

|         |   |
|---------|---|
| 氏名      | 水 <sup>みず</sup> 上 <sup>かみ</sup> 喜 <sup>よし</sup> 久 <sup>ひさ</sup> |
| 学位の種類   | 博士(医学)  |
| 学位記番号   | 甲第495号  |
| 学位授与年月日 | 平成27年3月18日  |
| 学位授与の要件 | 自治医科大学学位規定第4条第2項該当  |
| 学位論文名   | 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                            |
| 論文審査委員  | (委員長) 教授 古川 雄 祐<br>(委員) 教授 川島 秀 俊 准教授 水田 耕 一                    |

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

iPS(induced pluripotent stem)細胞は三胚葉性の分化能をもつ上、体細胞から樹立できる。理論上、自己のiPS細胞を移植治療に用いれば(自家移植)、免疫拒絶は起こらない。実際に、マウスiPS細胞の同系移植(自家移植と同等)や、サルiPS細胞の自家移植において免疫反応が起こらないことが報告された。これらの実験事実から、ヒトiPS細胞を自家移植すれば免疫拒絶は起こらないと考えられる。しかし、iPS細胞の樹立とその品質管理には時間的・経済的に多大な負担を要する。そのため、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)を適合させた移植治療が予想される。そこで我々は、移植治療を反映させた移植モデルとして、近交系のクラウン系ミニブタを用いて、ブタ白血球抗原(swine leukocyte antigen: SLA)を適合させたブタiPS細胞の移植を行い、その免疫反応の検証をおこなった。

### 2 研究方法

#### 1. ブタiPS細胞の移植

近交系クラウン系ミニブタでは、C1とC2の2つのSLA系統が確立されている。これまでに我々は、C1系統のブタiPS細胞(以下、C1iPS細胞)の樹立に成功している。iPS細胞は生体内で奇形腫を形成するが、移植後に免疫拒絶されれば奇形腫は形成されない。C1iPS細胞を、SLA適合のC1ブタへ移植した。移植部位として、奇形腫が発生しやすい精巣( $n=4$ )または卵巣( $n=1$ )を選んだ。

#### 2. 獲得免疫反応の解析

移植を受けたブタの細胞性免疫反応を検証するため、リンパ球混合培養と移植部位における免疫組織化学染色をおこなった。また、液性免疫反応を血清中抗体検査によって検証した。

#### 3. 自然免疫反応の解析

3-1. NK細胞: C1iPS細胞をC1、C2ブタそれぞれのNK細胞と共培養した。反応後にiPS細胞から放出される乳酸脱水素酵素(LDH)の放出量を検出することで、NK細胞による傷害をin vitroで検証した。さらに、NK細胞による奇形腫形成への影響をみるため、NK細胞を欠損したNOGマウス( $n=14$ )と、NK細胞をもつNOD/SCIDマウス( $n=14$ )へC1iPS細胞の移植を

おこなった。

- 3-2. 補体: C1 iPS 細胞を C1 ブタの血清と反応させた。反応後に iPS 細胞から放出される LDH の放出量を検出することで、血清中の補体による傷害を *in vitro* で検証した。さらに、iPS 細胞を補体と反応させた後に NOG マウスへ移植( $n=6$ )することで、補体による奇形種形成への影響を検証した。
- 3-3. マクロファージ: C1 iPS 細胞を C1 ブタのマクロファージと共培養した。反応後、iPS 細胞が貪食されるようすを *in vitro* で検証するため、免疫染色をおこなった。また、C1 iPS 細胞が CD47 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か検証するため、C1 iPS 細胞表面の CD47 を抗 CD47 抗体でブロックした。

### 3 研究成果

1. ブタ iPS 細胞の移植 C1 iPS 細胞を免疫不全マウスへの移植後に奇形腫が形成された( $n=19$ )。ところが、C1 iPS 細胞を SLA 適合ブタ(C1)の精巣または卵巣への移植後、奇形腫は形成されなかった。

