



Title	Natural killer cells impede the engraftment of cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells in syngeneic mouse model
Author(s)	中村, 優貴
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76218
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 中村優貴	
論文審査担当者	(職) 氏 名 主 査 大阪大学教授 副 査 大阪大学教授 副 査 大阪大学教授 澤 芳 樹 熊 御 淳 坂 田 泰 史
	論文審査の結果の要旨 同種iPS細胞由来心筋細胞移植マウスモデルにおいてNK細胞の移植部位への浸潤を認め、移植後にNK細胞は活性化し、移植細胞の生着を阻害した。NK細胞活性化に関与するリガンド発現を探索した結果、iPS細胞由来心筋細胞上のClassical MHC class1は低発現であり、NK細胞の活性化リガンドの発現も認めた。またIFN-γ添加によりClassical MHC class1の発現は誘導された。iPS細胞由来心筋細胞とNK細胞を共培養した結果、iPS細胞由来心筋細胞のclassical MHC class1の発現誘導やNK細胞の活性化経路を阻害することでNK細胞による細胞障害性およびNK細胞活性が有意に抑制された。In vivoでもclassical MHC class1の発現を誘導したiPS細胞由来心筋細胞の移植またはマウスにCD226, NKG2Dに対する中和抗体を投与しNK細胞の活性化経路を阻害することで移植細胞のアポトーシスや移植部へのNK細胞浸潤が有意に抑制された。同種iPS細胞由来心筋細胞移植マウスモデルにおいて移植後にNK細胞が移植細胞の生着を阻害し、iPS細胞由来心筋細胞上のclassical MHC class1の低発現およびCD226とNKG2Dを介した活性化経路がこの免疫応答に関与していることが示された。 以上を踏まえた結果、申請者は学位の授与に値すると考えられる。

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	中村優貴
論文題名 Title	Natural killer cells impede the engraftment of cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells in syngeneic mouse model (iPS細胞由来心筋細胞移植後のNK細胞による自然免疫応答が移植細胞生着に及ぼす影響とそのメカニズムの検討)
論文の要旨 [目的 (Purpose)] iPS細胞由来心筋細胞移植は心筋細胞補充療法として期待され、その長期生着を得るためには移植後の拒絶反応の制御が重要である。しかし移植後拒絶反応としての自然免疫応答の詳細については未だ不明である。今回、同種iPS細胞由来心筋細胞移植マウスモデルにおいて移植後のNK細胞による免疫応答により移植したiPS細胞由来心筋細胞の生着が阻害され、NK細胞の活性を阻害することでその免疫応答が減弱すると仮説を立て検討した。 [方法 (Methods)] ・Luciferase遺伝子とDsRed遺伝子を導入したC57BL/6由来iPS細胞を心筋細胞に分化誘導した。 ・iPS細胞由来心筋細胞に発現するNK細胞関連リガンド：flow cytometryにて評価 (1) 抑制性リガンド；MHC class1, (2) 活性化リガンド；CD226リガンド(CD112, CD155), NKG2Dリガンド(Rae-1など) ・C57BL/6マウスにiPS細胞由来心筋細胞を皮下移植モデルを用いて下記を評価した(同種移植モデル)。 (1) 移植後の免疫応答の評価(移植後4日目)：移植部の免疫染色(リンパ球；CD3, マクロファージ；CD68, 好中球；Myeloperoxidase, NK細胞；CD335) (2) 移植細胞の生着の定量評価(移植後7日間)：ルシフェラーゼ・アッセイ(NKC depletion群(NK細胞をマウス体内から除去) vs control群, それぞれn=6) (3) 移植後の脾臓内のNK細胞の活性評価(移植後7日目)：flow cytometry(活性化マーカー；CD107a, Granzyme B) ・in vitro細胞障害性試験(iPS細胞由来心筋細胞とNK細胞を共培養) (1) 細胞障害の定量評価：細胞障害によりiPS細胞由来心筋細胞から培養上清中に放出されるLDH酵素活性を測定 (2) NK細胞活性の定量評価：ELISA(培養上清内のGranzyme B濃度を測定) ・in vivo細胞障害性試験(移植後7日目の移植部の免疫組織染色) (1) 細胞障害の定量評価：移植細胞の死細胞数(Annexin V) (2) NK細胞活性の定量評価：NK細胞浸潤(CD335)(cells/mm²) [結果 (Results)] 分化誘導産物のトロポニンT陽性率は92.9%。In vivo移植後4日目の免疫組織染色では移植部位へのNK細胞の集積を認めた。移植後7日目の生着率はNKC depletion群で83±16%, Control群で44±8%(p<0.05)。移植前後でマウスの脾臓内のNK細胞におけるCD107aの発現はそれぞれ7.2±2.1%と37.4±3.5%(p<0.05)であり、NK細胞内に発現しているGranzyme Bは32.6±1.8%と62.9±3.1%(p<0.05)であった。iPS細胞由来心筋細胞のClassical MHC class1の発現は低発現であったもののIFN-γ添加によりこれらが誘導された(H2Db: 2.9%→93.7%, H2Kb: 1.3%→90.7%)。さらに活性化リガンドの発現も認めた(CD112: 27.7%, CD155: 24.3%, Rae-1: 12.0%)。In vitro細胞障害性試験ではIFN-γ添加によるiPS細胞由来心筋細胞上のMHC class1の誘導や抗CD226抗体と抗NKG2D抗体を加えることでNK細胞の活性およびNK細胞による細胞障害が有意に抑制された。またin vivo細胞障害性試験においてもMHC class1を誘導したiPS細胞由来心筋細胞の移植やマウスへの中和抗体の投与により移植部位へのNK細胞浸潤や移植細胞のアポトーシスが有意に抑制された。 [総括 (Conclusion)] 同種iPS細胞由来心筋細胞移植マウスモデルにおいて移植後のNK細胞による自然免疫応答が誘導され移植細胞の生着が阻害され、iPS細胞由来心筋細胞上のclassical MHC class1の発現誘導やCD226およびNKG2Dを介した活性化経路の阻害によりNK細胞による免疫応答が減弱した。	