

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08878

研究課題名（和文）新規肺移植後免疫抑制療法の開発を目指した間葉系幹細胞由来の細胞外小胞の解析と応用

研究課題名（英文）Development of a New Immunosuppressive Therapy After Lung Transplantation: Analysis and Application of Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells

研究代表者

大石 久 (Oishi, Hisashi)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：60451580

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、肺移植後の慢性期の問題であるchronic lung allograft dysfunction（CLAD）に対する新規の治療法を開発することを目指した。まずは、間葉系幹細胞（Mesenchymal stromal cells; MSC）由来の細胞外小胞（Extracellular vesicles; EVs）を応用した新規肺移植後免疫抑制療法の開発を目指した。MSCからのEVsの分離に成功した。多種のEVsの回収に成功し、動物モデルを使用したパイロット研究をするに至った。ただし、EVsの投与によるCLADの抑制効果が十分に観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、肺移植後慢性期の問題であるchronic lung allograft dysfunction（CLAD）に対する新規治療法を開発を目指した。確立した治療法がないCLADであるが、間葉系幹細胞（Mesenchymal stromal cells; MSC）由来の細胞外小胞（Extracellular vesicles; EVs）を応用する新規性の高い免疫抑制療法の開発を目指した。MSCからのEVs分離に成功し、多種のEVsの回収に成功した。CLADに対する明らかな治療効果を証明できなかったものの、EVsの動物モデルへの導入方法を確立しえた点では意義深い研究であったといえる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop a novel treatment for chronic lung allograft dysfunction (CLAD), a significant issue in the chronic phase after lung transplantation. Specifically, we sought to develop a new post-lung transplantation immunosuppressive therapy using extracellular vesicles (EVs) derived from mesenchymal stromal cells (MSC). We successfully isolated EVs from MSC and collected various types of EVs. This led us to conduct a pilot study using an animal model. However, the suppressive effect of EV administration on CLAD was not sufficiently observed.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺移植 慢性移植肺機能不全 免疫抑制療法 間葉系幹細胞 細胞外小胞 MUSE細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

肺移植は他に有効な治療手段がない終末期呼吸器疾患患者に行う確立した治療であり、1983年のトロント大学(カナダ)における世界初の移植成功例以降、肺移植数は増加し続け、全世界で年間約5500例以上が施行されている(国際心肺移植学会レジストリレポート)。日本でも2000年に東北大学および大阪大学で、初の脳死肺移植が施行されて以降、着実に肺移植数を伸ばしている。

2020年、世界は新型コロナウイルス(COVID-19)肺炎が蔓延し、多くの人命が奪われた。COVID-19肺炎により、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)に至り、肺移植を受け、救命された患者がすでに報告されている。(Lung transplantation for COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome in a PCR-positive patient. *Lancet Respir Med.* 2020;8:1057-1060.)このようなCOVID-19関連のARDSに対する肺移植には慎重な意見もあるが(When to consider lung transplantation for COVID-19. *Lancet Respir Med.* 2020;8:944-946.)、今後、COVID-19によるARDSから回復した一部の患者の中でも、慢性期に肺が器質化し、将来的に呼吸不全が進行し、肺移植を必要とする患者が、世界中で急増することも考えられている。いわば、ポストCOVID-19の状況下で、肺移植の重要性は今後益々増してくると予想される。

