

表 題 近交系ミニブタにおける MHC を適合させた iPS 細胞移植
後の免疫反応の解析

論文の区分 博士課程

著 者 名 水上 喜久

担当指導教員氏名 花園 豊

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
分子病態治療研究センター
再生医学研究部

2015年1月9日申請の学位論文

目次

はじめに	・・・1
1. 背景	・・・3
2. 実験材料と方法	・・・6
3. 結果	・・・13
4. 考察	・・・27
5. 結語	・・・31
6. 引用文献	・・・32

はじめに

多能性幹細胞は、身体を構成するあらゆる細胞や組織に分化できると考えられている。この多能性幹細胞には2つある。ES細胞とEpi幹細胞である。ES細胞は、胚盤胞の内部細胞塊から樹立できる。一方でEpi幹細胞は、胚盤胞よりも発生が進んだ着床後のエピブラストから樹立できる。ES細胞とEpi幹細胞は、三胚葉性の細胞や組織を形成する点においては同等であると言える。しかし、両者の間には大きな違いが多数みられる。ES細胞はその培養操作が簡便で、増殖能が高く、凍結融解後の生存率が高いなどの特徴があり、最も特徴的なのは初期胚に移植することでキメラ個体を作成できる点である。この性質をナイーブ (naive) 型とよぶ。一方でEpi幹細胞は、細胞操作が困難で、増殖が遅く、凍結融解後の生存率が極めて低いなどの特徴があり、キメラ形成能も持たない。この性質をプライム (primed) 型とよぶ。これらの性質の違いは、発生段階を反映していると考えられてきた。しかし、マウスやラット以外の動物種では着床前の胚盤胞を用いても、樹立できる多能性幹細胞はプライム型の細胞株しか得られなかった。このことから、ナイーブ型の性質は、マウスやラットに特徴的なものであるとする考え方が主流になってきた。

しかし、近年になってプライム型の細胞、例えばヒトES/iPS細胞の培養条件を改良することで、プライム型からナイーブ型の性質に変換できる可能性が出てきた。ナイーブ型の細胞は、前述の通りプライム型に比べて優れた点が多い。例えば、造血幹細胞や生殖幹細胞などの未分化な幹細胞への分化能もナイーブ型に限定された特徴である。さらに、胚盤胞補完法と呼ばれる方法を用いれば、異種の動物を使ってナイーブ型の細胞由来の臓器を作成できる可能性がある。これらナイーブ型の性質をもつヒトiPS細胞を誘導することができれば、臨床応用する上で多くの利点が見られることが期待される。しかし、ナイーブ型に特徴的なキメラ形成能の評価をヒト初期胚を用いて行うことは倫理的に許されない。そこで、サルやブタなどのプ

ライム型の多能性幹細胞をナイーブ型にし、その方法を応用することでヒト iPS 細胞のナイーブ化が試みられている。

これまでに我々は、ナイーブ型の細胞の培養条件を応用することによって、通常はプライム型の性質を持つブタ iPS 細胞をナイーブ化することに成功した。本研究では、このナイーブ型ブタ iPS 細胞を用いて、その移植時における奇形腫形成リスクについて評価した。

1. 背景

1981年、イギリスの Martin Evans らによって、マウス初期胚(胚盤胞の内部細胞塊)から胚性幹細胞(Embryonic stem cell: ES 細胞)が樹立された(1)。ES 細胞は、全ての組織に分化する能力をもち、すぐれた増殖能をもつ。これを受けて、1998年にアメリカの James Thomson らによって、ヒト胚盤胞の内部細胞塊からヒト ES 細胞が樹立された(2)。ここから、ヒト ES 細胞による再生医療の実現化が期待された。しかし、生命の萌芽であるヒト胚盤胞を供することへの倫理的な問題や、ES 細胞が他人の受精卵に由来することによる免疫拒絶の問題があった。

これら二つの問題を同時に解決したのが、2006年に京都大学の山中伸弥らによって樹立された人工多能性幹(induced pluripotent stem; iPS)細胞である。iPS 細胞は、体細胞に山中4因子と呼ばれる4つの転写因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を遺伝子導入することによって樹立できる(3, 4)。iPS 細胞は、ES 細胞と同様に全ての体細胞に分化することができ、無限に近い増殖能をもつ(5-7)。ES 細胞と比較した際の iPS 細胞の優れた点は、ES 細胞は受精卵から樹立されるのに対して、iPS 細胞は皮膚や血液などのあらゆる体細胞から樹立できることである。そのため、iPS 細胞を樹立する際に倫理的な問題は起こらないし、採取する際の身体的な苦痛もほとんどない。さらに、リンパ球から iPS 細胞を樹立する場合には採血と同時に血液検査も可能である。これらの特徴に加えて、iPS 細胞が ES 細胞に比べて特に優れたもう一つの点は、自己の体細胞から iPS 細胞を樹立し、それを移植治療(自家移植)に用いれば、MHC が完全に一致するため、移植後の免疫反応を回避できることである(8, 9)。

しかし、2012年、iPS 細胞を用いても免疫拒絶を回避できないという報告がアメリカの Zhao らのグループから発表された。この報告の中で、Zhao らはマウス iPS 細胞を遺伝的に均一な個体間で移植(同系移植)した際に、免疫反応が見られることを示した(10)。その理

由の一つとして、体細胞を iPS 細胞へと初期化した結果、がん遺伝子が高発現に見られることによって T 細胞からの傷害を受けるようになり、移植後に生体内で拒絶されることが示された。この Zhao らの報告を受けて、複数の研究チームが詳細な解析を行った。その結果、免疫拒絶される iPS 細胞株は、不完全に初期化された株のみであることが明らかになった(11)。具体的には、iPS 細胞を胚盤胞へ移植した際に、キメラ形成能を持ち、かつ生殖細胞系列に寄与し得る iPS 細胞株であれば免疫原性を持たないことが明らかになった。その後、マウスやサル*の* iPS 細胞は免疫反応をほとんど起こさないことが報告されている(11-14)。さらに、2014 年 9 月に理化学研究所の高橋政代らによって、ヒト iPS 細胞に由来する網膜色素上皮シートの自家移植が世界で初めて実施された。経過観察には約1年が必要とされるが、2015 年 2 月(移植後約 5 ヶ月)現在、合併症などの有害事象は見られていない。こうして iPS 細胞の免疫原性についての問題は解決されていき、その安全性が確かなものであることが明らかになってきた。

しかしながら、ヒト iPS 細胞を臨床応用するにあたって、自己の iPS 細胞を樹立し、その品質を評価するためには時間的・経済的に大きな負担を要する。具体的には、体細胞から iPS 細胞を樹立するまでに最短で約2ヶ月は要する。そこから性状解析を行って選別すると、最低、3ヶ月近くの時間がかかる。その場合、例えば脊髄損傷などの早急に移植治療が必要な患者に自己の iPS 細胞を利用することは不可能である。そこで、あらかじめバンキングしたヒト iPS 細胞と、レシピエントのヒト白血球抗原(Human Leukocyte Antigen; HLA)を適合させた他家移植(同種移植)が実用的であると考えられている(15-19)。

この HLA を適合させたヒト iPS 細胞の臨床応用に向けて、その移植治療を反映させたモデル実験が必要である。そこで我々は、大型動物のブタに着目した。ブタは、解剖学的、生理学的にヒトに近い特徴を持つ(20, 21)。さらに、ブタは多産で成長が早く、長期の実験が可能であり、その飼育管理も容易である。また、小型化にも成功しており、実

験の目的に応じてブタ（約 200kg）、ミニブタ（約 50kg）、マイクロミニブタ（約 20kg）を使い分けることができる。近年、動物愛護の観点から欧米ではイヌやサルの実験をブタへ移行する動きがある。さらに国内でもブタ専用の施設が増えつつあることから、ブタの需要は今後ますます高まることが予想される。これらのブタがもつ特徴の中で我々が最も重視した点は、大型動物で唯一、MHC (major histocompatibility complex; 主要組織適合複合体) の明らかな近交系が確立されていることである(22-24)。我が国では、1978 年に近交系のクラウン系ミニブタが鹿児島大学で確立され、ヒトの HLA に相当するブタ白血球抗原 (Swine Leukocyte Antigen; SLA) が明らかにされている(23, 25, 26)。これまでに、我々は近交系クラウン系ミニブタの iPS 細胞を樹立した(27; 図 1)。SLA を適合させたブタ iPS 細胞の移植は、HLA を適合させたヒト iPS 細胞移植の優れた前臨床モデル実験となりうる。

本研究において、我々は近交系クラウン系ミニブタを用いて、ドナーとレシピエントの SLA を適合させたブタ iPS 細胞の移植をおこなった。移植後に、iPS 細胞を臨床応用する上で懸念されている奇形腫形成が起こるのかどうかを検証した。

2. 実験材料と方法

2-1. 実験動物

7～20ヶ月齢の近交系クラウン系ミニブタは、株式会社 ジャパンファーム(鹿児島)から購入した。クラウン系ミニブタは、C1 系統と C2 系統の 2 つの SLA 系統が確立されている (25, 26)。クラウン系ミニブタの家系図に示している通り、ドナーiPS 細胞に用いたブタ(AT25)とレシピエントブタ(CT19、CQ38、CU65、SF65、SD57、CQ74)は、同じ C1 系統の中でも特に近い血縁関係にある(図 2-2 C)。ブタの飼育は、室温 23～27°C、湿度 50-70%、12 時間ごとの明暗照明周期下でおこなった。また、ブタは 1 頭あたり 1 つのケージ(1 m x 1.5 m、ベッドスペース 0.5 m x 1 m)内で、毎日 600 g の飼料を与え、水は自由に摂取できる環境下で飼育した。

6 週齢の非肥満型糖尿病/重症複合免疫不全(non-obese diabetic/severe combined immunodeficient ; NOD/SCID) マウスは、株式会社 日本クレア(東京)から購入した。NOD/SCID/ γc^{null} (NOG) マウスは、財団法人 実験動物中央研究所(神奈川)から購入した。全てのマウスは、1 ケージあたり 5 匹以下で、12 時間ごとの明暗照明周期下、餌や水は自由に摂取できる環境下で飼育した。全ての動物実験は、自治医科大学の動物実験倫理委員会であらかじめ承認されている。

