

論文の内容の要旨

論文題目 異種大型動物におけるサル ES 細胞移植後の長期肉眼的生着

指導教員 岩中 督 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 田中裕次郎

組織および細胞移植の発展においてドナー不足が大きな障害となっている。胚性幹細胞（ES 細胞）は無限増殖力と多分化能を持ち合わせており、十分な移植用組織・細胞を供給するソースとして期待されている。また、ES 細胞は分化した後でも免疫原性が低く、移植した際の拒絶反応もより起こりにくいとされており、移植用組織・細胞として用いる際に有利だと考えられる。ヒト ES 細胞は 1998 年に初めて樹立が報告されたが、現在のところ、試験管内で特定の細胞に分化させる技術は未だ限られたものである。そこで、動物の生体内に未分化ヒト ES 細胞を移植して分化した細胞を得ることも一つの方法となりうると考えた。実際、げっ歯類や霊長類で ES 細胞の同種移植を行うと、移植した部位に応じた分化がみられることが過去に証明されている。このことから移植部位の微小環境が ES 細胞の分化に重要な役割を果たし、ヒト ES 細胞を特定の細胞に分化させうることが期待された。しかし、分化した細胞を得るために未分化ヒ

ト ES 細胞をヒトに移植するわけにはいかないので、異種動物に移植することを考えなくてはならない。その際に、異種間移植に見られる強い免疫拒絶、および異種間の微小環境のミスマッチが大きな問題になると考えられる。

将来の臨床応用を考え、大量の移植用組織・細胞を得るためにはヒト ES 細胞を大動物に移植するのがよいと考えられるが、成体の異種大動物にヒト ES 細胞が生着したという報告はほとんどない。一方、動物胎仔は在胎早期には免疫系が未熟で移植片を拒絶できないと考えられている。ヒト造血幹細胞を異種動物胎仔へ移植すると出生時にヒト/動物造血キメラが作成されることが報告されているが、霊長類、ブタ、マウスなどと比較してヒツジでは高いキメラ率が得られており、ヒツジにはヒト幹細胞が生着しやすい環境がある可能性も示唆される。また、胎仔期の生体内の環境はサイトカインの濃度なども含めて急速な成長と発達に適した微小環境となっているとされており、移植した ES 細胞の増殖、分化に都合のよい環境を提供してくれる可能性もある。

ヒト ES 細胞を異種大動物の胎仔に移植するにはクリアすべき倫理的な問題もあり困難であるので、この研究ではヒト ES 細胞と増殖、分化の条件がほぼ同じカニクイザル ES 細胞をヒツジ胎仔皮下に移植して、その生着および組織形成がみられるかを調べることにした。同時に移植した ES 細胞に対して免疫反応が起こるのか可能な限り検索した。

未分化のカニクイザル ES 細胞を在胎 43–67 日のヒツジ胎仔の皮下へ移植したところ、出生時（移植後 3 ヶ月）に移植部位に一致して ES 細胞由来の腫瘍の形成が 15 頭中 4 頭（36 箇所中 6 箇所）でみられた。その内訳をみると在胎 50 日以前に 1×10^6 個の細胞を移植しないと腫瘍が形成されなかったことが分かった。

生着したすべてのヒツジに対して、腫瘍（グラフト）を生後 1.5 ヶ月までに採取して調べたところ、いずれも 3 胚葉性を示し、神経上皮、軟骨、腺管上皮といった成熟した組織構造をもっていた。

グラフトの細胞は未分化性、多分化性を示す ES 細胞マーカー Oct-3 がすべて陰性であり、MHC class I の発現がみられる細胞も多数存在し、分化した細胞が得られていることが示された。

次に、ヒツジ胎仔の免疫反応を調べるために GFP を恒常的に発現している ES 細胞を 1 ヶ所あたり 6×10^6 個ずつ在胎 48(<50)日および 60(>50)日のヒツジ胎仔の皮下に移植して、移植後 5 日および 2 週間後における移植細胞の存在と免疫反応を組織学的に検討した。

在胎 48 日で移植した群では、移植 5 日後には移植細胞は管腔構造を形成しており、免疫細胞の浸潤はみられなかった。移植後 2 週間では細胞数が増え、移植細胞は多数の CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ T 細胞に囲まれ、少数の B 細胞の浸潤はみられたが、マクロファージの浸潤はみられなかった。

在胎 60 日で移植した群では、移植 5 日後には移植細胞は管腔構造を形成しており、免疫細胞の浸潤はやはりみられなかった。ところが、移植後 2 週間では移植した ES 細胞は検出されなかった。その代わりに、T 細胞、B 細胞、マクロファージの浸潤している肉芽組織を認めた。このことから在胎 60 日で移植すると、2 週間後には移植した細胞は排除されてしまうことが分かった。

生後のグラフトでは、多数の T 細胞、および少数ながら B 細胞・マクロファージ・好中球の浸潤が認められた。また、移植した ES 細胞は生後 6 ヶ月以上（移植後 9 ヶ月以上）生着が認められたが、次第に宿主由来の肉芽に置き換わっていくことが分かった。

