

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09309

研究課題名(和文) 独自ラット肺移植モデルを用いた間葉系幹細胞による拒絶抑制法の開発

研究課題名(英文) Development of rejection control method by mesenchymal stem cells using original rat lung transplantation model

研究代表者

宮崎 拓郎 (MIYAZAKI, TAKURO)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：00584749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は間葉系幹細胞(MSC)の免疫抑制効果に注目した。動物実験で肝臓等ではMSC投与により持続的な免疫抑制効果を示し、免疫抑制剤の減量や免疫寛容状態も確立している。しかし、肺移植領域ではその検討は遅れているため、有効な幹細胞治療が確立されれば、肺移植後の拒絶反応の軽減と生存率の上昇、長期的な免疫抑制剤による副作用を軽減できる。幹細胞治療において最適な幹細胞ソースを見つけるため、レシピエント由来脂肪幹細胞、ドナー由来脂肪幹細胞、他科由来脂肪幹細胞の免疫抑制効果を比較し、明らかな有意な差は認めなかったが、より拒絶反応軽減傾向を認めたレシピエント由来幹細胞がより免疫抑制効果を発揮することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究によって、肺移植においては脂肪由来間葉系幹細胞の投与タイミングは移植直後の方が拒絶反応を軽減することが判明した。肺移植において間葉系幹細胞の投与タイミングの違いによる免疫抑制効果および拒絶反応の減弱効果を直接的に比較検討した研究は存在せず、臓器移植に間葉系幹細胞の免疫抑制効果を応用するにあたり重要な情報となる。臓器移植後の拒絶反応に対して間葉系幹細胞を使用し、肺移植後の予後の改善が期待できると共に、従来の免疫抑制剤の減量も可能であり、免疫抑制剤の有害事象を軽減することも期待される。結果的にレシピエントのQOLの改善、医療経済的に多大な利益をもたらす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have focused on the immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells (MSCs). MSCs have shown sustained immunosuppressive effects in the liver and other organs, and reductions in the dose of immunosuppressive agents and a state of immunological tolerance have also been established. However, in the area of lung transplantation (LTx), the study has lagged behind. If an effective stem cell therapy is established, it will reduce rejection and increase the survival rate after LTx, and reduce long-term side effects caused by immunosuppressive agents. To find the optimal stem cell source for stem cell therapy, we compared the immunosuppressive effects of recipient-derived adipose stem cells, donor-derived adipose stem cells, and adipose stem cells from other departments, and found no obvious significant difference, but recipient-derived stem cells, which showed a tendency to reduce rejection more. However, recipient-derived adipose stem cells showed more immunosuppressive effect.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：呼吸器外科学 脂肪肝細胞 拒絶反応

1. 研究開始当初の背景

動物実験や臨床研究において、臓器移植に間葉系幹細胞の免疫抑制効果を応用して、拒絶反応の減弱を認めたとする研究結果は報告されている。肺は高い抗原性から臓器移植後の拒絶反応のコントロールは難渋し、免疫抑制剤の多剤併用が必須である。したがって、間葉系幹細胞を使用した肺移植に関する研究も、他の臓器移植と比べ遅れており、不明な点が多い。当施設では前実験としてラットを用いた肺移植モデルにおいて、間葉系幹細胞を静脈投与し、免疫抑制剤を併用することで、拒絶反応を軽減することができたという結果を報告した。しかし、その効果は満足いくものではなく、間葉系幹細胞の細胞ソースや投与タイミング等不明な点が多く、さらなる研究が待たれる状況であった。将来的には、間葉系幹細胞を用いた細胞治療の最適なプロトコルを確立することが期待されている。

2. 研究の目的

間葉系幹細胞を臓器移植に応用する研究は、各臓器で始まっており、腎臓移植や心臓移植等では肺移植後よりも肺移植前に間葉系幹細胞を投与した方が、免疫抑制効果が高かったという研究が散見される。肺移植において肺移植前と肺移植後のどちらがより効果的に免疫抑制効果を発揮し、拒絶反応を軽減することができるのかを比較し、間葉系幹細胞の投与タイミングの違いによる投与後の体内分布と、それに伴った免疫抑制効果の違いを検証する目的で本研究を実施した。

3. 研究の方法

移植前にレシピエント由来脂肪幹細胞投与する群と、移植直後にレシピエント由来脂肪幹細胞投与する群とで、免疫抑制効果の比較を行う実験を実施した。具体的に、移植以外無治療の群(C群)、免疫抑制剤のみ使用する群(T群)、移植前に脂肪幹細胞を投与する群(PreTx群)、移植直後に脂肪幹細胞を投与する群(PostTx群)の4群を設定し、それぞれ移植3、7、10日目(各群n=4)に安楽死させ、肉眼的・組織学的評価にて拒絶反応の比較を行った。またグラフト肺組織の免疫染色、ELISAによる血清のサイトカイン値の測定、脾臓・血液・グラフト肺のフローサイトメトリーを行い、免疫抑制効果の評価を行った(図1)。