肺移植医療において、克服すべき最も深刻な問題の1つは、肺移植後の生存率である。国際心肺移植学会のレジストリレポートによれば、肺移植後の5年生存率は55%であり、他の臓器移植に比較し、予後は不良である。肺は気道を介して、外気と接する臓器であり、リンパ組織が豊富な臓器であるために、急性拒絶反応を起こしやすい臓器であり、他の臓器移植と比較して、高容量の免疫抑制剤を要する。その免疫抑制状態により、移植後1か月から1年目の死因のトップは感染症となっている。一方、肺移植後慢性期(1年目以降)の死因のトップは、慢性拒絶反応であり、近年は慢性移植肺機能不全(Chronic lung allograft dysfunction: CLAD)と呼ばれる。慢性的な拒絶反応がその病態に関与するとされているが、不明な点が多く、現在も有効な治療法は確立していない。年間多くの肺移植レシピエントがCLADにより死亡したり、再移植を要したりしている。以上より、肺移植後の予後を改善するためには、移植後の急性期から慢性期まで有効な、より副作用の少ない新たな拒絶反応制御法を開発することが急務である。

間葉系幹細胞(Mesenchymal stromal cells; MSC)は、骨芽細胞・脂肪細胞・軟骨細胞などに分化する再生能力を有し、さらには抗炎症作用や、自然免疫・獲得免疫に対する免疫抑制作用をも有することが大きな注目を集めている。我々は早くからMSCが持つこれらの作用を肺移植医療への応用することを目指し、基礎研究を続けてきた。我々は、マウス同所性肺移植モデルにおいて、肺移植グラフトにMSCを投与した後に、そのグラフトをレシピエントマウスに移植した場合、肺移植後の虚血再灌流障害を有意に軽減されることを明らかにした。(Mesenchymal stem cells attenuate ischemia-reperfusion injury after prolonged cold ischemia in a mouse model of lung transplantation: a preliminary study. *Surg Today*; 2017; 47:425-431.)さらに、ラット同所性肺移植モデルにおいて、レシピエントラットにMSC細胞を経静脈投与すると、肺移植後の急性拒絶反応が有意に抑制されることを明らかにした。(Bone marrow mesenchymal stromal cells protect allograft lung transplants from acute rejection via the PD-L1/IL-17A axis. *Surg Today*; 2018;48:726-734.)MSCの抗炎症作用や免疫抑制作用に注目したこれらの研究は、肺移植における細胞治療の先駆的研究であるといえる。

このようなMSCの持つ可能性により世界で様々な臨床応用が進められつつあるが、MSCのヒトへの投与に関し、警鐘を鳴らす研究者もいる。すなわち、(1)MSCは一旦導入されると、その産生物による効果は永続的であり、容易に取り除くことができなくなる、(2)MSCによる宿主の免疫機構に望ましくない作用を及ぼし、悪性腫瘍の発生を起こす可能性がある等の懸念が挙げられている。(Caveats of mesenchymal stem cell therapy in solid organ transplantation. *Transpl Int.* 2015;28:1-9.)そんな中、MSCから放出される細胞外小胞(Extracellular vesicles; EVs)が注目を集めている。EVsはmRNAやmiRNAやタンパク質などを運び、細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たすとされている。MSC由来のEVsは、MSCと同等の生物学的活性を有しているといわれているが、MHC class IまたはII抗原が低発現であり、その免疫原性は低いとされているため、MSCより安全な臨床応用を期待されている。MSC由来のEVsは、MSCと同様な抗炎症作用や免疫抑制作用を有すると考えられているが、その利用が肺移植において、肺移植においてEVsの投与が急性拒絶やCLADに対する新規拒絶反応制御法になりうるかは未だ明らかとされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、MSC由来のEVsが、肺移植後の急性期・慢性期に有効な新たな拒絶反応制御法として応用可能であるかを、肺移植後急性拒絶反応・CLADのそれぞれの動物モデルを用いて、検討することを目的とした。またMSCの培養方法の違いにより、放出されるEVsが変化することから、肺移植後の急性拒絶反応・CLADのそれぞれに対する免疫抑制として、特化したEVs

