

渡邊洋之助 論文内容の要旨

主 論 文

Adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate rejection in a rat lung transplantation model

脂肪由来間葉系幹細胞はラット肺移植モデルにおいて拒絶を抑制する

渡邊洋之助, 土谷智史, 下山孝一郎, 清水 章,
秋田定伯, 湯川 博, 馬場嘉信, 永安 武

Journal of Surgical Research 227:17-27,2018

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: 永安 武 教授)

緒 言

難治性呼吸器疾患に対する肺移植の治療効果は実臨床で証明されているが、免疫抑制剤の副作用のコントロールと拒絶抑制のバランスの制御は容易ではない。近年、種々の疾患動物モデルにおいて、他の間葉系幹細胞と比して多量の細胞数の採取が容易とされる脂肪幹細胞(Adipose derived mesenchymal stem cell; ADMSC)の免疫抑制効果が報告されており、脂肪幹細胞が分泌する Hepatocyte Growth Factor (HGF) も、その免疫抑制効果が注目されている。今回、ラット肺移植モデルを用いて、脂肪幹細胞の肺移植時の拒絶抑制効果について検討した。

対象と方法

Brown Norway ラットをドナー、Lewis ラットをレシピエントとして、同所性アロ左肺移植を行った。移植に先んじ、レシピエントの腹部脂肪から脂肪幹細胞を採取・培養した。免疫抑制剤はタクロリムスを用いた。移植直後に自己の脂肪幹細胞(1.0×10^6)を経静脈的に投与した群(AD)、移植後から連日タクロリムス(0.5mg/kg)を投与した群(T 群)、移植直後に脂肪幹細胞を投与し、上記と同量のタクロリムスを連日投与した群(AT)、コントロールとして移植後無治療群(C)の、4 群を作成した。移植後(POD)1、3、7 日目に犠牲死させ、組織学的評価・血清中の HGF 濃度等を測定した。

組織学的評価

グラフト肺の拒絶の程度を、国際心肺移植学会基準 HE 染色と PCNA 免疫染色とで評価した。また、HGF の受容体である cMet のグラフト内における発現を、酵素抗体法およ

び蛍光免疫染色法により評価した。さらに、ADMSC のグラフト肺内の樹状細胞 (DC) への作用を検討するために、DC のマーカーである OX-62 と cMet の二重染色、および DC の活性化のマーカーである CD40 の免疫染色を行った。

血清学的評価

T、AT 群レシピエントラットの POD 1、3、7 での血清を用いて ELISA 法による HGF の定量評価を行った。

その他の評価

単離・培養された ADMSC の、特徴的細胞表面マーカーをフローサイトメトリーで検証し、さらに専用分化培地を用いた ADMSC の多分化能への検証培養実験を行った。グラフト肺中の cMet の発現の評価をウエスタンブロット (WB) 法でも評価した。ADMSC を蛍光量子ドットで染色したうえで AT 群モデルに投与し、POD7 での組織内分布を検討した。

結 果

- ・ 単離・培養された ADMSC からは、CD44/CD73/CD90 陽性、CD11b/c/CD31/CD34/CD45 陰性という所見が確認され、骨芽細胞/軟骨細胞/脂肪細胞への多分化能も確認された。
- ・ ADMSC の投与単独では拒絶は抑制されず (AD 群)、T 群では中等度の拒絶が認められた。一方、AT 群において拒絶のスコアは他の群よりも有意に低い結果であった。また、AT 群において、PCNA スコアは T 群よりも有意に低い結果であった。
- ・ AT 群において、血中 HGF の値は、POD3、7 において T 群よりも有意に高い結果であった。
- ・ cMet の発現は、パラフィン検体での免疫染色では AT・T 群の両群において経時的に増大しており、WB 法による評価では AT 群において発現の増大がより認められた。蛍光免疫染色による評価では、POD7 の AT 群において cMet の発現がより増大しており、樹状細胞においても cMet の発現がより増大していた。一方、グラフトにおける CD40 の発現は AT 群でより低下していた。
- ・ 量子ドットで標識された ADMSC は、グラフトに主に集積しており、多臓器からは検出されなかった。

考 察

ADMSC 単独投与では拒絶は抑制されなかったが、タクロリムスと ADMSC 投与の併用群はタクロリムス単独群よりもより拒絶が抑制された。この結果は、我々の以前の報告で同量のタクロリムス単独投与では中等度の拒絶が認められたこと、他研究者によるこれまでの多くの報告でも、幹細胞投与と免疫抑制剤が併用されていたことと符号する結果であった。ADMSC から分泌されたと考えられる血中の HGF の経時的な上昇と、グラフト肺内、特に樹状細胞における cMet の発現亢進と CD40 の発現低下は、ADMSC による免疫抑制作用の機序の一つである可能性が示唆された。今回の結果からは、ADMSC 治療の併用により、より少ない量での免疫抑制剤投与で拒絶が抑制される可能性があり、臨床への応用が期待される。今後の課題として、さらなる機序解析や、ADMSC の複数回投与や投与する細胞量の増大を検討する必要があると考えられる。