

論文内容要旨

Co-transplantation of pre-activated mesenchymal stem cells improves intraportal engraftment of islets by inhibiting liver natural killer cells in mice
(経門脈的膵島移植における活性化間葉系幹細胞の同時移植は肝臓内ナチュラルキラー細胞を抑制し、グラフト生着率を改善する)

American Journal of Transplantation, in press.

主指導教員：大段 秀樹教授
(医系科学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：安達 伸生教授
(医系科学研究科 整形外科学)

副指導教員：田中 友加准教授
(医系科学研究科 消化器・移植外科学)

石田 伸樹

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景】

経門脈的膵島移植は 1 型糖尿病の治療として行われているが、生着率が悪く、単回投与では十分な治療効果が得られないため複数回の移植を必要とする。これまで我々は、膵島移植後の肝臓内 Natural Killer (NK)細胞の活性が膵島傷害に関与していることを証明してきたことから、膵島移植後の肝臓内 NK 細胞の活性を抑制することにより、生着率が改善すると考えられた。そこで、NK 細胞を含む各種免疫細胞に対して、抑制効果を持つと報告されている間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSCs)に注目した。膵島移植直後には補体、凝固、自然免疫反応により非特異的炎症反応を生じるが、この反応には interferon- γ (IFN- γ)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-1 β (IL-1 β)といった炎症性サイトカインの産生を伴う。一方でこれらのサイトカインは MSCs を活性化し、免疫抑制能を誘導するとされている。これらのことから膵島と MSCs を同時に門脈内に投与した際、炎症性サイトカインにより活性化した MSCs が NK 細胞の活性化を抑制し、膵島の生着率が改善すると考え、これを検討した。しかしながら、*in vivo* において MSCs の活性化が不十分な可能性もあり、投与前に *in vitro* で炎症性サイトカインによる活性化を行った MSCs についても膵島との同時投与後の肝臓内 NK 細胞活性に対して抑制効果を示すか、また膵島グラフト生着率改善効果を有するかについて検討を行った。

【方法】

はじめに活性化 MSCs をマウス門脈内に投与するにあたって、MSCs 活性化に適したサイトカインの組み合わせについて *in vitro* で検討を行った。MSCs の NK 細胞を抑制する因子は prostaglandin E2 (PGE2)であることから、サイトカイン刺激下における MSCs の cyclooxygenase 2 (COX-2)活性について経時的变化について検討した。次にマウスの門脈に膵島のみを投与した群、膵島と前処置なしの naive MSCs を同時投与した群、膵島と活性化 MSCs を同時投与した群、それぞれの群における膵島投与後の肝臓内 NK 細胞の表面マーカーについてフローサイトメトリー で検討を行った。また、糖尿病化を行ったマウスに投与を行い、血糖改善効果について検討を行った。

【結果】

in vitro の実験において、MSCs を IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β の 3 種で刺激を行った場合において、COX-2 活性は徐々に増強し、96 時間後にピークに達していた。単一のサイトカイン刺激や 2 種類のサイトカインで刺激を行った場合では、COX-2 活性が十分に上昇しない、あるいは長時間維持することができなかった。このことから、3 種類のサイトカインで 24 時間刺激を行ったものを活性化 MSCs とした。この活性化 MSCs を膵島と同時に門脈内に投与した場合において、膵島のみを投与した場合と比べて、移植 3 日後の肝臓内 NK における CD69 (活性化マーカー)、TRAIL (細胞傷害分子)、CXCR3 (ケモカインレセプター) 表出率の低下が認められた。naive MSCs を膵島と同時に投与した場合には抑制効果が認められなかった。糖尿病化マウスに投与した場合においては活性化 MSCs と膵島を同時に投与した場合において顕著な血糖改善効果が認められた。さらにこの実験モデルにおいて実際に PGE2 が NK 細胞に対する抑制効果と血糖改善効果に関与しているかについて COX-2 遺伝子のノックアウトを行った MSCs での効果を検討し

た。活性化 COX-2 knockout MSCs を膵島と同時投与した群において、活性化 control MSCs を投与した群に比べてNK細胞における TRAIL と CXCR3 表出率が有意に高値であった。また、血糖改善効果が有意に悪化していた。

【考察】

MSCs と膵島の同時移植の有用性はこれまでに報告されていたが、実臨床と同様の経門脈的に移植を行った実験モデルで検討されることは稀であった。また、それらの報告の多くは膵島グラフトへの血管新生促進効果や MSCs のインスリン分泌細胞への分化能に着目したものであった。肝臓内の免疫細胞に対する影響について検討した報告はこれまでなく、我々は肝臓内 NK 細胞を抑制するには、MSCs の投与前の活性化が有用であること、その抑制効果に PGE2 が関与していることを明らかにした。この研究結果は経門脈的膵島移植における MSCs 同時移植の有用性について、新たな合理的根拠を示した。