

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592249

研究課題名(和文) 複合組織同種移植におけるレシピエント間葉系幹細胞による免疫制御に関する研究

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

研究代表者

池口 良輔 (Ikeguchi, Ryosuke)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80437201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：レシピエント骨髄間葉系幹細胞(MSC)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。移植肢の生着期間について、有意な生着期間の延長が認められ、組織学的にも免疫学的にも拒絶反応が抑制されていた。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. Mesenchymal stem cells (MSCs) have some immunomodulatory properties to suppress T cell mediate responses. The purpose of this study is to evaluate the effect of intravenous recipient MSCs infusion for immunomodulation in the rat composite tissue allotransplantation model. The graft survival of MSCs infusion group was significantly prolonged in comparison with that of control group. Cytokine expression analysis showed that MSCs treatment significantly decreased pro-inflammatory cytokine expression. An in vitro mixed lymphocyte reaction showed MSCs inhibiting T cell proliferation. MSCs demonstrate some immuno-modulatory properties that can be accomplished without the need for significant recipient immunosuppression.

研究分野：整形外科

キーワード：間葉系幹細胞 同種移植 移植 四肢移植 複合組織移植

## 1. 研究開始当初の背景

外傷や悪性腫瘍により手などの運動器官を失えば、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50例以上の手同種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。現在本邦で行われている腎、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いる。

## 2. 研究の目的

万能細胞と呼ばれる間葉系幹細胞には採取されるソースに関わらず免疫調節作用があり、免疫抑制剤が必要な同種移植において細胞による免疫抑制療法としての役割も考えられる。複合組織同種移植のモデルを用い、レシピエントからの間葉系幹細胞を投与することによって拒絶反応が抑制されることを明らかにするのが今回の研究の目的であ

る。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験の対象

オスBrown-Norwayラット(BN)をドナーとし、MHCの異なるオスLEWISラットをレシピエントとして用いて実験を行う。

### (2) 間葉系幹細胞の分離、培養、準備

Aziziらの方法に従って、間葉系幹細胞の分離培養する(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998)。レシピエントLEWラットの大腿骨と脛骨から骨髄を採取し、遠心密度勾配法にて血球成分を除去し、プラスチック培養皿にて分離培養する。3日ごとに培地は交換を行い1週間ごとに継代し、2週間後培養皿に付着した細胞をトリプシンにて剥離し、それを骨髄間葉系幹細胞として、1ml注射器に吸引し( $1.0 \times 10^6$ 個)、レシピエントに投与できるように準備しておく。

### (3) 移植手術

Doiらの方法に従って、ラット下肢移植手術を行う(Plast Reconstr Surg 1979)。

オスBNラットをドナーとし、ペントバルビタールにて麻酔の上、ソケイ部を展開し、大腿動静脈を剥離しソケイ靭帯のレベルで切離し、大腿中央レベルで皮膚、筋肉、大腿神経、坐骨神経、大腿骨を切離し、ヘパリン加乳酸リンゲル液にて還流を行い、両側の下肢を採取する。採取した下肢は乳酸リンゲル液中に冷所保存する。

レシピエントの手術は、オスLEWISラットをレシピエントし、同様に麻酔の上、ソケイ部を展開し、大腿動静脈を剥離し血管縫合ができるように大腿遠位部で切離し、大腿中央レベルで皮膚、筋肉、大腿神経、坐骨神経、大腿骨を切離し、片側の下肢を切離する。ドナーから採取した下肢を、18G注射針にて大腿骨を髓内釘固定し、筋肉と後面の皮膚を縫合し、顕微鏡下に大腿動静脈を10-0ナイロンにて血管縫合を行い、残りの皮膚縫合を行い、移植手術を完了する。術後は脱水を補正するために約5mlの乳酸リンゲル液を腹腔内に補う。

### (4) 免疫抑制療法及び実験群

術直後から毎日タクロリムス(FK506)0.2mg/kgを筋肉内注射し、術後6日目まで計7回投与する。分離培養したレシピエント骨髄間葉系幹細胞 $10 \times 10^6$ 個を術後7日目にペニス背側の静脈から静脈内投与する(MSC群)。コントロールグループとして、骨髄間葉系幹細胞投与を行わないタクロリムスのみのグループ(FK群)、全く免疫抑制療法を行わないグループ(allograft群)、LEWISラットからLEWISラットに移植したグループ(isograft群)を作成する。

### (5) 拒絶反応評価

移植された下肢は、拒絶反応が始まると、肉眼的には、浮腫、発赤、表皮剥離、ミイラ化の順に経過をたどり、表皮剥離が進みミイラ化が始まった時点でも不可逆的な状態と考え拒絶されたものと評価する。各グループの手術からの生存期間を統計学的に比較検討する。拒絶された時点で皮膚、筋肉、骨、軟骨の組織を採取しホルマリンにて固定し、また、同時に末梢血を採取し、血清と単核球を分離し凍結保存し、評価する。

(6) 組織学的評価

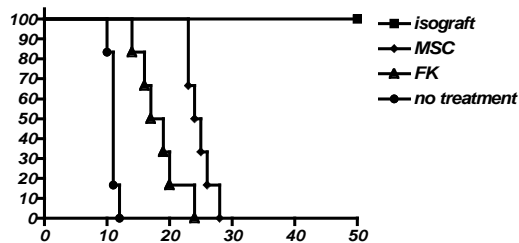
ホルマリン固定しておいた皮膚、筋肉、骨、軟骨の組織の切片を作成しHE染色を行い、組織学的に拒絶反応を確認し、それぞれの組織で単核球の浸潤を数値化し形態学的かつ統計学的に比較検討する。

