) CBA/N-iPSC 移植から 40 日目の iPSC 由来奇形腫中 Foxp3⁺CD4⁺T 細胞の代表的なプロットパターン (D) および定量的 barplot (E)。(F, G) CBA/N-iPSC を B6C3F1 に移植して 42 日後の iPSC 由来奇形腫の形成。代表的な画像 (F) および定量的 barplot (G)。(H) CBA/N-iPSC を移植した wildtype B6C3F1 マウスまたは Foxp3^{DTR} B6C3F1 に DT または saline を投与し、CBA/N 皮膚移植片の生存を評価した。

(C, E, G, H) *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (Tukey's HSD 検定 (C, E, G), log-rank 検定 (H))。

他家 iPSC 由来奇形腫における Tgfb2 発現

次に、奇形腫内 effector Treg の増殖について、Treg の増殖と維持に関わることが知られている Tgfb の遺伝子発現を解析した。その結果、*Tgfb2* の遺伝子発現が経時的に向上していることが明らかになった (図 25A)。そこで、奇形腫及び血清中の Tgfb2 を ELISA で評価したところ、奇形腫でのみ、Tgfb2 の発現向上が認められた (図 25B, C)。奇形腫内の免疫細胞の scRNA-seq では、Tgfb2 を発現する免疫細胞は認められないことから (図 25D)、Tgfb2 の発現増加は奇形腫実質細胞に起因するものと考えられた。

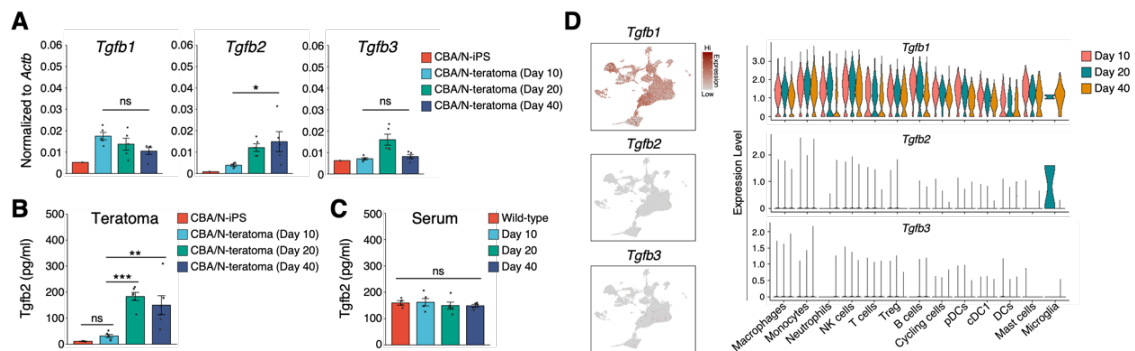


図 25. 他家 iPSC 由来奇形腫における Tgfb2 発現

(A) iPSC 由来奇形腫における Tgfb ファミリーの遺伝子発現。iPSC および奇形腫における *Tgfb1* (左)、*Tgfb2* (中)、*Tgfb3* (右) の発現を示す。(B, C) Tgfb2 タンパクの定量 (pg/ml)。iPSC 移植後 10、20、40 日目の奇形腫および iPSC (左)、また CBA/N-iPSC を移植した B6C3F1 マウス血清 (右) を経時的に測定した。(D) iPSC 由来奇形腫浸潤免疫細胞における Tgfb ファミリー遺伝子の発現。

(A-C) *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (Tukey's HSD 検定)。

他家 iPSC 由来奇形腫における Tgfb2 発現細胞

次に、iPSC 由来奇形腫のどの細胞種が Tgfb2 を発現しているのか明らかにするために、Tgfb2 の免疫染色を実施し形態学的な評価を実施した。その結果、iPSC 移植から 40 日後に回収した奇形腫において、Tgfb2 陽性領域の大部分は、筋肉や神経様の形態であった（図 26A）。

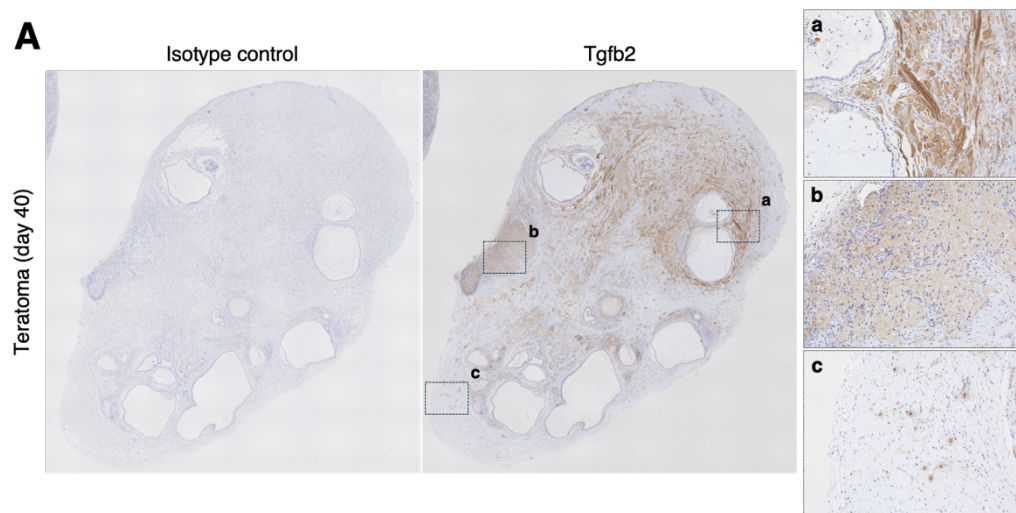


図 26. 他家 iPSC 由来奇形腫における Tgfb2 発現細胞

(A) iPSC 移植後 40 日目の奇形腫の代表的な Tgfb2 免疫染色像。全体像（左）と拡大像（右）を示す。筋肉様組織（a）、神経様組織（b）、未知の細胞（c）が Tgfb2 陽性である。

