

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591510

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞を用いた移植免疫操作の開発と応用

研究課題名(英文) Invention of immunomodulation with mesenteric stem cells

研究代表者

鳴海 俊治 (NARUMI SHUNJI)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：90250612

研究成果の概要(和文)：マウスによる脂肪細胞由来の幹細胞(ASC)の分離精製に成功し、これから神経細胞、軟骨細胞、骨細胞への分化誘導を確認した。このASCを用いた免疫寛容誘導には肺塞栓が障害となり現在も至適投与量が決定されていない。一方、ASCをConcanavalin Aによる劇症肝炎誘発マウスに投与し、生存延長効果を見いだした。この生存延長効果は投与量依存であることも確認された。これによりASCの新たな臨床応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Adipose tissue derived stem cells (ASCs) were successfully separated and purified in mice. Potential of transforming to nerve cells, osteocytes, and cartilage cells were confirmed. Immunomodulation using ASCs have not been established due to pulmonary embolism. Instead, prolongation of survival of mice with Concanavalin A induced hepatitis were recognized by administration of ASCs. This effect was recognized as dose-related response. New clinical utility of ASC was invented.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：移植外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：免疫寛容、臓器移植、間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 臓器移植の最終目標は、免疫抑制剤を用いずに移植片を機能的に生着させることであり、それにより免疫抑制剤のもつ副作用・危険性、すなわち感染、発癌性、成長障害等を回避し、QOLを更に向上させることが可能であると考えられる。近年、臓器移植後の患者がドナーの抗原を移植臓器以外にも共存する microchimerism を獲得し、免疫抑制剤を中止することが可能であったとする報告が散見される。申請者自身も肝移植症例に

おいて、免疫抑制剤の中止・減量が可能であった症例に遭遇した。キメリズムではレシピエントはドナー特異的な免疫寛容状態にありながら、第三者を正常に拒絶する。このような状態を人為的に作成させることが可能であれば臓器移植の最終目標に大きく近づくと考えられる。

(2) 免疫寛容を誘導する目的でこれまでに骨髓移植と実質臓器との組み合わせによるキメリズムの作成が試みられてきたが、いず

れの報告にもドナーからの多量の骨髄採取が必要であり、生体移植は勿論、脳死移植においても臨床応用にはほど遠いものであった。そこで骨髄移植のみに頼らないキメリズムの誘導又は免疫寛容誘導操作の開発を目指すことが重要と考えた。

## 2. 研究の目的

- (1) 間葉系幹細胞の分離精製方法の確立
- (2) 間葉系幹細胞と骨髄および脾細胞の混入移入によるキメラの確立
- (3) キメラ成立後のドナー特異的免疫寛容の確認
- (4) 間葉系幹細胞の肝炎モデルに対する効果の確認。

## 3. 研究の方法

- (1) 脂肪由来間葉系幹細胞 (ASC) の分離、培養  
BALB/c マウスの皮下脂肪、内臓脂肪を摘出。0.2%コラゲナーゼで脂肪を消化した後培養。
- (2) 急性肝障害モデルマウスの作製  
BALB/c マウスに対し、ConcanavalinA を投与し急性肝障害を発症させた。

### (3) ASC の移入

肝障害を発症したマウスを2群に分け、MSC 投与群とPBS 投与群で生存率を比較。また肝逸脱酵素、各種サイトカインや肝組織を検討

## 4. 研究成果

- (1) 脂肪細胞由来の幹細胞の分離精製に成功した。すなわち脂肪を採取し、コラゲナーゼを用いて分離した後、IMDM 培地で継代培養することにより幹細胞を生成した(図1)。

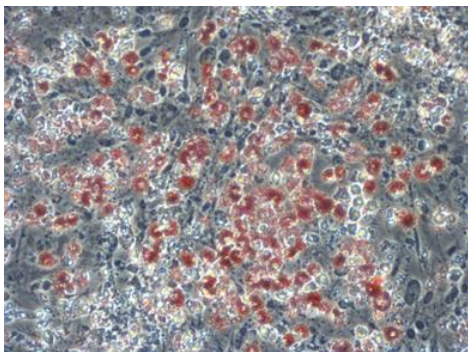


図1 生成された脂肪細胞由来幹細胞

この幹細胞にサイトカインを加えることで神経細胞、骨細胞(図2)、や軟骨細胞(図3)への分化誘導を確認した。

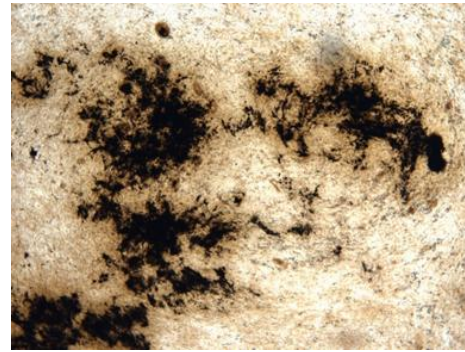


図2 骨細胞への分化)