2-2. ブタ iPS 細胞の培養

C1 iPS 細胞の培養において、STO 細胞(マウス胎仔線維芽細胞にピューロマイシン、ハイグロマイシン耐性遺伝子を導入し、株化したもの)をマイトマイシン C(協和発酵工業、東京)処理したものをフィーダー細胞として用いた。培地は、Knockout Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Rockville, MD)に、15% 非働化ウシ胎仔血清(fetal

bovine serum ; FBS, Invitrogen)、1% glutamax-L (Invitrogen)、1% 非必須アミノ酸 (Invitrogen)、0.1 mM 2-メルカプトエタノール (Invitrogen)、抗生物質 (50 U/ml penicillin、50 µg/mL streptomycin: Invitrogen)、10 µM フォルスコリン (Sigma, St. Louis, MO)、ブタ LIF (leukemia inhibitory factor;白血球遊走阻止因子)を用いて、38.5°C、5% CO₂ の条件で培養した。ブタ LIF の作成は、ブタ LIF 遺伝子の cDNA (GenBank; AY585336.1) をクローニングし、それを 293FT 細胞へリポフェクションすることによって導入後、その培養上清を DMEM で 200 倍希釈したものを用いた。

2-3. 移植

クラウン系ミニブタへの C1 iPS 細胞の移植は、自治医科大学 先端医療技術開発センターと、株式会社 ジャパンファーム クラウン研究所でおこなった。C1 iPS 細胞をトリプシン処理によって剥離後、培養皿上で 15 分静置し、フィーダー細胞を除去した。回収した C1 iPS 細胞を遠心し、 3×10^7 個の細胞を 500 µL のリン酸緩衝液 (Phosphate buffered saline; PBS, Sigma) で懸濁した。全ての移植は、レシピエントブタに 5%イソフルランの吸引麻酔後に、23-gauge (テルモ) の針を用いておこなった。ブタ精巣への移植は超音波検査下でおこなった(図 2-2A)。また、ブタ卵巣への移植は、開腹手術をしておこなった (図 2-2B)。移植後 47 ~125 日に、深麻酔下でレシピエントブタに塩化カリウム溶液を静脈注射することによって安楽殺し、サンプルの回収をおこなった。

C1 iPS 細胞の奇形腫形成能を確認するために、NOD/SCID マウスと NOG マウスを用いた。 1×10^6 個の C1 iPS 細胞を、マウス下肢大腿部の筋肉内に注入した。移植から 5~16 週後にマウスを安楽殺し、サンプルの回収をおこなった。

2-4. 免疫組織化学染色

組織サンプルを 4% パラホルムアルデヒド (Wako) を用いて 4°C で一晩固定した後に、パラフィンで包埋した。切片を 2% ウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich, MO, USA) ・PBS でブロッキングした後に、抗ブタ CD3 抗体 (Abcam, MA, USA; 1:50)、抗ヒト CD79 抗体 (Dako, CA, USA; 1:50) を用いて染色した。染色した切片を HE 染色した後に、顕微鏡で観察をおこなった。

2-5. 細胞染色

細胞を 4% パラホルムアルデヒド・PBS を用いて、室温で 15 分間固定した。その後、PBS で 3 回洗い、2% ウシ血清アルブミン (Sigma) ・PBS で室温 30 分間静置し、非特異的反応を抑えた。また、Oct3/4 や Nanog などの核内因子の染色は、0.2% Triton X-100・PBS (Sigma-Aldrich) を用いて膜透過処理をおこなった。一次抗体をそれぞれ最適な濃度で希釈し、4°C で一晩反応させた後に、PBS で 3 回洗い、蛍光標識した二次抗体を室温で 1 時間反応させた。使用した一次抗体は、以下の通りである。Oct3/4 (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA; 1:200)、SLA class I (Vmr, WA, USA; 1:100)、CD47 (Thermo Fisher Scientific, CA, USA; 1:50)、Nanog (R&D Systems, MN, USA; 1:50)、Sox2 (Millipore, 1:100)、GFAP (BD Biosciences, CA, USA; 1:500)、Nestin (Cell Signaling, MA, USA; 1:500)、Tuj-1 (Covance, VA, USA; 1:500)、Desmin (Thermo, 1:100)、 α -SMA (Dako, 1:1)、Vimentin (Santa Cruz, 1:100)、FOXA2 (Millipore, 1:100)、Cytokeratin 18 (BioLegend, CA, USA; 1:300)、AFP (Dako, 1:1)、Albumin (Dako, 1:500)。二次抗体は、FITC、または Alexa Fluor 555 で蛍光標識した抗マウス、ウサギ IgG を用いた。

細胞表面に発現しているシアル酸のレクチン染色は、biotinylated *Maackia amurensis* lectin II (MAL, Vector Laboratories, USA; 1:25)、または FITC-conjugated *Sambucus nigra*

lectin (SNA, Vector Laboratories, USA; 1:40) を用いて 4°C で一晩反応させた。ビオチン標識した MAL は、FITC-ultravidin (Leinco Technologies, MO, USA; 1:200) を室温で 1 時間反応させて染色した。

2-6. リンパ球混合培養試験

ブタ末梢血からの単核球の分離は、Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて密度勾配遠心分離によっておこなった。単核球の培養は、RPMI 1640 (Invitrogen) に 10% FBS を添加した培地を用いた。各レシピエントブタのリンパ球を 2×10^5 /ml に懸濁し、96 穴の U 底プレート (Becton Dickinson, USA) の各ウェルに 100 μ L ずつ加えた。リンパ球と反応させる細胞をマイトマイシン C 処理した後に 1×10^5 /ml に懸濁し、各ウェルに 100 μ L ずつ加え、38.5°C 下で 5 日間培養した。プレートの各ウェルに 1 μ Ci の 3 H チミジン (GE Healthcare) を加えて 24 時間後に、細胞の 3 H チミジンの取り込みをシンチレーションカウンター (Aloka, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

2-7. 液性免疫反応

血清中の抗ブタ iPS 細胞抗体の検出は、BD FACS Calibur フローサイトメーター (BD Pharmingen, USA) を用いておこなった。C1 iPS 細胞移植後のレシピエントブタから採血し、末梢血から血清を遠心分離した。血清を PBS で 10 倍希釈し、C1 iPS 細胞と常温で 30 分間反応させた。細胞を回収して遠心し、PBS で洗浄後に、FITC 標識された抗ブタ IgG 抗体 (AbD serotec, Oxford, UK) を iPS 細胞と反応させた。フローサイトメーターを用いて FITC 陽性の細胞を検出した。データ解析は、CellQuest software (BD pharmingen) を用いておこなった。

2-8. NK 細胞による細胞傷害活性の測定

NK 細胞による細胞傷害は、細胞内の乳酸脱水素酵素(lactate dehydrogenase; LDH)の放出を測定することによって評価した。C1 ブタと C2 ブタの末梢血から Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて単核球を分離した後に、BD Pharm Lysis Buffer (BD Bioscience) を用いて溶血処理をした。単核球に PE 標識抗ブタ CD16 抗体 (AbD Serotec) を反応させた後に、抗 PE マイクロビーズ (Miltenyi Biotech) と反応させた。標識細胞を MACS 細胞分離装置 (Miltenyi Biotech) によって分離した後に、FITC 標識抗ブタ CD3 抗体 (BD Bioscience) と反応させた。この単核球を、セルソーター (SH800, SONY) を用いて CD3-/CD16+細胞集団 (ブタ NK 細胞) のソーティングをおこなった。回収したブタ NK 細胞を C1 iPS 細胞と細胞数 30:1 の比率で共培養した。この共培養は、DMEM (1% FBS、1 ng/ml ブタ IL-2) 中で 6 時間、38.5°C でおこなった。培養上清を回収し、上清に含まれる乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase; LDH) の活性を、Cytotoxicity detection kit (Takara Bio Inc) を用いて測定した。細胞傷害活性は以下の式で計算した。細胞傷害活性 (%) = (実験値 - 低コントロール1 - 低コントロール2) x 100 / (高コントロール - 低コントロール1)。低コントロール1は、iPS 細胞の培養上清である。低コントロール2は、NK 細胞の培養上清である。高コントロールは、iPS 細胞を 2% Triton X-100・PBS 含有培地で培養した上清である。

2-9. 補体による細胞傷害活性の測定

血清中の補体による細胞傷害は、細胞内 LDH の放出を測定することによって評価した。DMEM (1% FBS) を用いて C1 ブタの血清を 30%、10%、3% に希釈した。血清中の補体の非働化は、56°C の熱湯中で 30 分間おこなった。C1 iPS 細胞をブタ血清で 30 分間 38.5°C で培養し、その上清を回収した。回収した上清中に含まれる LDH の活性を、

Cytotoxicity detection kit を用いて測定した。細胞傷害活性は以下の式で計算した。細胞傷害活性 (%) = (実験値 - 低コントロール) x 100 / (高コントロール - 低コントロール)。低コントロールは、iPS 細胞の培養上清である。高コントロールは、iPS 細胞を 2% Triton X-100・PBS 含有培地で培養した上清である。

2-10. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNA は ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて抽出した。逆転写反応は Thermo Scientific Verso cDNA Synthesis kit (Thermo) を用いておこなった。PCR は、TaKaRa Ex-Taq (Takara Bio Inc) を用いておこなった。PCR 産物は 2% アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイド染色によって可視化した。半定量リアルタイム PCR は ABI Step One (Applied Biosystems, CA, USA) と SYBR green PCR mix (Qiagen, USA) を用いておこなった。プライマーの配列、アニーリング温度、サイクル数は表 1 に示した。

2-11. 統計処理

数値データは平均値に標準偏差で示した。有意差検定には、Student's *t*-test を用いた。

表 1. プライマー配列

		配列	アニーリング 温度	サイクル数
SLA class I	F	CCTCTTCCTGCTGCTGTCG	64	28
	R	AGCGTGTCCCTTCCCCATCT		
ULBP1	F	GGCCTGCGATACTCACTCTC	63	30
	R	AGGAAGTCCCCAACGTCTTT		
MICA	F	GTCGTTGCACAGCACAACTCT	63	30
	R	TACGCCATGTCTCAGTGCTC		
GAPDH	F	ACCTGCCGCCTGGAGAAACC	63	30
	R	GACCATGAGGTCCACCACCCTG		
CD47	F	TCAGATCCTGGGGTTTCTTG	63	30
	R	GTAGGCAGTTCCCAACCAA		
β -actin	F	CATCACCATCGGCAACGA	62	30
	R	GTTGGCGTAGAGGTCCTTCCT		
hOCT3/4-S944	F	CCCCAGGGCCCCATTTTGGTACC	53	35
hSOX2-S691	F	GGCACCCCTGGCATGGCTCTTGGCTC	53	35
hKLF4-S1128	F	ACGATCGTGGCCCCGAAAAGGACC	53	35
hMYCS1011	F	CAACAACCGAAAATGCACCAGCCCCAG	53	35
pMXs-L3205	R	CCCTTTTTCTGGAGACTAAATAAA		