他家 iPSC 移植が誘導する免疫寛容への Tgfb2 の寄与

奇形腫における Tgfb2 の経時的な発現亢進が認められたため、これが effector Treg 増加や免疫寛容の誘導に寄与しているのか明らかにする目的で、Tgfb の阻害実験を行った。iPSC 移植から 40 日間 4 日に一度、抗 Tgfb 抗体投与を投与した。その結果、抗 Tgfb 抗体投与群において、奇形腫内浸潤 T 細胞の smad2 のリン酸化が有意に低下し（図 27A, B）、Foxp3⁺CD4 T 細胞中の CD103⁺CD25⁺ effector Treg の割合も有意に低下した（図 27C, D）。抗 Tgfb 抗体の投与は iPSC 移植後 40 日目の奇形腫体積に影響しなかったが（図 27E, F）、2 次移植した皮膚移植片は、肥厚し、CD3⁺T 細胞の浸潤も有意に増加した（図 27G, H）。

したがって、奇形腫における Tgfb2 の増加は、effector Treg の誘導と関連していることが推察される。奇形腫除去実験および Treg 枯渇実験の結果と合わせて考えると、奇形腫における Tgfb2-effector Treg 軸は、iPSC 移植による免疫寛容の誘導に極めて重要である可能性がある。

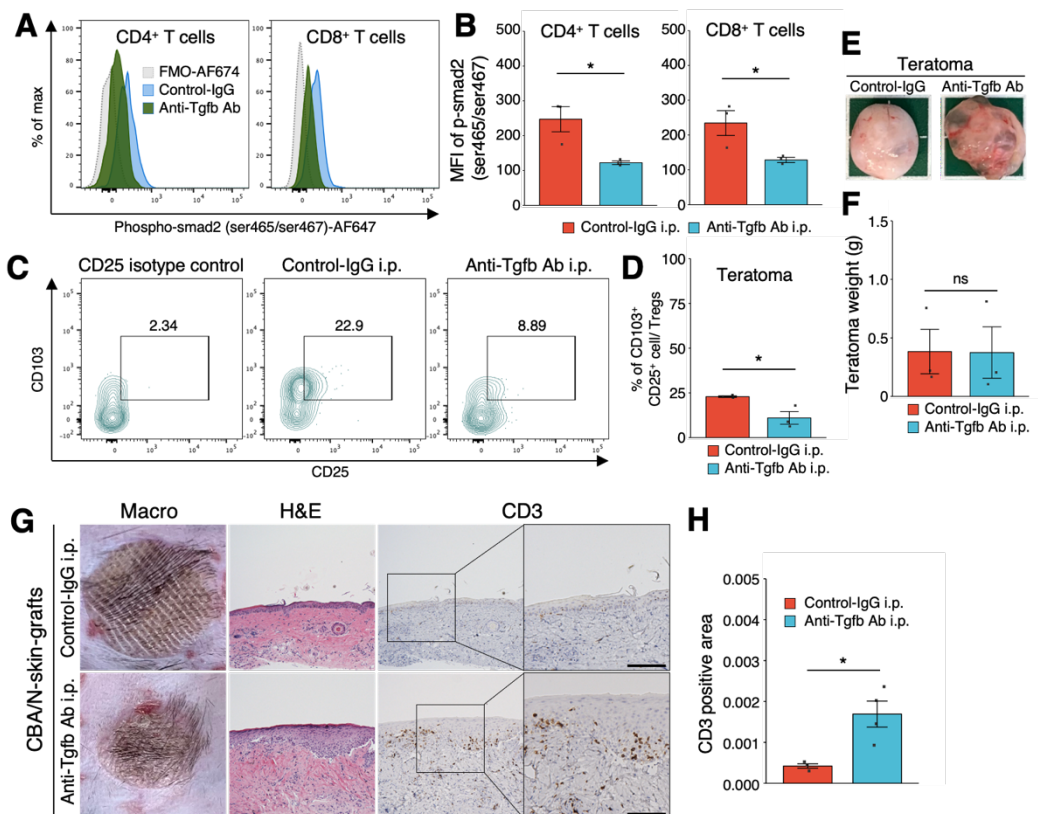


図 27. 他家 iPSC 移植が誘導する免疫寛容への Tgfb2 の寄与

(A, B) iPSC 由来奇形腫に浸潤する T 細胞における p-smad2 の MFI の代表的なプロット

(A) と定量的な bar plot (B)。(C, D) CBA/N-iPSC 移植後 40 日目の奇形腫における CD103⁺CD25⁺Foxp3⁺CD4⁺T 細胞の代表的プロットパターン (C) と定量的な bar plot (D)。

(E, F) B6C3F1 マウスに形成された CBA/N-iPSC 由来奇形腫の代表的なマクロ画像 (E) および定量的な bar plot (F)。(G, H) 皮膚移植片の代表的な病理学的画像 (G) と CD3⁺細胞の浸潤面積 (H)。