(7) 免疫学的拒絶反応評価

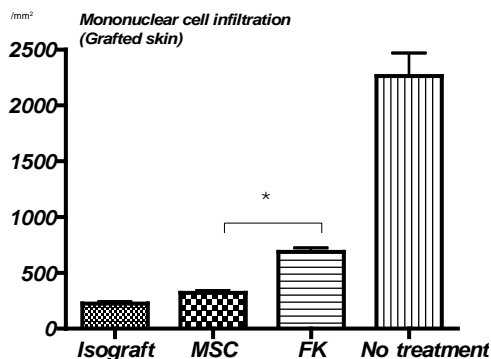
凍結保存しておいた血清を用い、ELISA法にて血清中のサイトカイン量を測定し、各グループ間で比較検討する。また、凍結保存しておいた単核球を用い、ドナー、レシピエント、3rd partyの脾臓細胞をstimulatorとしてMixed lymphocyte reactionを行い、ドナーや3rd partyへのT細胞の反応をグループ間で比較検討する。

4. 研究成果

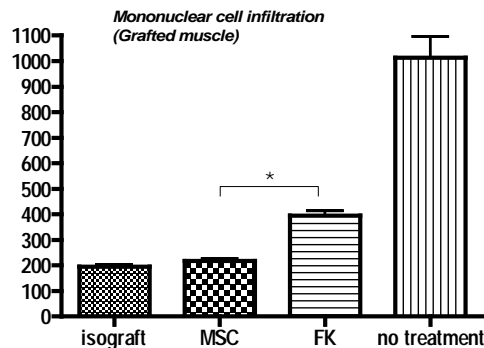
(1) 移植肢の生存期間はMSC投与群(中央値 24.5日)は、タクロリムスのみグループ(中央値 18日)と比較し、有意に生存期間の延長が認められた。



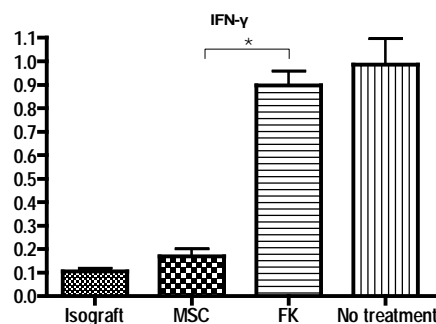
(2) 移植後 14 日での皮膚組織を比較したところMSC群は FK群と比較し優位に単核球の浸潤が少なく、MSC群と isograft群では有意差が認められなかった。



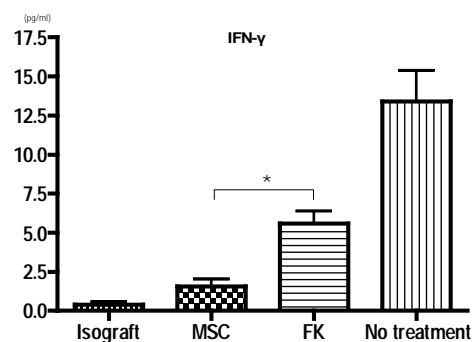
(3) 移植後 14 日での筋肉組織でも単核球の浸潤は、同様にMSC群は FK群と比較し有意に単核球の浸潤が少なく、MSC群と isograft群では有意差が認められなかった。



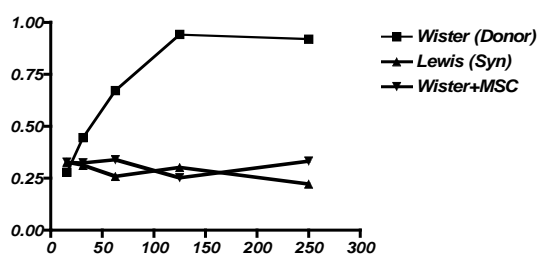
(4) 皮膚組織でのmRNAレベルではIFN- $\gamma$ の発現がMSC群では FK群と比較し有意に減少していた。



(5) 拒絶時の血清中の炎症性サイトカイン (IFN- $\gamma$ ) は、MSC群は FK群と比較し優位に少なく、MSC群と isograft群では有意差が認められなかった。



(6) Mixed lymphocyte reactionではMSC群ではドナーや 3rd party反応が有意に抑制されていた。



#### <引用文献>

1. Ringdén O. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2006 May 27;81(10):1390-7.
2. Tse WT. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003 Feb 15;75(3):389-97.
3. Azizi SA Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 31;95(7):3908-13.
4. Doi K. Homotransplantation of limbs in rats. A preliminary report on an experimental study with nonspecific immunosuppressive drugs. *Plast Reconstr Surg*. 1979 Nov;64(5):613-21.

#### 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)

[学会発表](計1件)

1. Immunomodulation of recipient mesenchymal stem cells in composite tissue allotransplantation, Ryosuke Ikeguchi, Ryosuke Kakinoki, Hiroto Mitsui, Tomoki Aoyama, Tadashi Yasuda, Junya Toguchida, Shuichi Matsuda. American Academy of Orthopaedic Surgeons 2014 March 11-15, New Orleans, USA

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

池口 良輔 (IKEGUCHI RYOSUKE)  
 京都大学・医学研究科・准教授  
 研究者番号：80437201

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし