

末梢血単球とヒト骨髄間葉系幹細胞の相互作用による プロスタグランジン E2を介した *in vitro* T細胞分裂抑制に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

血液疾患に対する同種造血幹細胞移植の目的の一つは、移植したドナーの免疫担当細胞がレシピエントの腫瘍細胞を傷害する効果 (GVL効果) であるが、同時に発生するレシピエントの体細胞への傷害が強すぎる場合は急性移植片対宿主病 (以下急性GVHD) としてレシピエントの予後に多大な影響を及ぼす。急性GVHDでは、単球系細胞がLPSなどの刺激を受けて活性化し、T細胞を刺激することが重要な役割を果たしている。

2004年以降、難治性急性GVHDを対象とした骨髄由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell; 以下MSC) の臨床応用が発表され、有望な成績が報告されている。MSCによる免疫制御の機序にはさまざまなものが想定されているが、急性GVHDの起点となる単球系細胞を介した免疫抑制機序にはまだ不明な点が多い。

本研究では、急性GVHDにおいて重要な役割を果たす樹状細胞やマクロファージが単球由来の細胞であることに注目し、COX-2-PGE2系を介して単球系細胞とMSCが相互に作用し、T細胞増殖を抑制する機序の解明を行った。

【方法と結果】

MSCは健常人より骨髄液を採取し、既存の報告通り作成した。単球とT細胞は健常人の末梢血を、それぞれの磁気マイクロビーズ抗体と磁気細胞分離システムを用いて作成した。

まず、LPS存在下もしくは非存在下でそれぞれMSCと単球を共培養し、細胞質内にCOX-2を発現しているMSC及び単球の割合をフローサイトメトリー法にて解析した。MSCにおいては、単独の培養では $0.8 \pm 1.0\%$ とほぼ認められなかったCOX-2は、LPS刺激下では $21.3 \pm 18.5\%$ ($p < 0.05$ vs MSC)、単球との共培養では $41.1 \pm 29.9\%$ ($p < 0.05$ vs MSC)、LPS刺激下での共培養では $75.4 \pm 24.2\%$ ($p < 0.05$ vs MSC, MSC+LPS, MSC+単球)と増加していた。単球においては、単独の培養では $0.3 \pm 0.2\%$ とCOX-2を発現している単球はほとんど認められなかったが、LPS刺激下では $87.7 \pm 7.4\%$ ($p < 0.05$ vs 単球)と著明に増加した。一方、MSCとの共培養では $16.7 \pm 13.3\%$ ($p < 0.05$ vs 単球, 単球+LPS)と軽度の増加を認め、LPS刺激下でのMSCとの共培養では $85.6 \pm 7.5\%$ ($p < 0.05$ vs 単球, MSC+単球)と、MSCが存在しないLPSによる刺激とほぼ同等の増加を示した。

次に、これらの培養上清中のCOX-2の代謝産物であるPGE2の濃度を測定した。MSC単独あるいは単球単独の培養上清のPGE2濃度はそれぞれ 76.0 ± 50.9 pg/ml, $1,040 \pm 1,125$ pg/mlであり、LPSを加えるとそれぞれ $1,044 \pm 1,405$ pg/ml, $2,282 \pm 1,420$ pg/mlと増加を示した。MSCと単球の共培養後の濃度は $57,319 \pm 47,154$ pg/ml、LPS刺激下でのMSCと単球の共培養後の濃度は $109,297 \pm 75,651$ pg/mlであり、MSCと単球との共培養で有意差をもってPGE2の濃度の上昇が見られた。またMSCと単球との共培養下でのPGE2の濃度は、LPSの有無でその産生に有意

差は見られなかったものの、LPS添加群で高い傾向が見られた。

さらに、T細胞にCD3/CD28ビーズとrIL-2を添加によって引き起こされるT細胞分裂は、LPS存在下の単球と共培養すると亢進した。一方このT細胞の分裂はPGE2の添加で抑制され、LPS添加と単球との共培養による分裂の亢進もPGE2の添加により有意に抑制された。次に、PHA-MとrIL-2を添加して分裂を促進させたT細胞とMSCの共培養を行ったところ、T細胞の分裂抑制が観察され、さらにPGE2添加時と同様に、LPS添加と単球との共培養による分裂の亢進もMSCとの共培養により有意に抑制された。CD3/CD28ビーズとrIL-2とLPSを添加したT細胞と単球とMSCの共培養下にCOX-2選択的阻害剤であるNS398を添加したところ、MSCによるT細胞の分裂抑制が解除され、PGE2をさらに添加すると分裂が再度抑制された。