(B, D, F, H) *p < 0.05 (Student's t-test)。(G) スケールバー：25μm。

奇形腫内 Treg の 2 次移植片生着への関与

これまでに、奇形腫内における経時的な effector Treg の増加および、iPSC 移植が誘導する移植免疫寛容への Treg の寄与を明らかにした。奇形腫内の Treg の 2 次移植片生着への寄与を模索する目的で、皮膚移植片における Foxp3⁺細胞の免疫染色をした。その結果、皮膚移植後 30 日目において、事前の iPSC 移植を行なった群における有意な Foxp3⁺細胞の増加が認められた (図 28A, B)。また、皮膚移植後 100 日目において、事前の iPSC 移植を行なったマウスにおける同種同系由来皮膚移植片と同種異系由来皮膚移植片における Foxp3⁺細胞の免疫染色した結果、同種異系由来皮膚移植片における Foxp3⁺細胞が有意に多いことが認められた (図 28C, D)。

したがって、同種異系マウスへの iPSC 移植は、同種異系 2 次移植片における Treg の増加を促進する可能性が示唆された。

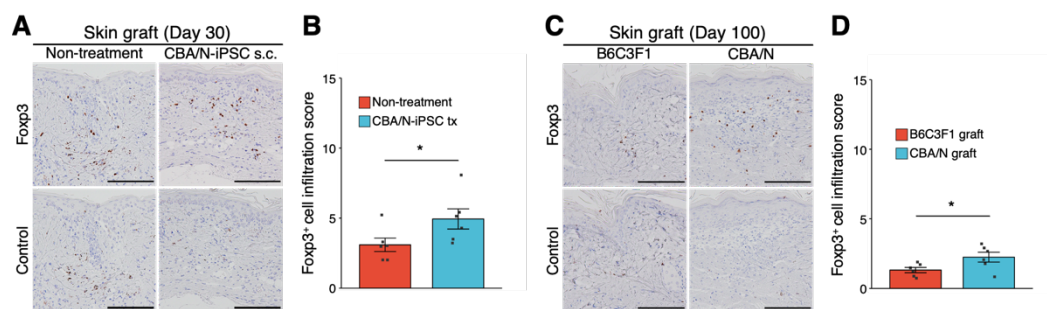


図 28. 奇形腫内 Treg の 2 次移植片生着への関与

(A-D) 皮膚移植片における Foxp3⁺細胞の免疫染色画像 (A, C) と定量的な bar plot (B, D)。

(B, D) * $p < 0.05$ (Student's t-test)。 (A, C) スケールバー : 25 μ m。

奇形腫内 Treg の生着 2 次移植片への移行の可能性

次に、事前の iPSC 移植を行なったマウスにおける 2 次移植片内 Treg の増加が、奇形腫内 Treg の移行の結果であるか明らかにする目的で、次の実験を行なった。Foxp3^{DTR}B6C3F1 マウスに CBA/N-iPSC を移植し、30 日後に奇形腫を回収し、野生型の B6C3F1 マウスの皮下に再移植を行なった。奇形腫の移植から 32 日目に CBA/N マウス由来皮膚を移植した（図 29A）。この時移植した奇形腫内には Foxp3^{DTR}B6C3F1 マウス由来の Treg が浸潤しており、この Treg は Luc シグナルをもとに検出可能であるため、Luc シグナルをもとに、奇形腫浸潤 Treg の体内動態を追跡できる。その結果、Luc シグナル検出のコントロールとして、同種同系に移植した Foxp3^{DTR} C57BL/6N マウスの皮膚移植片において、Luc シグナルが検出された（図 29B）。この条件下において、Luc シグナルは奇形腫およびリンパ節に相当する領域において検出されたものの、同種同系および同種異系の 2 次移植皮膚においては検出されなかった（図 29B）。

