

マウス iPS 細胞からの制御性樹状細胞の作製と特性評価

● ポイント

マウスの iPS 細胞^{*1} から免疫調節機能を有する制御性樹状細胞^{*2} を作り出す手法を確立しました。

● 概要

マウスの iPS 細胞から制御性樹状細胞（以下、iPS-DCreg と呼びます）を作り出すプロトコルを確立しました。その性質や機能を、骨髄幹細胞（BM）から誘導した通常の樹状細胞（以下、BM-DCcon と呼びます）や、同じく骨髄幹細胞から誘導した制御性樹状細胞（以下、BM-DCreg と呼びます）と比較したところ、下記のことが明らかとなりました。

- (1) iPS-DCreg は、BM-DCreg とよく似た表面マーカーやサイトカイン発現パターンを示しました。
- (2) iPS-DCreg は、BM-DCreg と同様に、T 細胞の活性化能力を持たず、制御性 T 細胞を選択的に増殖させました。
- (3) 3 種類の DC をそれぞれマウスに投与したところ、iPS-DCreg > BM-DCreg > BM-DCcon の順にリンパ節への免疫細胞の集積の抑制が強く見られました。

以上のことから、iPS 細胞から、生体外および生体内のいずれにおいても免疫を抑制する機能を示す制御性樹状細胞を分化誘導することができたと考えられます。

● 研究の背景

免疫を抑制する機能を持つ制御性樹状細胞は、臓器移植後の拒絶反応（移植片対宿主病；GvHD）や、様々な自己免疫疾患の治療薬として利用できる可能性があり、多くの臨床試験が行われています。その結果から、治療の安全性と有効性が示されつつありますが、治療に使用する大量の制御性樹状細胞を安定的に生産する方法がないことが問題となっています。

これまでに、制御性樹状細胞を作り出した報告では、材料としてマウスの骨髄幹細胞やヒトの血中単核球を使用しています。また、iPS 細胞から通常の樹状細胞を誘導する方法はすでに報告されていますが、制御性樹状細胞を作り出す方法は確立されていません。本研究では、これら既存の手法を組み合わせ、マウスの iPS 細胞から制御性樹状細胞を作る方法を開発しました（Figure 1A）。

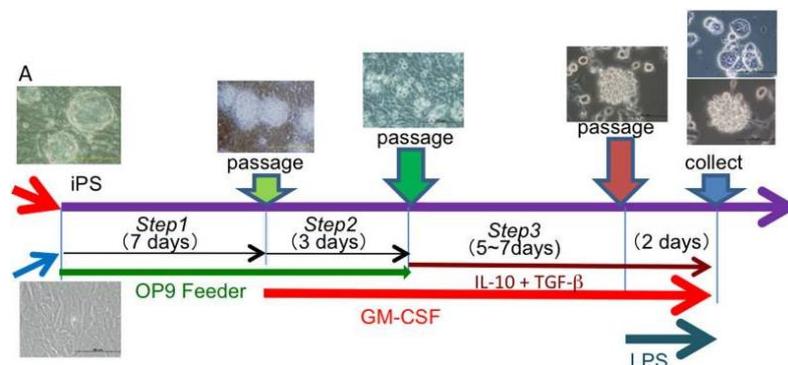


Figure 1A : iPS-DCreg の培養プロトコル

● 研究の成果

(1) 細胞の表面マーカーおよびサイトカイン発現パターンの比較分析

iPS 細胞から作った制御性樹状細胞 (iPS-DCreg) は、骨髄幹細胞から作った制御性樹状細胞 (BM-DCreg) と同様の表面マーカー (細胞表面に発現しているタンパク質の種類や量、Figure 2B) およびサイトカイン発現パターン (細胞内の mRNA の種類や量、Figure 2C) を示しました。この結果は、骨髄幹細胞と同様に、iPS 細胞からも目的の制御性樹状細胞を作り出せたことを示唆します。