#### 2. 獲得免疫反応の解析

リンパ球混合培養法による細胞性免疫反応の検証において、C1 iPS 細胞に対する C1 ブタリンパ球の反応がみられた。この C1 iPS 細胞に対する C1 ブタリンパ球の反応(C1→C1)は、SLA 不適合の同種細胞に対する反応(C1→C2)より有意に低かった( $p < 0.01$ )。さらに、iPS 細胞の移植部位において、CD3 陽性細胞(T 細胞)と CD79 陽性細胞(B 細胞)の浸潤がみられた。

また、液性免疫反応の検証をしたところ、レシピエントブタの血清中に抗 iPS 細胞抗体がみられた。

#### 3. 自然免疫反応の解析

C1 iPS 細胞は SLA class I の陰性化と、NK 細胞を活性化するリガンドを発現していたことから、NK 細胞から傷害を受けやすいことが示唆された。これを *in vitro* で検証するため、iPS 細胞を NK 細胞と共培養したところ、SLA の適合によらず、傷害されることが分かった。続いて、*in vivo* で検証するため、iPS 細胞を免疫不全マウスへの移植したところ、NK 細胞欠損の NOG マウス(T-/B-/NK-)からは、NK 細胞をもつ NOD/SCID マウス (T-/B-/NK+)と比べて、優位に大きな奇形腫が形成された( $p < 0.01$ )。さらに、奇形腫形成の頻度についても、NOG マウス(78.6%)は、NOD/SCID マウス(58.1%)に比べて高かった。

補体は、細胞表面に発現するシアル酸によって制御される。C1 iPS 細胞はシアル酸の発現が低かったことから、補体に感受性であることが示唆された。これを *in vitro* で検証するため、C1 iPS 細胞を C1 ブタ血清と反応させたところ、血清濃度に比例して iPS 細胞から LDH の放出がみられた。一方で、熱湯処理で補体を非働化した血清と反応させたところ、LDH の放出はほとんどみられなかった。また、上述の通り C1 iPS 細胞は NOG マウスへの移植によって高頻度で奇形腫を形成する(78.6%)。補体による奇形種形成への影響をみるために C1 iPS 細胞をブタ血清と反応させた後に NOG マウスへ移植すると、奇形腫の形成はみられなかった。

C1 iPS 細胞をマクロファージと共培養したところ、66.3%の細胞がマクロファージからの貪食を回避していた。これは、C1 iPS 細胞が CD47 (“don’t-eat-me” signal) の発現によって回避している可能性が示唆された。そこで、C1 iPS 細胞上の CD47 を CD47 ブロック抗体で処理し

たところ、63.4%の iPS 細胞マクロファージに貪食された。

#### 4 考察

SLA適合iPS細胞への細胞性免疫反応は、同種細胞に対する反応に比べて減弱されていた。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。その理由として、主に3つの可能性が考えられる。

1つ目に、近交系ブタは近交系マウスほど遺伝的に均一ではなく、SLAやマイナー抗原のミスマッチが免疫拒絶を引き起こした可能性がある。

2つ目に、iPS細胞の樹立に用いた外来遺伝子による免疫拒絶が考えられる。C1 iPS 細胞は、樹立後にもヒト山中4因子が持続的に発現している。ブタにとって異種に相当する外来遺伝子は、ブタ体内において免疫原性をもつと予想される。特に、その中でもOct4は免疫系が成立する前の胎性期にのみ発現するため、Oct4 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 Oct4 陽性細胞は、Oct4 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。Oct4を含む異種由来の外来遺伝子が免疫反応を引き起こした可能性が考えられる。

3つ目に、異種由来フィーダー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細胞はマウスの細胞株であるため、ブタ体内で免疫原性を示すことが予想される。実際に、リンパ球混合培養の結果からも、C1ブタのリンパ球から STO 細胞への反応がみられた。iPS細胞の回収時に、STO 細胞を完全に除去することは出来なかった。移植細胞中に混入した STO細胞が免疫反応を引き起こした可能性がある。

自然免疫系からの影響として、これまでの報告で、ES 細胞は NK 細胞や補体に対して感受性が高いため、移植後に奇形腫の形成が阻害されることが知られている。本研究における SLA 適合個体へのブタ 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。