したがって、事前の iPSC 移植によって生着する 2 次移植皮膚内 Treg が奇形腫内 Treg の移行した結果である可能性は低いものと考えられた。

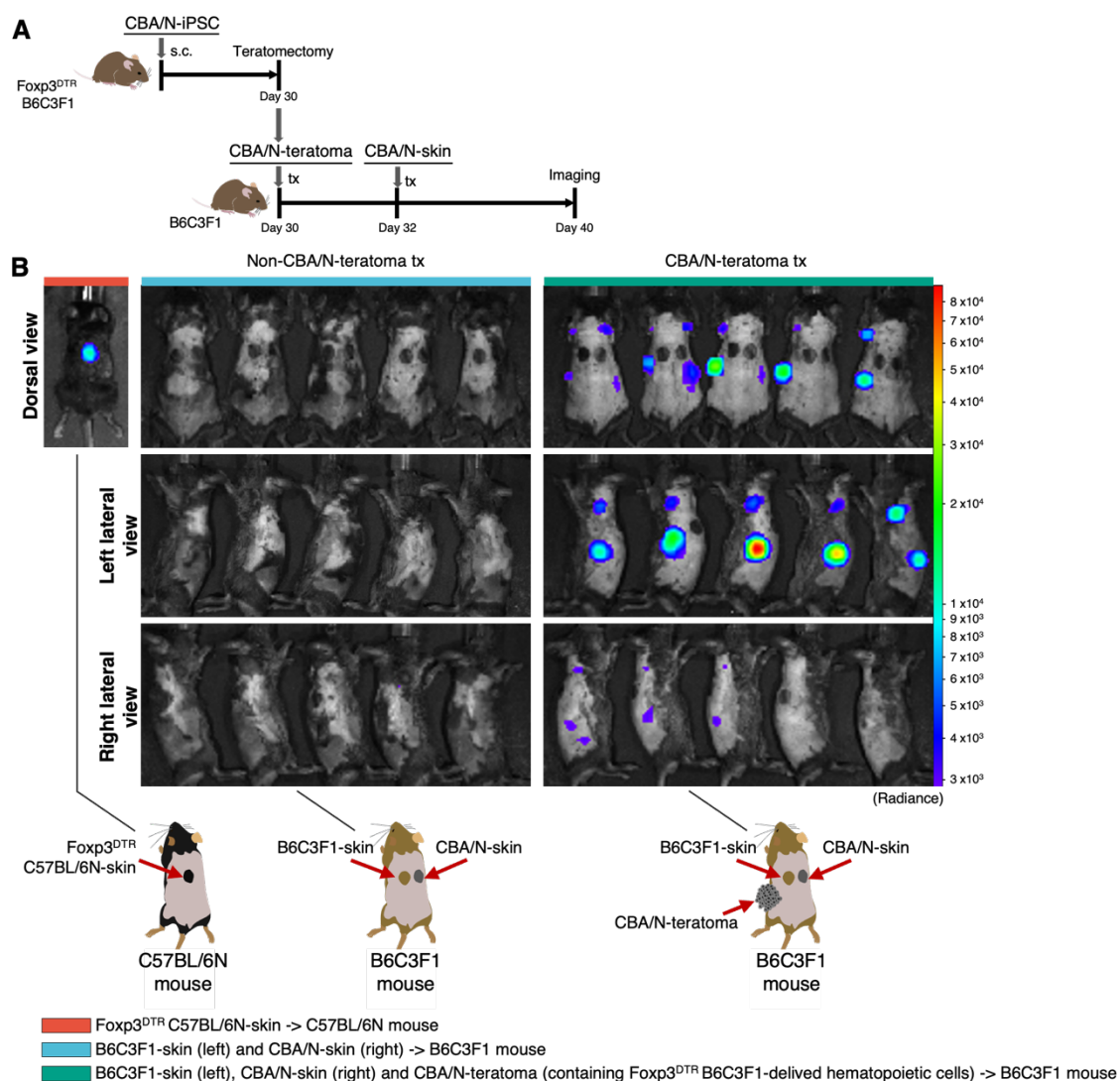


図 29. 奇形腫内 Treg の生着 2 次移植片への移行の可能性

(A, B) 奇形腫再移植モデルを用いた奇形腫内 Foxp3⁺細胞の皮膚移植片への移行解析。(A) 実験概念図。Foxp3^{DTR}B6C3F1 マウスに CBA/N-iPSC を移植し形成された奇形腫を野生型 B6C3F1 マウスに再移植した後、皮膚移植を行い、Luc シグナルを分析した。(B) Luc シグナルの検出画像。(左) C57BL/6N マウスに Foxp3^{DTR}C57BL/6N 皮膚を移植したコントロール、(中央) 奇形腫および皮膚移植片を移植しない B6C3F1 マウス、(右) 奇形腫および、皮膚移植片を移植した B6C3F1 マウス。

考察

本研究では、MHC 適合一致・マイナー抗原不一致の同種異系マウスに皮下移植した iPSC が非免疫抑制下にもかかわらず拒絶されず奇形腫を形成し、この他家 iPSC の生着は 2 次的なドナー抗原特異的免疫寛容をも引き起こすことを発見した。今回、このドナー由来多能性幹細胞を移植するのみでドナー抗原特異的免疫寛容を誘導するという現象について、その誘導効率が経時的に向上すること、本現象の誘導と維持に多能性幹細胞由来奇形腫が不可欠であることの特性を明らかにした。また、Treg 依存的な寛容誘導メカニズムであることを示した。これらの知見は、幹細胞と免疫応答の関係に関する今後の研究に新たな示唆を与えるものである上に、安全で効率的な再生医療の開発にとって重要な情報を提供するものと考ええる。

マウス ESC は、ESC が発現する Tgfb を介して、MHC 型不一致のマウスに生着することを示す *in vivo* 実験や (Koch et al., 2008) や、いくつかの *in vitro* 実験において、マウスやヒトの ESC における MHC 低発現や、Arg1 や MFG-E8 などの免疫抑制因子の発現が、ESC 免疫原性の低下や免疫抑制能力に寄与していることが報告されている (Drukker et al., 2006; Yachimovich-Cohen et al., 2010; Tan et al., 2015)。また、ドナー由来の ESC を門脈に注入すると、全身性の寛容が誘導される (Fändrich et al., 2002; Imberti et al., 2011) という報告もあるが、門脈に抗原を注入するだけでも寛容が誘導されることがある (Crispe et al., 2003; Malhi et al., 2008) 上、これらの研究では奇形腫の形成の免疫寛容誘導への関与を否定しており、異なるメカニズムが関与していることが考えられる。したがって、本研究が示すように、iPSC が無処置で同種異系マウスに生着し、奇形腫の形成によってドナー抗原特異的な免疫寛容現象を引き起こすことは初めての知見であると考えている。

我々はさらに、Tgfb2 が奇形腫内 effector Treg を誘導する因子の一つである可能性を示した。Tgfb の 3 つのアイソフォーム (Tgfb1、Tgfb2、Tgfb3) は、それぞれ異なる遺伝子から転写されるが、いずれも TgfbR シグナル伝達を介して、TGF- β 調節遺伝子の転写を誘導する (Wilson et al., 2021; Sun et al., 2021)。Tgfb2 は主に神経と眼に発現しており (Feo et al., 2017; Siglienti et al., 2007; Hirsch et al., 2015; Sugita et al., 2006; Ng et al., 2007)、CD4⁺CD25⁺T 細胞の Treg への分化 (Fu et al., 2004; Chen et al., 2023; Becker et al., 2018) や、抗原提示細胞の抗原提示能の低下を介した Treg の生成 (Siglienti et al., 2007; Becker et al., 2018; Denniston et al., 2011) に寄与することで、それらの組織の免疫特権を促進する重要な因子と考えられてきており、本研究の知見と関連している可能性が考えられた。

