

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591879

研究課題名(和文) 脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた臓器移植モデルにおける急性期拒絶反応制御の検討

研究課題名(英文) Development of novel therapy to control the acute rejection in organ transplantation model using the dedifferentiated fat cells(DFAT).

研究代表者

杉藤 公信(sugtou, kiminobu)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：10328750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：マウスDFATとマウスの脾臓から抽出したT細胞を用いて、T細胞増殖抑制効果を検討したところ、DFATの濃度依存性にT細胞の増殖を抑制することが可能であった。生体における、DFATの免疫抑制効果に関しては、皮膚-皮膚交換移植モデルと異所性心臓移植モデルを確立した上で、DFAT投与による移植片の生着延長を検討した。しかしながら、DFAT投与による移植片の生着延長はみられなかったことから、細胞レベルでの免疫抑制効果は存在するものの、生体における拒絶反応を抑制するには至らないことがわかった。

研究成果の概要(英文)：We examined T cell proliferation assay by co-culturing the T cells extracted from spleens of mice and mouse DFAT. In result, it was possible to suppress the proliferation of T cells in a concentration dependent of the DFAT. Then we examined for the immunosuppressive effect of DFAT in vivo. At first, establish a skin replacement transplant model and ectopic cardiac transplant model, we examined the survival prolongation of graft by DFAT administration. However, we didn't observed survival prolongation of graft by DFAT administration. Immunosuppressive effect in vitro is present, but it was found that not resulting to suppress rejection in vivo.

研究分野：医歯薬学

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：移植・再生医療 再生医学 小児外科 脱分化脂肪細胞 免疫拒絶

### 1. 研究開始当初の背景

これまでの臓器移植に対して拒絶反応を制御する方法は、新規免疫抑制剤を開発することが主たる方法であった。近年では、移植前にドナー側からレシピエント側へ骨髄移植を行い、レシピエント側にキメラを形成することで移植片の寛容を獲得し、移植後の免疫抑制剤の使用量を極端に減少できたことが報告されている (Seung E, et al. J Clin Invest. 2003)。しかしながら、ドナー側への骨髄採取のリスクや、骨髄移植の際にレシピエントに施行される放射線療法、抗癌剤による骨髄抑制などのリスクが存在することは否めない。そこで最近では、臓器移植の際に MSC (間葉系幹細胞) を同時投与することで免疫抑制ないし免疫寛容を獲得する方法も検討されるようになってきた。最近まで MSC は多分化能と自己再生能を持つ組織幹細胞としての認識が強かったが、2004年 Le Blanc K ら (Le Blanc K, et al. Lancet. 2004) が、治療抵抗性である Grade IV の急性 GVHD に対し骨髄 MSC を使用し、著しい治療成果を示したことで、MSC の持つ免疫抑制能、免疫寛容能が世に知られることとなった。MSC の免疫抑制に対する効果機序は詳細にされてはいないが、主に3つの機構により成ると考えられる。1つ目は、細胞 (MSC) とエフェクター細胞 (ex: 樹状細胞) の直接接触による抑制。2つ目は、MSC から分泌された液性因子によるエフェクター T 細胞の抑制。3つ目は、調節性 T 細胞 (Regulatory T cell: Treg) を介したエフェクター T 細胞の抑制である。臓器移植の拒絶において主な原因となるものに T 細胞の異常活性があることは言うまでもないが、最近の報告では、naive T 細胞から分化するヘルパー T 細胞は、Th1、Th2 だけではなく、Th17 やこれらエフェクター T 細胞を抑制する Treg の存在が報告されている (Zhi Chen, et al. Immunol Res. 2008)。生体内において Treg は、エフェクター T 細胞の過剰反応を抑えるだけではなく、非自己を自己とする免疫寛容に大きく関わっており、免疫応答のバランスを整えている。そこで、拒絶反応制御を免疫抑制剤に頼ってきた我々も Treg の活性化によるエフェクター T 細胞の抑制に注目した。

一方、当教室にて開発された DFAT (dedifferentiated fat cell) は、脂肪を脱分化することで得られる細胞であり、多分化能、自己再生能を持つことから組織幹細胞として認識されている (Yagi K, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2004) (国際特許出願 PCT/JP2004/007322)。我々のこれまでの研究成果として、DFAT が他の MSC と同様の表面抗原を発現し、骨、脂肪、軟骨、平滑筋への分化能を確認できたことから (Matsumoto T, et al. J Cell Physiol. 2007) (図1) MSC に代わる細胞源として臨床応用を目指して研究を行っている。また、DFAT が T 細胞の増殖抑制を有して

