

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592080

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞による肺移植後急性および慢性拒絶反応制御

研究課題名(英文) Prevention of acute and chronic lung allograft rejection by mesenchymal stem cells

研究代表者

岡田 克典 (Okada, Yoshinori)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：90323104

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)：本研究では、様々な液性因子分泌を介して抗炎症作用を発揮する間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSC)のレシピエントへの投与が、肺移植後急性拒絶反応を抑制するかどうかにつき主要組織適合性抗原不適合ラット肺移植モデルを用いて検討した。移植後6日目に移植肺を摘出し病理学的検討を行ったところ、MSC投与群において拒絶反応のステージとリンパ球浸潤、浮腫、肺胞内出血のスコアが、コントロール群と比較し有意に低値であった。定量RT-PCR解析では、移植肺内のTNF- α のmRNA発現は、hMSC投与両群でコントロール群と比較し低い傾向であった。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of human mesenchymal stem cells (hMSCs) that exhibit immunomodulatory and anti-inflammatory effects on acute allograft rejection in a highly allogeneic lung transplantation model. The lung allografts were harvested on day 6 after transplantation and submitted to the pathological examination and RT-PCR analysis. The stage of acute rejection and pathological scores of lymphocytic infiltration, edema and intraalveolar hemorrhage of the allograft in the recipients administered with hMSCs were significantly decreased compared with those in the control animals receiving PBS. Gene expression of TNF- α in the allografts in the hMSC groups showed a trend toward decrease compared with the those in the control group. The present study demonstrated that hMSC administration was effective in preventing acute allograft rejection in a rat model of lung transplantation.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺移植 ラット 急性拒絶反応 間葉系幹細胞 リンパ球浸潤 浮腫 肺胞内出血 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

肺移植は終末期呼吸器疾患患者に対する有効な治療方法として確立しているが、術後生存率は他の臓器移植と比較し未だ満足できるものではない。この主な原因として、急性・慢性拒絶反応や感染症の頻度が他の臓器に比べ高い事が挙げられる。肺移植の成績向上のためには、効果的で副作用の少ない新たな拒絶反応予防法を開発する必要がある。近年、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) が再生医療の分野で盛んに研究され、様々な細胞への分化能を持つ他、抗炎症作用や免疫抑制作用を発揮することが報告されている。

2. 研究の目的

今回研究者らは、MSC のレシピエントへの投与が急性拒絶反応を抑制しうるか否かについてラット肺移植モデルを用いて検討した。

3. 研究の方法

MHC 完全不適合同種左片肺移植モデル (Brown Norway ラット Lewis ラット) を用いた。実験群として以下の 3 群を設定した。

コントロール群：再灌流直後に PBS 1ml を肺動脈から投与した。

hMSC1 群：ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) 3.0×10^6 cells/ml PBS 1mL を再灌流直後に肺動脈から投与した。

hMSC2 群：hMSC 3.0×10^6 cells/ml PBS 1mL を再灌流直後に肺動脈から投与し、さらに術後 3 日目に hMSC 6.0×10^6 cells/ml PBS 0.5mL をレシピエントラットの陰茎静脈より投与した。

術後 6 日目にレシピエントラットを犠牲死させ、移植肺を採取した。移植肺の急性拒絶反応の程度は、これまで報告された方法で病理組織学的にグレーディングする (Stage1-4) とともに、拒絶反応

に伴う移植肺の炎症所見について、病理学的パラメーター (リンパ球浸潤、浮腫、肺胞内出血、壊死) を設定し、それぞれの所見が各切片内に占める割合に基づいてスコア化した。レシピエント各組織における hMSC の分布の評価をするため、抗ヒト MHC class I 抗体を用いて免疫染色を行った。また、hMSC 投与が移植肺内のサイトカインプロファイルへどのように影響しているか検討すべく、移植肺内の 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) サイトカインとして、interleukin-2 (IL-2)、interferon- (IFN-)、tumor necrosis factor- (TNF-) を、2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) サイトカインとして、interleukin-4 (IL-4)、interleukin-10 (IL-10) の mRNA の発現を定量 PCR を用いて検討した。さらに、hMSC で産生・分泌され MSC の抗炎症効果に主要な役割を果たすことが報告されている tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein (TSG-6) の発現を、RT-PCR 法にて検索した。