#### 5 結論

ブタ iPS 細胞の移植後に引き起こされた獲得免疫反応は、SLA を適合させることによって軽減されたと予想される。また、ブタ iPS 細胞は NK 細胞や補体などの自然免疫による傷害も受けたと予想される一方で、マクロファージからの貪食を回避していることがわかった。以上の理由から、ブタ iPS 細胞は SLA を適合させた移植であっても免疫拒絶され、奇形腫形成が起こらなかったと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

多能性幹細胞には naïve 型と prime 型があり、ES 細胞に代表される前者は増殖能が高く、キメラ個体を作製できることから、再生医療への応用に適している。マウスの iPS 細胞は naïve 型の性質を有するが、これまで霊長類・ブタでは prime 型の iPS 細胞しか樹立されておらず、解決すべき課題であった。

申請者らは、prime 型のブタ iPS 細胞を forskolin とブタ LIF を用いて naïve 型に転換することに成功した。次いでこの naïve 型ブタ iPS 細胞を用いて SLA を適合させた近交系移植を行い、レシピエントに惹起される免疫反応を解析した。

- 1) Naïve 型ブタ iPS 細胞 (C1 由来) を SLA 適合 (C1) および不適合 (C2) 近交系の精巢あるいは卵巣に移植したが、奇形種は形成されなかった。一方、NOD/SCID マウスへの移植では約 60%、NOG マウスへの移植では約 80%に奇形種が認められた。
- 2) そこで近交系移植における免疫拒絶のメカニズムについて解析を進めた。リンパ球混合培養試験において、SLA 適合細胞でも自己細胞に比べ有意に高いリンパ球活性化が認められた。またレシピエントの血清中に抗 iPS 細胞同種抗体が検出され、獲得免疫が働いていることが示唆された。
- 3) Naïve 型ブタ iPS 細胞は class I SLA を発現せず、NK ligands の発現が見られることから、NK 細胞によって傷害される可能性が考えられる。この点をブタ NK 細胞との共培養にて確認した。また免疫不全マウスへの移植においても、NK 細胞を有する NOD/SCID に比べ、NK 細胞を欠損する NOG で奇形種の形成率とサイズが有意に大きかった。
- 4) さらにブタ非働化血清で前処理したブタ iPS 細胞を NOG マウス (補体を欠損) に移植したところ、奇形種の形成が見られなかった。すなわち補体による傷害が排除に重要であることが分かった。一方、マクロファージによる貪食は CD47 によって回避されていることが示された。

以上より、iPS 細胞は MHC 適合レシピエントに移植しても、主に NK 細胞と補体を介する自然免疫によって拒絶を受けることが明らかになった。この結果は、iPS 細胞の臨床応用における安全性の確保に重要な基盤情報を提供するものである。

## 最終試験の結果の要旨

申請者は、前半は iPS 細胞の高品質化すなわちブタ iPS 細胞の naïve 型への転換について説明し、後半は樹立した naïve 型ブタ iPS 細胞の近交系移植における免疫反応について発表を行った。プレゼンテーションの時点で提出されていた学位論文は、ほぼ後半の部分で構成され、前半の内容は「今後の展望と総括」に記載されていた。ブタ iPS 細胞の naïve 型への転換は、本研究課題の前提となる研究結果であり、学位論文においても序章で述べられるべきであるとの指摘が審査委員からなされた。そこで、実際のプレゼンテーションの順序に合わせて学位論文を修正することとした。

それ以外の質問およびコメントとして、1) データの統計処理に一部不備が見られること、2) 今回示された iPS 細胞の免疫原性を臨床応用に際してどうコントロールするか、などが挙げられた。申請者はいずれの質問に対しても的確に返答し、有意義な discussion が行われた。

発表および質疑応答から、申請者が研究者として十分な資質・能力を有することは明らかで、医学博士号を受けるに値すると審査員全員が判断し、最終試験に合格とした。学位論文は審査委員の指摘に従って構成を変更することとし、再提出後に審査委員全員が確認した上で合格とした。