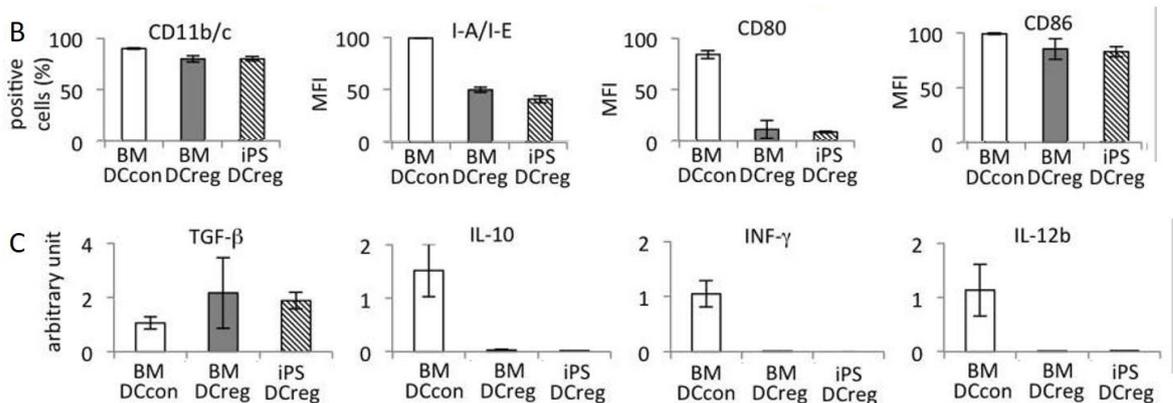


Figure 2BC (論文より一部抜粋) : iPS-DCreg は BM-DCreg と同様の特徴を持つ

BM-DCcon : 骨髄幹細胞から作った通常の樹状細胞 (免疫機能を活性化する)

BM-DCreg : 骨髄幹細胞から作った制御性樹状細胞 (免疫機能を抑制する)

iPS-DCreg : iPS 細胞から作った制御性樹状細胞 (免疫機能を抑制する)

(2) 体外における T 細胞の活性化 (増殖促進) 能力の比較分析

各 DC に T 細胞を反応させ、T 細胞を増殖させることができるかどうか確認したところ、通常の樹状細胞である BM-DCcon は大きな T 細胞の増殖が確認される一方で、制御性樹状細胞である BM-DCreg と iPS-DCreg では、いずれの T 細胞もほとんど増殖しませんでした (Figure 4A、左・中図)。また、わずかに増殖した T 細胞を調べたところ、iPS-DCreg は制御性 T 細胞の割合を選択的に増やすことが明らかとなりました (Figure 4A、右図)。

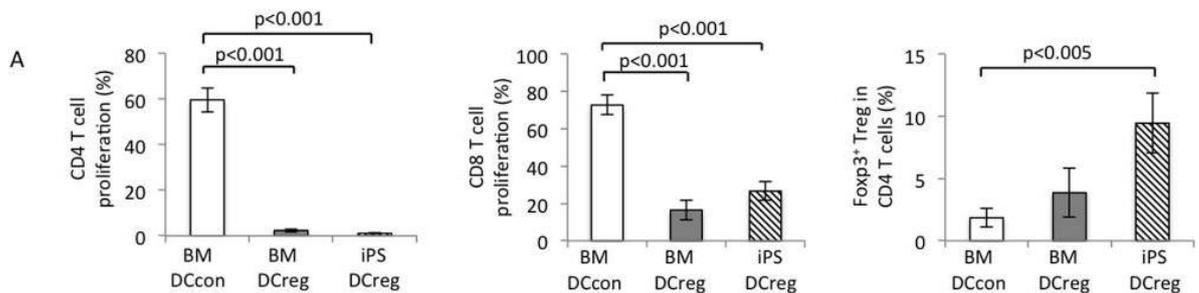


Figure 4A : iPS-DCreg は BM-DCreg と同様に T 細胞の増殖を促進しないが、

制御性 T 細胞の割合を選択的に増やす

左図 : CD4+ (ヘルパー) T 細胞の増殖率

中図 : CD8+ (キラー) T 細胞の増殖率

右図 : 増殖した T 細胞のうち、制御性 T 細胞 (CD4+/FoxP3+) の割合

この反応は制御性樹状細胞に特有のものであり、この結果から、iPS-DCreg は、BM-DCreg と同様に、フラスコ内（体外）において制御性樹状細胞としての機能を有することが示されました。

