

# 論文内容要旨

Capacity of Retinal Ganglion Cells Derived from Human  
Induced Pluripotent Stem Cells to Suppress T-Cells

(ヒト人工多能性幹細胞由来網膜神経節細胞の T 細胞抑制能)

International Journal of Molecular Sciences,

21(21):7831,2020

主指導教員：木内 良明教授

(医系科学研究科 視覚病態学)

副指導教員：東 幸仁教授

(原爆放射線医科学研究所 ゲノム障害病理)

副指導教員：近間 泰一郎准教授

(医系科学研究科 視覚病態学)

江戸 彩加

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

網膜は10層構造でありその最内層に位置する網膜神経節細胞は、網膜に到達した光情報を収集し視神経を介して脳に伝達する役割を担っている。網膜神経節細胞が緑内障や視神経症といった疾患で障害されると不可逆的な視覚障害に陥る。特に緑内障は世界で不可逆的な失明の主な原因である。網膜神経節細胞は自己複製しないため、一度傷害されると新たに細胞が補充されない限り視機能回復は望めない。近年、幹細胞由来の網膜神経節細胞の移植による機能回復を目指し、世界中で研究が行われている。細胞移植治療では拒絶反応が重大な懸念事項である。

網膜の最外層を構成する網膜色素上皮細胞は、免疫抑制能を持つことが示され、すでに幹細胞由来の細胞移植が臨床応用されている。一方、網膜神経節細胞の免疫学的特性についてはまだ報告されていない。私たちは、網膜神経節細胞も網膜色素上皮細胞と同様に免疫抑制作用を有しているのではないかという仮説を立て、ヒトiPS細胞由来網膜神経節細胞(iPS-RGC)の免疫学的特徴について調べた。

健常者由来のiPS細胞(TLHD2株、201B7株)を3次元網膜立体組織に分化させた。55-65日間培養した3次元網膜立体組織からtwo-step immunopanning法でiPS-RGCを単離した。単離後3-5日目のiPS-RGCを実験に用いた。IFN- $\gamma$ の処理を必要とした分析では48-96時間前に100 ng/mLのヒトリコンビナントIFN- $\gamma$ でiPS-RGCを処理した。

iPS-RGCの免疫原性を調べるために免疫細胞染色法でiPS-RGC上のヒト白血球抗原(HLA)クラスI(HLA-A,B,C)とHLAクラスII(HLA-DR, DP, DQ)の発現を解析した。続いて、フローサイトメトリー法でT細胞を活性化するCD80(B7-1)およびCD86(B7-2)分子、活性化T細胞の増殖やサイトカイン産生を抑制するCD274(PD-L1:B7-H1)分子のiPS-RGCの発現を調べた。

次に、iPS-RGCが活性化した免疫細胞を抑制するかどうかを調べるために、混合リンパ球反応を用いたリンパ球刺激試験を実施した。この試験では、96 well plateで健常者5人の混合末梢血単核球(PBMC)  $5 \times 10^5$  細胞/wellとiPS-RGC  $2.5 \times 10^5$  細胞/wellを共培養した。120時間培養後、細胞増殖マーカーKi-67で染色したPBMCをフローサイトメトリーで解析し、また培養上清中のIFN- $\gamma$ 濃度を酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)で測定した。

結果、iPS-RGCはHLAクラスIをわずかに発現しており、その発現はIFN- $\gamma$ 処理により増強されることがわかった。HLAクラスII、CD80、CD86は、IFN- $\gamma$ の処理の有無に関わらずiPS-RGCには発現が見られなかった。T細胞の活性化を抑制するCD274は、iPS-RGC上で弱く発現し、IFN- $\gamma$ 存在下でその発現が増強された。

リンパ球刺激試験の結果、iPS-RGCと共培養したCD3陽性T細胞、CD4陽性ヘルパーT細胞

胞、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞、CD11b 陽性単球・マクロファージ、CD159a 陽性ナチュラルキラー細胞の増殖率は、コントロール（iPS 細胞との共培養）と比較して有意に低いことがわかった。iPS-RGC と共培養した上清中の IFN- $\gamma$  濃度は、コントロールよりも有意に低かった。これらの結果は、iPS-RGC が各種免疫細胞の活性化を抑制している事が示された。

次に iPS-RGC の免疫抑制機構を明らかにするため、DNA マイクロアレイ解析により、iPS-RGC の免疫調節因子の発現を調査した。T 細胞に関連する免疫抑制因子のうち、iPS-RGC は、コントロール細胞（iPS 細胞、PBMC）と比較して、トランスフォーミング増殖因子  $\beta 2$ （TGF- $\beta 2$ ）、トロンボスポンジン-1（TSP-1）、ソマトスタチンを高発現していた。

これらの3つの候補分子の免疫抑制作用を確認するために、候補分子を添加した培地で PBMC を 120 時間培養し、上清中の IFN- $\gamma$  を ELISA 法で測定した。TGF- $\beta 2$  を添加したものでは、コントロール（添加がないもの）に比べて IFN- $\gamma$  の産生が有意に抑制されていたが、TSP-1 とソマトスタチンを加えたものでは抑制されなかった。この結果から、TGF- $\beta 2$  が iPS-RGC を介した T 細胞抑制に重要な役割を果たす可能性を示唆していると考えられた。

続いて、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）および免疫細胞染色で iPS-RGC 上に TGF- $\beta 2$  が構成的に発現していることを確認した。次に iPS-RGC による T 細胞の抑制における TGF- $\beta$  の関与を調べるため、TGF- $\beta$  を阻害してリンパ球抑制試験を行った。TGF- $\beta$  シグナルの阻害には TGF- $\beta$  受容体 I の阻害剤である SB431542 を用いた。Ki-67 フローサイトメトリー解析により、SB431542 の存在下で iPS-RGC と共培養した CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の増殖の割合は、SB431542 の添加がないものと比べて増加していた。上清中の IFN- $\gamma$  の濃度についても SB431542 を添加したものでは添加がないものに比べて部分的ではあるが有意に増加していた。

これらの結果から、iPS-RGC の免疫原性は低く、iPS-RGC は T 細胞を中心とした免疫担当細胞を抑制する作用を有していることが示された。また、iPS-RGC の T 細胞抑制作用には TGF- $\beta$  が関与していることが示唆された。このことから、iPS-RGC は拒絶反応の観点からは移植治療に有利な免疫学的特徴を有していると考えられた。本研究は iPS-RGC の細胞移植治療において拒絶反応への対策を検討する際の重要な知見の一つとなると考えられる。