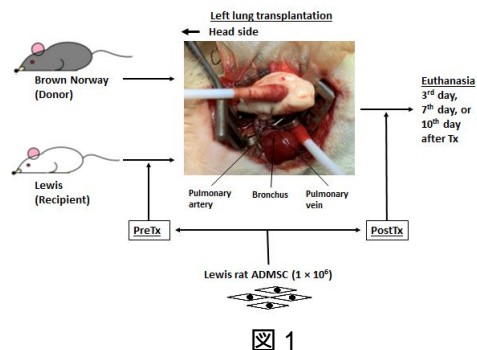


図 1

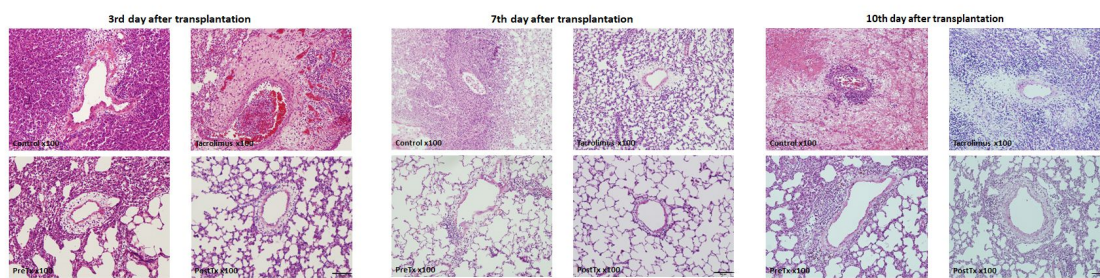
4. 研究成果

(1) 肉眼的・組織学的評価では移植前投与より移植直後投与の方が拒絶反応の軽減を認め(図2-4)、組織学的拒絶スコアでも移植後投与群が低い傾向を示した(図5)。

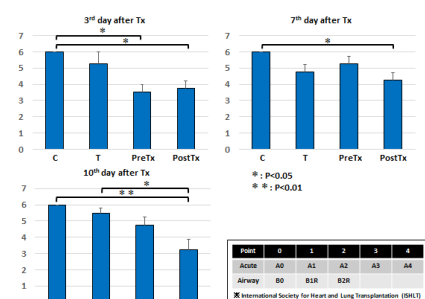
(図2)

(図3)

(図4)



(図5)

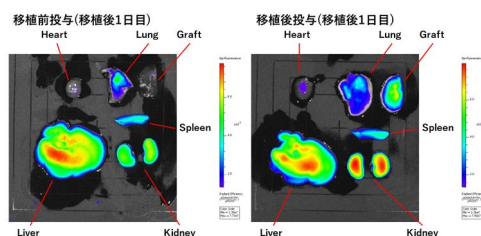


(2) 免疫抑制効果に違いが生じる要因として、投与後の脂肪幹細胞のラット体内における局在の

違いが影響していることに注目し、量子ドットで標識した脂肪幹細胞を頸静脈より投与し、その後の体内分布を IVIS イメージングで撮影した。結果は、投与された脂肪幹細胞は投与後、肺と肝臓に多く取り込まれ、時間経過と共に脾臓等の二次リンパ器官へも取り込まれることが判明した。移植後のモデル(移植 1 日目)でも IVIS イメージングで撮影したところ、移植前投与群では移植されたグラフト肺内に脂肪幹細胞はほとんど存在せず、移植直後投与群では移植されたグラフト肺内に多くの脂肪幹細胞を認めた(図 6)。直接的にグラフト肺内に脂肪幹細胞が取り込まれることが高い免疫抑制効果を発揮する要因である可能性が示唆された。

(図 6)