を回収できるように、MSC の培養方法を検討することも目的とした。

なお、後述するとおり、本研究では動物モデルにおいて、EVs による明らかな免疫抑制効果が観察されなかったことより、その後の研究の推進方策を修正し、Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse)細胞という、成体の間葉系組織である皮膚、骨髄、脂肪組織などに存在し、腫瘍性を示さない新たなタイプの多能性幹細胞に着目し、肺移植後急性拒絶反応や CLAD への治療応用の可能性を探ることとなった。Muse 細胞は間葉系幹細胞 (MSC) の中の約 1% を占め、幹細胞としての能力がきわだって高い細胞であることがこれまでの研究でわかっている。近年、我々は、細胞治療の肺移植臨床への応用を目指した基礎研究を開始しており、Muse 細胞が虚血再灌流性肺傷害を抑制することを動物モデルで示した (Human Multilineage-differentiating Stress-Enduring Cells Exert Pleiotropic Effects to Ameliorate Acute Lung Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Model. *Cell Transplant* 2018;27:979-93.)。

### 3. 研究の方法

#### 【実験 MSC 由来の EVs の解析方法の確立と MSC の培養方法の検討】

MSC 由来の EVs は、すでいくつかの研究グループによりプロテオーム解析され、EVs には共通の成分があるとされながらも、EVs 回収前の MSC の培養方法には多くの方法があり、回収されるタンパクにも多様性が生じている。(Proteomic Signature of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Small Extracellular Vesicles. *Proteomics*; 2019;19(1-2):e1800163.) MSC は炎症性サイトカインである TNF- や IFN- が高い環境に暴露されると、抗炎症作用をもった EVs が産生すると報告されている。(Novel insights into MSC-EVs therapy for immune diseases. *Biomark Res*; 2019;18;7:6.) Ragni らは MSC 由来の EVs を RT-PCR により解析し、抗炎症サイトカインである IL-10 の mRNA が多く含まれたことやそのような EVs により mRNA が標的細胞に導入されることを報告している。(Extracellular Vesicle-Shuttled mRNA in Mesenchymal Stem Cell Communication. *Stem Cells*; 2017;35:1093-1105.) MSC 培養条件による違いから、様々な特徴をもった EVs を回収し、肺移植後の急性拒絶反応や CLAD の抑制のために、特に適した EVs を回収できるプロコルを見つけ出すことを目指す。我々はこれまで、IL-10 と肺移植後拒絶反応との関連を長年研究している。本実験では、EVs を RT-PCR により解析する方法を確立し、MSC の培養方法を工夫し、例えば、IL-10 を始めとした抗炎症サイトカインの mRNA が豊富な強力な抗炎症作用を有した EVs、いわば肺移植のためのオーダーメイドな EVs の回収を目指した。

#### 【実験 MSC 由来の EVs の肺移植後急性拒絶反応に対する効果の検討】

肺移植の急性拒絶反応モデルである同種異系マウス同所性肺移植モデル(Balb/c C57BL/6)において、MSC 由来の EVs が肺移植後急性拒絶反応に与える効果を検討することを目的とした。コントロールとして、線維芽細胞から得られた EVs を用いることとした。実験により得られた MSC 由来の EVs を治療群に投与することとした。EVs の投与経路については、ドナーから摘出した肺グラフトに経気道投与(経気管支投与)とした。気管支内投与は我々がこれまで行ってきた方法で行った。(A novel combined ex vivo and in vivo lentiviral interleukin-10 gene delivery strategy at the time of transplantation decreases chronic lung allograft rejection in mice. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2018;156:1305-1315.)肺移植時に上記方法で EVs を投与し、6 日目に動物を犠牲死させ、移植肺を摘出した。急性拒絶反応の病理学的検討：摘出した移植肺を HE 染色し、確立したグレーディング法でリンパ球浸潤・浮腫・肺泡出血・壊死のパラメーターを評価した。

【実験 Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse)細胞投与による肺移植後急性拒絶反応に対する効果の検討】