最後にMSCが単球から分泌されるサイトカインの産生の制御にMSCが関与している可能性を検討するために、単球が分泌するTNF- α およびIL-10の細胞質内の発現量をフローサイトメトリー法にて測定した。LPSを加えると単球はTNF- α を産生したが、これはMSCとの共培養あるいはPGE2の添加により有意に抑制された。また、LPS刺激下では単球内のIL-10発現量は軽度増加したが、MSCの添加によりさらに増加傾向が認められた。MSCの代わりにPGE2を添加しても同様にIL-10を産生する単球の増加が観察された。

【考察】

今回の検討から、MSCが炎症性の単球と共培養されることによりCOX-2を高発現し、高容量のPGE2を分泌することが明らかとなった。LPSによる刺激ではMSCと単球それぞれの単独での培養上清におけるPGE2の濃度はほぼ同じであるが、共培養することでその濃度は約200倍となった。この時、COX-2を発現している細胞の割合を見ると、単球では約85%でほぼ不変なのに対してMSCでは約20%から約75%へ著明に増加していた。このことから、共培養によって増加した上清中PGE2はMSCから分泌されたものである、と考えられた。さらに、CD3/28ビーズやPHA-Mによって惹起されるT細胞の分裂はMSCとの共培養や、培養液にPGE2を加えることで有意に抑制され、このMSCによるT細胞の分裂抑制がCOX-2選択的阻害剤の存在下で解除された。以上から、MSCによるT細胞の分裂抑制の機序にはMSCが発現したCOX-2から産生されるPGE2が重要な役割を担っていることが示された。

急性GVHDの発症およびその維持には、T細胞ならびに抗原提示細胞の両者が存在することが必須である。T細胞をCD3/28ビーズやPHA-Mで刺激した際に引き起こされる分裂は、LPSで刺激した単球が加わることで著しく増強された。これは、実際に体内で起こっている急性GVHDの発症やその持続を実験系で再現している状態と言える。炎症性の単球が加わって増強されたT細胞分裂が、MSCの添加によりほぼ完全に打ち消されたことは極めて興味深い。すなわち、MSCが存在しないとT細胞と単球という急性GVHDの発症および維持における責任細胞が協調してT細胞の増殖方向へと向かうのを、MSCが加わることにより、T細胞と単球両者の協調によって増強された増殖さえも抑制出来ることが示されたと言える。

また、MSCが存在しない状態ではLPSで刺激された単球はTNF- α を産生するが、ここにMSCを加えるとLPSで刺激された単球によりMSCのCOX-2の発現が誘導され、このCOX-2によってMSCがPGE2を産生し、このPGE2が単球に働いてTNF- α ではなく、IL-10を優位に産生する細胞へと変化させた。このことは炎症性の単球に端を発した現象にMSCが加わることで最終的には単球が抗炎症性へ帰着することを意味している。この機構を考慮すると、臨床的に急性GVHDに対してMSCを投与する場合、単球がそこにより多く存在することで、よりGVHDが沈静化する可能性がある。しかし、投与する細胞の割合や投与前にMSCと単球を共培養する必要性の有無など、今後*in vivo*でのさまざまな検討が必要と思われる。

【結語】

間葉系幹細胞(MSC)は単球との共培養によりCOX-2を高発現し、高容量のPGE2を産生し、T細胞分裂を抑制した。この分裂抑制は、LPSで刺激された単球により増強されたT細胞分裂も抑制可能であった。MSCから産生されたPGE2により、単球から産生されるTNF- α の産生が低下しIL-10の産生が増加し、単球が抗炎症性の性質を持つように変化した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学 位 論 文 題 名