いることを確認し、主要な T 細胞抑制性分子の発現や、Treg の分化促進効果も確認している。今後更なる検討を行う予定であるが、臓器移植片の拒絶反応における免疫イベントを改善する可能性を示していると考えられる。

### 2. 研究の目的

近年、移植片対宿主病 (GVHD) をはじめとした免疫システムの異常を伴う疾患の細胞治療に MSC の有効性が確認されるようになり、臓器移植片の拒絶反応制御においても動物実験、臨床治験等で MSC の効果が検討・期待されている。本研究申請者は、骨髄 MSC に代わる細胞源として成熟脂肪細胞から脱分化させた MSC 様細胞 DFAT を開発し、臨床応用を目指し研究してきた。そこで当該研究では DFAT を用いて、マウス、ラット臓器移植モデルに対する免疫抑制作用、免疫寛容の有効性を検討することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 皮膚移植モデルの確立

C57BL/6 マウスの皮膚 (1x1cm) をドナー臓器とし、C3H マウス背面の皮膚 (1x1cm) と交換移植する。マウス皮膚移植では拒絶反応が起こると移植片の縮小がおこるため、NIH Image にて移植部位の面積を測定し、移植当日と移植後の面積比をもって graft survival とする。graft survival が 50% 以下で graft failure とする。

#### (2) 頸部異所性心臓移植モデルの確立

Lewis ラットの心臓をドナー臓器とし、SD ラットの頸部に移植する。SD ラットの頸部に移植された異所性心臓が拍動をしている期間を graft survival とする。

#### (3) DFAT を用いた急性期拒絶反応制御の検討

上記に示す二つのモデルに対して DFAT 投与を行う。DFAT は、マウス、ラットおよびヒトから作成した細胞を用いる。なお、マウス、ラットに関しては、GFP 遺伝子組み換え動物からの DFAT がすでに存在しており、DFAT 局在の追跡に応用する。

#### 皮膚移植モデルに対する DFAT 投与

##### 細胞シート法

CellSeed 社の UpCell と CellShifter を使用して DFAT の細胞シートを作製する。細胞シートは移植片と皮膚欠損部位の間に留置して置く。

##### 尾静脈投与

DFAT は MSC と比べると細胞 size が大きいいため、尾静脈から大量の DFAT を投与すると肺塞栓にて死亡してしまうことが分かっている。我々の検討では  $3 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$  ならば尾静脈からの投与が可能であることを確認しており、そこで尾静脈投与では皮膚移植と同時に  $3 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$  にて DFAT を投与する。

##### 評価

graft survival: NIH Image にて面積比を測定し、graft survival の延長が起こること

を確認する。

HE 染色: 移植片の組織学的変化(細胞浸潤、cell apoptosis, fibroblast)などを検討し、DFAT 投与により細胞浸潤や cell apoptosis が減少することを確認する。

頸部異所性心臓移植モデルに対する DFAT 投与

尾静脈投与

皮膚移植モデルと同様、移植と同時に  $3 \times 10^5/100\mu\text{l}$  にて DFAT を投与する。

動脈への直接投与

Zonta S らの報告によると、腎移植モデルにおける MSC の尾静脈投与では約 90% の MSC が肺にてトラップされると報告しており、移植時に近傍動脈より MSC を投与することで効果を挙げている (Zonta S, et al. Transplant Proc. 2010)。DFAT は MSC よりも細胞 size が大きいことから、DFAT においても同様のことが考えられる。そこで、頸部へ心臓移植を行った際に、近傍動脈より DFAT を直接投与した際の効果を検討する。

評価

頸部異所性心臓移植に関しては、graft survival 以外は移植後から一週間を目安に移植片を摘出して評価する。

graft survival: レシピエント頸部における拍動をもって評価し、DFAT 投与がにより生着期間が延長することを確認する。

HE 染色: 移植片の組織学的変化(細胞浸潤、cell apoptosis, fibroblast)などを検討し、DFAT 投与により細胞浸潤や cell apoptosis が減少していることを確認する。