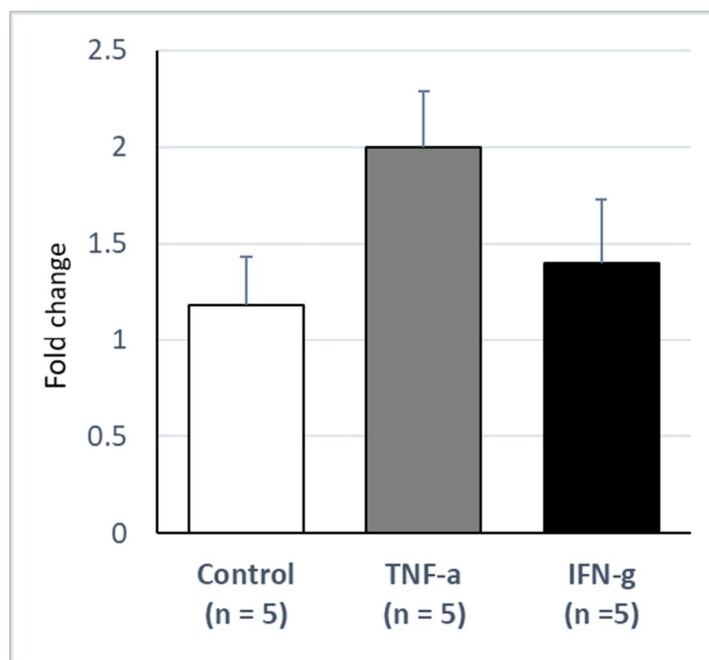
上記の実験と同じく、肺移植の急性拒絶反応モデルである同種異系マウス同所性肺移植モデル(Balb/c C57BL/6)を用いて実験を行うこととした。われわれの Muse 細胞を用いた先行研究 (Human Multilineage-differentiating Stress-Enduring Cells Exert Pleiotropic Effects to Ameliorate Acute Lung Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Model. *Cell Transplant* 2018;27:979-93.) に倣い、ここで行う細胞治療では、上記肺移植モデルで肺移植直後の再灌流を行った後に肺動脈から Muse 細胞を注射することとした。コントロール群では、線維芽細胞を投与することとした。

### 4. 研究成果

#### 【実験 MSC 由来の EVs の解析方法の確立と MSC の培養方法の検討】

MSC を 175cm<sup>2</sup> の細胞培養フラスコに培養し、60-70%のコンフルエンスとした。その時点の培養液を exosome depleted FBS-supplemented medium に交換し、48 時間培養した。その細胞培養の上清から EVs を分画遠心法により回収した。培養液(exosome depleted FBS-supplemented medium)に TNF- を加えた群、IFN- を加えた群、両者を加えない群を作成し、EVs を回収した。それぞれの群において、抗炎症作用のあるインターロイキンとして IL-10 の mRNA を RT-PCR により解析した。

