

ヒト自然免疫型 T 細胞の大量産生の試み

杉本智恵

北海道大学大学院医学研究科 衛生学・細胞予防医学分野

【研究の背景】

粘液関連インバリアント T(MAIT) 細胞は自然免疫型 T 細胞のひとつであり、ヒト末梢血・粘膜に多く存在する。MAIT 細胞は獲得免疫を司る通常型 T 細胞とは異なり、限られたレパトアの T 細胞受容体(インバリアント TCR)を発現し、MHC クラス I 様分子である MR1 に抗原提示された細菌由来のビタミン B2 代謝中間体を認識する。近年の研究から MAIT 細胞は細菌や真菌の感染制御に重要な役割があるだけでなく、さまざまな自己免疫疾患等の発症にも関与することも明らかにされつつある。また MAIT 細胞は加齢とともに減少することも示されており、高齢者における免疫低下にも関連することが示唆されている。このため MAIT 細胞の生理的意義、病態との関与を調べることは、新規の疾患の診断法、予防法、そして治療法を確立する上で非常に重要である。ところが MAIT 細胞は *in vitro* において一般的な T 細胞が増殖する刺激では容易には増殖しないことからその解析は容易ではない。我々はヒト臍帯血 MAIT 細胞由来 iPS 細胞を樹立し、その iPS 細胞から MAIT 細胞へと選択的に分化誘導することに成功した。iPS/ES 細胞から血球系前駆細胞への分化誘導にはフィーダー細胞を用いる方法や胚様体を形成させる方法が一般的である。しかしこれら従来の方法は技術的にコントロールすることが難しく、分化効率・再現性も著しく悪い。そこで本研究では細胞外マトリックスタンパクを用い、サイトカインのみで T 細胞前駆細胞に分化させることを試みた。

【目的】

iPS/ES 細胞から血球系前駆細胞への分化誘導は一般にマウス骨髄ストローマ細胞である OP9 細胞をフィーダー細胞として用いる方法、embryoid body(EB)を形成させる方法が汎用される。しかしこれら方法は技術的に制御が難しく、分化効率・再現性も悪い。そこで細胞外マトリックスタンパクを固相化して iPS 細胞を単細胞で播種し、サイトカインのみの添加で T 細胞前駆細胞に分化させることを検討する。

【方 法】

- 1) 細胞外マトリックスの選定: 胚発生の血球・血管内皮系分化過程で発現が見られる種々の細胞外マトリックスタンパクを細胞培養プレートにコーティングして iPS 細胞を播種し、iPS 細胞からの分化能(血液幹細胞マーカー CD34 の発現)を評価することにより、最適なマトリックスを選定した。
- 2) サイトカインの条件検討: 血球系前駆細胞への分化誘導のためのサイトカインとして BMP-4、bFGF、CSF、VEGF、Flt-3L、などが使用されるが、これら因子の添加時期、期間、組み合わせ等の最適条件を検討した。
- 3) 細胞群のフェノタイプと T 細胞誘導効率:iPS 細胞から分化した血球系前駆細胞の細胞表面マーカーの発現を解析し、どのような細胞群が MAIT 細胞への分化能を有するか検討した。

【結 果】

- 1) Geltrex, collagen IV、vitronectin、tenascin C、SK-MEL28 培養上清から精製した細胞外マトリックスのそれぞれ

を細胞培養プレートに固相化して iPS 細胞を播種し、血球系前駆細胞(CD34 陽性細胞)への分化効率を比較検討した。SK-MEL28 培養上清には本研究で調べた細胞外マトリックスの中で、最も優れた CD34 陽性細胞誘導能を持つ成分が含まれていることがわかった。

- 2) iPS 細胞を播種後、BMP4/bFGF 添加培地で 2 日間、bFGF/VEGF 添加培地で 2 日間の低酸素下での培養によって中胚葉に分化誘導し、4~8 日目まで血球系前駆細胞を誘導するサイトカイン類(IL-3、IL-6、SCF、TPO)を添加することにより効率に CD34 陽性細胞を誘導できることがわかった。
- 3) OP9 細胞系によって誘導された血球系前駆細胞のうち CD34⁺CD43⁺細胞が T 細胞に分化することがこれまでに報告されているが、細胞外マトリックスを用いたフィーダーフリー分化系で得られた血球系前駆細胞では必ずしも CD43 陽性である必要はなく、CD34⁺CD43⁻細胞も OP9 細胞で得られた CD34⁺CD43⁺細胞と同等に MAIT 細胞へ分化した。

【考 察】

本研究によりフィーダー細胞を用いた分化システムの 100 倍以上の規模で iPS 細胞から CD34 陽性細胞を產生することができ、この CD4 陽性細胞から MAIT 細胞を分化誘導することが可能であった。フィーダーフリー分化系は化学的組成の明らかな試薬のみで血球系前駆細胞を誘導できる点、細胞回収が簡便である点でもフィーダー細胞系より優れていると考えられた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究で確立を目指した血球系前駆細胞の誘導方法は MAIT 細胞だけでなく、すべての血球系細胞を iPS/ES 細胞から安定的にかつ大量に产生する技術も包括する。MAIT 細胞はマウスにおいてほとんど検出できないことから、トランスジェニックやノックアウトマウスでの MAIT 細胞の免疫学・細胞生物学的な解析は進んでいない。本研究の成果は MAIT 細胞の機能解析と MAIT 細胞移入による新たなヒト化マウスの作製、このマウスを用いた疾患モデル確立等、従来では不可能であったヒト MAIT 細胞研究が可能になる。これにより、多くのヒト炎症性疾患(細菌感染症、自己免疫疾患、代謝性疾患)における新規メカニズムによる薬剤・治療法開発に貢献することが期待される。また、MAIT 細胞の大量產生系の確立により、フィーダー細胞を用いた分化システムの 100 倍以上の規模で MAIT 細胞を作り出すことが可能になる。これは MAIT 細胞をテイラーメイドで产生し、将来的な細胞治療にも応用可能である。

【参考・引用文献】

Wakao H, Yoshikiyo K, Koshimizu U, Furukawa T, Enomoto K, Matsunaga T, Tanaka T, Yasutomi Y, Yamada T, Minakami H, Tanaka J, Oda A, Sasaki T, Wakao R, Lantz O, Udagawa T, Sekiya Y, Higuchi K, Harada N, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Fujita H. Expansion of functional human mucosal-associated invariant T cells via reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell Stem Cell*, 2013, 12: 546-58

Sugimoto C, Fujita H, Wakao H. Mucosal-associated invariant T cells from induced pluripotent stem cells: A novel approach for modeling human diseases. *World Journal of Stem Cells*, 2016, 8: 158-169.