

機関番号：84503

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591753

研究課題名(和文) 複合組織同種移植における間葉系幹細胞を用いた免疫制御に関する研究

研究課題名(英文) Immunomodulation of mesenchymal stem cells in composite tissue allotransplantation

研究代表者

池口 良輔 (IKEGUCHI RYOSUKE)

財団法人 先端医療振興財団 先端医療センター 研究員

研究者番号：80437201

研究成果の概要(和文)：

近年、世界で30例以上の手同種移植成功例と数例の顔面同種移植成功例が報告されている。しかし、通常の免疫抑制療法には術後、感染や悪性腫瘍の発生など致命的な副作用があり、腎、肝、心肺移植などの生命維持器官の移植では、致命的副作用を伴う免疫抑制剤の使用は認められるが、生命維持器官でない四肢運動器官の同種移植では、免疫抑制剤の使用については議論の多いところである。

一方、骨髄間葉系幹細胞(MSC)は、骨、軟骨、脂肪組織などへの多分化能を有し、採取分離培養が比較的容易な細胞として知られているが、移植医療分野では同細胞の免疫調節効果を用いた治療法が近年報告されてきている。

今回我々は、免疫調節効果を持つ骨髄間葉系幹細胞を投与し、ラット四肢同種移植モデルでの拒絶反応の抑制効果を評価検討した。

Lewis ラットをレシピエントとし、Wistar ラットの後肢の同種移植を行い MSC( $2 \times 10^6$ )と1週間のFK506(0.2mg/kg/日)を投与したものをMSC群(n=6)、同様に同種移植を行いFK506(0.2mg/kg/日)のみを投与したものをFK群(n=6)、コントロール群として免疫抑制療法を行わない群(n=6)とLewisラット間の同系移植群(n=6)を作成した。移植肢の生着期間を組織学的に評価し、拒絶反応の程度を免疫学的に評価した。

移植肢の生着期間について、MSC群ではFK群に対して有意な生着期間の延長が認められ、組織学的にも拒絶反応が抑制されていた。免疫学的にもMSC群での拒絶反応抑制が確認された。

MSCには免疫反応抑制効果があり、それによりラット四肢同種移植モデルでの生着期間が延長したものと思われる。運動器官の同種移植など通常の免疫抑制剤の使用が致命的副作用のため制限されるような場合、細胞を用いた新たな免疫抑制療法として間葉系幹細胞を応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Hand transplantations have revolutionized the reconstruction field for patients with hand defects. However, immunosuppressants are essential for maintaining human hand transplant survival despite lethal side effects such as infections, drug toxicity and malignancies. Recent studies indicate that mesenchymal stem cells (MSCs) have some immunomodulatory properties to suppress T cell mediated responses that cause graft rejection. The purpose of this study is to evaluate the effect of intravenous donor MSC infusion for

immunomodulation in the rat composite tissue allotransplantation model.

Orthotopic rat hind limb transplantation was performed using donor Wister rats and recipient Lewis rats. The recipient rats were randomly divided into two experimental groups: in group FK, 0.2 mg/kg/day intramuscular tacrolimus were administered to recipient rats for seven consecutive days (days 0-6); in group MSC, recipient rats were injected intravenously with  $2 \times 10^6$  donor MSCs on day 6 with 0.2 mg/kg/day tacrolimus administered for 7 days.

Graft survival was assessed by daily inspection and histological study. Recipients' immunological reactions were evaluated by serum ELISA, RNA assays and mixed lymphocyte reactivity assays.

The graft survival of group MSC was significantly prolonged in comparison with that of group FK. Cytokine expression analysis of grafted limbs showed that MSC treatment significantly decreased pro-inflammatory cytokine expression. An in vitro mixed lymphocyte reaction showed MSCs inhibiting T cell proliferation.