ここで、在胎 48 日と 60 日での移植の違いとして、2 週間後のマクロファ-

ジの浸潤の有無が挙げられる。成体での異種細胞の排除は初期には自然免疫 (innate immunity) が関与しているとされているが、この働きの有無が胎仔においても生着が可能かを決める要因の1つになっていると考えられる。

また、生着後に次第に排除されていることから獲得免疫が働いていることが考えられた。細胞性免疫を調べるために、出生した仔ヒツジ (生後 3 ヶ月) に対して、リンパ球混合試験を施行した。未分化 ES 細胞およびグラフト細胞に対する反応は ES 細胞生着群において ES 細胞非生着群および非移植群に比べて高く、このことは ES 細胞が生着したヒツジでは ES 細胞に対する細胞性免疫が起きていることを示している。一方、ES 細胞非生着群では、ES 細胞に対する記憶型の T 細胞が発達する前に拒絶してしまったことが示唆される。

液性免疫に関しては、在胎 60 日で ES 細胞を移植した場合には移植後 2 週間 (day 60+14) で ES 細胞に対する IgM が検出された。一方、生直後の仔ヒツジでは ES 細胞生着群すべてで ES 細胞に対する IgG が検出された。このことから、胎仔期から ES 細胞に対する液性免疫が生じていることが示された。

次に、免疫寛容が誘導されているかを調べるために、移植したのと同じ未分化 ES 細胞 1×10^7 個を ES 細胞生着群および非生着群の仔ヒツジの皮下に出生後 6 ヶ月以上経ってから追加移植し、3 ヶ月後に腫瘍の形成を調べた。ところが、いずれの仔ヒツジにおいても腫瘍の形成は認められなかった。このことから、ES 細胞が長期間にわたって肉眼的に生着しているにもかかわらず、ES 細胞に対する細胞性および液性免疫が働いており、免疫寛容は誘導されていなかったといえる。

それにもかかわらず、異種のヒツジという環境下で ES 細胞が長期間にわたって生着できたのには何らかの機構が働いていることが考えられた。在胎 48 日に移植した ES 細胞は 2 週間後に CD4⁺ T 細胞に囲まれながら、ほぼ整然とした管

腔構造を形成しており、この囲むように存在する T 細胞は 'peri-insulitis' にみられるものに類似しているのではないかと考えた。'peri-insulitis' とは血糖が正常化した non-obese diabetic (非肥満糖尿病) マウスにおいて、抑制性 T 細胞 (Treg) が膵島の周囲を取り囲むように存在している現象を呼んだものである。異種移植の系でも、新生仔のブタの胸腺を移植した無胸腺マウスでは宿主のマウス Treg がブタに対する免疫反応を抑制したことを示した報告がある。また、ヒト胎仔では在胎早期には Treg が高い割合で存在し、それが胎齢が進むにつれて下がり、出生時には成人の末梢血と同レベルになることが報告されている。さらに、ヒト胎仔の Treg は胎児期の未発達な T 細胞が自己または母由来の抗原に対して過剰な反応をするのを抑える働きをしていることがいわれている。これらのことから、在胎早期のヒツジ胎仔においても Treg が高い割合で存在し、移植後比較的初期には異種の ES 細胞に対する免疫反応を抑制していたという可能性は十分にある。

ヒツジにおいて Treg はまだ調べられていないが、転写因子の Foxp3 は Treg の最も特異的なマーカーの一つと考えられており、種間で相同性が高いことが知られているのでヒツジの *foxp3* に相当する配列をクローニングし、他の種の動物の Foxp3 と高い相同性があることが確認した(ヒトと 90%、マウスと 88%、ウシと 99%の相同性)。次に、ヒツジ *foxp3* に反応する Foxp3 抗体を用いて、在胎 48 日に移植した細胞を移植 2 週間後に取り囲んでいた T 細胞を染色したところ、半数以上が Foxp3 陽性であることが分かった。また、出生後に採取した腫瘍にみられた T 細胞のうち 10-20%が Foxp3 陽性であった。これらのことから、ヒツジ胎仔に移植した ES 細胞が長期間にわたって生着できたことに Treg が関与している可能性が十分あると考えられた。

今回の研究では、ヒツジに子宮内移植（胎仔移植）した異種霊長類 ES 細胞が分化し、長期間肉眼的に生着しうることを示した。今後、ヒツジ体内に霊長類の組織を十分量作るためには、追加移植に成功する必要があると考えられ、生後も Treg が異種免疫を抑制するように操作する、あるいは ES 細胞由来の造血キメラを構築し、免疫寛容を誘導するなどのさらなる工夫が必要である。

今回得られたカニクイザルの細胞は奇形種形成能を失っていると考えられ、安全性の観点からは臨床応用に一步近づいた細胞といえる。しかしながら、得られた細胞が機能をもつようにあるいは組織として働けるようにしないと臨床応用は難しい。移植した ES 細胞は移植部位の影響を受けつつ分化していくことが分かっており、移植部位の工夫が何らかの役に立つ可能性はある。また、ES 細胞に遺伝子導入を行ったり、移植前に初期分化させたりすることも役立つ可能性があり、今後の検討課題である。