3. 結果

1. ナイーブ型ブタ iPS 細胞の樹立

これまでに我々は、C1系統のクラウン系ミニブタの胎仔線維芽細胞に、ヒトの山中4因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC) をレトロウイルスベクターで遺伝子導入することで、ブタ iPS 細胞 (以下、C1 iPS 細胞) の樹立に成功している(27)。通常、ヒト iPS 細胞はプライム型の細胞株であるが、培養条件を改良することでナイーブ型に近いヒト ES/iPS 細胞を樹立できることが Jaenisch らのグループから報告されている(28)。この Jaenisch らの報告にある培養条件を参考に、低分子化合物の Forskolin と、サイトカインのブタ LIF を培地に添加して樹立を試みた。細胞の形態は、マウス ES/iPS 細胞のようなラウンド型のコロニーを示した(図1-1)。樹立した iPS 細胞の性状解析を行ったところ、未分化性、三胚葉分化性をともに確認することができた(図1-1, 図1-2, 図1-3)。一方で、通常の iPS 細胞ではサイレンシングされている外来遺伝子が持続的に発現していることが分かった(図1-4)。この外来遺伝子の持続発現がナイーブ型の性質をもたらす一つの理由であると考えられる。

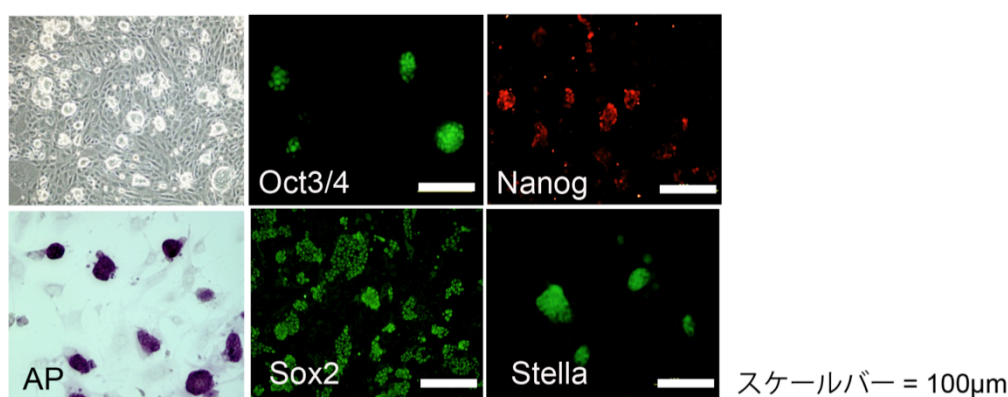


図 1-1. ブタ iPS 細胞の性状解析

C1 iPS 細胞の形態とその免疫細胞染色図。Oct3/4、Sox2、Nanog、Stella などの ES/iPS 細胞に特徴的な未分化マーカー遺伝子の発現や、アルカリフォスファターゼの活性がみられた。

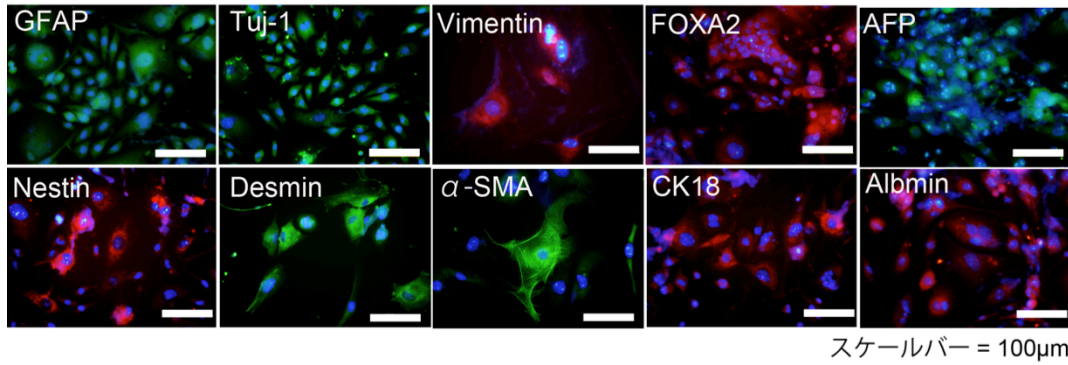


図 1-2. ブタ iPS 細胞の *in vitro* における三胚葉分化能

C1 iPS 細胞を *in vitro* で分化させた細胞の免疫染色において各種、三胚葉性マーカーの発現がみられた。

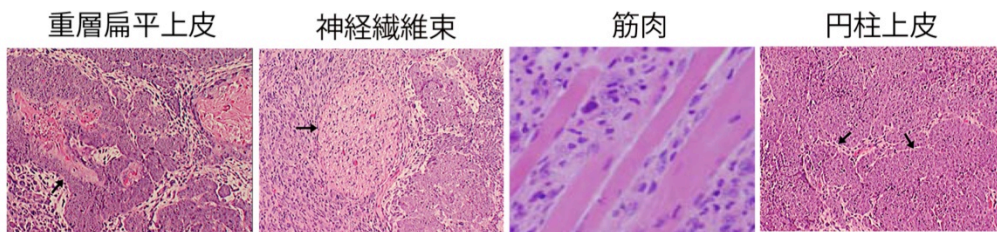


図 1-3. ブタ iPS 細胞の *in vivo* における三胚葉分化能

C1 iPS 細胞を免疫不全マウスへ移植後に形成される奇形腫の HE 染色。

重層扁平上皮(外胚葉)、神経繊維束(外胚葉)、筋肉(中胚葉)、円柱上皮(内胚葉)への分化がみられた。

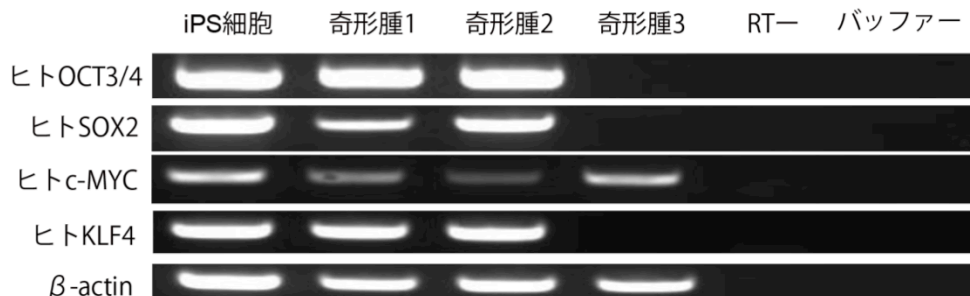


図1-4. ブタ iPS 細胞における外来遺伝子の持続発現

C1 iPS 細胞において、その樹立に用いた山中4因子の発現がみられた。外来遺伝子の発現は、奇形腫の形成後にもみられた。

2. iPS 細胞とレシピエントの SLA を適合させた移植における奇形腫形成

iPS 細胞の移植後に奇形腫形成のリスクが懸念されているが、未だにその検証はおこなわれていない。本研究では、はじめに、C1 iPS 細胞を免疫不全マウスへ移植することによって、奇形腫形成の観察をおこなった(図1-3, 表2)。次に、ドナーとレシピエントの SLA を適合させた移植として、C1 iPS 細胞 (3×10^7 個/部位)を、同じ C1系統のクラウン系ミニブタへ移植した (C1→C1)。iPS 細胞を移植する際に、異種由来の細胞であるフィーダー細胞を極力除いた後に、移植を行った(図2-1)。

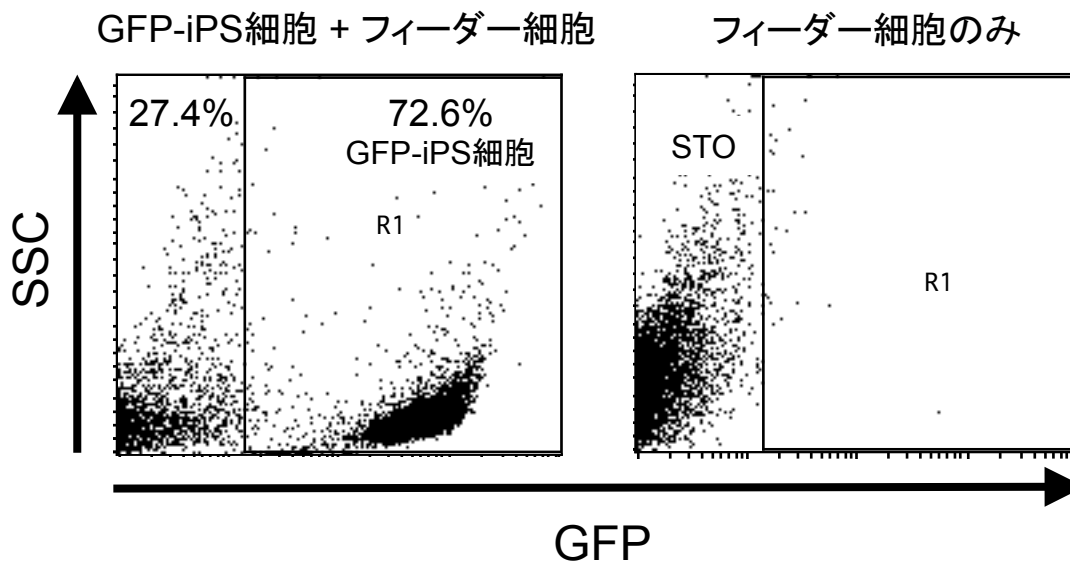


図 2-1. ドナーiPS 細胞中におけるフィーダー細胞の混入

フローサイトメトリーによって、ドナーiPS 細胞中のフィーダー細胞 (STO) の細胞比率を解析した。フィーダー細胞と区別するため、iPS 細胞を EGFP 標識した。C1 iPS 細胞をトリプシン処理によって回収後、ゼラチンコートしたディッシュ上で静置することでフィーダー細胞を除去した後に、細胞を回収した。回収した細胞の 27.4% がフィーダー細胞だった。

iPS 細胞の移植部位として、奇形腫の形成されやすい精巣 ($n = 4$)、または卵巢 ($n = 1$) を選んだ(図2-2A, B)。また、SLA 不適合の移植として、C1 iPS 細胞を C2ブタの卵巢 ($n = 1$)

への移植をおこなった (C1→C2)。レシピエントに用いたブタは、近交系の中でも特に遺伝的に近いブタを用いた(図2-2C)。移植後47～112日において、奇形腫の形成はみられなかった(表2)。このことから、iPS 細胞は移植後に免疫拒絶されたことが示唆された。