MSCs induce T cell hyporesponsiveness and prolong graft survival in the rat composite allotransplantation model. MSCs demonstrate some immuno-modulatory properties that can be accomplished without the need for significant recipient immunosuppression.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計			

研究分野：整形外科

科研費の分科・細目：移植 免疫抑制

キーワード：間葉系幹細胞，複合組織同種移植，免疫抑制，拒絶，手移植

#### 1. 研究開始当初の背景

外傷や悪性腫瘍、先天異常により運動器官の一部失ったり欠損したりすれば人としての生活は大きく制限される。欠損部が小範囲の場合は自家組織を用いての再建が可能であるが、これには限界があり、重度の欠損に対

する解決法として他の人から手や関節などの複合組織を移植する四肢同種移植が開発され、近年世界で20例以上の手同種移植成功例と1例の顔面移植成功例が報告されている。これは手術手技の進歩に加え、同種移植の際に必ずおこる拒絶反応の予防、治療の

ための免疫抑制療法の進歩によるものが大きい。

免疫抑制療法は進歩してきてはいるが、このような移植はきわめて拒絶反応の強い皮膚を含むため普通の臓器移植に比べ約2-3倍の免疫抑制剤の投与が必要で、しかも、免疫抑制療法には感染、糖尿病や悪性腫瘍の発生など致命的な副作用があり、新しい免疫抑制剤によってもこれらの問題は解決されていない。現在臨床で行われている腎、肝、心肺移植などは生命維持器官の移植であるため、致命的副作用を伴う免疫抑制剤の使用は容認されているが、生命維持器官でない四肢運動器官の同種移植では、免疫抑制剤の使用に関して多くの問題が提起され、論争的となっている。つまり、四肢同種移植については、いかに長期間の免疫抑制剤の投与量を減らし拒絶反応をコントロールするかが重要となってきた。

一方、間葉系幹細胞は、骨髄、骨格筋、脂肪組織、臍帯血、胎児組織等から分離培養できる細胞で、骨、筋肉、軟骨、腱、脂肪などに分化できる上に自己増殖能を持ち、それゆえ万能細胞と呼ばれている。移植免疫の分野では、間葉系幹細胞が、*in vitro* で、T細胞の機能を抑制する (Ringden *et al* 2006, Transplantation)、リンパ球の増殖を抑制する (Tse *et al* 2003, Transplantation)、regulatory T細胞を増殖させるなどの報告があり、*in vivo* では皮膚移植の際の拒絶反応を抑制できたと報告されている。臨床応用もされており、ステロイドでコントロールできないような重度の移植片対宿主反応を間葉系幹細胞移植によりコントロールできたとの報告もあり (Ringden *et al* 2006, Transplantation)、間葉系幹細胞は再生医療分野での万能細胞としての役割のみならず、移植医療の分野でも従来の免疫抑制剤とは

違った細胞による免疫抑制療法としての役割も考えられてきている。

## 2. 研究の目的

ラット四肢移植モデルを用い、FK506(0.2mg/kg/day)の移植後7日間の投与のみでは約19日間程度の術後生存期間であるが、ドナー間葉系幹細胞( $10 \times 10^6$ 個)を同時に投与し生存期間の延長が得られるかどうかを評価するのが目的である。

現在までのところ手同種移植に代表される複合組織同種移植に間葉系幹細胞を応用した報告はなく、移植の際の拒絶反応を間葉系幹細胞の投与によりある程度コントロールできれば、現在問題となっている長期間の免疫抑制剤の投与量を減らすことができることにつながるのではないかと考えられる。

## 3. 研究の方法

1) ラット四肢移植モデルを用いて短期間の免疫抑制剤投与と組み合わせて、生存期間に対する間葉系幹細胞投与の有用性を統計学的に確認する。

2) 皮膚、筋肉、骨、軟骨、のそれぞれの組織の拒絶反応の程度を組織形態学的に明らかにする。

3) 移植後レシピエントの血清を用い ELISA法にて間葉系幹細胞による拒絶反応抑制の程度を明らかにする。

4) Mixed lymphocyte reaction を用いてレシピエント内のT細胞に対する間葉系幹細胞投与の有用性を比較検討し明らかにする。

## 4. 研究成果

間葉系幹細胞を投与することにより、コントロール群であるタクロリムス単独投与群と比べて生着期間の有意な延長が認められた。組織形態学的にも皮膚や筋肉組織への単核球の浸潤が有意に抑制されていた。RNA を抽