4. 研究成果

急性拒絶反応の stage は hMSC2 群においてコントロール群と比較し、有意に低値であった。リンパ球浸潤のスコアは、コントロール群と hMSC1 群において有意差は見られなかったが、hMSC2 群において優位に低値であった。浮腫、肺胞内出血のスコアは、hMSC1 および hMSC2 群において、コントロール群と比較し有意に低値であった。壊死のスコアは、コントロール群と hMSC1 群、hMSC2 群との間に有意差はみられなかった。術後 6 日目に採取した移植肺において、抗ヒト MHC class I 抗体で染色される hMSC が観察された。Th1、Th2 サイトカインの発現については、TNF- の発現が MSC 投与群でコントロール群に

比べ低い傾向にあったが、統計学的な有意差はみられなかった。この他、検索したすべてのサイトカインの発現においてコントロール群と hMSC1 群、hMSC2 群との間に有意差を認めなかった。TSG-6 の RT-PCR では、hMSC1 群・hMSC2 群において TSG-6 の発現を認めた。本研究の結果から、hMSC の移植後投与が肺移植後急性拒絶反応に伴う病理学的変化、すなわち浮腫、肺胞内出血を顕著に軽減させる可能性が示唆された。一方、hMSC 投与が移植肺へのリンパ球浸潤を抑制する効果は軽度であった。hMSC の臨床応用を考える上では、今後投与方法や投与量を詳細に検討するとともに、免疫抑制剤との併用による効果なども検討する必要があると考えられた

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 4 件)

1. Ishibashi N, Okada Y, Watanabe Y, Watanabe T, Hoshikawa Y, Kondo T. Human mesenchymal stem cells reduced acute inflammation associated with acute allograft rejection in rat model of lung transplantation. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation, September 3, 2013, Kyoto International Conference Center (Kyoto Prefecture・Kyoto City)
2. 石橋直也, 岡田克典, 渡辺有為, 渡邊龍秋, 江場俊介, 野津田泰嗣, 星川 康, 近藤 丘. 間葉系幹細胞投与による肺移植後急性拒絶反応抑制に関する実験的検討 .第 29 回日本肺および心肺移植研究会, 2013 年 1 月 26 日, 千葉大学亥鼻キャンパス(千葉県・千葉市)
3. 石橋直也, 岡田克典, 渡辺有為, 渡邊龍秋, 星川 康, 近藤 丘. 間葉幹細胞

投与による肺移植後拒絶反応抑制効果の検討 . 第 2 回 Integrated Pulmonary Circulation Research-III, 2013 年 6 月 22 日、大手町サンケイプラザ(千代田区・東京都)

4. 石橋直也, 岡田克典, 渡辺有為, 渡邊龍秋, 野田雅史, 佐渡 哲, 星川 康, 近藤 丘. 間葉系幹細胞投与による肺移植後急性拒絶反応抑制効果の検討 . 第 49 回日本移植学会総会, 2013 年 9 月 6 日, 国立京都国際センター(京都府・京都市)〔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 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
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
岡田 克典 (OKADA Yoshinori)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号 : 90323104

(2)研究分担者
近藤 丘 (KONDO Takashi)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号 : 10195901

佐渡 哲 (SADO Tetsu)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 20396485

大河内眞也 (SHINYA Okouchi)
東北大学・医学系研究科・講師
研究者番号：40375035

渡邊龍秋 (WATANABE Tatsuaki)
東北大学・病院・助手
研究者番号：70636034

(3) 連携研究者
()

研究者番号：