

マウス急性移植片対宿主病モデルに対する脱分化脂肪細胞移植の効果

Effect of dedifferentiated fat cell transplantation in a mouse model of acute graft-versus-host disease

村井健美¹⁾, 石毛美夏¹⁾, 風間智彦²⁾, 加野浩一郎³⁾, 高橋昌里¹⁾, 麦島秀雄⁴⁾, 松本太郎⁵⁾
Takemi MURAI¹⁾, Mika ISHIGE¹⁾, Tomohiko KAZAMA²⁾, Koichiro KANO³⁾,
Shori TAKAHASHI¹⁾, Hideo MUGISHIMA⁴⁾, Taro MATSUMOTO²⁾

¹⁾日本大学医学部小児科科学系小児科学分野, ²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野, ³⁾日本大学生物資源科学部応用生物科学科, ⁴⁾川越予防医療センター・クリニック

【要旨】

造血幹細胞移植において移植片対宿主病(graft versus host disease: GVHD)はしばしば治療に難渋する重大な合併症である。近年、ステロイド抵抗性急性 GVHD に対し、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)を用いた細胞治療の有効性が報告され、臨床応用が開始されている。脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)は成熟脂肪細胞を天井培養することにより調製される MSC 様細胞である。本研究では、マウス急性 GVHD モデルに対し DFAT を経静脈的に投与し、その治療効果を評価した。その結果、DFAT 投与により、GVHD に伴う体重減少が抑制され、GVHD の臨床スコアを有意に改善することが明らかになった。急性 GVHD に対する DFAT を用いた細胞治療の可能性が示唆された。

【背景および目的】

造血幹細胞移植に伴う重大な合併症として移植片対宿主病(graft versus host disease: GVHD)がある。レシピエントの抗原提示細胞によるドナーT 細胞の活性化により免疫拒絶が惹起されて起こる病態である。治療としてステロイドや免疫抑制剤投与が行われるが、しばしば治療に抵抗性を示し、重篤な場合は死に至る。薬物治療に抵抗性を示す急性 GVHD に対して、近年、細胞治療が注目されており、間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)を用いた臨床応用が開始されている¹⁾。Matsumotoら²⁾は、成熟脂肪細胞を天井培養という方法で培養することにより調製される脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell : DFAT)が、高い増殖能と MSC に類似した多分化能を獲得することを明らかにした。DFAT は少量の脂肪組織より大量調製することが可能であることから実用性の高い細胞治療用ソースとして期待される。本研究では、マウス急性 GVHD モデルに DFAT を経静脈投与し、その治療効果を検討した。

【方法】

MHC 不一致の急性 GVHD モデルは、Schroederらの既報³⁾に従い作成した。具体的にはドナーマウス(C57BL/6J, MHC:H-2[b])より単離した骨髓細胞(1×10^7)および脾臓 CD3⁺細胞(3×10^6)を骨髓破壊処置(X線 11Gy 全身照射)を行ったレシピエントマウス(B6D2F1, MHC:H-2[b/d])の尾静脈に投与して GVHD を誘導した。計 30 頭のマウスを Control 群、GVHD 群、GVHD+DFAT 群の3群に分けた(各群 n=10)。Control 群は、放射線照射後のレシピエントマウスにドナーマウス骨髓細胞を移植した。GVHD 群は、放射線照射後のレシピエントマウスにドナ

一マウス骨髄細胞と脾臓 CD3⁺細胞を同時移植した。GVHD 群は、放射線照射後のレシピエントマウスにドナーマウス骨髄細胞と脾臓 CD3⁺細胞を同時移植した。GVHD+DFAT 群は、放射線照射後のレシピエントマウスにドナーマウス骨髄細胞と脾臓 CD3⁺細胞を同時移植したのに加え、マウス DFAT(5 x10⁵)を移植当日、7日後、14日後に尾静脈より投与した(図1)。各群の評価は、Kaplan-Meier 曲線による生存分析、体重の推移、GVHD 臨床スコア⁴⁾、移植 21 日後の大腸の組織学的検討にて行った。

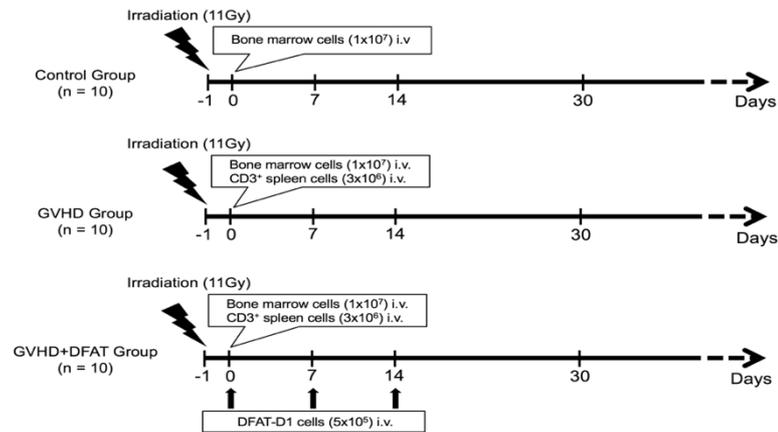


図 1. 実験プロトコール

【結果】

各群の生存分析では、Control 群は、移植後 84 日の観察期間中、死亡は 10 頭中 2 頭のみであった。GVHD 群は、移植後 20 日目より死亡例が出現し、54 日目には 10 頭全て死亡した。一方、GVHD+DFAT 群は移植後 24 日目から死亡例が認められたものの、84 日目まで生存例が認められた。各群の体重推移の比較を図2に示す。Control 群は移植後 3 日目までは体重が減少したが、その後増加に転じ、14 日目には移植前の体重に回復した。GVHD 群と GVHD+DFAT 群は Control 群に比べ、7 日目より有意な体重低下を認めた。GVHD+DFAT 群は全期間を通して GVHD 群よりも体重減少が軽度であり、14、24 日目の時点において両群間に有意差(p<0.05)を認めた。各群の臨床症状の比較では、移植後 21 日以後 GVHD+DFAT 群は GVHD 群に比べ、活動性の低下、亀背、脱毛の程度が弱い傾向があり、下痢を認める個体は存在しなかった。各群の大腸組織所見の比較では、Control 群がほぼ正常であったのに対し、GVHD 群は腸管径の拡大、絨毛構造の破壊、著明な炎症性細胞の浸潤が認められた。一方、GVHD+DFAT 群は炎症細胞の浸潤は認めるものの絨毛構造は比較的保たれており、腸管径の拡大も軽度であった。

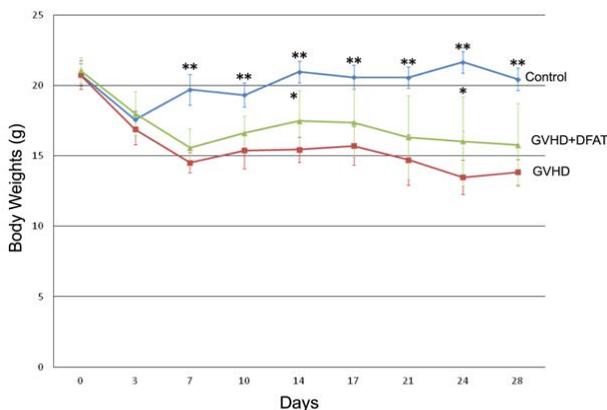


図2. 各群の体重推移の比較

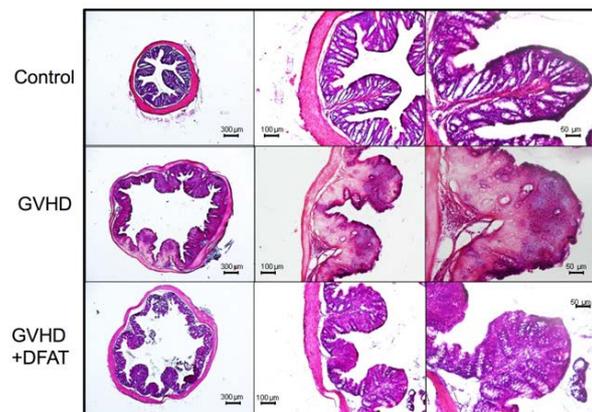


図3. 各群の大腸組織像の比較

【考察】

本研究では、DFAT を全身投与すると急性 GVHD が抑制できる可能性が示された。DFAT は MSC と類似した液性因子の分泌プロファイルを示すことが明らかにされている⁵⁾。したがって MSC で報告されている TGF- β , HGF, NO, HLA-G, IDO-1 といった免疫制御に関わる液性因子の分泌や、制御性 T 細胞の誘導促進作用⁶⁾を介して治療効果を示したと予想される。造血幹細胞移植後の急性 GVHD 患者では、骨髄 MSC を採取することは困難であるため、同種他家 MSC 移植が行われている。DFAT は少量の脂肪組織から低侵襲性に大量調製できることから、患者自身の細胞を用いた治療が可能となることが予想される。今後ヒト DFAT を用いた前臨床試験を行い、有効性や安全性を検証することが望まれる。

【結語】

マウス急性GVHDモデルに対しDFATを静脈内投与すると、GVHDに伴う臨床症状や病理所見を改善できることが明らかになった。急性GVHDに対するDFATを用いた新規細胞治療の可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371:1579-1586.
- 2) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J. Cell. Physiol.* 2008;215:210-222.
- 3) Schroeder MA, DiPersio JF. Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis. Model. Mech.* 2011;4:318-333.
- 4) Fukui J, Inaba M, Ueda Y, et al. Prevention of graft-versus-host disease by intra-bone marrow injection of donor T cells. *Stem Cells* 2007;25:1595-1601.
- 5) Kikuta S, Tanaka N, Kazama T, et al. Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. *Tissue Eng Part A* 2013;19:1792-1802.
- 6) Ben-Ami E, Berrih-Aknin S, Miller A. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2011;10:410-415.