末梢血単球とヒト骨髄間葉系幹細胞の相互作用による プロスタグランジン E₂を介した *in vitro* T 細胞分裂抑制に関する研究

血液疾患に対する同種造血幹細胞移植の合併症である急性GVHDに対し、難治性のものに対する治療法として骨髄由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell ; 以下MSC) の臨床応用が報告されているが、このMSCの免疫抑制機序のうち、単球系細胞を介したものについては、まだ不明な点が多い。本研究では、急性GVHDにおいて重要な役割を果たす樹状細胞やマクロファージが単球由来の細胞であることに注目し、COX-2-PGE₂系を介して単球系細胞とMSCが相互に作用し、T細胞分裂を抑制する機序の解明を行った。

研究には、健常人末梢血より作成したT細胞、単球、及び健常人骨髄液より作成したMSCを用いた。MSCは炎症性の単球と共培養されることによりCOX-2を強発現し、高容量のPGE₂を分泌することが明らかとなった。また、LPS刺激下でのMSCと単球の培養において、それぞれ単独での培養上清におけるPGE₂の濃度はほぼ同じであるが、共培養することでその濃度は約200倍となった。この時のCOX-2を発現している細胞の割合は、単球では約85%でほぼ不変なのに対してMSCでは約20%から約75%へ著明に増加していた。このことから、共培養によって増加した上清中PGE₂はMSCから分泌されたものである、と考えられた。T細胞刺激で惹起されるT細胞の分裂は、MSCとの共培養や、培養液にPGE₂を加えることで有意に抑制され、このMSCによるT細胞の分裂抑制がCOX-2選択的阻害剤の存在下で解除された。以上から、MSCによるT細胞の分裂抑制の機序にはMSCに発現したCOX-2から産生されるPGE₂が重要な役割を担っていることが示された。また、MSCが存在しない状態ではLPSで刺激された単球はTNF- α を産生するが、ここにMSCを加えるとLPSで刺激された単球によりMSCのCOX-2の発現が誘導され、このCOX-2によってMSCがPGE₂を産生し、このPGE₂が単球に働いてTNF- α ではなく、IL-10を優位に産生する細胞へと変化させた。

急性GVHDの発症及び維持には、T細胞ならびに抗原提示細胞の両者の存在が必須である。炎症性の単球が加わって増強されたT細胞分裂がMSCの添加によりほぼ完全に打ち消されたことは極めて興味深い。すなわち、MSCが存在しないとT細胞と単球という急性GVHDの発症及び維持における責任細胞が協調してT細胞の増殖方向へと向かうのを、MSCが加わることにより、T細胞と単球両者の協調によって増強された増殖さえも抑制出来ることが

示されたと言える。

以上より、間葉系幹細胞 (MSC) は単球との共培養により COX-2 を高発現し、高容量の PGE₂ を産生し、T 細胞分裂を抑制し、この分裂抑制は、LPS で刺激された単球により増強された T 細胞分裂も抑制可能であること、また、MSC から産生された PGE₂ により、単球から産生される TNF- α の産生が低下し IL-10 の産生が増加し、単球が抗炎症性の性質を持つように変化することが分かった。

本研究の結果を臨床応用する際には、MSC と共に単球を投与することで、より GVHD が沈静化させる細胞療法が期待されると考えられた。

質疑応答では、副査の秋田弘俊教授から、PGE₂ 以外に MSC 由来の抗炎症性に働くと考えられる液性因子についての考察、MSC と単球間の直接的な接触による免疫抑制機構についての考察、の 2 点について質問があった。次いで、副査の今村雅寛教授から、MSC による T 細胞の分裂抑制について、CTL など T 細胞をさらに細かく分類しての検討の有無と考察、単球を DC に変更した場合に予想される分化抑制効果についての考察、今回検索した TNF α や IL-10 以外のサイトカインについての検討の有無と考察、今回の検討から言える臨床応用での具体的な戦略、の 4 点についての質問があった。さらに、主査の小池隆夫教授より、MSC を作成する方法論や作成の際の注意点、多分化能を有する細胞であることから予想される発癌性と抗原性についての考察、臨床的に MSC ではなく PGE₂ を直接投与した際に考えられる作用、の 3 点についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は過去の文献報告や未発表であった実験結果などを引用し、概ね適切に回答した。

この論文は、MSC が T 細胞の活性化を抑制する機序に、直接的ではなく、単球を介して起こる作用を検討し、さらにその単球の性質が MSC により変化することを示したことが高く評価され、今後のさらなる MSC の免疫抑制機序の解析、ならびに GVHD への治療応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。