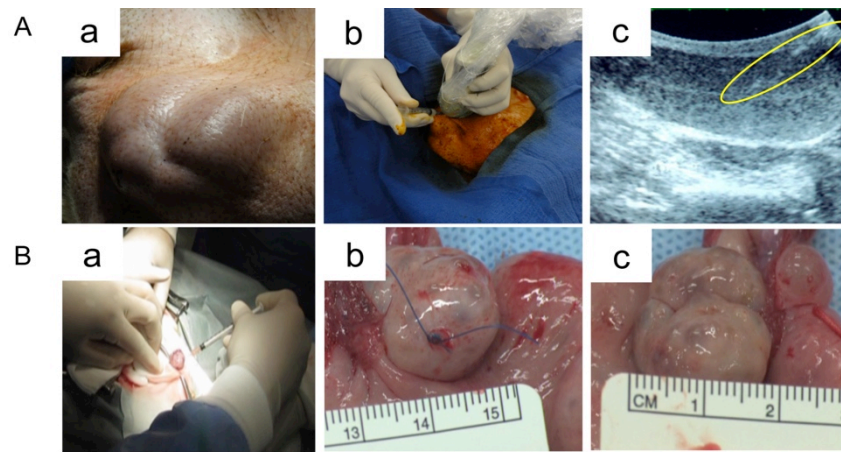
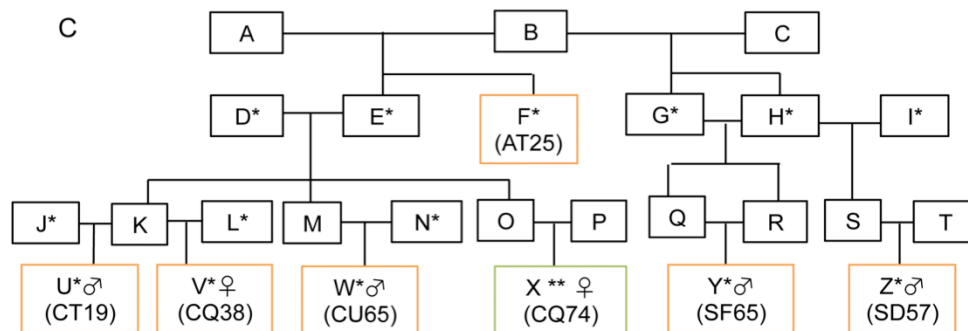


図 2-2. C1 iPS 細胞のブタ精巣と卵巣への移植

(A) ブタ精巣 (a)。精巣への移植を超音波操作下でおこなった (b)。精巣のエコー図。シリンジの針を黄色い円で示した (c)。

(B) 卵巣への移植を開腹後におこなった (a)。移植側の卵巣を紐で結ぶことでマークした (b, c)。



(C) C1 系統のクラウン系ミニブタの家系図。ドナー (AT25) とレシピエント (CT19、CQ38、CU65、CQ74、SF65、SD57) とは同じ近交系の中でも血縁的に近い関係にある。C1 系統は* (オレンジ)、C2 系統は** (緑) で示した。

	C1 ブタ (SLA 適合) (T+/B+/NK+)	NOD/SCID マウス (T-/B-/NK+)	NOG マウス (補体処理後の iPS 細胞を移植)	NOG マウス (T-/B-/NK-)
奇形腫形成 (形成個体/移植個体)	0/5	8/14	0/6	11/14
頻度 (%)	0	57.1	0	78.6

表 2. C1 iPS 細胞の奇形腫形成

3. SLA を適合させたブタ iPS 細胞に対する獲得免疫反応

SLA を適合させた iPS 細胞の移植後に奇形腫形成が見られなかったことから、免疫反応が起きたと考えられる。移植後にどのような免疫反応がおこったのかを検証するため、はじめに、細胞性免疫反応の検証を *in vitro* でおこなった。リンパ球混合培養試験において、C1 iPS 細胞に対する C1ブタリンパ球の反応がみられた(図3-1A)。この SLA 適合 C1ブタリンパ球からの C1 iPS 細胞に対する免疫反応は、SLA 不適合 C2ブタの細胞に対するものよりも有意に低く、自己の細胞に対する反応よりも有意に高かった(* $p < 0.01$)。これは、ドナー細胞とレシピエントブタの SLA 適合によって、T 細胞の反応が減弱化したためと考えられる。また、iPS 細胞の移植部位において CD3陽性細胞や CD79陽性細胞の浸潤がみられた(図3-1B)。以上の結果から、SLA 適合移植の系において、細胞性免疫反応が起きたと考えられる。

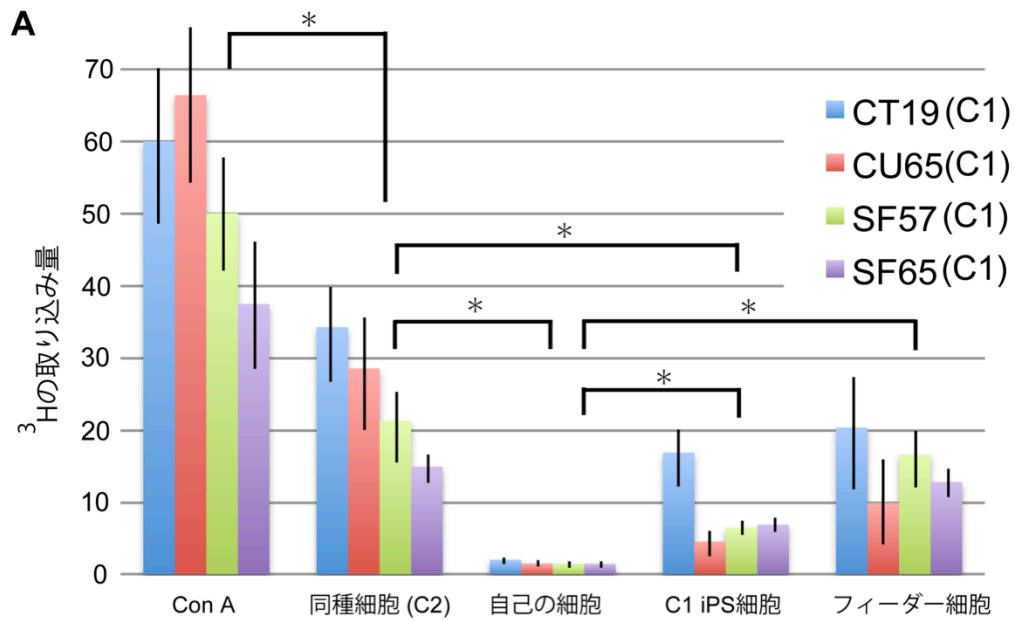
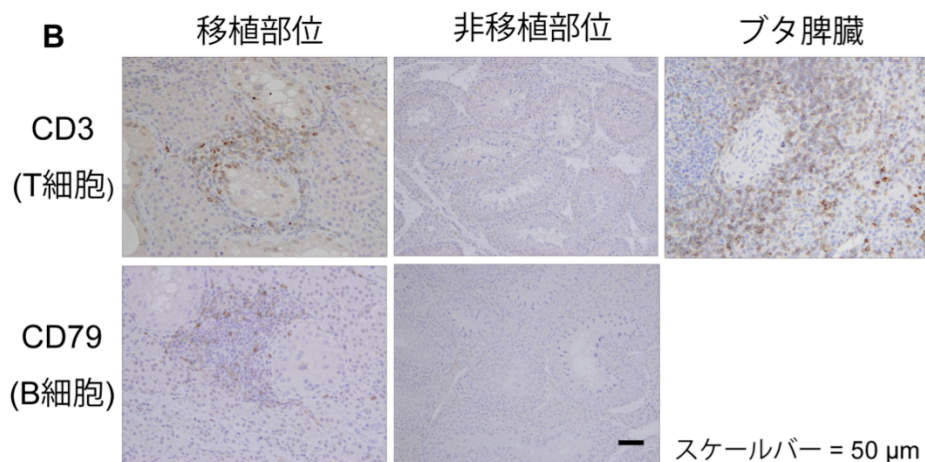


図3-1. SLA を適合させた iPS 細胞の移植における獲得免疫反応

(A) リンパ球混合培養。ポジティブコントロールとして、コンカナバリン A (Con A)によるリンパ球の幼若化と、同種ブタに相当する C2ブタ細胞 (SLA 不適合細胞)と反応させた。ネガティブコントロールとして、自己の単核球を用いた。SLA を適合させた iPS 細胞に対するリンパ球の反応は、同種細胞に対するものよりも有意に低く(* $p < 0.01$)、自己の細胞に対するものよりも有意に高かった(* $p < 0.01$)



(B) 移植部位における免疫組織化学染色。iPS 細胞の移植部位において、CD3陽性細胞と、CD79陽性細胞の浸潤がみられた。CD3のポジティブコントロールとして脾臓を用いた。

続いて、液性免疫反応について検証をおこなった。レシピエントブタ血清中の抗 iPS 細胞抗体価を調べたところ、レシピエントブタの血清中で抗 iPS 細胞抗体が検出された。このことから、iPS 細胞の移植によって、液性免疫反応が起こっていることが分かった(図3-2)。

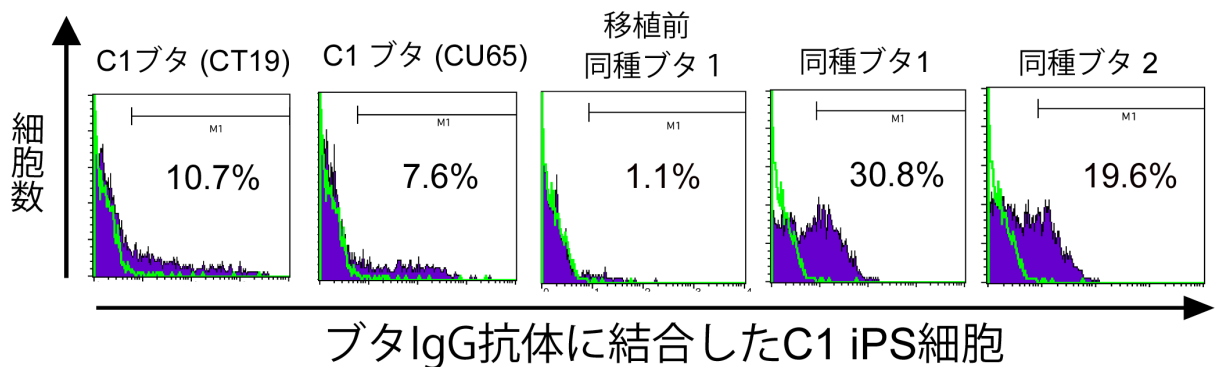


図3-2. SLA を適合させた iPS 細胞の移植における獲得免疫反応

レシピエントブタ血清中の抗 C1 iPS 細胞抗体の検出。ポジティブコントロールとして、SLA 不適合(同種)ブタへ iPS 細胞の移植をおこなった。iPS 細胞を二次抗体でのみ標識した値を緑で示した。C1 iPS 細胞の移植後、SLA 適合ブタの血清中に、抗 C1 iPS 細胞抗体がみられた。

