

## 論 文 要 旨

### CD8+ T cell-mediated rejection of allogenic human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in human PBMC-transferred NOG MHC double knockout mice

アロヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートはヒト免疫 NOG MHC double knockout マウスにおいて、CD8+T 細胞主体的に拒絶される

松本 龍

#### 【序論及び目的】

近年の分子生物学的技術の進歩に伴い、アロ iPS 細胞を用いた再生医療は、難治性疾患に対する新たな治療法として注目されている。アロ iPS 細胞に対する免疫反応を制御するため、HLA を適合させた iPS 細胞株や HLA-C 以外の HLA-ClassI 分子を除去した iPS 細胞株の樹立など、免疫反応が起きにくい細胞株の作成が行われてきた。一方で、HLA を適合しても、minor 抗原や iPS 細胞のミトコンドリア DNA 内の neoepitope に対する免疫反応が誘発されることが報告され、それぞれの患者の免疫環境において免疫反応を予測することが必要である。

ヒト免疫マウスはマウス内のヒト免疫を再構築することで、*in vivo*でヒト免疫反応を評価することを目的に開発された。特に、免疫不全マウスにヒト単核球細胞 (hPBMC) を投与するモデルは、簡便に作成が可能であり、成熟したリンパ球を投与することから、患者の免疫環境を部分的に再現することが可能である。一方で、移入した hPBMC がマウス MHC を認識し、攻撃することで、異種移植片対宿主病 (xeno-GvHD) が誘発されるため、長期間ヒト免疫反応を評価予測するには限界があった。近年、マウス MHC class I/II が欠損した NOG マウス (NOG- $\Delta$ MHC) が開発され、hPBMC を投与しても Xeno-GVHD を起こさず、長期間ヒト免疫反応の評価が可能新たなヒト免疫マウスモデルとして注目されている。

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (hiPS-CMs) は虚血性心疾患に対する新たな治療法として注目されている。我々は、hiPS-CM シートを作成し、ブタ心筋梗塞モデルの心臓表面に移植したところ、Paracrine による血管増殖を促され、心機能の改善効果を確認した。現在、HLA が適合した hiPS-CM シートを用いた医師主導治験を実施中であり、心機能改善効果や奇形腫等の有害事象がないことを報告している。一方で、従来の非ヒト霊長類モデルでは、MHC 適合した iPS-CM シート移植でも、長期のグラフト生着には複数の免疫抑制剤使用が必要であった。以上より、アロ hiPS-CMs は免疫抗原性が低いものの、生体内において特異な免疫反応を誘発することが予想される。本研究の目的は、ヒト免疫 NOG- $\Delta$ MHC を用いてアロ hiPS-CMs に対する免疫反応を解析することである。

#### 【方法】

##### 1. *in vitro*における hiPS-CMs の免疫抗原性評価

ヒト iPS 細胞 (201B7 株) に luciferase 遺伝子を knock in し、hiPS-CMs を作成した。hiPS-CMs の HLA classI および classII の発現をフローサイトメトリー (FCM) で評価した。また、健常人から末梢

血単核球細胞(hPBMCs)を採取し、hiPS-CMsで刺激した、96時間後の上澄み中のヒトIFN- $\gamma$ 産生量をELISA法で評価した。さらに、hiPS-CMs刺激後のhPBMCsを回収し、CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞の分裂能をFCMで評価した。

## 2. NOG- $\Delta$ MHCを用いた、長期間ヒト免疫反応の評価が可能なヒト免疫マウスモデルの作成

NOG- $\Delta$ MHCに2.0Gyの全身性放射線照射を行い、同日に $1 \times 10^7$  cellsのhPBMCsを静脈内投与した(hPBMCs-NOG- $\Delta$ MHC)。末梢血中および脾臓内hPBMCsの生着期間およびリンパ球プロファイルをFCMで評価した。さらに、xeno-GvHD評価のため、体重減少および皮膚へのリンパ球浸潤を評価した。

## 3. hiPS-CMsシートに対する*in vivo*での免疫反応の解析

温度応答性ディッシュ(UpCell<sup>®</sup>)にhiPS-CMsを $5 \times 10^6$  cellsずつ播種し、37°Cで2日間培養した。2日後に常温に戻し、hiPS-CMシートを作成した。hiPS-CMシートを2枚重ねて、hPBMCs-NOG- $\Delta$ MHCの背側皮下に移植した。グラフト生着はIn Vivo Imaging System (IVIS)のシグナルを用いて評価した。移植片を免疫組織学的に評価した。

