

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	石田 伸樹
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 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）			
論文審査担当者			
主査	教授	一戸	辰夫 印
審査委員	教授	田	妻 進
審査委員	准教授	仲	一 仁
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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、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-<math>\gamma</math> (IFN-<math>\gamma</math>)、tumor necrosis factor-<math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>)、interleukin-1<math>\beta</math> (IL-1<math>\beta</math>)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。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。</p> <p>その結果、in vitro の実験において、MSCs を IFN-<math>\gamma</math>、TNF-<math>\alpha</math>、IL-1<math>\beta</math> 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</p>			

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。これまでに、MSCs と膵島の同時移植の有用性は報告されていたが、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、本研究は肝臓内 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。

以上の結果より、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点で高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が石田伸樹に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。