

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 ( 医学 )	氏名	江戸 彩加
学位授与の条件	学位規則第 4 条第① 2 項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主 査	教授 池上 浩司	印	
審査委員	教授 保田 朋波流		
審査委員	准教授 田中 友加		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>網膜の最内層を構成する網膜神経節細胞は、視細胞および双極細胞からの光受容情報をその軸索である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などの疾患で傷害されると不可逆的な視機能障害となり、傷害が重度の場合は失明する場合もある。2006 年に京都大学の山中伸弥教授らによって人工多能性幹 (iPS) 細胞が発明され、iPS 細胞由来網膜神経節細胞 (iPS-RGC) の作製が可能になった。世界中で網膜神経節細胞の移植による視機能回復を目指す試みがなされているが、特に iPS 細胞バンクを活用した他家移植治療の懸念事項の 1 つに拒絶反応がある。本研究では iPS-RGC の免疫原性と T 細胞に対する作用の 2 点を対象に、iPS-RGC の免疫学的特徴とその分子機構の一端が詳細に検討された。</p> <p>実施された実験や解析は以下のとおり多岐にわたる。iPS-RGC は健常人由来の iPS 細胞から分化誘導した 3 次元網膜立体組織より two-step immunopanning 法を用いて単離され、単離後培養 3-5 日目の iPS-RGC が実験に供された。iPS-RGC の免疫原性は HLA class I、HLA class II の免疫染色により評価された。さらに T 細胞を活性化する共刺激分子である CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2) 分子、T 細胞を抑制する CD274 (PD-L1:B7-H1) 分子の発現レベルがフローサイトメトリー法により定量解析された。くわえてヒト組換え IFN-<math>\gamma</math> で処理した iPS-RGC が実験に用いられ、炎症下におけるそれらの分子の発現も解析された。iPS-RGC の T 細胞に対する作用を検証する実験では、iPS-RGC と末梢血単核球 (PBMC) の共培養試験が行われた。2.5<math>\times</math>10<sup>5</sup> 細胞/ウェルの iPS-RGC と、5<math>\times</math>10<sup>5</sup> 細胞/ウェルの混合リンパ球反応で活性化されたヒト PBMC が 120 時間、96 ウェル培養プレートで共培養され、Ki-67 (細胞増殖マーカー) 陽性リンパ球の割合がフローサイトメトリー法により定量解析された。さらに、同共培養の培地に放出された IFN-<math>\gamma</math> の濃度が酵素結合免疫吸着測定法により測定され、T 細胞からの IFN-<math>\gamma</math> 分泌に対する iPS-RGC の作用が評価された。以上の実験解析にくわえ、iPS-RGC による T 細胞抑制機構の一端を明らかにすることを目指し、DNA マイクロアレイ法による iPS-RGC 上の免疫調節因子の発現解析が実施された。さらに、PBMC からの IFN-<math>\gamma</math> 放出に対する効果を指標に、マイクロアレイ解析で得られた候補分子の中から T 細胞抑制分子の同定が試みられた。同定された分子の iPS-RGC における発現が定量的逆転写 PCR (RT-PCR) 法および免疫細胞染色法により検証された。最後に、同定分子の T 細胞抑制効果をより強固に実証するために、特異的阻害薬を用いた iPS-RGC と PBMC の共培養試験が行われ、培養上清中の IFN-<math>\gamma</math> 濃度および Ki-67 陽性リンパ球の割合が測定解析された。</p> <p>結果は以下のごとくまとめられる。iPS-RGC は HLA class I をわずかに発現しており、その発現は IFN-<math>\gamma</math> の処理により増強された。HLA class II、CD80、CD86 分子は IFN-<math>\gamma</math> 処理の有無に関わらず iPS-RGC 上に発現していなかった。一方で T 細</p>			

胞を抑制する CD274 分子は iPS-RGC 上に弱く発現しており、IFN- $\gamma$  処理によってその発現は増強した。iPS-RGC と PBMC の共培養試験において、iPS-RGC は対照群と比較して、CD3 陽性汎 T 細胞、CD4 陽性ヘルパー T 細胞、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 NK 細胞の増殖を抑制した。培養上清中の IFN- $\gamma$  濃度も iPS-RGC と共培養したものでは対照群と比べて有意に低かった。DNA マイクロアレイ解析では、眼内の免疫抑制に関わる因子のうち TGF- $\beta$  2、TSP-1、ソマトスタチンの 3 分子が iPS-RGC において対照群(同一株の iPS 細胞および PBMC)と比べて高発現を示した。PBMC の培養培地に対する添加実験では、これら 3 つの候補分子のうち TGF- $\beta$  2 のみが IFN- $\gamma$  の分泌を抑制した。RT-PCR および免疫細胞染色により、iPS-RGC が TGF- $\beta$  2 を構成的に発現していることが確認された。TGF- $\beta$  受容体 I の阻害薬である SB431542 を添加した iPS-RGC と PBMC の共培養試験では、TGF- $\beta$  の阻害によって CD4 陽性ヘルパー T 細胞、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の増殖が TGF- $\beta$  を阻害しない対照群に比べて増加した。IFN- $\gamma$  の分泌量も TGF- $\beta$  を阻害したものでは対照群と比べて部分的ではあるが有意に増加していた。

以上の一連の結果から、iPS-RGC は免疫原性が低く、TGF- $\beta$  が関与する T 細胞抑制能を有することが示された。このことから、iPS-RGC は細胞移植治療を行うにあたり拒絶反応の観点では有利な免疫学的特性をもつこと、他家移植においても拒絶反応が比較的起こりにくい可能性が示唆された。

本研究は iPS-RGC の免疫学的特性を明らかにした初めての研究である。著者は緻密かつ多岐にわたる膨大な実験により、iPS-RGC が拒絶反応に大きく関わる T 細胞の増殖および活性化を抑制することを示し、iPS-RGC の細胞移植治療における拒絶反応回避の可能性について新たな知見を見出した。

よって審査委員会全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。