### 【結果】

#### 1. *in vitro*においてhiPS-CMsはCD8<sup>+</sup>T細胞主体的な免疫反応を誘発した

hiPS-CMsは、HLA-classIのみが発現しており、ClassIIの発現は認めなかった。手術侵襲を想定しヒトIFN- $\gamma$  (100ng/ml)で48時間培養後に再評価したところ、HLA-classIの発現は上昇したが、HLA-ClassIIの発現は認めなかった。HLA-classIを強発現したhiPS-CMsでアロhPBMCsを刺激したところ、CD4<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>T細胞の分裂は認めなかったが、CD8<sup>+</sup>T細胞のみ活性化マーカーであるCD25の発現上昇を認め、さらに培養上清中のヒトIFN- $\gamma$ の優位な上昇を認めた。以上より、hiPS-CMsはHLA-classIのみを発現し、アロCD8<sup>+</sup>T細胞を活性化させる細胞であることを確認した。

#### 2. hPBMCs-NOG- $\Delta$ MHCはxeno-GvHDを誘発せず、長期間ヒト免疫反応が評価可能なモデルである

hPBMCs-NOG- $\Delta$ MHCの末梢血中では7日後よりヒトCD45<sup>+</sup>細胞が確認された。徐々に細胞数は増加し、少なくとも90日間の生着を確認した。また、hPBMCs-NOG- $\Delta$ MHCは、投与前のhPBMCsのリンパ球プロファイルが反映されていた。また、体重減少や皮膚へのリンパ球浸潤は認めなかった。以上より、NOG- $\Delta$ MHCを用いて長期間ヒト免疫反応が評価可能なモデルを作成した。

#### 3. hiPS-CMsシートは、CD8<sup>+</sup>T細胞主体的な免疫反応により拒絶される

hPBMCs-NOG- $\Delta$ MHCに移植したhiPS-CMシートは、術後24日でシグナルが消失した。術後17日目の移植片を免疫組織学的に解析したところ、ロポニン陽性細胞はわずかに残存しており、周囲には多量のCD8<sup>+</sup>T細胞の浸潤像を認めた。また、同切片ではGranzyme BやIFN- $\gamma$ が高発現していたことから、CD8<sup>+</sup>T細胞は細胞障害性活性を有していることが考えられた。続いて、hiPS-CMシートが消失したhPBMCs-NOG- $\Delta$ MHCの脾臓からヒトCD3<sup>+</sup>T細胞を分離し、hiPS-CMsで再刺激したところ、未刺激群と比較し著明にIFN- $\gamma$ の産生量が増加した。続いて、CD8<sup>+</sup>T細胞を除去したhPBMCs-NOG- $\Delta$ MHCにhiPS-CMシートを移植したところ、移植片は24日間以上生着した。以上より、hiPS-CMsシートはCD8<sup>+</sup>T細胞により拒絶されることが明らかとなった。また、hiPS-CMシート移植後に臨床濃度のタクロリムスを持続投与することで、移植片は24日間以上生着した。

### 【結論および考察】

hiPS-CMs移植では、hPBMCs-NOG- $\Delta$ MHCにおいて、HLA-classIに対するCD8<sup>+</sup>T細胞主体的な免疫反応によりグラフトが拒絶された。

*In vitro*では、CD8<sup>+</sup>T細胞による免疫反応はわずかであったが、*in vivo*ではCD8<sup>+</sup>T細胞による免疫反応によりhiPS-CMシートが消失した。*In vitro*では、CD4<sup>+</sup>T細胞に免疫反応が起きないため、IL-2やIL-15などの成長因子が分泌されず、CD8<sup>+</sup>T細胞は活性化するものの、分裂しないことが考えられた。一方、*in vivo*においては、hiPS-CMシート移植に伴う局所の炎症反応や、physiological expansionにより増殖したCD8<sup>+</sup>T細胞による持続的なIFN- $\gamma$ 分泌により、hiPS-CMs上のHLA-classI

の発現が上昇することが考えられた。さらに、indirect pathway を介した抗原提示により CD8<sup>+</sup>T 細胞が増殖、活性化することで、免疫反応が増幅することが考えられた。以上より、安全な hiPS-CM 移植には、*in vitro*のみならず、*in vivo*での免疫反応評価が不可欠である。

また、hiPS-CMs 移植に対する免疫反応は、Class I および Class II が発現した心臓移植と比較し、緩やかな可能性が示唆された。アロ hiPS-CM 移植は、従来の非ヒト霊長類の研究結果から、心臓移植に準じた複数の免疫抑制剤(タクロリム、ミコフェノール酸モフェチル、およびステロイド)が投与されている。しかし、これらの長期化感の免疫抑制剤に伴い、腎機能障害や糖尿病などの代謝性疾患が増悪し、結果として原疾患の病態も悪化する懸念があり、hiPS-CMs 移植による治療効果が十分に得られない可能性が懸念されていた。本研究結果から、CD8<sup>+</sup>T 細胞に特化した免疫抑制戦略や、よりマイルドな免疫抑制療法でも十分にアロ免疫反応を抑制できる可能性が示唆された。

(The journal of heart and lung transplantation 掲載)