出し、RT-PCR 法にてサイトカイン発現を見ると、IFN- $\gamma$  の有意な発現抑制が認められ、血清サイトカイン量など免疫学的にも同様に有意な抑制が確認できた。また、In vitro でのリンパ球混合試験でも間葉系幹細胞投与群が非投与群に比べて有意に T 細胞増殖を抑制していたことにより、抑制効果はタクロリムス投与とは関係しないと考えられた。間葉系幹細胞による免疫制御のメカニズムとしては、T リンパ球、NK 細胞、樹状細胞などが関与し、炎症性サイトカイン産生の抑制、抑制性サイトカインの産生の増加が指摘されており、樹状細胞に対しては TNF- $\alpha$  が抑制され IL10 分泌が亢進するため、樹状細胞が抗炎症・トレランスの方向に働き、炎症の部位に置いては Th1 リンパ球や NK 細胞からの IFN- $\gamma$  分泌を抑制し、Th2 リンパ球からの IL-4 分泌を増加させると考えられている。つまり、投与した間葉系幹細胞が T リンパ球に直接作用するのではなく、MSC がサイトカインを産生し、そのサイトカインを介して T リンパ球、NK 細胞、樹状細胞の炎症性サイトカイン産生が減少し、同時に抑制性サイトカイン産生が増加し、そのことにより移植抗原に対する T 細胞の反応が抑制される結果、拒絶反応が抑制され移植肢の生着期間が延長したものと考えられた。

MSC には免疫反応抑制効果があり、それによりラット四肢同種移植モデルでの生着期間が延長したと思われる。運動器官の同種移植など通常の免疫抑制剤の使用が致命的副作用のため制限されるような場合、細胞を用いた新たな免疫抑制療法として間葉系幹細胞を応用できる可能性がある。

## 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 1 件)

池口良輔 柿木良介 三井裕人 青山朋樹  
布留守敏 太田壮一 藤田俊史 野口貴志  
川那辺圭一 戸口田淳也 中村孝志

ラット四肢同種移植における骨髄間葉系幹細胞の拒絶反応抑制効果

日本マイクロ会誌 査読有 2011 年 24 巻 4 号 p412-416

英文論文については現在執筆中で平成 24 年 1 月末には投稿予定。

[学会発表] (計 3 件)

Immunomodulation of mesenchymal stem cells in composite tissue allotransplantation

Ryosuke Ikeguchi, Ryosuke Kakinoki, Hiroto Mitsui, Moritoshi Furu, Tomoki Aoyama, Keiichi Kawanabe, Junya Toguchida, Takashi Nakamura

American Academy of Orthopaedic Surgeons  
2011 年 2 月 San Diego

Immunomodulation of mesenchymal stem cells in composite tissue allotransplantation

Ryosuke Ikeguchi, Ryosuke Kakinoki, Hiroto Mitsui, Tomoki Aoyama, Junya Toguchida, Takashi Nakamura

America Society for Surgery of the Hand  
2010 年 9 月 Boston

ラット四肢同種移植における骨髄間葉系幹細胞による免疫応答制御

池口良輔 柿木良介 三井裕人 布留守敏  
太田壮一 藤田俊史 野口貴志 青山朋樹  
川那辺圭一 戸口田淳也 中村孝志

第 37 回日本マイクロサーシャリー学会 2010

年 10 月 名古屋

〔図書〕（計 0 件）

〔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◇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

特になし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

池口 良輔

先端医療振興財団（先端医療センター研究  
員）

研究者番号：80437201

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：