4. NK 細胞による iPS 細胞への傷害

次に、自然免疫からの影響について検証した。はじめに、NK 細胞からの傷害について調べた。これまでに、C1 iPS 細胞は SLA class I をほとんど発現していないことが分かっている(27; 図4A、B)。そのため、生体内において NK 細胞の標的となり得る(29)。さらに、ES 細胞や iPS 細胞、生殖幹細胞は NK 細胞に感受性が高いことが報告されており、これらの細胞は NK 細胞を活性化するリガンドを発現している(30, 31)。C1 iPS 細胞について NK 細胞を活性化するリガンドの発現を調べたところ、MICA (MHC class I-related chain A)

や ULBP1(UL16-binding protein 1)などのリガンドの発現がみられた(図4 B)。これらの結果から、C1 iPS 細胞は NK 細胞へ感受性があることが示唆された。

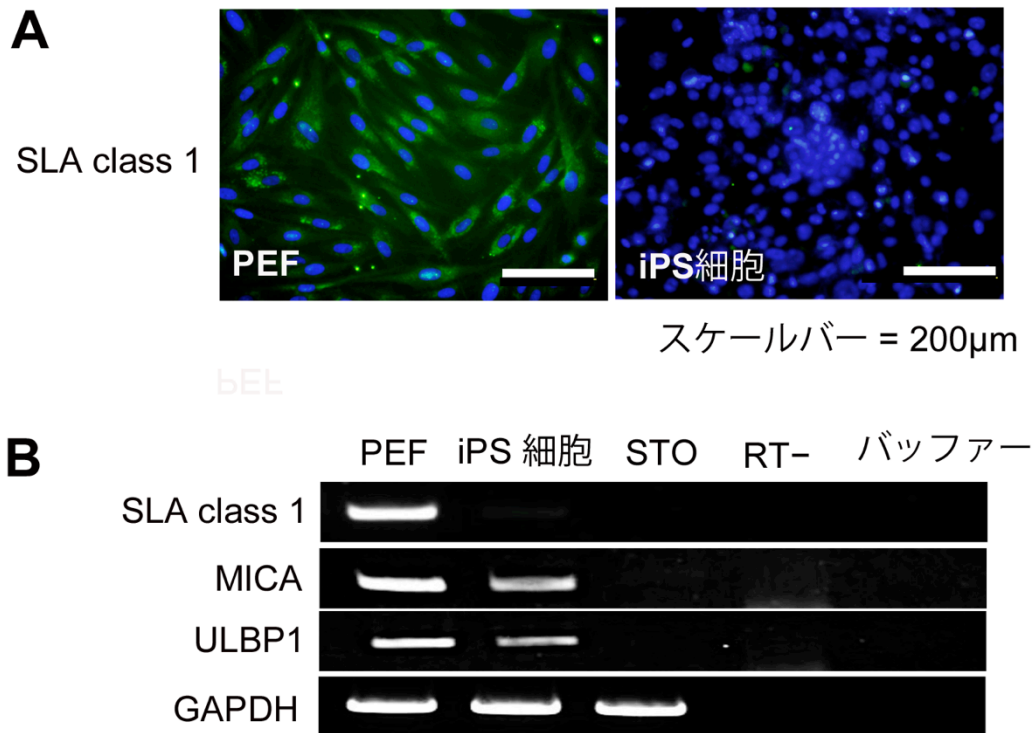


図 4. C1 iPS 細胞の NK 細胞への感受性

(A) SLA class I の免疫染色。ポジティブコントロールとしてブタ胎仔繊維芽細胞 (PEF) を用いた。C1 iPS 細胞は SLA class I が陰性だった。

(B) RT-PCR による *SLA class I* やリガンドの発現。左から PEF、C1 iPS 細胞、STO フィーダー細胞、逆転写酵素なし、バッファーのみ。C1 iPS 細胞において *SLA class I* の発現はみられなかった。また、*MICA*、*ULBP1* などの NK 細胞特異的なリガンドの発現がみられた。内在性コントロールとして *GAPDH* を用いた。

次に、iPS 細胞が実際に NK 細胞へ感受性を示すか検証をおこなった。C1 iPS 細胞をブタの NK 細胞と *in vitro* で共培養し、細胞傷害性を評価した。NK 細胞からの傷害を、iPS 細胞内の乳酸脱水素酵素 (Lactate Dehydrogenase; LDH) の放出量を検出することでおこなった。C1 iPS 細胞をブタ NK 細胞と共培養することで、多量の LDH の放出がみられたことから、iPS 細胞は NK 細胞から傷害されることが分かった (図4C)。その傷害の程度は、C1と C2の NK 細胞で同程度であったことから、NK 細胞からの傷害は SLA の適合に依らないことが確認できた。

続いて、NK 細胞による iPS 細胞への傷害を *in vivo* での検証を、免疫不全マウスを用いた移植によっておこなった。NK 細胞による奇形腫形成の阻害を検証するために、NK 細胞をもつ NOD/SCID マウス (T-B-NK+) と、NK 細胞欠損した NOG マウス (T-B-NK-) へ C1 iPS 細胞を移植した (1×10^6 個/部位)。NK 細胞欠損した NOG マウスから得られた奇形腫は、平均して $4052.1 \pm 701.7 \text{ mm}^3$ の大きさで (図4D)、奇形腫の形成率は 71.4% (11/14) であった (表2)。一方で、NK 細胞をもつ NOD/SCID マウスから得られた奇形腫は、 $1817.3 \pm 988.9 \text{ mm}^3$ の大きさで (図4D)、奇形腫の形成率は 57.1% (8/14) であった (表2)。また、これら奇形腫の大きさには優位差があることがわかった (* $p < 0.01$)。以上の結果から、C1 iPS 細胞は移植後に生体内において NK 細胞から傷害を受けたと考えられ、その傷害によって奇形腫形成が阻害されることが示唆された。

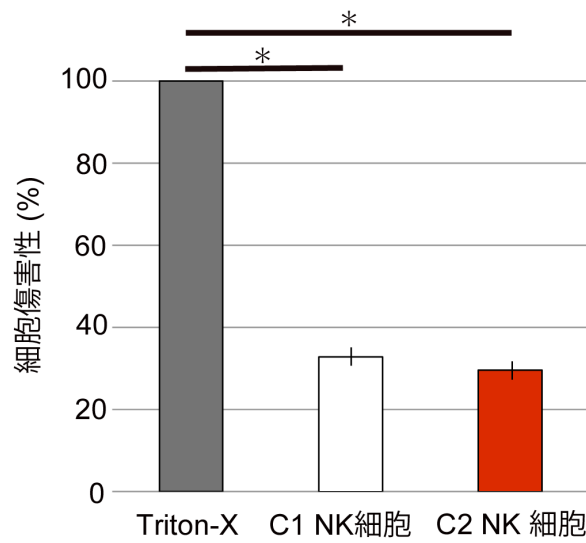
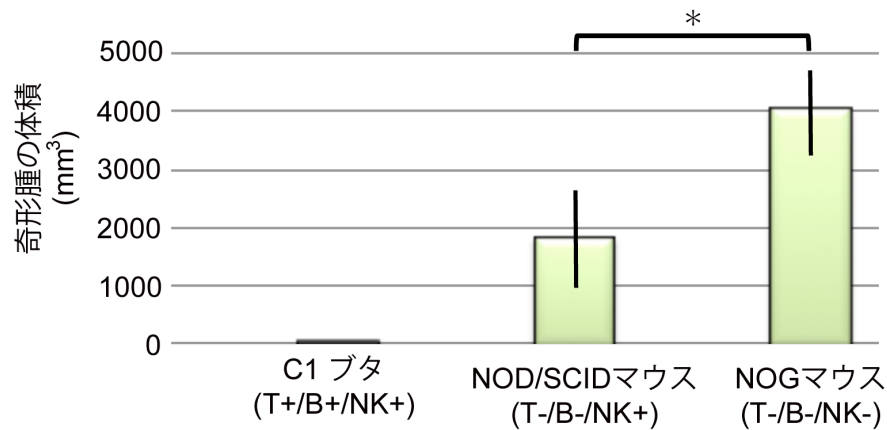
C**D**

図 4. C1 iPS 細胞の NK 細胞への感受性

(C) 乳酸脱水素酵素 (LDH) の放出による細胞傷害の定量

ポジティブコントロールとして、界面活性剤である2% Triton-X・PBS を用いた。C1ブタ NK 細胞と C2ブタ NK 細胞のそれぞれと iPS 細胞を共培養したところ、同程度の LDH の放出がみられた ($p < 0.01$)。

(D) 免疫能の異なるレシピエント体内において形成された奇形腫の大きさ

C1ブタ ($n = 5$)、NOD/SCID マウス ($n = 14$)、NOG マウス ($n = 14$)へ iPS 細胞の移植後、形成された奇形腫の体積を計算した ($p < 0.01$)。SLA を適合させた C1ブタへの移植では、その全例において奇形腫の形成はみられなかった。

5. 補体によるブタ iPS 細胞の傷害

次に、自然免疫の一種である補体から受ける影響について調べた。まず始めに、C1 iPS 細胞の補体への感受性について検証した。マウスでは、ES 細胞や間葉系幹細胞などの幹細胞は、血清中の補体に対して感受性が高いことが報告されている(32, 33)。補体の活性は、細胞表面に発現するシアル酸によって制御される(34)。そこで、C1 iPS 細胞のシアル酸の発現について調べたところ、PEF においてみられた発現が C1 iPS 細胞ではほとんど見られなかった(図5-1)。このことから、C1 iPS 細胞は補体に対して感受性が高いことが示唆された。

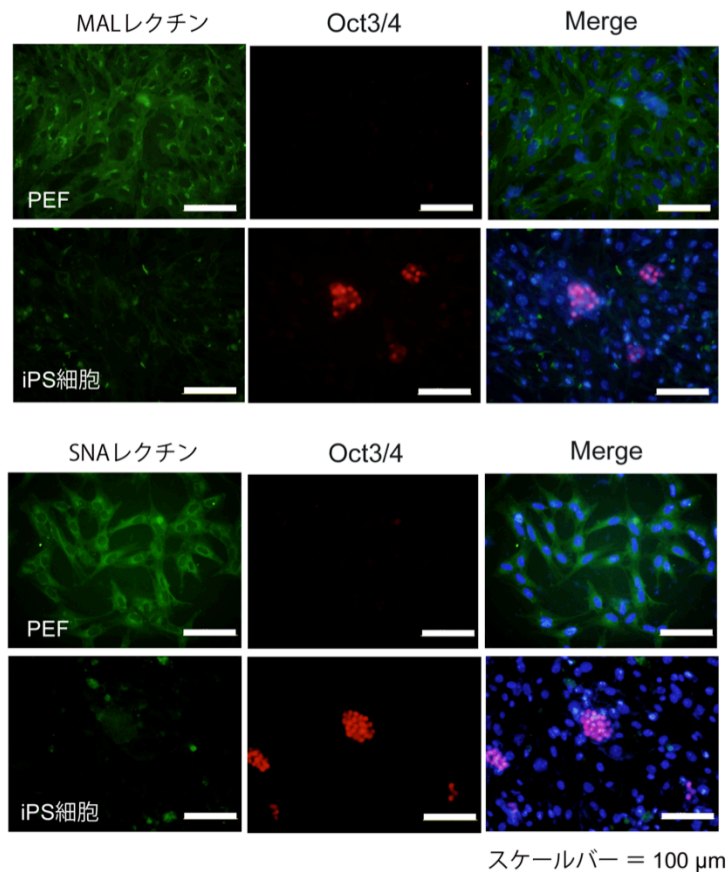


図5-1. 血清中の補体による C1 iPS 細胞の傷害

レクチン(SNA や MAL)によるシアル酸の検出。C1 iPS 細胞は、PEF に比べてほとんどシアル酸の発現がみられなかった。C1 iPS 細胞は Oct3/4が発現するが、PEF では発現しない。

