

現代科学技術により解き明かす胎仔期誘導免疫寛容機構

和田はるか

北海道大学遺伝子病制御研究所 免疫生物分野

【研究の背景】

半世紀以上前から行われてきた異種・異系由来の移植実験において、ある特定の条件下でドナー細胞・組織片に対する寛容が誘導されることが観察されている。メダワーらは、マウス胎仔に異系由来の細胞懸濁液を注入しておくとし、その後その異系細胞に対し寛容が獲得されることを確認している(参考文献1など)。中内ら²は胚盤胞に ES 細胞を注入してキメラ個体を発生させる胚盤胞補完技術を用い、脾臓を欠損するマウス由来胚盤胞を野生型ラット ES 細胞で補完し、ラット脾臓をもつマウスを出生させた。このマウスは成獣まで発育し脾機能にも問題なく、異種であるラット由来脾臓に対しての免疫寛容が成立していると考えられる。これらの結果をもとに、免疫系が未熟な時期に暴露された異種・異系抗原に対しては寛容が誘導されると一般的に理解されている。

これに矛盾する実験結果も報告されている。ルドワランらは受精後 3～4 日のウズラ神経管をニワトリの神経管とすげ替え、キメラ動物を作製した³。このニワトリは、免疫学的拒絶により生後 3 週間から 2 か月程度でウズラに由来する羽が脱落し、個体も死に至った。この実験とメダワーらの実験結果に差異を生じた要因については不明なままである。

【目 的】

先人たちの努力により、胎生期における抗原や細胞の暴露により、生後にその暴露抗原と同じ動物の細胞に対し免疫寛容が獲得されることが明らかにされている。しかし、それらの成果は各種分析技術が未発達であった時代のものであり、具体的な免疫寛容獲得の機序については曖昧なままである。われわれは半世紀以上前に先人たちにより達成された免疫寛容誘導現象の機序を現代の発生工学、細胞生物学的手法を用いて解き明かすとともに究極的には移植医療へ応用することを目指す。

【方 法】

具体的な実験の一例として、アロ血液細胞の胎仔期暴露によるアロ脾臓に対する免疫学的拒絶／寛容を検討する系について説明する。

まず、成熟胸腺上皮細胞を欠損するマウスの ES 細胞(FoxN1 KO)をゲノム編集技術(Crispr/Cas9 システム)で更に血液細胞全般を欠損(Tal1 KO)させる。この ES 細胞で脾臓を欠損するマウス(Pdx1 KO)由来の胚盤胞に注入し補完する。この時、胚盤胞と ES 細胞のハプロタイプは互いにアロの関係(胚盤胞:H-2b、ES 細胞:H-2d)とする。出生したマウスは血糖値等で脾臓機能をモニターし、更に個体の生死、病理学的解析で脾臓の生着／拒絶を評価する。

仮に、この脾臓が拒絶された場合、胎仔期抗原暴露による免疫寛容獲得においては血液細胞が“抗原”として必須であったと考えられる。一方で脾臓が生着し続けた場合は、血液細胞は寛容獲得において必須ではないと判断する。

この実験系は、解析対象としたい細胞種を遺伝的に欠損する ES 細胞さえ準備できれば、どのような細胞種が重要なのかをつぶさに解析できる。例えば、血液及び血管を欠損する Flk-1 KO の ES 細胞を用いれば、血液及び血管細胞の免疫寛容獲得への寄与を検討することができる。寛容誘導に真に寄与する細胞種同定に向けて、種々の細胞の関与を検討する。

【結 果】

1. FoxN1 KO マウス ES 細胞株の樹立

本研究において、成熟胸腺上皮細胞を欠損する FoxN1 KO マウス ES 細胞は欠かすことのできない細胞材料である。点突然変異による終始コドン発生のため FoxN1 遺伝子を欠損する BALB/c-Nude マウス (H-2 ハプロタイプ d) から FoxN1 KO マウス ES 細胞株の樹立を試みた。当初、KO マウス同士による交配を実施していたが、妊娠がほとんど成立せず ES 細胞樹立に必要な受精卵が得られなかった。そこで交配方法を変更し、雌雄いずれかのマウスをヘテロとすることにより、交配が成立し、受精卵が得られるようになった。通常、4～8 細胞期胚で採卵し、*in vitro* 培養で胚盤胞まで発生させて ES 細胞の樹立を行うが、BALB/c-Nude マウス胚では B6 マウス胚などと比べて *in vitro* での発生スピードが遅く、胚盤胞まで発生させるのが困難であった。そこで、採卵時期を遅らせ、子宮灌流により胚盤胞を得ることとした。現在は順調に胚盤胞が得られるようになっており、本学動物実験施設の協力を得て、BALB/c-FoxN1 KO ES 細胞を樹立中である。ES 細胞樹立後、ゲノムシーケンスにより FoxN1 をホモで欠損する細胞株を選択する。

2. CRISPR/Cas9 によるゲノム編集細胞株作製技術の確立

CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術は本研究に欠かすことのできない技術基盤である。広く一般に普及している CRISPR/Cas9 システムでは、ゲノム二本鎖 DNA の切断とそれに伴う非相同末端連結 (のエラー) により生じるフレームシフト変異による遺伝子破壊を期待するものである。しかしこの方法の場合、1/3 の確率でインフレームの変異となり、結果として一部に欠損が生じるものの機能的には問題のないタンパク質を生成し、期待する遺伝子破壊効果を得られないケースがある。そこで本研究では、ドナーベクターの同時トランスフェクトにより効率よく遺伝子破壊を行う方法を選択した。ドナーベクターには、破壊したい遺伝子の相同配列および選択マーカーがコードされており、相同組換え修復の際のテンプレートとなり、遺伝子のノックインが可能である。実際にこの方法にてマウス細胞株における分泌タンパク質 A について遺伝子破壊を実施したところ、タンパク質レベルで欠損させることに成功した。

今後、この方法を用いて BALB/c-FoxN1 KO ES 細胞に Tal1 をはじめとする遺伝子破壊を実施し、胎仔期免疫寛容誘導に重要な遺伝子群の同定を行う。

【考 察】

BALB/c マウスからの ES 細胞樹立は困難を伴うことが知られているように⁴、本研究でも BALB/c マウスと同系統に由来する BALB/c-Nude マウス ES 細胞の樹立に苦慮した。一方で困難ではあるが樹立は可能とされており⁴、引き続き BALB/c-Nude マウス ES 細胞の樹立を試みる。CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子破壊技術については既に確立した。BALB/c-Nude マウス ES 細胞が樹立され次第、各種遺伝子破壊を行い、胎仔期免疫寛容誘導にかかわる責任細胞、責任遺伝子の同定を実行可能と期待する。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究は、胎児期免疫寛容誘導機構の解明に焦点を当てたものであるが、「免疫寛容」はさまざまな疾病や病態と関連がある現象である。よって、本研究の成果は移植医療のみならず免疫寛容機構の破綻ともいえる自己免疫疾患やがんの治療法の開発にも役立つ可能性があると期待している。

【参考・引用文献】

1. Billingham R et al., 'Actively Acquired Tolerance' of Foreign Cells. *Nature* 172, 603–606. 1953
2. Kobayashi T et al., Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell*. 142(5), 787-99. 2010
3. Kinutani M et al., Avian spinal cord chimeras. I. Hatching ability and posthatching survival in homo- and heterospecific

chimeras. Dev Biol. 111(1), 243-55. 1985

4. Umehara H et al., Efficient Derivation of Embryonic Stem Cells by Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3. Stem cells. 25(11), 2705-2711, 2007