

京都大学	博士 (医科学)	氏名	鈴木大助
論文題目	<p>iPSC-derived platelets depleted of HLA class-I are inert to anti-HLA class-I and NK cell immunity HLA クラス I を欠失させた iPS 細胞由来血小板は、抗 HLA クラス I 抗体と NK 細胞による免疫機構を回避する</p>		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>輸血のための血小板製剤は献血によって賄われているが、需給バランスの維持には多大な労力が必要である。また、妊娠や血小板輸血を受けた患者の一定数は自己と異なる HLA クラス I に対する抗体が産生されることで血小板輸血不応に陥るため、HLA 型を適合させた血小板輸血が必要となるが、供給や稀少型の対応に困難を伴う。</p> <p>献血によらない新規血小板産生システムとして、iPS 細胞から巨核球を分化誘導しつつ薬剤制御性の 3 遺伝子を導入する手法により、増殖と血小板産生の任意切替が可能な巨核球細胞株が樹立された。一方で、血小板輸血不応を回避するためには幅広い HLA 型の巨核球株を用意する必要があり、血小板の HLA クラス I を欠失させる戦略が提唱されている。HLA 欠失血小板は、抗体による排除を回避でき、HLA 型を合致させる必要がないため幅広い患者に対して使用可能な万能性を有する。一方で、HLA は NK 細胞の活性化抑制因子であり、実際にウイルス感染細胞や腫瘍細胞のような発現の低下した細胞は NK 細胞に攻撃されるが、HLA 欠失血小板を輸血しても NK 細胞に拒絶されないかの検証は未だなされていない。</p> <p>そこで、HLA 欠失血小板の NK 細胞を含めた免疫原性の検証のため、HLA クラス I の構成分子である $\beta 2$ マイクログロブリンをノックアウトすることで得られた HLA 欠失巨核球細胞株から誘導した血小板を用いて解析を行った。形態学的所見、品質、機能面では HLA 欠失血小板は、野生型血小板と比較して同等であった。健常人ボランティアの血液から単離した NK 細胞との共培養では、HLA 発現が欠失している K562 白血病細胞株は攻撃活性の指標である CD107a 発現を上昇させたが、iPS 由来血小板は HLA の有無によらず CD107a 発現の上昇を来さなかった。他の活性化指標であるインターフェロンの産生も見られず、血小板側のダメージ指標であるアネキシン V 結合の上昇も見られなかったことから、血小板は NK 細胞に攻撃されないことが示唆された。</p> <p>HLA を欠失しても NK 細胞に攻撃されない理由の解明のため血小板表面の分子の発現を解析したところ、主要な抑制分子の発現は見られなかったが、K562 細胞では見られた NK 細胞を活性化する DNAM-1 のリガンド分子 CD112 や CD155、あるいは NKp30 のリガンド分子 B7H6 の発現が見られず、血小板は NK 細胞を積極的に抑制することはないものの、活性化もしないことが一因と考えられた。</p> <p>次に、HLA 欠失血小板が生体内で NK 細胞にも攻撃されずに循環可能かを検証するため、免疫不全マウスをベースにヒト造血系サイトカインを遺伝子導入した MSTRG マウスに対してヒト臍帯血 CD34 細胞を移植し、さらにヒト IL-15/IL-15 レセプター α を投与することで NK 細胞を含むヒト造血系の再構成を行ったマウスモデルをまず作出した。このマウスに HLA 欠失型と野生型の血小板を等量混合して投与したところ、二つの血小板の比率は一定であった。一方、血小板と異なる血球系細胞の投与では HLA 欠失型が拒絶されたので、このモデルマウスでは NK 細胞が HLA 欠失細胞を攻撃して拒絶するものの、血小板は攻撃されないことが示された。最後に、抗 HLA 抗体を投与し血小板輸血不応症の状態を再現したマウスに対して再度血小板の循環実験を行ったところ、投与 30 分後から野生型の比率が減少し、3 時間後以降は HLA 欠失型のみが循環した。これらは、HLA 欠失血小板は高い NK 細胞数が保たれている免疫応答状態や、抗 HLA 抗体によって起こる血小板輸血不応症の状態でも有効であることを示唆した。</p> <p>以上の知見は、iPS 細胞由来 HLA 欠失血小板が安定供給可能かつ万人に使用可能な血小板製剤として使用できる可能性を示した概念実証(proof-of-concept)となる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

血小板輸血は現代医療に必須の治療であるが、輸血される患者の一定数は自己と異なる HLA クラス I に対する抗体による血小板輸血不応に陥る。HLA クラス I を欠失させて体外で製造する血小板はこの問題を回避できると提唱されているが、HLA クラス I 発現の減少した細胞に対する攻撃活性を持つ NK 細胞との免疫反応は未だ明らかにされていない。そこで、iPS 細胞由来巨核球細胞株に対して HLA クラス I の構成分子である $\beta 2$ マイクログロブリンをノックアウトすることで得た、iPS 細胞由来 HLA クラス I 欠失血小板を用いてこの免疫原性の検証を行った。血小板と NK 細胞の共培養実験において、NK 細胞は攻撃活性を示さず、血小板も細胞ダメージは認めなかった。血小板表面分子を調べたところ、NK 細胞を活性化する主要なリガンド分子が発現していなかった。次にヒト NK 細胞を含めたヒト血球が再構成されたヒト化マウスを樹立し、HLA クラス I 欠失血小板を輸血したところ野生型血小板と同等の循環動態を示した。また、血小板輸血不応を模した抗 HLA クラス I 抗体が循環したマウスでは HLA クラス I 欠失血小板のみが循環した。以上の研究は、HLA クラス I 欠失血小板に対する NK 細胞の免疫反応の解明に貢献し、実用化の概念実証となり、将来の医療に寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士 (医科学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 2 年 3 月 26 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降