また、他家 iPSC 由来奇形腫内に炎症組織や移植臓器で形成される三次リンパ節 (TLO) 様の組織が形成されていることも観察した。移植において、移植臓器における TLO 様組織の形成が移植片の生着にとって有益か有害かについては

様々な論争がある (Hsiao et al., 2016) が、比較的最近の報告では、TLO 様組織が Treg を介した移植片の生存率向上に寄与していることが示されている (Brown et al., 2011; Li et al., 2012; Rosales et al., 2022; Li et al., 2019) 。今後、他家 iPSC 由来奇形腫内の TLO 様組織に焦点を当てた研究を実施することで新たな知見が得られる可能性が考えられる。

本研究の限界として、多能性幹細胞移植による免疫寛容誘導現象が、特定のマウス間の移植実験でのみ検証されたことが挙げられる。また、Treg や Tgfb2 の枯渇実験・中和実験では、特異性という点で不十分であり、今後 Tgfb2-KO を用いた実験や、iPSC 由来奇形腫内 effector Treg 特異的な枯渇実験等を実施する必要があるものと考えている。

以上のことから、本研究では、ドナー由来多能性幹細胞移植によるドナー抗原特異的免疫寛容誘導の特性に加え、Treg や Tgfb2 といった細胞・因子の寄与といったメカニズムの一端を解明した。今後さらなるメカニズム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ある。

結論

1. 本研究全体から得られた新知見

【第1章より】

- 臓器移植における一般的な免疫抑制剤の組み合わせに加え移植前 T 細胞除去を行うことで、拒絶の弱い組み合わせの皮膚移植片は長期生着する
- CB+ラパマイシンの併用によって拒絶の強い組み合わせであっても皮膚移植片は長期生着する
- CB を用いることでドナーに対する T 細胞応答性の低下とドナー反応性抗体の産生抑制が可能である

【第2章より】

- 多能性幹細胞は MHC 型適合・マイナー抗原不一致アロホストから拒絶されず生着する
- 多能性幹細胞の生着後 40 日程度でドナー抗原特異的免疫寛容が誘導される
- 多能性幹細胞が誘導する移植免疫寛容は Treg 依存적である可能性がある
- 奇形腫内 Effector Treg の増加には Tgfb2 が寄与している可能性がある

2. 新知見の意義

レシピエントに対して MHC 型一致他家 iPSC を用いた移植医療では、ドナーレシピエント間において拒絶反応の程度が異なり、一般的な免疫抑制方法では拒絶を制御できない可能性がある。この課題に対して、今後臨床利用されることが考えられる CB も含めた薬剤による免疫抑制方法を提示した。また、免疫抑制のみならず、新たな免疫寛容誘導方法の創出に発展し得る新規の免疫寛容誘導現象を発見し、この現象の特性とメカニズムの一端を解明した。いずれにおいても、今後の他家 iPSC を用いた再生医療における拒絶反応制御に資する重要な発見であると考えられる。

3. 今後どのような研究が展開されうるか

第二章の現象について、本研究の内容は主にマウス皮膚移植モデルを用いて検証されているため、ヒト iPSC 由来治療用細胞（インスリン産生細胞や神経細胞など）に対するヒト免疫応答を再現する免疫系ヒト化動物モデルを用いて免疫制御方法について検討することは本研究を次なるステップに展開するものと期待する。また、より詳細なメカニズム解析を実施することは、iPSC 由来奇形腫の形成を伴わない、免疫寛容誘導方法に発展するものと考えている。

4. 今後の課題

- ドナー由来多能性幹細胞移植が誘導するドナー抗原特異的免疫寛容現象のメカニズムをより詳細に明らかにすること。
- ドナー由来多能性幹細胞移植が誘導するドナー抗原特異的免疫寛容現象を他の免疫関連疾患に応用可能であるか検証すること。

謝辞

本研究の一部は JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2119 および一般社団法人日本臓器保存生物医学会の支援を受けたものである。

本研究の遂行にあたって、多大なる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 清野研一郎教授に厚く御礼を申し上げます。また、実験技術のご指導およびデータ解析について多大なるご協力を頂きました住友ファーマ 池田聡史様、および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深く感謝いたします。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Aran D, Looney AP, Liu L, Wu E, Fong V, Hsu A, Chak S, Naikawadi RP, Wolters PJ, Abate AR, et al (2019) Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage. *Nat Immunol* 20, 163–172.
- Brown K, Sacks SH and Wong W (2011) Tertiary lymphoid organs in renal allografts can be associated with donor-specific tolerance rather than rejection. *Eur J Immunol* 41, 89–96.
- Becker W, Nagarkatti M and Nagarkatti PS (2018) miR-466a targeting of TGF- β 2 contributes to FoxP3⁺ regulatory T cell differentiation in a murine model of allogeneic transplantation. *Front Immunol* 9, 688.
- Busque S, Scandling JD, Lowsky R, Shizuru J, Jensen K, Waters J, Wu HH, Sheehan K, Shori A, Choi O, et al (2020) Mixed chimerism and acceptance of kidney transplants after immunosuppressive drug withdrawal. *Sci Transl Med* 12, eaax8863.
- Crispe IN (2003) Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 3, 51–62.
- Chen W (2023) TGF- β Regulation of T Cells. *Annu Rev Immunol* 41, 483–512.
- Davis WC, McKenzie IF and Melvold RW (1980) A comparison of skin and heart graft rejection patterns in H-2 mutant mice. *Transplantation* 29, 189–192.
- Drukker M, Katchman H, Katz G, Even-Tov Friedman S, Shezen E, Hornstein E, Mandelboim O, Reisner Y and Benvenisty N (2006) Human Embryonic Stem Cells and Their Differentiated Derivatives Are Less Susceptible to Immune Rejection Than Adult Cells. *Stem Cells* 24, 221–229.
- Denniston AK, Kottoor SH, Khan I, Oswal K, Williams GP, Abbott J, Wallace GR, Salmon M, Rauz S, Murray PI, et al (2011) Endogenous Cortisol and TGF- β in Human Aqueous Humor Contribute to Ocular Immune Privilege by Regulating Dendritic Cell Function. *J Immunol* 186, 305–311.
- Daniel MG, Pereira CF, Lemischka IR and Moore KA (2016) Making a Hematopoietic Stem Cell. *Trends Cell Biol* 26, 202–214.

