

田上幸憲 論文内容の要旨

主 論 文

Timing of Mesenchymal Stromal Cell Therapy Defines its Immunosuppressive Effects in a Rat Lung Transplantation Model

ラット肺移植モデルにおける間葉系幹細胞の投与時期による免疫抑制効果の検証

田上幸憲, 土谷智史, 宮崎拓郎, 岩竹真弓, 渡邊洋之助, 湯川 博, 佐藤和秀, 畑地 豪, 下山孝一郎, 松本桂太郎, 土肥良一郎, 朝重耕一, 永安 武

Cell Transplantation, 32, 2023,
doi: 10.1177/09636897231207177

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員: 池松和哉 教授)

緒言

肺移植は呼吸不全に対する現時点での最終的な治療法である。移植後は、拒絶反応を予防するために生涯にわたり免疫抑制剤投与が必要だが、腎機能障害や感染症、二次癌の発生等の有害事象を引き起こす。そのため免疫抑制剤の減量や中止が可能になれば、移植患者には大きな恩恵となる。近年間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stromal Cell: MSC) が分泌する種々の液性因子の働きや抗炎症作用による免疫抑制効果の臓器移植への応用が報告されている。腎臓や心臓移植の動物実験では、MSC の移植前の投与で拒絶反応を軽減したと報告されている。一方で肺移植では、MSC の最適な投与時期は分かっていない。本研究では、ラット肺移植モデルを用いて MSC 投与時期の違いによる免疫抑制効果を比較・検証した。

対象と方法

Lewis ラットから自己脂肪由来 MSC (Adipose-derived MSC: ADMSC) を作成し、以下の実験に用いた。

1. Mixed Lymphocyte Reaction (MLR): ADMSC の免疫抑制効果を in vitro で確認するため、Lewis ラットと Brown Norway ラットの脾細胞を共培養し、ADMSC の有無にて評価を行った。
2. ADMSC の体内分布評価: ADMSC の体内分布の評価を行うため、量子ドットで標識した ADMSC を頸静脈から投与した。
3. ラット肺移植モデル作成/実験デザイン: ドナーの 8-15 週齢の雄の Brown

Norway ラットの左肺を、レシピエントの 8-15 週齢の雄の Lewis ラットの左肺に移植し、ラット肺移植モデルを作成した。実験群として、移植以外無治療のコントロール群(C 群)、移植後のタクロリムス半量投与(0.5mg/kg)のみのタクロリムス群(T 群)、移植前日に ADMSC (1×10^6) を頸静脈投与する移植前投与群(PreTx 群)、移植直後に ADMSC (1×10^6) を頸静脈投与する移植後投与群(PostTx 群)の 4 群とし、移植後 3, 7, 10 日目(各群 n=4)に安楽死させ、下記内容を比較検討した。ADMSC を投与した両群ではタクロリムス半量投与も併用した。

- 1) 肉眼・組織学的拒絶所見の検討：肉眼/組織所見、拒絶スコアを用いた比較
- 2) グラフト肺の免疫組織学的検討：抗 CD68, 抗 CCR7, 抗 CD163, 抗 FoxP3, 抗 IL-17A, 抗 CD4 抗体を用いた免疫染色
- 3) レシピエント血清中サイトカインの検討：ELISA 法で IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , IL-17A, IL-10 を解析
- 4) グラフト肺、血清、脾臓中の Treg の検討：フローサイトメトリーで移植肺中、血清中、脾臓中の FoxP3 陽性細胞の割合を解析

結果

- ・ MLR において、ADMSC を追加して共培養した場合にのみ T 細胞の増殖を抑制し ADMSC の免疫抑制効果が確認された。
- ・ 頸静脈投与した ADMSC は、投与後 1 日目に肺と肝臓に取り込まれた。肺移植モデルでは、PostTx 群で ADMSC はグラフト肺へ多く取り込まれたが、PreTx 群ではグラフト肺には殆ど認められなかった。
- ・ 肉眼的、組織学的比較では、PreTx 群と PostTx 群の両群で拒絶反応の軽減を認めたが、拒絶スコアは PostTx 群で最も低値であった。
- ・ PreTx 群と PostTx 群の両群で、炎症性サブタイプの M1 マクロファージのマーカーの CCR7 陽性細胞の減少、抗炎症性サブタイプの M2 マクロファージのマーカーの CD163 陽性細胞、免疫抑制細胞である Treg のマーカーである FoxP3 陽性細胞が増加した。
- ・ PreTx 群では、PostTx 群及び T 群と比較し血清中の炎症性サイトカインが低下した。
- ・ PostTx 群では、PreTx 群と比較しグラフト肺中の Treg 細胞が優位に増加したが、血清中、脾臓中の Treg 細胞に差は認めなかった。

考察

本研究では腎臓や心臓移植とは異なり、肺移植では移植後に投与された ADMSC が移植肺に蓄積し、移植肺内の Treg を有意に増加させることで、比較群の中で最大の免疫抑制効果を発揮した。この結果は、細胞治療において投与時期によりその体内局在が異なり、かつその免疫抑制効果にも影響を与えることを示した。今後 MSC を臨床応用するためには、臓器特性に応じて MSC の投与時期を適切に選択することが重要で、肺移植における MSC 投与という細胞治療を組み合わせた新しい免疫抑制プロトコル確立のための重要な知見となった。今後は、MSC の移植後頻回投与や移植前後投与など、新たな投与方法も検証し、安全な免疫抑制剤の減量を目指す予定である。