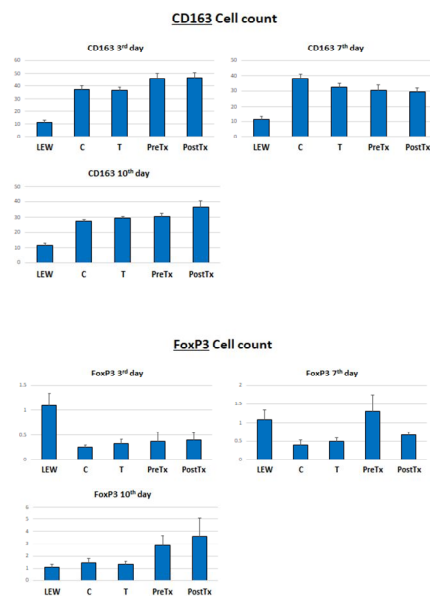
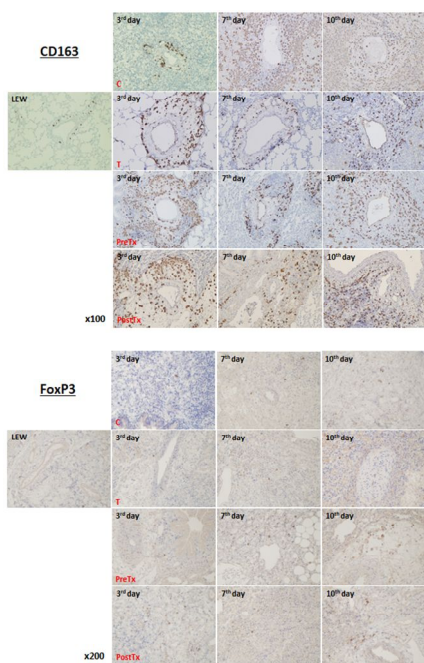
移植前・移植後投与後の ADMSC の体内分布



(3) 肺組織内の免疫細胞の免疫抑制性サブタイプへの分化に関して、グラフト肺組織の免疫染色で評価したが、M2 マクロファージ(CD163 陽性細胞)は各群で有意差は認めなかったが、移植 10 日目の移植前投与群、移植直後投与群の両群において Treg(FoxP3 陽性細胞)の増加を認め、移植直後投与群でより Treg が多い傾向であった(図 7, 8)。

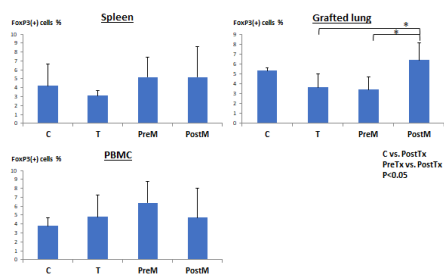
(図 7)

(図 8)



(4) 血清サイトカインの評価においては、移植直後投与群と比較し、移植前投与群でより、炎症性サイトカイン(IFN-、IL-6、TNF-等)の抑制傾向を認め、全身性の免疫制御は強い傾向がみられた。IL-10 に関しては各群間で差は認めなかった。Treg に注目し、レシピエントの脾臓、血液、グラフト肺内の CD4 細胞中の Treg 細胞の割合をフローサイトメトリーで測定したところ、脾臓内の Treg の割合は移植直後投与群も移植前日投与群も差がみられなかったが、グラフト肺内の Treg の割合は移植前投与群と比較し、移植直後投与群で有意に高い結果であり、対して血液中の Treg の割合は移植直後投与群と比較し、移植前投与群でより高い傾向であった(図 9)。

(図 9)



(5) 今回の結果で、肺移植においては脂肪幹細胞を移植直後に投与した方が免疫抑制効果を有効に発揮できることが判明した。それは投与後の体内分布が影響しており、脾臓等の二次リンパ器官へ脂肪幹細胞が取り込まれる移植前投与群は全身性の免疫制御が有効であるが、投与直後にグラフト肺内へ脂肪幹細胞が多く取り込まれる移植直後投与群では、さらにグラフト肺内で Treg が増加し、より局所での免疫抑制効果を発揮して拒絶反応を軽減していたことが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田上幸憲、土谷智史、岩竹真弓、吉元崇文、中司交明、高村祐磨、松本桂太郎、宮崎拓郎、朝重耕一、土肥良一郎、永安武
2. 発表標題 ラット肺移植モデルを用いた脂肪由来間葉系幹細胞の投与タイミングの違いによる免疫抑制効果の検討
3. 学会等名 第38回 日本肺および心肺移植研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田上幸憲、土谷智史、岩竹真弓、吉元崇文、中司交明、高村祐磨、松本桂太郎、宮崎拓郎、朝重耕一、土肥良一郎、永安武
2. 発表標題 ラット肺移植モデルを用いた脂肪由来間葉系幹細胞の投与タイミングの違いによる免疫抑制効果の検討
3. 学会等名 第47回 日本臓器保存生物医学学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	土肥 良一郎 (Doi Ryoichiro) (00817786)	長崎大学・病院(医学系)・助教 (17301)	
研究分担者	土谷 智史 (Tsuchiya Tomoshi) (30437884)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授 (17301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡邊 洋之助 (Wanatabe Hironosuke) (30457551)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員研究員 (17301)	
研究分担者	永安 武 (Nagayasu Takeshi) (80284686)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・教授 (17301)	
研究分担者	畑地 豪 (Hatachi Go) (80437889)	長崎大学・病院（医学系）・助教 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関