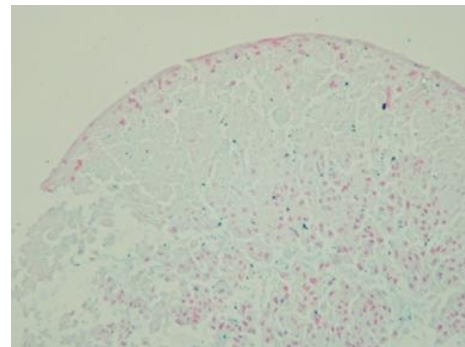


図3 軟骨細胞への分化

このASCと脾細胞との混合でより簡便な免疫寛容誘導法の確立の可能性を模索し、現在キメラが成立する条件を検討しているところである。しかしながら、この脂肪細胞由来幹細胞のサイズが大きいため肺塞栓を生じることが判明した。この幹細胞投与に於ける至適調整濃度が未だに決定されていない。腹腔内投与など、投与経路も模索している状況である。

- (2) 脂肪細胞由来の幹細胞を ConcanavalinA による劇症肝炎誘発マウスに投与し、生存延長効果を見いだした(図4)。

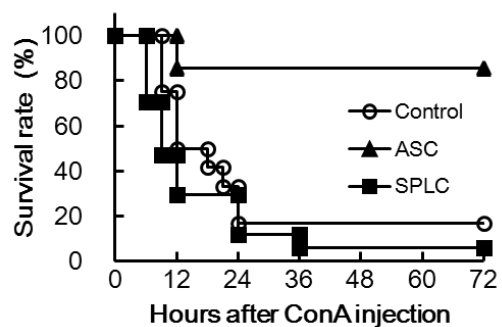


図4 劇症肝炎マウスにおけるASC投与の生存率におよぼす効果

この幹細胞による生存延長効果は投与量依

存であることも確認された(図 5)。

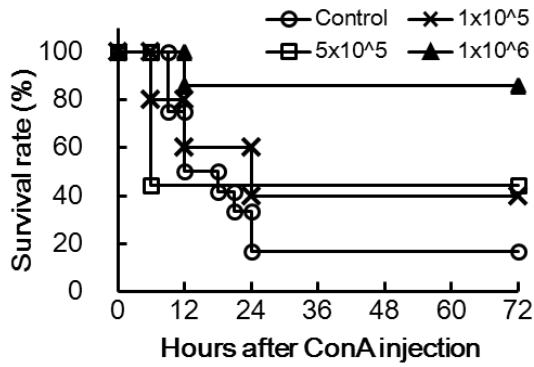


図 5 ASC の生存効果と投与量依存性

サイトカインを測定すると ASC 投与群において TNF- $\alpha$  (図 6)、IFN- $\gamma$  (図 7) が抑制されていることが確認され、炎症反応を押さえていることが証明された。

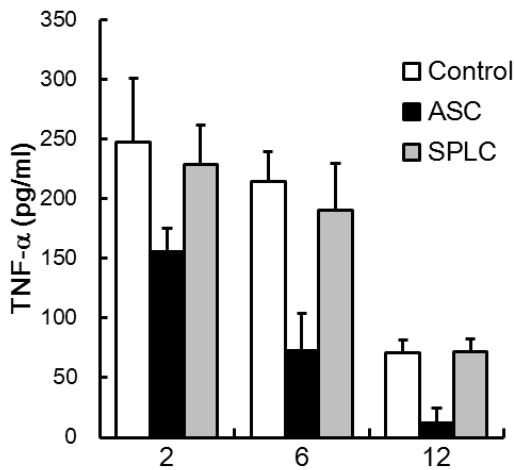


図 6 ASC 投与による TNF- $\alpha$  の抑制効果

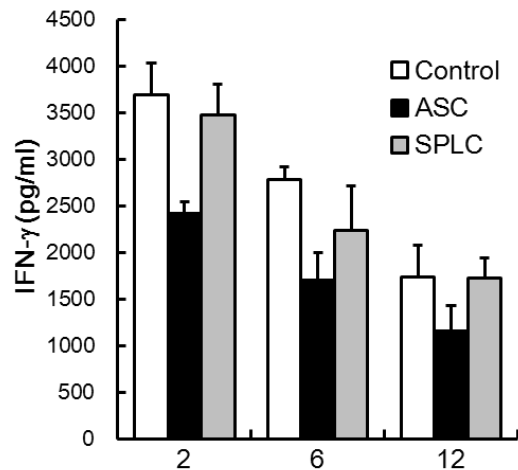


図 7 ASC 投与による IFN- $\gamma$  の抑制効果

組織学的にも ASC 投与群で肝細胞壊死が抑制されていることを確認した (図 8、9)