#### 4. 研究成果

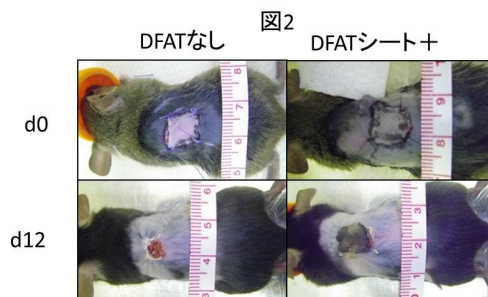
DFAT のもつ免疫抑制能を検討するために、本年度はマウスの皮膚-皮膚交換移植を用いた臓器拒絶モデルを作製し、DFAT 投与による臓器移植片の延長を検討した。まず、皮膚-皮膚交換移植モデルの確立を行った。当初、B6 マウスの耳介皮膚を C3H の皮膚欠損部に生着させて、皮膚移植モデルを検討したが、物理的刺激により、移植片の脱落が起こり、移植片の拒絶反応評価が困難であった。そこで、B6 マウスと C3H マウスの背部皮膚の交換移植を行った。両マウスの背部皮膚を 1 cm 四方切除し、交換移植の際に 5-0 PDS を用いて、移植片と宿主側の皮膚の結紮縫合を行った (図



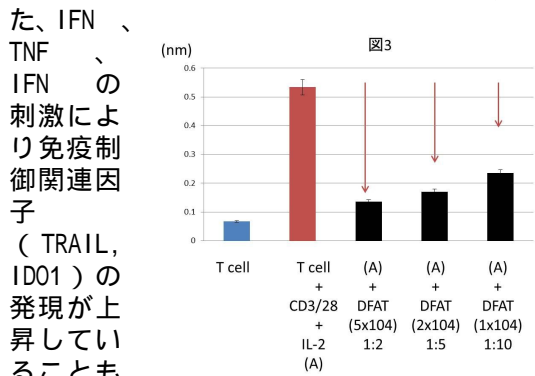
図1

1)。移植片の拒絶反応を評価するために、移植後から二日ごとに移植片の写真を撮影し、Image J を用いて移植片の面積を比較した。移植片の面積が移植当日の移植片面積と比較し約 50% を下回ったところで graft failure と判断し、組織片を採取した。B6 マウスと C3H マウスはともに移植日より約 8 日

から 10 日目にて graft failure となった。また、炎症性細胞の浸潤を評価するために、経時的に移植片を採取し、HE 染色を行ったところ、炎症性細胞の浸潤が最も強く見られたのは、移植日より約 4 日から 6 日の間であった。皮膚-皮膚交換移植モデルが確立したところで、DFAT 投与による移植片の生着延長を検討した。DFAT 投与は移植日当日に、宿主側の皮下に  $1 \times 10^5 \times 4$  ヶ所局所投与した。対照群として PBS を局所投与し、移植片の面積を測定した。PBS 投与群が graft failure となった時点では、DFAT 投与群は graft failure とならず、DFAT 投与による移植片の生着延長効



果がみられた (図 2)。そこで DFAT が生着延長に寄与する機序の検討と他の細胞種 (negative control: 繊維芽細胞) を用いた確認の検討を同時に施行した。結果、DFAT による生着延長と繊維芽細胞の局所投与による生着延長には有意差がみられず、生着延長自体、DFAT による効果かどうかの懸念が存在したために、細胞投与の方法の検討を行った。DFAT の細胞投与方法は、局所投与以外に、静脈投与、並びに温度感受性細胞シートを用いた DFAT 投与方法を施行した。しかしながら、DFAT 投与の方法を変更しても、皮膚生着率の有意な上昇は見られなかった。そこで確認のために、再度ディッシュ上による DFAT の免疫抑制効果、並びに免疫制御因子の発現検討を行ったところ、DFAT は濃度依存性にリンパ球の増殖を抑制することが明らかとなり、また、IFN、TNF、IFN の刺激により免疫制御関連因子 (TRAIL, IDO1) の発現が上昇していることも



明らかとなった (図 3)。in vitro においては DFAT が免疫抑制能並びに免疫寛容能を保持しているものの、動物実験モデルに対しては、DFAT 投与の効果は得られなかったことから、DFAT の持つ免疫抑制能を移植片 (皮膚) に対する拒絶反応の方が強力であったと考えられた。

一方、血液 (動脈血) を介した DFAT の免疫抑制効果を検討するために、ラットを用い

た異所性心臓移植モデルの作成を行った。ドナーの心臓を摘出、レシピエントの胸部大動脈に血管吻合することで上記モデルの作製を行った。しかしながら、一つのモデルを作製するのに時間がかかり、また、異所性心臓移植モデルにおける異所性心臓の graft survival が安定せず、DFAT 投与の検討には至らなかった。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔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

杉藤 公信 (SUGITOU KIMINOBU)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：10328750

##### (2)研究分担者

越永 従道 (KOSHINAGA TUGUMICHI)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：70205376

松本 太郎 (MATUMOTO TARO)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：50366580

池田 太郎 (IKEDA TARO)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：00318396

小沼 憲祥 (KONUMA NORIYOSHI)

日本大学・医学部・その他

研究者番号：50553103