

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861419

研究課題名(和文)腎拒絶反応における脂肪由来間葉系幹細胞の免疫調整効果に関する研究

研究課題名(英文) Adipose Tissue-Derived Stem Cells Suppress Acute Cellular Rejection by TSG-6 and CD44 interaction in Rat Kidney Transplantation.

研究代表者

加藤 大悟 (Kato, Taigo)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70648021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラット腎移植急性拒絶反応モデルを用いて、脂肪由来間葉系幹細胞(Adipose-tissue derived stem cells, ADSCs)の免疫調整効果の解明を行った。その結果、ADSCs投与により拒絶反応は改善し、生着率も延長した。MLRにおいて、ADSCsはレシピエントリンパ球増殖を抑制し、培養上清中では、免疫抑制作用を示すtumor necrosis factor-inducible gene 6 protein (TSG-6)の増加がみられた。リコンビナントTSG-6により有意にリンパ球増殖が抑制され、ADSCsはTSG-6を分泌しつつT細胞の活性化を抑制すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the beneficial effects of ADSCs in rat kidney transplantation and analysed the underlying molecular mechanism. DA rat kidneys were transplanted into Lewis rats. Histological findings of the ADSCs group revealed a reduced rejection grade, while the number of infiltrated CD4+/CD8+ T cells was also significantly decreased as compared to the control. Relative to these findings, injection of ADSCs led to a significantly prolonged mean graft survival compared with the control. In vitro, autologous ADSCs dose-dependently suppressed alloreactive lymphocytes. Moreover, ADSCs increased the level of tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein (TSG-6) in MLR, which has anti-inflammatory capacity. Recombinant TSG-6 markedly suppressed alloreactive T cells through downregulating CD44, which may lead to the suppression of T cell activation and infiltration into allografts.

研究分野：腎移植学、移植免疫学

キーワード：間葉系幹細胞 腎移植 急性拒絶反応

## 1. 研究開始当初の背景

腎移植は年間症例数が本邦では約 1600 例、世界的には約 4 万例と臓器移植において最大数を占めている (臓器移植ファクトブック 2013)。近年の免疫抑制療法の進歩により、短期・中期的な移植腎生着率は大幅に向上したが、長期成績においては慢性拒絶反応や感染症、悪性腫瘍、心血管系疾患の合併など未解決の問題が多く残っている。今後の検討課題としては、現在主流の免疫抑制療法での臨床成績を維持しながらも、それに伴う合併症を軽減する免疫抑制療法の開発が望まれる。

## 2. 研究の目的

申請者は腎移植における基礎研究として免疫抑制作用を持つ細胞療法の開発に重点を置き、間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells, MSC) に関する研究を行った。

MSC は *in vitro* において T 細胞の増殖抑制などの免疫調整効果が示されている体性幹細胞であるが、その効果を示す作用機序は未だ解明されていない点が多い。臨床腎移植においても、術後急性期あるいは慢性期に MSC を投与することで、現行の免疫抑制薬の減量や拒絶反応の治療としての可能性が期待できる。脂肪由来の MSC である Adipose tissue derived stem cells (ADSCs) は骨髄由来の MSC と比較して幹細胞数が多く、比較的容易に採取可能である利点を有している。また高い免疫調整効果を有しており、臨床応用が期待されるが、その前提としての臓器移植モデルにおける ADSCs の免疫調整効果や作用機序を検討した報告はなかった。そこで申請者は拒絶反応における ADSCs の免疫調整効果及びその作用機序の解明を目指し研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) ラット腎移植急性拒絶反応モデルにおける ADSCs の拒絶反応抑制効果の検討  
ラット腎移植急性拒絶反応モデルを作成し、

腎動脈より ADSCs を投与した。移植腎病理組織像及び生着率を検討した。

(2) ADSCs による免疫抑制作用機序の解明  
Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) により、ADSCs がリンパ球増殖を抑制し得るかを検討した。また MLR 培養上清中の免疫抑制効果を示す soluble factor の検討も行った。