- DeWolf S and Sykes M (2017) Alloimmune T cells in transplantation. *J Clin Invest* 127, 2473–2481.
- De Feo D, Merlini A, Brambilla E, Ottoboni L, Laterza C, Menon R, Srinivasan S, Farina C, Garcia Manteiga JM, Butti E, Bacigaluppi M, et al (2017) Neural precursor cell-secreted TGF- β 2 redirects inflammatory monocyte-derived cells in CNS autoimmunity. *J Clin Invest* 127, 3937–3953.
- Fändrich F, Lin X, Chai GX, Schulze M, Ganten D, Bader M, Holle J, Huang DS, Parwaresch R, Zavazava N, et al (2002) Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat Med* 8, 171–178.
- Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, Zhang H, Ding Y and Bromberg JS (2004) TGF- β Induces Foxp3⁺ T-Regulatory Cells from CD4⁺ CD25⁻ Precursors. *Am J Transplant* 4, 1614–1627.
- Goldfarb DA (2005) Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *J Urol* 173, 2105–2105.
- Gurkan S, Luan Y, Dhillon N, Allam SR, Montague T, Bromberg JS, Ames S, Lerner S, Ebcioğlu Z, Nair V, et al (2010) Immune reconstitution following rabbit antithymocyte globulin. *Am J Transplant* 10, 2132–2141.
- Hirsch L, Nazari H, Sreekumar PG, Kannan R, Dustin L, Zhu D, Barron E and Hinton DR (2015) TGF- β 2 secretion from RPE decreases with polarization and becomes apically oriented. *Cytokine* 71, 394–396.
- Hsiao HM, Li W, Gelman AE, Krupnick AS and Kreisel D (2016) The Role of Lymphoid Neogenesis in Allografts. *Am J Transplant* 16, 1079–1085.
- Hart A, Lentine KL, Smith JM, Miller JM, Skeans MA, Prentice M, Robinson A, Foutz J, Booker SE, et al (2021) OPTN/SRTR 2019 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant* 21, 21–137.
- Imberti B, Casiraghi F, Cugini D, Azzollini N, Cassis P, Todeschini M, Solini S, Sebastiano V, Zuccotti M, Garagna S, et al (2011) Embryonic Stem Cells, Derived

Either after In Vitro Fertilization or Nuclear Transfer, Prolong Survival of Semiallogeneic Heart Transplants. *J Immunol* 186, 4164–4174.

Kawai T, Andrews D, Colvin RB, Sachs DH and Cosimi AB (2000) Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat Med* 6, 114.

Koch CA, Geraldles P and Platt JL (2008) Immunosuppression by Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 26, 89–98.

Kawai T, Sachs DH, Sprangers B, Spitzer TR, Saidman SL, 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.

Karnell JL, Albulescu M, Drabic S, Wang L, Moate R, Baca M, Oganessian V, Gunsior M, Thisted T, Yan L, Li J, et al (2019) A CD40L-targeting protein reduces autoantibodies and improves disease activity in patients with autoimmunity. *Sci Transl Med* 11, eaar6584.

Li W, Bribiesco AC, Nava RG, Brescia AA, Ibricevic A, Spahn JH, Brody SL, Ritter JH, Gelman AE, Krupnick AS, et al (2012) Lung transplant acceptance is facilitated by early events in the graft and is associated with lymphoid neogenesis. *Mucosal Immunol* 5, 544–554.

Lim MA, Kohli J and Bloom RD (2017) Immunosuppression for kidney transplantation: Where are we now and where are we going? *Transplant Rev (Orlando)* 31, 10–17.

Loupy A and Lefaucheur C (2018) Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *N Engl J Med* 379, 1150–1160.

Leventhal JR, Miller J, Mathew JM, Kurian S, Tambur AR, Friedewald J, Charrette J and Abecassis MM (2018) Updated follow-up of a tolerance protocol in HLA-identical renal transplant pairs given donor hematopoietic stem cells. *Hum Immunol* 79, 277–282.

Li W, Gauthier JM, Higashikubo R, Hsiao HM, Tanaka S, Vuong L, Ritter JH, Tong AY, Wong BW, Hachem RR, et al (2019) Bronchus-associated lymphoid tissue–resident

- Foxp3⁺ T lymphocytes prevent antibody-mediated lung rejection. *J Clin Invest* 129, 556–568.
- Lee KW, Park JB, Park H, Kwon Y, Lee JS, Kim KS, Chung YJ, Rhu JS, Choi S, Kwon GY, et al (2020) Inducing Transient Mixed Chimerism for Allograft Survival Without Maintenance Immunosuppression with Combined Kidney and Bone Marrow Transplantation: Protocol Optimization. *Transplantation* 104, 1472–1482.
- Lassiter G, Otsuka R, Hirose T, Rosales I, Karadagi A, Tomosugi T, Dehnadi A, Lee H, Colvin RB, Baardsnes J, et al (2023) TNX-1500, a crystallizable fragment–modified anti-CD154 antibody, prolongs nonhuman primate renal allograft survival. *Am J Transplant* 23, 1171–1181.
- Mason A, Mottram PL, Mirisklavos A, Clurne GJ and Mandel TE (1988) A comparison of cyclosporine, donor-specific transfusion, and antilymphocyte serum suppression of skin, heart, and fetal pancreatic islet allograft rejection in mice. *Transplantation* 45, 1155–1157.
- Moffatt SD, McAlister V, Calne RY and Metcalfe SM (1999) Potential for improved therapeutic index of FK506 in liposomal formulation demonstrated in a mouse cardiac allograft model. *Transplantation* 67, 1205–1208.
- Malhi H and Gores GJ (2008) Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Injury. *Gastroenterology*, 134, 1641–1654.
- Mai HL, Boeffard F, Longis J, Danger R, Martinet B, Haspot F, Vanhove B, Brouard S and Souillou JP (2014) IL-7 receptor blockade following T cell depletion promotes long-term allograft survival. *J Clin Invest* 124, 1723–1733.
- Murata T, Wada H, Otsuka R, Sasaki A, Tsuji H, Itoh M, Eguchi N, Kawai T and Seino KI (2020) Establishment of an experimental model for MHC homo-to-hetero transplantation. *Sci Rep* 10, 1–8.
- Mori A, Murata S, Tashiro N, Tadokoro T, Okamoto S, Otsuka R, Wada H, Murata T, Takahashi T, Seino KI, et al (2021) Establishment of Human Leukocyte Antigen-Mismatched Immune Responses after Transplantation of Human Liver Bud in Humanized Mouse Models. *Cells* 10, 476.

- Miura S, Habibabady ZA, Pollok F, Ma M, Rosales IA, Kinoshita K, Pratts S, McGrath G, Chaban R, Fogarty S, et al (2023) TNX-1500, a crystallizable fragment–modified anti-CD154 antibody, prolongs nonhuman primate cardiac allograft survival. *Am J Transplant* 23, 1182–1193.
- Nash JR, Peters M and Bell PR (1977) Comparative survival of pancreatic islets, heart, kidney, and skin allografts in rats, with and without enhancement. *Transplantation* 24, 70–73.
- Ng TF, Lavik E, Keino H, Taylor AW, Langer RS and Young MJ (2007) Creating an Immune-Privileged Site Using Retinal Progenitor Cells and Biodegradable Polymers. *Stem Cells* 25, 1552–1559.
- Nakatsuji N, Nakajima F and Tokunaga K (2008) HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nat Biotechnol* 26, 739–740.
- Opelz, G (2005) Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *Lancet* 365, 1570–1576.
- Opelz G and Döhler B (2007) Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: Comparative analysis of two decades. *Transplantation* 84, 137–143.
- Opelz G and Döhler B (2010) Pediatric kidney transplantation: Analysis of donor Age, HLA match, and posttransplant non-hodgkin lymphoma: A collaborative transplant study report. *Transplantation* 90, 292–297.
- Orlando G, Murphy SV, Bussolati B, Clancy M, Cravedi P, Migliaccio G and Murray P (2019) Rethinking Regenerative Medicine from a Transplant Perspective (and Vice Versa). *Transplantation* 103, 237–249.
- Pearl JI, Lee AS, Leveson-Gower DB, Sun N, Ghosh Z, Lan F, Ransohoff J, Negrin RS, Davis MM and Wu JC (2011) Short-term immunosuppression promotes engraftment of embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 309–317.
- Patil A and Patil A (2022) CellKb Immune: a manually curated database of mammalian hematopoietic marker gene sets for rapid cell type identification. *BioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/2020.12.01.389890> (PREPRINT)

- Rosales IA, Yang C, Farkash EA, Ashry T, Ge J, Aljabban I, Ayyar A, Ndishabandi D, White R, Gildner E, et al (2022) Novel intragraft regulatory lymphoid structures in kidney allograft tolerance. *Am J Transplant* 22, 705–716.
- Steinmuller D (1998) The enigma of skin allograft rejection. *Transplantation Reviews* 12, 42–57.
- Shimmura H, Tanabe K, Habiro K, Abe R and Toma H (2006) Combination effect of mycophenolate mofetil with mizoribine on cell proliferation assays and in a mouse heart transplantation model. *Transplantation* 82, 175–179.
- Sugita S, Futagami Y, Smith SB, Naggar H and Mochizuki M (2006) Retinal and ciliary body pigment epithelium suppress activation of T lymphocytes via transforming growth factor beta. *Exp Eye Res* 83, 1459–1471.
- Sheldon S and Poulton K (2006) HLA Typing and Its Influence on Organ Transplantation. *Methods Mol Biol* 333, 157–174.
- Shultz LD, Ishikawa F and Greiner DL (2007) Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* 7, 118–130.
- Siglienti I, Chan A, Kleinschnitz C, Jander S, Toyka KV, Gold R and Stoll G (2007) Downregulation of Transforming Growth Factor- β 2 Facilitates Inflammation in the Central Nervous System by Reciprocal Astrocyte/Microglia Interactions. *J Neuropathol Exp Neurol* 66, 47–56.
- Sener A, Tang AL and Farber DL (2009) Memory T-Cell predominance following T-Cell depletion therapy derives from homeostatic expansion of naive T cells. *Am J Transplant* 9, 2615–2623.
- Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV and Greiner DL (2012) Humanized mice for immune system investigation: Progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol* 12, 786–798.
- Sachs DH, Kawai T and Sykes M (2014) Induction of tolerance through mixed chimerism. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4, a015529.