(3) 体内における T 細胞の活性化（増殖促進）能力の比較分析

iPS-DCreg が、マウスの体内で制御性樹状細胞の機能を有するか（免疫機能を抑制するか）を確認するために、各 DC をそれぞれマウスに投与し、リンパ節の重さ（Figure 4C）およびリンパ節内の免疫細胞の数（Figure 4D）を測定しました。リンパ節が重く、免疫細胞の数が多いことは、免疫機能が亢進していることを示唆し、逆にリンパ節が軽く、免疫細胞の数が少ないことは、免疫機能が抑制されていることを意味します。その結果、BM-DCcon の実験と比較して、iPS-DCreg や BM-DCreg でリンパ節が軽く、細胞数が少なくなりました。

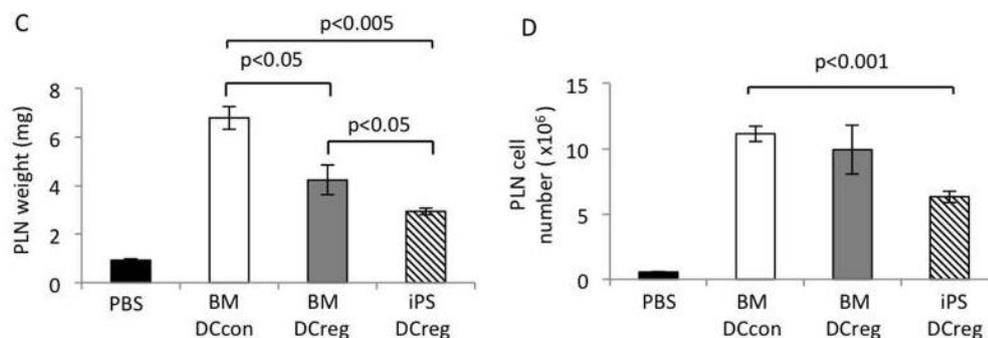


Figure 4CD : iPS-DCreg は BM-DCreg と同様に、マウスの免疫機能を抑制する

左図：リンパ節の重さ

右図：リンパ節内の細胞数

これらの結果から、iPS-DCreg は、マウスの体内においても制御性樹状細胞としての機能を示すことが示唆されました。

以上の結果を総合すると、iPS-DCreg は、骨髄から作製した制御性樹状細胞（BM-DCreg）と同様の特性を持ち、生体の内外において免疫機能を抑制することが示されたことから、この培養プロトコル（Figure 1A）によって iPS 細胞から制御性樹状細胞が作製できたと考えられます。

● 今後の展望

この培養手法を応用することで、将来的に、ヒト iPS 細胞から各種治療に使用できる制御性樹状細胞を作り出すことができるようになることが期待されます。

● 用語説明

(1) iPS 細胞（induced Pluripotent Stem 細胞；人工多能性幹細胞）

細胞にいくつかの因子を導入することで人為的に作られた幹細胞です。通常、分化が進んだ体の細胞は、その他の種類の細胞への分化能力や、無限の増殖能力を持ちません。ところが、その細

胞に因子を導入して iPS 細胞にすると、幹細胞としての機能を持つようになり、色々な種類の細胞に分化したり、ほぼ無限に増殖できるようになります。この仕組みを利用し、例えば患者本人の皮膚細胞の一部を使って iPS 細胞化し、大量に増殖させ、目的の細胞に分化させて治療に使用するという技術が数多く開発されています。

(2) 制御性樹状細胞

通常の樹状細胞は、一般に免疫機能を活性化する機能を持っていますが、制御性樹状細胞は、免疫機能を抑制する機能を持つことが知られています。例えば、免疫機能を抑制する機能を持つ制御性 T 細胞を増殖させたり、自分の体を攻撃してしまう免疫細胞の働きを抑制したりすることができます。この性質を利用して、臓器移植の際の拒絶反応の抑制や、自己免疫疾患の治療に応用しようとする研究が進んでいます。

● 論文情報

タイトル Generation and characterization of regulatory dendritic cells derived from murine induced pluripotent stem cells
著者 Qi Zhang, Masayuki Fujino, Shizue Iwasaki, Hiroshi Hirano, Songjie Cai, Yuya Kitajima, Jinhua Xu, and Xiao-Kang Li
掲載誌 Scientific Reports 誌、2014; 4: 3979. doi: 10.1038/srep03979
URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3913921/>

以上