続いて、C1 iPS 細胞の補体感受性を *in vitro* において検証した。補体からの傷害は、先述の NK 細胞からの傷害を検証した方法と同様に、iPS 細胞内 LDH の放出量を検出することでおこなった。C1 iPS 細胞を C1ブタの血清と反応させたところ、ブタ血清の希釈濃度に比例して LDH が検出された(図5-2)。一方で、非働化(熱湯で補体を不活性化)した C1ブタの血清と反応させた場合には、ほとんど LDH が検出されなかった(図5-2)。このことから、iPS 細胞は補体に感受性があり、その傷害を受けることが示された。

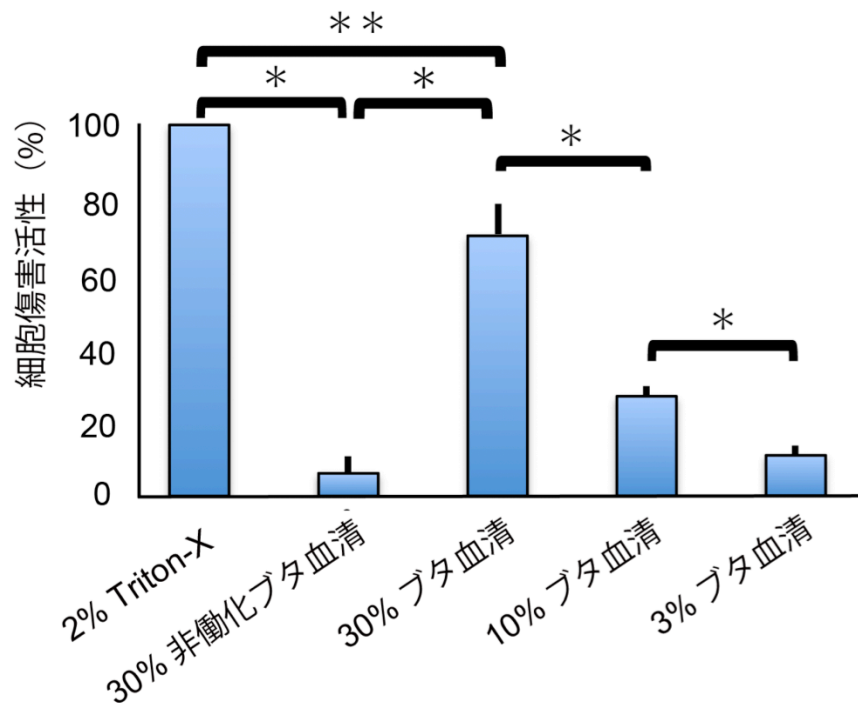


図5-2. 血清中の補体による C1 iPS 細胞の傷害

LDH の放出による細胞傷害の定量。ポジティブコントロールとして界面活性剤である2% Triton-X・PBS を用いた。C1ブタ血清の濃度に比例して、C1 iPS 細胞から LDH の放出がみられた。非働化した C1ブタ血清(30%)と反応させた iPS 細胞からは、LDH の放出がほとんどみられなかった(* $p < 0.01$ 、** $p < 0.05$)。

さらに、補体によって iPS 細胞の奇形腫形成が阻害されるか検証した。免疫不全マウスの一種である NOG マウスへ、C1 iPS 細胞の移植をおこなった。NOG マウスは、T 細胞、B 細胞、および NK 細胞に加えて、補体活性も極めて低いことが分かっている。C1 iPS 細胞 (1×10^6 個/部位) を NOG マウスへ移植することで奇形腫の形成が 71.4% (11/14) でみられた (表 2)。一方で、ブタ血清で 6 時間培養した後に移植したところ、NOG マウス体内において奇形腫の形成は見られなかった (表 2)。以上の結果から、ブタ iPS 細胞の奇形腫形成は、補体からの傷害によって阻害されることが分かった。

6. CD47リガンドの発現によるマクロファージの貪食を回避

最後に、C1 iPS 細胞がマクロファージから貪食されるかを検証した。マクロファージは受容体 SIRP- α によって、標的となる細胞の CD47 (“don’t-eat-me” signal) リガンドを認識し、自己と非自己とを区別している (35, 36)。C1 iPS 細胞の CD47 リガンドの発現について調べたところ、PEF と同程度に発現していることがわかった (図 6A, B)。このことから、C1 iPS 細胞は自然免疫の中でもマクロファージからの貪食は免れている可能性が示された。

続いて、CD47 リガンドによって、iPS 細胞はマクロファージからの貪食を回避しているか検証をおこなった。iPS 細胞をマクロファージと共培養したところ、30% 程度の iPS 細胞がマクロファージから貪食されていた (図 6C)。一方で、iPS 細胞表面の CD47 リガンドを抗 CD47 抗体によってブロッキングしたところ、60% 以上の iPS 細胞がマクロファージから貪食された (図 6C)。このことから、iPS 細胞の一部では CD47 リガンドによってマクロファージからの貪食を回避していることが分かった。

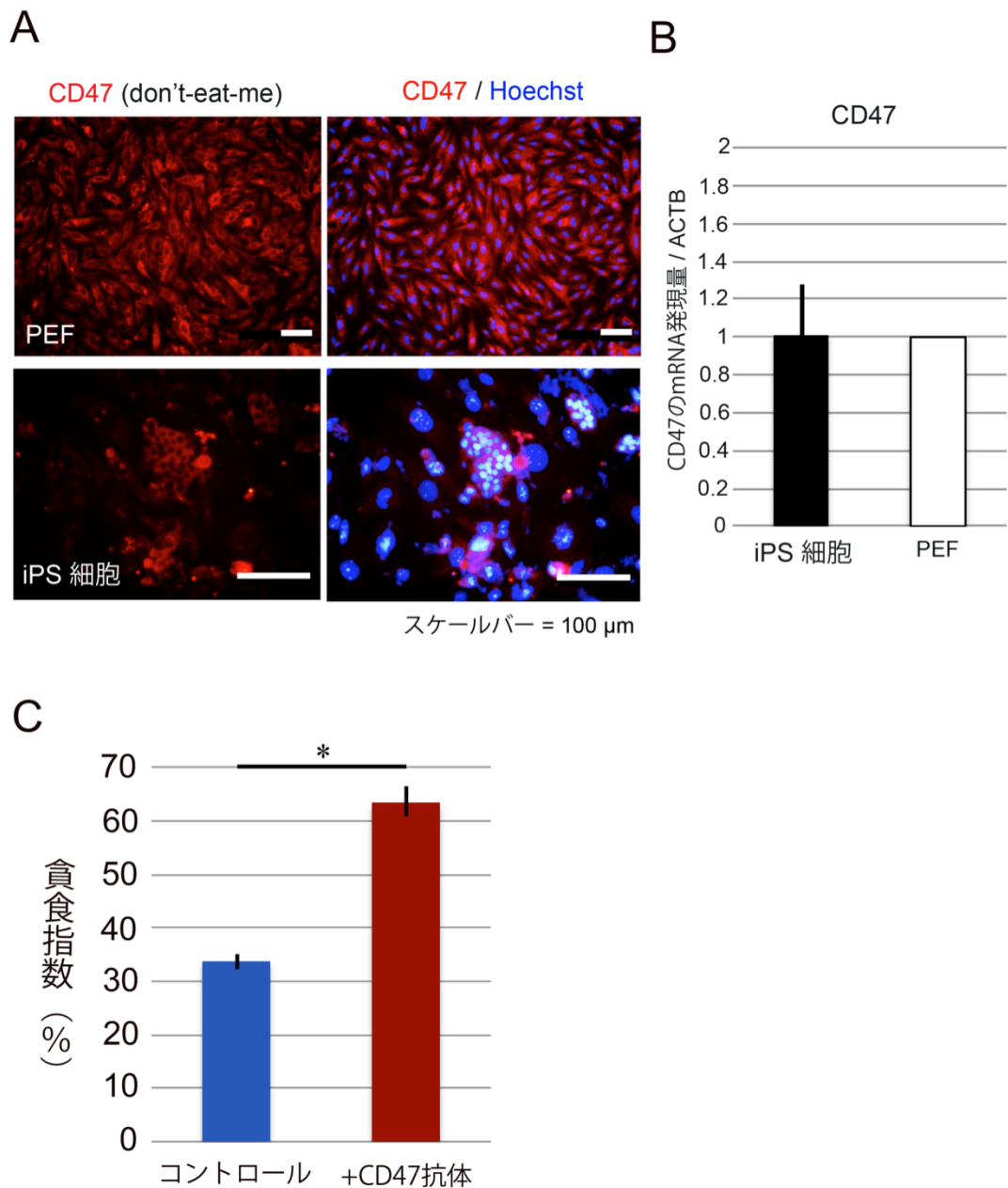


図6. ブタ iPS 細胞の CD47リガンドによるマクロファージからの貪食を回避

(A, B) CD47 (“don’t-eat-me” signal) の発現を、免疫染色と定量 PCR によって評価した。C1 iPS 細胞における CD47 の発現は、PEF と同程度にみられた。

(C) C1 iPS 細胞を C1 ブタのマクロファージと共培養し、その貪食を評価した。CD47 ブロックング抗体によって、C1 iPS 細胞表面に発現する CD47 リガンドをブロックングしたところ、マクロファージに貪食される iPS 細胞が非処置群に比べて倍近くに増加した。

4. 考察

本研究において、我々は SLA を適合させたブタ iPS 細胞の移植後における免疫反応について検証をおこなった。ブタ iPS 細胞の移植後に起こる獲得免疫反応は、SLA を適合させることによって、SLA の適合しない同種細胞に対する反応よりも減弱化された。その一方で、ブタ iPS 細胞は自然免疫によって傷害されるため、結果として奇形腫を形成できないことが分かった。

