

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

工藤 浩也

専攻分野：腎泌尿器外科学

コース：

指導教授：力石 辰也

主論文の題目：

Induction of Macrophage-Like Immunosuppressive Cells from Mouse ES Cells That Contribute to Prolong Allogeneic Graft Survival.

(マウス ES 細胞からのアログラフト生着延長に寄与するマクロファージ様免疫抑制細胞の誘導)

共著者: Haruka Wada, Hajime Sasaki, Hyuma Tsuji, Ryo Otsuka, Muhammand Baghdadi, Satoshi Kojo, Tatsuya Chikaraishi, Ken-ichiro Seino

緒言

臓器不全に対する治療として移植医療が行われているが、近年移植医療が発展する一方で臓器不足が問題となっている。この問題を解決する方法として多能性幹細胞による再生医療が期待されている。

多能性幹細胞には ES 細胞や iPS 細胞があるが、ES 細胞を用いた再生医療には免疫学的に他家移植となるため免疫抑制療法が必要となる。

免疫抑制療法には免疫抑制剤が使用されるが、感染症の発症や発がんのリスクが高くなることが問題とされている。そのため、長期生着や副作用の問題を解決するため、免疫抑制細胞による細胞治療が広く研究されている。

多能性幹細胞が将来的に移植医療に用いられる際に、他人由来の細胞を移植すると拒絶反応がおこることが予想されるが、同じ多能性幹細胞から誘導した免疫抑制細胞による細胞治療で、拒絶反応が抑えられるか実験を行った。

方法

はじめにマウス ES 細胞から免疫抑制性細胞を分化誘導する方法を新規に樹立することに成功した。ES 細胞は 129/SvJ 系統の E14 を用いた。また移植実験に、同 ES 細胞から胚様体と心筋細胞を分化誘導し、再生医療用細胞（移植片）のモデルとして準備した。移植を受ける C3H マウスは ES 細胞から誘導した免疫抑制細胞を投与して前処置を行った後に移植片を移植する群、免疫抑制細胞を投与せずに移植片を移植する群で、その生着期間を比較検討した。

またこの誘導した免疫抑制細胞の表面マーカーをフローサイトメトリー (FCM) により、遺伝子発現を real time PCR を用いて解析を行った。免疫抑制能を解析するため、免疫抑制細胞と T 細胞を共培養して、T 細胞の増殖活性をチミジン法で測定した。

検定方法は t 検定を用いた。

結果

ES 細胞から胚様体を形成し、マウス腎被膜下に移植する実験をおこなった。129 マウスと ES 細胞は同系同種のため生着したが、同系異種の C3H マウスには生着しなかった。C3H マウスに免疫抑制細胞を前処置として投与した群では、約 14 日間の生着延長が見られた ($p < 0.001$)。

次に ES 細胞から誘導した心筋細胞を移植片として用いた。同様に同系同種間の移植では全例生着が見られたが、同系異種では移植後 14 日目には 30%、21 日目には 20%、28 日目には 10% の生着率であった。免疫抑制細胞を前処置として投与した群では、移植後 14 日目には 90%、

21 日目には 75%、28 日目には 63%と有意な生着延長がみられた (p<0.01)。

この免疫抑制細胞の性状を解析するため、FCM による表面マーカーの発現を調べた。その結果、CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺F4/80⁺であることからマクロファージに類似していることが判明した。

次に real time PCR を用いて免疫を抑制する因子の遺伝子発現を比較すると *Retnl α* 、*Arginase1*、*Nos2*、*Tgf β 1* の分子を強く発現していた。

多能性幹細胞から誘導した免疫抑制細胞は同系異種の T 細胞と共培養すると、T 細胞の増殖を抑える効果があることがリンパ球混合試験の結果からわかった。この抑制細胞の作用機序を解明するため、免疫抑制因子の阻害剤を加え、抑制された T 細胞の活性が回復するかを確認する実験を行った。その結果、*Nos2* 遺伝子にコードされている一酸化窒素合成酵素の働きにより、T 細胞の活性を抑制していることが判明した。

考察

移植実験の結果から、再生医療に用いる多能性幹細胞由来の移植片は他家移植では拒絶されてしまうが、免疫抑制細胞を先行投与することによりその拒絶反応が抑えられることが可能であることを示すことができた。

FCM の結果より、免疫抑制細胞はマクロファージの表面抗原に類似していた。また *Retnl α* や *Arginase1* などの創傷治癒マクロファージのマーカーが強く発現している一方で、古典的活性化マクロファージのマーカーである *Nos2* も強く発現していた。そのため両方の特性をもつ hybrid なマクロファージと考えられる。

本実験ではでは多能性幹細胞再生医療用の移植片と同時に、免疫拒絶反応を抑える新しい細胞を作り出し、拒絶反応を抑えるという新しいコンセプトを提案しただけでなく、その有効性を実証した初めての研究であり、これからの移植医療での実践応用が期待される。

結論

本研究では、ES 細胞から新しい免疫抑制細胞を分化・誘導する方法を確立し、その抑制機序と抑制効果を示すことができた。