- Sasaki H, Wada H, Baghdadi M, Tsuji H, Otsuka R, Morita K, Shinohara N and Seino K (2015) New immunosuppressive cell therapy to prolong survival of induced pluripotent stem cell-derived allografts. *Transplantation* 99, 2301–2310.
- Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, Ogasawara T, Okada K, Shiba N, Sakamoto K, et al (2016) Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* 538, 388–391.
- Shi Y, Inoue H, Wu JC and Yamanaka S (2017) Induced pluripotent stem cell technology: A decade of progress. *Nat Rev Drug Discov* 16, 115–130.
- Steers NJ, Li Y, Drace Z, D'Addario JA, Fischman C, Liu L, Xu K, Na YJ, Neugut YD, Zhang JY, et al (2019) Genomic Mismatch at LIMS1 Locus and Kidney Allograft Rejection. *N Engl J Med* 380, 1918–1928.
- Sun T, Huang Z, Liang WC, Yin J, Lin WY, Wu J, Vernes JM, Lutman J, Caplazi P, Jeet S, et al (2021) TGFβ2 and TGFβ3 isoforms drive fibrotic disease pathogenesis. *Sci Transl Med* 13, 1–16.
- Terasaki PI (2003) Deduction of the fraction of immunologic and non-immunologic failure in cadaver donor transplants. *Clin Transpl*, 449–452.
- Takahashi K, Okita K, Nakagawa M and Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc* 2, 3081–3089.
- Taylor CJ, Peacock S, Chaudhry AN, Bradley JA and Bolton EM (2012) Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types. *Cell Stem Cell* 11, 147–152.
- Turner M, Leslie S, Martin NG, Peschanski M, Rao M, Taylor CJ, Trounson A, Turner D, Yamanaka S and Wilmut I (2013) Toward the development of a global induced pluripotent stem cell library. *Cell Stem Cell* 13, 382–384.
- Tan Y, AlKhamees B, Jia D, Li L, Couture JF, Figeys D, Jinushi M and Wang L (2015) MFG-E8 Is Critical for Embryonic Stem Cell-Mediated T Cell Immunomodulation. *Stem Cell Reports* 5, 741–752.

- Takebe T, Sekine K, Kimura M, Yoshizawa E, Ayano S, Koido M, Funayama S, Nakanishi N, Hisai T, Kobayashi T, et al (2017) Massive and Reproducible Production of Liver Buds Entirely from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep* 21, 2661–2670.
- Tsuchida T, Murata S, Matsuki K, Mori A, Matsuo M, Mikami S, Okamoto S, Ueno Y, Tadokoro T, Zheng YW, et al (2020) The regenerative effect of portal vein injection of liver organoids by retrorsine/partial hepatectomy in rats. *Int J Mol Sci* 21, 1–13.
- Umemura A, Park EJ, Taniguchi K, Lee JH, Shalapour S, Valasek MA, Aghajan M, Nakagawa H, Seki E, Hall MN, et al (2014) Liver damage, inflammation, and enhanced tumorigenesis after persistent mTORC1 inhibition. *Cell Metab* 20, 133–144.
- Valenzuela NM and Reed EF (2017) Antibody-mediated rejection across solid organ transplants: Manifestations, mechanisms, and therapies. *J Clin Invest* 127, 2492–2504.
- Vila-Cejudo M, Ibañez E and Santalo J (2017) Derivation of stem cell lines from mouse preimplantation embryos. *J Vis Exp* 20, 1–6.
- Wang C, Sun J, Sheil AG, McCaughan GW and Bishop GA (2001) A short course of methylprednisolone immunosuppression inhibits both rejection and spontaneous acceptance of rat liver allografts. *Transplantation* 72, 44–51.
- Wilson SE (2021) TGF beta –1, –2 and –3 in the modulation of fibrosis in the cornea and other organs. *Exp Eye Res* 207.
- Yachimovich-Cohen N, Even-Ram S, Shufaro Y, Rachmilewitz J and Reubinoff B (2010) Human Embryonic Stem Cells Suppress T Cell Responses via Arginase I-Dependent Mechanism. *J Immunol* 184, 1300–1308.
- Yamanaka S (2020) Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. *Cell Stem Cell* 27, 523–531.
- Zhang Z, Zhu L, Quan D, Garcia B, Ozcay N, Duff J, Stiller C, Lazarovits A, Grant D and Zhong R (1996) Pattern of liver, kidney, heart, and intestine allograft rejection in different mouse strain combinations. *Transplantation* 62, 1267–1272.

- Zeng Q, Ng YH, Singh T, Jiang K, Sheriff KA, Ippolito R, Zahalka S, Li Q, Randhawa P, Hoffman RA, et al (2014) B cells mediate chronic allograft rejection independently of antibody production. *J Clin Invest* 124, 1052–1056.
- Zhang Q and Reed EF (2016) The importance of non-HLA antibodies in transplantation. *Nat Rev Nephrol* 12, 484–495.