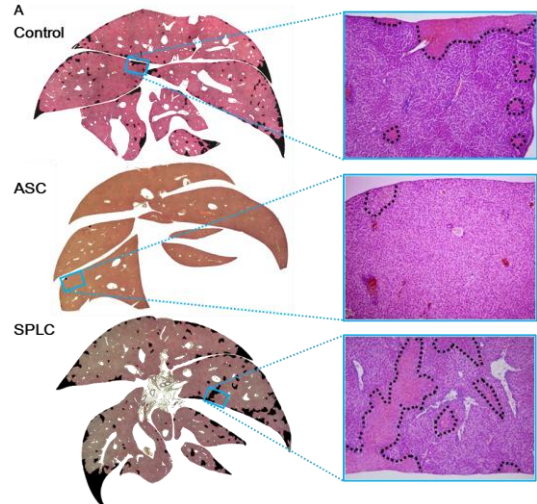


図 8 ASC 投与と劇症肝炎肝組織壊死

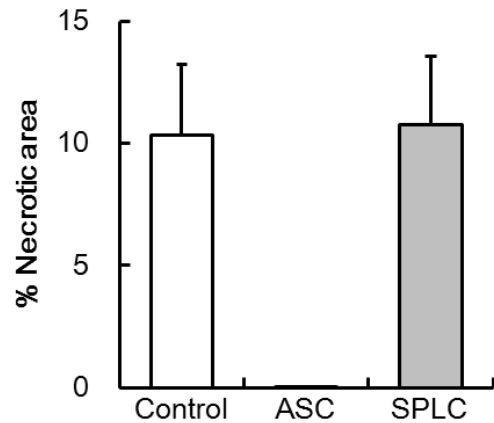


図 9 ASC 投与と劇症肝炎肝組織壊死面積

これにより脂肪細胞由来幹細胞の新たな臨床応用の道を開くことができる可能性が示唆された。この研究成果のインパクトは国際的にも評価されており、本研究は平成 23 年 5 月に Chicago で開催された Digestive Disease Week のポスターセッションに採択され、Poster of Distinction という分野に選出された。

今後この脂肪細胞由来幹細胞を他の細胞に分化誘導させる実験系を考慮中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

- ① 高橋研太郎、鳴海俊治、他 4 名、5 番目、血漿交換排液浄化循環透析(劇症肝炎)、日本アフェレシス学会雑誌、査読有り、2009、28、203-10
- ② Narumi S、他 6 名、Biliary hemorrhage

after removal of an expandable metallic stent during liver transplantation, Liver Transpl, 査読有り、2008、14、1578-81

- ③ Takahashi K, Narumi S、他7名、5番目 Plasma exchange-based plasma recycling dialysis system as an artificial liver support, Ther Apher Dial, 査読有り、2008、12、264-70
- ④ Toyoki Y, Narumi S、他5名、3番目、Timing for orthotopic liver transplantation in children with biliary atresia: a single-center experience, Transplant Proc, 査読有り、2008、40、2494-6
- ⑤ Nara M, Narumi S、他7名、4番目、Living donor liver transplantation for a child with recurrent pediatric adult-type hepatocellular carcinoma, Transplant Proc, 査読有り、2008、40、2828-9

[学会発表] (計 68 件)

- ① Norihito Kubo、Efficacy of adipose tissue-derived mesenchymal stem Cells for liver injury induced by Concanavalin A, DDW2011、2011年5月7日、Chicago
- ② 鳴海俊治、生体肝移植ドナーの保護における周術期環境把握の重要性、第46回日本移植学会総会、2010年10月22日、京都市
- ③ 久保寛仁、免疫寛容誘導におけるドナー脂肪組織由来間葉系幹細胞の有用性について、第46回日本移植学会総会、2010年10月22日、京都市
- ④ 藤田雄、透析導入となった急性拒絶反応にバシリキシマブが著効した1例、第46回日本移植学会総会、2010年10月22日、京都市
- ⑤ 鳴海俊治、生体移植ドナーの術前神経精神科学的評価の役割、第110回日本外科学会定期学術集会、2010年4月9日、名古屋市
- ⑥ 豊木嘉一、当科における小児肝移植における長期経過例の諸問題、第110回日本外科学会定期学術集会、2010年4月9日、名古屋市
- ⑦ 村上礼一、生体腎移植における術後移植腎機能の予測 実測 Ccr、Cockcroft、Sjoestroem、MDRD の比較、第12回東北移植研究会、2009年12月5日、仙台市

[図書] (計 1 件)

鳴海俊治他、日本臨牀社、肝・胆道系症候群

(第2版)その他の肝・胆道系疾患も含めて  
肝臓編(下)肝細胞癌以外の肝腫瘍 肝 yolk sac tumor、2010年、266-269

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鳴海 俊治 (NARUMI SHUNJI)  
弘前大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：90250612

### (2) 研究協力者

久保 寛仁 (KUBO NORITHITO)  
弘前大学・大学院医学研究科・大学院生