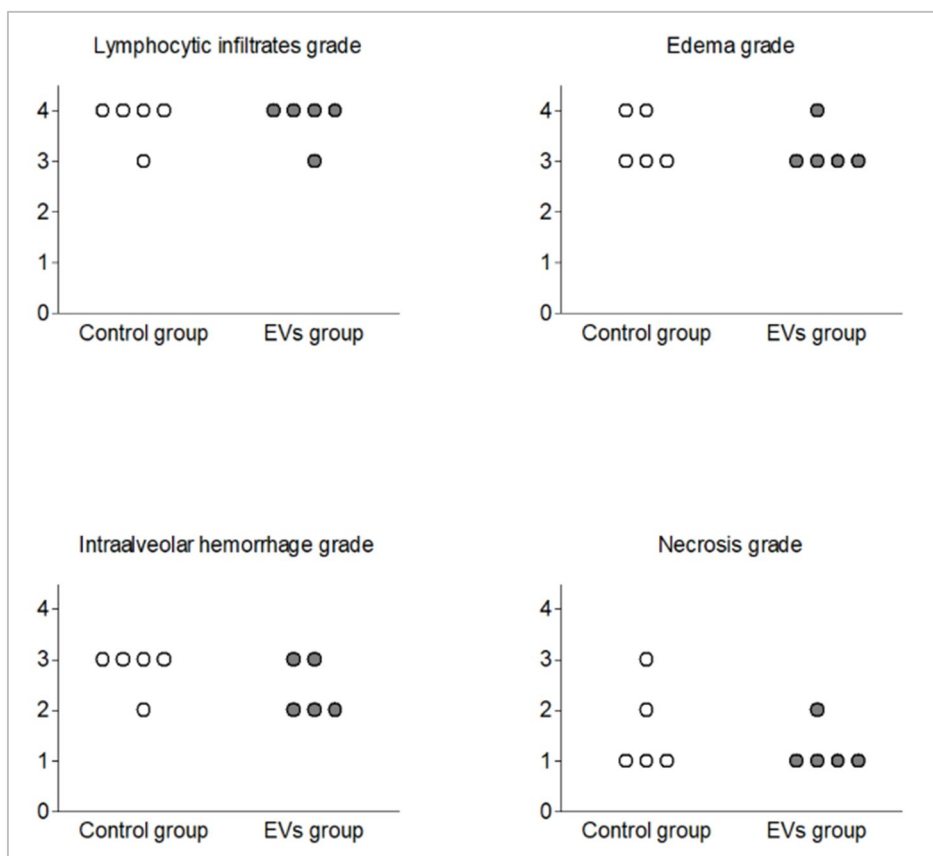
MSC は TNF- $\alpha$  を付加した培養液により培養すると、IL-10 の mRNA を有意に多く含んだ EVs を産生することが確認された（下図）。つづく実験 では、この方法による EVs の回収を行い実験



に用いることとした。

**【実験 MSC 由来の EVs の肺移植後急性拒絶反応に対する効果の検討】**

肺移植の急性拒絶反応モデルである同種異系マウス同所性肺移植モデル(BaIb/c C57BL/6)において、MSC 由来の EVs が肺移植後急性拒絶反応に与える効果を検討した。コントロールとして、線維芽細胞から得られた EVs を用いることとした（MSC と線維芽細胞からの EVs の回収方法については実験 のとおり）。肺移植時にドナーから摘出した肺グラフトに、EVs を経気道投与し、6 日目に動物を犠牲死させ、移植肺を摘出した。摘出した移植肺を HE 染色し、急性拒絶反応の病理学的検討を行った。リンパ球浸潤・浮腫・肺泡出血・壊死のパラメーターにおいて、すべて有意差はなかった（下図）。



【実験 Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse)細胞投与による肺移植後急性拒絶反応に対する効果の検討】

上記の実験と同じく、肺移植の急性拒絶反応モデルである同種異系マウス同所性肺移植モデル(Balb/c C57BL/6)を用いて実験を行った。肺移植を完了し再灌流を行った直後に肺動脈から Muse 細胞を注射した。コントロール群では、線維芽細胞を投与した。この実験は現在進行中である。免疫組織化学染色により、移植した肺には投与した Muse 細胞が生着していることを確認できている。今後、急性拒絶反応の病理学的検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

所属施設の東北大学加齢医学研究所内のミーティングでは数回発表しておりますが、上記に該当するような場での公表は現時点ではありません。

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	大河内 眞也  (Ohkouchi Shinya)  (40375035)	東北大学・事業支援機構・准教授    (11301)	
研究分担者	野田 雅史  (Noda Masafumi)  (70400356)	東北大学・加齢医学研究所・准教授    (11301)	
研究分担者	渡邊 龍秋  (Watanabe Tatsuaki)  (70636034)	東北大学・大学病院・助教    (11301)	
研究分担者	平間 崇  (Hirama Takashi)  (80510338)	東北大学・大学病院・助教    (11301)	

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	岡田 克典  (Okada Yoshinori)  (90323104)	東北大学・加齢医学研究所・教授    (11301)	

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