細胞性免疫反応については、リンパ球混合培養の結果から、C1 iPS 細胞に対する C1ブタリンパ球の反応は、同種細胞に対する反応に比べて減弱されていた。その一方で、SLA を適合させていても、自己の細胞に対する反応より強かった(図 3-1A)。その理由として、主に三つの可能性が考えられる。まず一つ目に、SLA やマイナー抗原のミスマッチによる拒絶である。ブタの近交系は、マウスの近交系ほど遺伝的に均一ではないため、ドナー iPS 細胞とレシピエントブタ間には遺伝的な相違がある。そのわずかな違いによって iPS 細胞が免疫拒絶された可能性がある。

二つ目に、iPS 細胞の樹立に用いた異種由来の外来遺伝子の発現による免疫拒絶が考えられる。通常、iPS 細胞は初期化が完了した時点でサイレンシングが起こり、外来遺伝子の発現は見られない(37)。しかし、C1 iPS 細胞ではその樹立に用いた山中4因子が株化した後も持続的に発現している(27; 図 1-4)。ブタにとってヒトの外来遺伝子は異種に相当するため、ブタ体内において免疫原性をもつと予想される。特に、山中4因子の一つ Oct3/4 は、免疫系が成立する前の胎性期にのみ発現するため、Oct3/4 反応性 T 細胞は胸腺において除かれていない。実際に、成体内における Oct3/4 陽性細胞は、Oct3/4 特異的な T 細胞によって傷害されることが報告されている(38)。Oct3/4 を含む異種由来の外来遺伝子の持続

発現によって、SLA を適合させた個体内において免疫反応が引き起こされた可能性が考えられる(図 1-4)。この点に関しては、現在、iPS 細胞の外来遺伝子による免疫反応を抑えるために、ドキシサイクリン誘導レンチウイルスベクターや、ゲノムへの挿入のない温度感受性センダイウイルスベクターを用いたブタ iPS 細胞の樹立をおこなっている。これらのシステムでは、それぞれドキシサイクリンの除去や 39°C 近い条件下での培養によって、外来遺伝子の発現を消去することが可能である(39-41)。さらに、異種成分であるウシ血清やフィーダー細胞を必要としない培養条件下で iPS 細胞を樹立・培養することで、移植後の免疫拒絶を軽減することを目指している(42, 43)。

三つ目に考えられることとして、異種細胞の混入による免疫拒絶である。C1 iPS 細胞のフィーダー細胞として用いた STO 細胞はマウス由来の細胞株であるため、ブタ体内において免疫反応を惹起することが予想される(44, 45)。実際に、リンパ球混合培養の結果からも、C1 ブタリンパ球から STO 細胞への反応がみられた(図 3-1A)。iPS 細胞を移植する際に、フィーダー細胞を完全に除去することは出来ないため(図 2-1)、移植した細胞中に混入した STO 細胞が免疫反応を起こした可能性がある。

これら三つの可能性に加えて、近年報告されたミトコンドリア DNA の違いによる免疫反応も、本移植系における免疫拒絶を引き起こした理由の一つと考えられるだろう(46)。以上のような理由から、SLA を適合させた移植においても獲得免疫反応が引き起こされたと考えられる。一方で、ドナーとレシピエントの性差による免疫拒絶の可能性は考えにくい。オスの Y 染色体上に存在する男性抗原(histocompatibility Y antigen; H-Y 抗原)は、副組織適合抗原である。メスは Y 染色体を持たないため、H-Y 抗原特異的な T 細胞が胸腺で除去されていない。そのため、H-Y 抗原を持つオスの細胞をメス個体に移植すると、免疫反応が起こる。しかしながら、C1 iPS 細胞はメス由来($2n = 38XX$)であり、Y 染色体を持たない。したが

って、C1 iPS 細胞の移植における免疫反応は、ドナーとレシピエント間の性差によるものではないと考えられる。

今回の移植系において、iPS 細胞は自然免疫による影響を強く受けることが分かった。これまでの報告において、マウスやサルの ES 細胞は NK 細胞や補体に対して高い感受性を示すことが知られており、それによって、生体内における奇形腫の形成が阻害されることが報告されている(30, 32, 47)。本研究における SLA を適合させた個体へのブタ iPS 細胞の移植においても、奇形腫の形成がみられなかった。これは、NK 細胞や補体などの自然免疫系によって、生体内における奇形腫形成が阻害されたためと考えられる(表 2)。

iPS 細胞が補体からの傷害を受けた理由として、シアル酸の発現が陰性化していることがその主な原因として考えられた(32)。その一方で、異種由来のシアル酸が発現することによって、補体から傷害を受けた可能性も考えられる。これまでに、ウシ血清やマウスフィーダー細胞などを用いた培養条件下において、ヒト ES 細胞はその細胞表面に異種由来のシアル酸である N-グリコシルノイラミン酸(Neu5Gc)が発現することが報告されている(48, 49)。この異種由来シアル酸が発現することによって、補体から傷害を受けるようになるため(50)、C1 iPS 細胞についても同様のことが起きていると予想される。こうした異種由来の成分は、血清やフィーダーだけでなく、培養操作時のトリプシン、ゼラチン、マトリゲルなどにも含まれている。そのため、iPS 細胞を用いた移植実験をする上で、ドナー細胞の免疫原性を減弱化するために、xeno-free 培養が必要になるだろう。

自然免疫の中でも、マクロファージからの貪食を iPS 細胞は回避していることが分かった。C1 iPS 細胞は、SLA class I やシアル酸の発現がみられなかったが、意外にも、CD47 リガンドを発現していた(図 6A, B)。この C1 iPS 細胞にみられた表面抗原の発現様式は、生体内の他の細胞においてもみられる。赤血球は、MHC class I を発現していない代わりに、

CD47 リガンドを発現している。それによって、自己と非自己の違いをマクロファージに認識させ、その貪食から免れている(35)。同様に、造血幹細胞や一部のがん細胞においても、CD47 リガンドの発現によってマクロファージからの貪食を回避している(51, 52)。このことは、細胞表面の CD47 リガンドをブロッキングすることで、マクロファージに貪食される iPS 細胞が大きく増えたことから裏付けられる(図 6C)。

移植後に iPS 細胞が自然免疫によって拒絶されることが分かったが、それは未分化な幹細胞全てに言えることなのだろうか。マウスでは ES/iPS 細胞から分化誘導した造血幹細胞を移植すると、同細胞に対する免疫寛容が誘導されることが報告されている(53)。造血幹細胞は、レシピエントに最小限の前処置をおこなうのみで生着することができるため(54, 55)、造血幹細胞の移植後に強い自然免疫反応は起こらないと予想される。一方で、iPS 細胞には MHC class I やシアル酸の発現がみられないことを考慮すると、自然免疫系が強く反応するのは、未分化な細胞の中でも、iPS 細胞に特有のことのように思われる。iPS 細胞の移植治療をおこなう上で、iPS 細胞から分化させた細胞のみ生着し、分化しなかった未分化な iPS 細胞が免疫拒絶されることは、奇形腫形成を防ぐ意味で大きな利点である。このことは、ヒト iPS 細胞を用いた細胞移植治療において懸念されている奇形腫形成のリスクは、ほとんど起こらない事象であることを示している。

ヒト iPS 細胞を臨床応用するに当たって、マウスなどの小型動物ではなく、ブタなどの大型動物を用いた評価系が今後さらに必要になると予想される。MHC 適合移植モデルの次の課題として、iPS 細胞から分化させた細胞や組織の移植を免疫抑制剤投与下でおこない、奇形腫形成のリスク評価をする必要がある。

5. 結語

本研究は、SLA の明らかな近交系ミニブタを用いて、SLA を適合させた iPS 細胞に対する免疫反応を検証した世界で最初の報告である。レシピエントと SLA を適合させたブタ iPS 細胞を用いた我々の結果を臨床に応用すると、HLA を適合させたヒト iPS 細胞を用いた移植後の免疫反応は減弱されることが予想される。また、ヒト iPS 細胞を HLA の適合したレシピエントに移植した際に、主に NK 細胞や補体などの自然免疫による拒絶を受けることによって、生体内における奇形腫形成は見られないことが分かった。

近交系ミニブタを用いた本移植系は、iPS 細胞から誘導した細胞や組織の機能や安全性の評価をする上で有効であり、将来の再生医療の実現化を加速させるものと考えられる。

6. 引用文献

1. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156; 1981.
2. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147; 1998.
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676; 2006.
4. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872; 2007.
5. Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M. Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science* 338, 971-975; 2012.
6. Yanagimachi MD1, Niwa A, Tanaka T, Honda-Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK. Robust and Highly-Efficient Differentiation of Functional Monocytic Cells from Human Pluripotent Stem Cells under Serum- and Feeder Cell-Free Conditions. *PLoS One* 4, e59243; 2013.

7. Yamaguchi T, Tashiro K, Tanaka S, Katayama S, Ishida W, Fukuda K, Fukushima A, Araki R, Abe M, Mizuguchi H, Kawabata K. Two-step differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 22, 726-734; 2013.
8. Hanna JI, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318, 1920-1923; 2007.
9. Alipio Z, Liao W, Roemer J, Waner M, Fink M, Ward DC, Ma Y. Reversal of hyperglycemia in diabetic mouse models using induced-pluripotent stem (iPS)-derived pancreatic beta-like cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 13426-13431; 2010.
10. Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 474, 212-215; 2011.
11. Araki R, Uda M, Hoki Y, Sunayama M, Nakamura M, Ando S, Sugiura M, Ideno H, Shimada A, Nifuji A, Abe M. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells *Nature* 494, 100-104; 2013.
12. Guha P, Morgan JW, Mostoslavsky G, Rodrigues NP, Boyd AS. Lack of Immune Response to Differentiated Cells Derived from Syngeneic Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 12, 407-412; 2013.
13. Emborg ME, Liu Y, Xi J, Zhang X, Yin Y, Lu J, Joers V, Swanson C, Holden JE, Zhang SC. Induced pluripotent stem cell-derived neural cells survive and mature in the nonhuman primate brain. *Cell Reports* 3, 646-650; 2013.

14. Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Okita T, Hotta A, Kawasaki T, Hayashi T, Onoe H, Shiina T, Yamanaka S, Takahashi J. Direct Comparison of Autologous and Allogeneic Transplantation of iPSC-Derived Neural Cells in the Brain of a Nonhuman Primate. *Stem Cell Reports* 1, 283-292; 2013.
15. Kaneko S, Yamanaka S. To Be Immunogenic, or Not to Be: That's the iPSC Question. *Cell Stem Cell* 12, 385-386; 2013.
16. Nakatsuji N, Nakajima F, Tokunaga K. HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nat Biotechnol* 7, 739-740; 2008.
17. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H, Yamanaka S. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature Methods* 5, 409-412; 2011.
18. Taylor CJ, Peacock S, Chaudhry AN, Bradley JA, Bolton EM. Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types. *Cell Stem Cell* 11, 147-152; 2012.
19. Zimmermann A, Preynat-Seauve O, Tiercy JM, Krause KH, Villard J. Haplotype-based banking of human pluripotent stem cells for transplantation: potential and limitations. *Stem Cells Dev* 13, 2364-2673; 2012.
20. Sachs DH, Leight G, Cone J, Schwarz S, Stuart L, Rosenberg S. Transplantation in miniature swine. 1. Fixation of the major histocompatibility complex. *Transplantation*

- 22, 559-567; 1976.
21. Sachs DH. The pig as a potential xenograft donor. *Pathol Biol* 42, 217-219; 1994.
 22. Bollen P, Ellegaard L. The Gottingen minipig in pharmacology and toxicology. *Pharmacol. Toxicol* 80, 3-4; 1997.
 23. Nakanishi Y, Ogawa K, Yanagita K. Body measurement and some characteristics of inbred Clawn miniature pigs. *Jpn J Swine Sci* 28, 211; 1991.
 24. Mezrich JD, Haller GW, Arn JS, Houser SL, Madsen JC. Histocompatible miniature swine: an inbred large-animal model. *Transplantation* 75, 904-907; 2003.
 25. Ando A, Kawata H, Shigenari A, Anzai T, Ota, M, Katsuyama Y, Sada M, Goto R, Takeshima SN, Aida Y, Iwanaga T, Fujimura N, Suzuki Y, Gojobori T, Inoko H. Genetic polymorphism of the swine major histocompatibility complex (SLA) class I genes, SLA-1, -2 and -3. *Immunogenetics* 55, 583; 2003.
 26. Ando A, Ota M, Sada M, Katsuyama Y, Goto R, Shigenari A, Kawata H, Anzai T, Iwanaga T, Miyoshi Y, Fujimura N, Inoko H. Rapid assignment of the swine major histocompatibility complex (SLA) class I and II genotypes in Clawn miniature swine using PCR-SSP and PCR-RFLP methods. *Xenotransplantation* 12, 121-126; 2005.
 27. Fujishiro SH, Nakano K, Mizukami Y, Azami T, Arai Y, Matsunari H, Ishino R, Nishimura T, Watanabe M, Abe T, Furukawa Y, Umeyama K, Yamanaka S, Ema M, Nagashima H, Hanazono Y. Generation of naive-like porcine-induced pluripotent stem cells capable of contributing to embryonic and fetal development. *Stem Cells Dev* 22,

473-482; 2013.

28. Hanna JI, Cheng AW, Saha K, Kim J, Lengner CJ, Soldner F, Cassady JP, Muffat J, Carey BW, Jaenisch R. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 9222-9227; 2010.
29. Raulet DH. Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. *Semin. Immunol* 18, 145-150; 2006.
30. Dressel R, Nolte J, Elsner L, Novota P, Guan K, Streckfuss-Bömeke K, Hasenfuss G, Jaenisch R, Engel W. Pluripotent stem cells are highly susceptible targets for syngeneic, allogeneic, and xenogeneic natural killer cells. *FASEB J* 24, 2164-2177; 2010.
31. Dressel R, Schindehütte J, Kuhlmann T, Elsner L, Novota P, Baier PC, Schillert A, Bickeböller H, Herrmann T, Trenkwalder C, Paulus W, Mansouri A. The tumorigenicity of mouse embryonic stem cells and in vitro differentiated neuronal cells is controlled by the recipients' immune response. *PLoS One* 3, e2622; 2008.
32. Koch CA, Jordan CE, Platt JL. Complement-dependent control of teratoma formation by embryonic stem cells. *Immunol* 177, 4803-4809; 2006.
33. Li Y, Lin F. Mesenchymal stem cells are injured by complement after their contact with serum. *Blood* 120, 3436-3443; 2012.
34. Kazatchkine MD, Fearon DT, Austen KF. Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta1 H for

- cell-bound C3b. *J Immunol.* 122, 75-81; 1979.
35. Oldenborg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288, 2051-2054; 2000.
 36. Ide K, Wang H, Tahara H, Liu J, Wang X, Asahara T, Sykes M, Yang YG, Ohdan H. Role for CD47-SIRP signaling in xenograft rejection by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 5062-5066; 2007.
 37. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317; 2007.
 38. Dhodapkar KM, Feldman D, Matthews P, Radfar S, Pickering R, Turkula S, Zebroski H, Dhodapkar MV. Natural immunity to pluripotency antigen OCT4 in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 8718-8723; 2010.
 39. Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, Kalma Y, Viukov S, Maza I, Zviran A, Rais Y, Shipony Z, Mukamel Z, Krupalnik V, Zerbib M, Geula S, Caspi I, Schneir D, Shwartz T, Gilad S, Amann-Zalcenstein D, Benjamin S, Amit I, Tanay A, Massarwa R, Novershtern N, Hanna JH. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* 504, 282-286; 2013.
 40. Takashima Y, Guo G, Loos R, Nichols J, Ficz G, Krueger F, Oxley D, Santos F, Clarke J, Mansfield W, Reik W, Bertone P, Smith A. Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell* 158, 1254–1269; 2014.
 41. Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S,

- Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya H, Fusaki N, Hasegawa M, Fukuda K. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* 7, 11-14; 2010.
42. Ross PJ, Suhr ST, Rodriguez RM, Chang EA, Wang K, Siripattarapivat K, Ko T, Cibelli JB. Human-induced pluripotent stem cells produced under xeno-free conditions. *Stem Cells Dev* 8, 1221-1229; 2010.
43. Hayashi Y, Chan T, Warashina M, Fukuda M, Ariizumi T, Okabayashi K, Takayama N, Otsu M, Eto K, Furue MK, Michiue T, Ohnuma K, Nakauchi H, Asashima M. Reduction of N-glycolylneuraminic acid in human induced pluripotent stem cells generated or cultured under feeder- and serum-free defined conditions. *PLoS One* 5, 11; e14099; 2010.
44. Okumura C1, Suto R, Furukawa K, Ahmed SS, Furukawa K, Nakayama E, Fujii T, Shiku H. Induction of murine gamma delta T cells cytotoxic for xenogeneic rat cells. *J Immunol* 154, 1114-1123; 1995.
45. Nikolic B1, Cooke DT, Zhao G, Sykes M. Both gamma delta T cells and NK cells inhibit the engraftment of xenogeneic rat bone marrow cells and the induction of xenograft tolerance in mice. *J Immunol* 166, 1398-1404; 2001.
46. Deuse T, Wang D, Stubben dorff M, Itagaki R, Grabosch A, Greaves LC, Alawi M, Grunewald A, Hu X, Hua X, Velden J, Reichenspurner H, Robbins RC, Jaenisch R, Weissman IL, Schrepfer S. SCNT-Derived ESCs with Mismatched Mitochondria Trigger an Immune Response in Allogeneic Hosts. *Cell Stem Cell* 16, 1–6; 2015.

47. Kishi Y, Tanaka Y, Shibata H, Nakamura S, Takeuchi K, Masuda S, Ikeda T, Muramatsu S, Hanazono Y. Variation in the incidence of teratomas after the transplantation of nonhuman primate ES cells into immunodeficient mice. *Cell transplant* 17, 1095-1102; 2008.
48. Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Diaz S, Bardor M, Varki N, Varki A, Muchmore E. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14, 12045-12050; 2003.
49. Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med* 11, 228-232; 2005.
50. Cerdan C, Bendall SC, Wang L, Stewart M, Werbowetski T, Bhatia M. Complement targeting of nonhuman sialic acid does not mediate cell death of human embryonic stem cells. *Nat Med* 12, 1113-1114; 2006.
51. Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, Traver D, van Rooijen N, Weissman IL. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* 138, 271-285; 2009.
52. Willingham SB1, Volkmer JP, Gentles AJ, Sahoo D, Dalerba P, Mitra SS, Wang J, Contreras-Trujillo H, Martin R, Cohen JD, Lovelace P, Scheeren FA, Chao MP, Weiskopf K, Tang C, Volkmer AK, Naik TJ, Storm TA, Mosley AR, Edris B, Schmid SM, Sun CK, Chua MS, Murillo O, Rajendran P, Cha AC, Chin RK, Kim D, Adorno M, Raveh T, Tseng D, Jaiswal S, Enger PØ, Steinberg GK, Li G, So SK, Majeti R, Harsh GR, van de Rijn M, Teng NN, Sunwoo JB, Alizadeh AA, Clarke MF, Weissman IL. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for

- human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109, 6662-6667; 2012.
53. Weissman IL, Shizuru JA. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood* 112, 3543-3553; 2008.
54. Kurre P, Pulsipher M, Woolfrey A, Maris M, Sandmaier B. Reduced toxicity and prompt engraftment after minimal conditioning of a patient with Fanconi anemia undergoing hematopoietic stem cell transplantation from an HLA-matched unrelated donor. *J Pediatr Hematol Oncol* 25, 581-583; 2003.
55. Shook DR, Triplett BM, Srinivasan A, Hartford C, Dallas MH, Pillai A, Laver J, Leung W. Successful allogeneic hematopoietic cell engraftment after a minimal conditioning regimen in children with relapsed or refractory solid tumors. *Biol Blood Marrow Transplant* 2, 291-297; 2013.

謝辞

本論文を執筆するにあたり、多くの方々から貴重なご指導とご協力、ご助力を賜りました。自治医科大学 分子病態治療研究センター 再生医学研究部の花園豊教授には全般にわたるご指導を頂きました。

本実験をおこなうにあたって、自治医科大学 再生医学研究部の藤城修平先生にはブタ iPS 細胞の樹立をして頂きました。フローサイトメーターによる解析をおこなうにあたって、自治医科大学 再生医学研究部の阿部朋行先生、河野正太氏にご助力を頂きました。細胞の移植にあたっては、自治医科大学 先端医療技術開発センターの和久井亨氏、松本治氏、山田実氏、宮澤和志氏、医用ミニブタ研究所の鳥取潤一氏、岩永健裕氏にご協力を頂きました。組織解析に関しては、予防衛生協会の岡林佐知氏、大野千恵子氏にご指導とご協力を頂きました。実験全般に渡るご助力を自治医科大学 再生医学研究部の古川裕氏、石野力也氏、野口瑛理氏から頂きました。そして、再生医学研究部の皆様にも様々なところでたいへんお世話になりました。以上の方々に、この場を借りて深く感謝の意を表します。

最後に、研究を進めるにあたって応援してくれた家族に心から感謝致します。

2015年 2月

水上 喜久