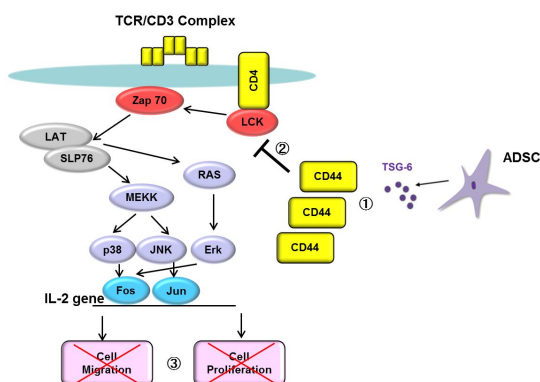
## 4. 研究成果

(1) 著明な拒絶反応を示す対照群と比較し、ADSCs 投与群では有意に改善し、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 細胞数も有意に減少した。これらを反映して、ADSCs 投与により生着率は  $7.7 \pm 1.3$  日と対照群 ( $6.6 \pm 0.6$  日) と比較して有意に延長し、*in vivo* における ADSCs の免疫抑制効果が証明された。

(2) ADSCs は用量依存性にリンパ球増殖を抑制したため、ADSCs は細胞間相互作用に加え、サイトカインなどの soluble factor の分泌によりリンパ球の増殖抑制効果を示していると考えられた。そこで MLR/ADSCs 共培養上清を解析したところ、免疫抑制効果を示す soluble factor として、Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein (TSG-6) の有意な上昇を認めた。また移植腎組織中における TSG-6 の発現および移植腎における ADSCs の局在性の検討した結果、ADSCs は TSG-6 を分泌しつつ、移植後早期の T 細胞活性化や移植腎への T 細胞浸潤を抑制していると考えられた。

更に TSG-6 による免疫抑制作用機序の解明を行い、ADSCs の分泌する TSG-6 は、直接的あるいは間接的に T 細胞上の CD44 に作用し、移植後早期に移植腎における T 細胞活性化や浸潤を抑制することで生着率を延長し得ることが示された。以上の研究成果により、今後免疫抑制薬の減量や拒絶反応治療といった臨床応用に繋がることが期待される。今後は慢性拒絶反応モデルにおいても ADSCs による組織障害の軽減や生着率の延長効果が得

られるかについても検討する予定である。



### 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)

1. Kato T, Okumi M, Tanemura M, Yazawa K, Kakuta Y, Yamanaka K, (4名省略、1番目), Takahara S, Nonomura N.: Adipose Tissue-Derived Stem Cells Suppress Acute Cellular Rejection by TSG-6 and CD44 interaction in Rat Kidney Transplantation Transplantation. 2014; 98: 277-84

[学会発表](計5件)

1. Kato T, Okumi M, Tanemura M, Yazawa K, Kakuta Y, Yamanaka K, Tsutahara K, Doki Y, Mori M, Takahara S, Nonomura N.: Adipose Tissue-Derived Stem Cells Suppress Acute Cellular Rejection via TSG-6 and CD44 interaction in Rat Kidney Transplantation. World Transplant Congress 2014(July 29, 2014, San Francisco)

2. Kato T, Okumi M, Nonomura N.: Adipose Tissue-Derived Stem Cells Suppress Acute Cellular Rejection via TSG-6 and CD44 interaction in a Rat Kidney Transplantation. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation

(Sep 5, 2013, Kyoto)

3. 加藤 大悟, 奥見 雅由, 山中 和明, 角田 洋一, 野々村祝夫: ラット腎移植急性拒絶反応モデルにおける脂肪組織由来間葉系幹細胞の免疫抑制効果およびその作用機序についての検討 第102回日本泌尿器科学会総会(2014年4月, 神戸)

4. 加藤 大悟, 奥見 雅由, 山中 和明, 角田 洋一, 野々村祝夫: ラット腎移植急性拒絶反応モデルにおける脂肪組織由来間葉系幹細胞の免疫抑制効果およびその作用機序についての検討 第23回泌尿器分子・細胞研究会(2014年3月, 山形)

5. 加藤 大悟, 奥見 雅由, 種村 匡弘, 山中 和明, 角田 洋一, 矢澤 浩治, 高原 史郎, 土岐祐一郎, 森 正樹, 野々村祝夫: ラット腎移植モデルにおける脂肪組織由来間葉系幹細胞(Adipose Tissue-Derived Stem Cells)の免疫調整効果についての検討 第49回日本移植学会(2013年9月, 京都)

[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

なし

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 大悟 (KATO, Taigo)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 70648021

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし