

ヒト胎児付属物由来幹細胞の免疫制御能の差異と
そのメカニズムに関する検討（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系小児科学専攻

下澤 克宜

2015 年

指導教員 細野 茂春

【背景】

造血幹細胞移植は、白血病などの造血器悪性腫瘍ならびに再生不良性貧血などの骨髄不全症に対する根治療法である。移植関連合併症としてもっとも多いのが移植片対宿主病 (Graft-versus-host disease: GVHD) である。急性 GVHD の一次治療はステロイドの全身投与であるが、奏効率は 30~50% で重篤化しやすく、ステロイド抵抗性急性 GVHD の予後は不良である¹⁻²⁾。ステロイド抵抗性急性 GVHD に対する標準化された二次治療はまだなく³⁾、治療戦略の一つとして、間葉系幹細胞 (mesenchymal stromal cell: MSC) による免疫細胞治療が近年注目されている⁴⁻⁶⁾。

MSC は骨細胞・軟骨細胞・筋細胞・腱などの中胚葉系のさまざまな組織に分化する能力をもち、高い増殖活性をもつ非造血系の未分化細胞である。ヒト胚性幹細胞 (Embryonic stem cell: ESC) とは異なり腫瘍原性はないとされ、さまざまな免疫制御因子を発現し、また免疫原性が低いことから第三者由来の細胞も用いることが可能であるといった、治療用細胞として有利な特徴を有している。現在進行中の臨床治験の多くは骨髄由来 MSC であるが、細胞採取に伴う侵襲性が比較的大きいこと、高齢者の骨髄由来 MSC は増殖活性が低下しやすく治療に必要な細胞数確保が困難であることなどが課題とされている。

胎盤や臍帯、卵膜、臍帯血などの胎児付属物は胎児が出産されるまで一時的に存在し、分娩後に不必要となる特殊な組織である。胎児付属物には MSC が豊富に存

在し、骨髄由来 MSC と同様な免疫調節機能をもつ細胞が含まれている可能性が高い⁷⁾。胎児付属物由来幹細胞は本来ならば分娩後に破棄される胎児付属物から無侵襲的に調製できるため、胎芽を破壊しないと得られない ESC や採取に侵襲的処置を要する骨髄由来 MSC に比べて、細胞の臨床使用に関連する倫理的障壁も少なく、細胞治療用細胞源として優位性がある⁸⁾。したがって、胎児付属物由来幹細胞による細胞治療は、ステロイド抵抗性急性 GVHD に対する二次治療の新たな戦略として期待でき、臨床応用に向けて研究が進んでいる⁹⁾。しかし、胎児付属物由来幹細胞の局在部位による形質や機能の差異に関しては、今まで詳細に検討されていない。MSC はその由来組織、培養方法によって性状が異なり、GVHD 治療に最適な MSC の確立のための研究が望まれる。

【目的】

臍帯 Wharton's jelly (WJ) および胎盤羊膜から単離・培養できる 3 種類の胎児付属物由来幹細胞の免疫調節能について比較解析し、急性 GVHD をはじめとする免疫関連疾患に対する免疫細胞治療ソースとして最適な細胞の同定を試みる。

【方法】

1. 細胞培養および調整、細胞表面抗原プロファイルの確認

両親の同意の得られた、帝王切開で出生した正期産児の臍帯と胎盤を用いて、同一ドナーに由来する臍帯 WJ 由来 MSC (WJ-MSC)、羊膜上皮由来幹細胞 (amniotic epithelial stem cell: AEC)、羊膜間質由来幹細胞 (amniotic mesenchymal stem cell: AMC) の 3 種類の幹細胞を培養調製した (n=4)。比較対照として Lonza 社から購入したヒト皮膚線維芽細胞 (Fibroblast, 5 株) を用い、第 5 継代以内の細胞で実験した。胎盤は胎児面の羊膜を一部切り取り、ピンセットを用いて機械的に羊膜上皮と羊膜間質に分離した。検体採取後 2 時間以内に細胞調整を開始した。WJ-MSC は臍帯動静脈を除去後に Explant 法で、AMC および AEC は酵素処理法 (Dispase および Collagenase type II) で単離し、10%ウシ胎児血清含有 Minimum Essential Medium Alpha でプラスチックディッシュにて培養した。付着細胞が 80% confluent に達した時点で、0.05% Trypsin-EDTA を用いて細胞を回収し、各実験に用いた。各細胞の細胞表面抗原プロファイルを FACSCalibur フローサイトメーターで解析し、MSC の特徴を有するかを評価した。なお、ヒト末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell: PBMNC) は健常ドナー末梢血より比重遠心法にて分離し、直ちに実験に使用した。

2. ヒト T リンパ球増殖抑制試験

WJ-MSC、AMC、AEC もしくは Fibroblast と PBMNC を共培養し、T リンパ球の carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) アッセイを行った。細胞密度を PBMNC との比が 1:100、1:10、1:5 となるように調整した各細胞を 24 well-plate に播種し一晩培養後、CFSE 標識 PBMNC を直接またはカルチャーインサートを介して加え、抗 CD3/CD28 抗体+リコンビナント IL-2 刺激下で 4 日間共培養した。培養 4 日後に非付着細胞を回収し、フローサイトメーターにて CFSE 蛍光強度を測定し、Proliferation index (PI) を算出してリンパ球増殖の程度を評価した。PBMNC のみで T リンパ球刺激を施したもの(陽性コントロール)の PI に対する比(Ratio of proliferation index)を算出し統計解析に用いた。

3. 細胞へのサイトカイン刺激と免疫調節関連因子の解析

GVHD の病態に関与する Th1 リンホカインである TNF α (10 ng/ml) もしくは IFN γ (150 U/ml) で各細胞を 6 時間もしくは 3 日間刺激した。サイトカイン刺激方法は Prasanna SJ ら¹⁰⁾、Deuse T ら¹¹⁾の既法に従ったが、あらかじめ予備実験を行い決定した。免疫制御および免疫原性に関する因子の発現を、未刺激(Basal 群)、TNF α 刺激群、IFN γ 刺激群に分けて、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR)法およびフローサイト

メーターを用いて解析した。リアルタイム RT-PCR では、
prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2)、hepatocyte growth factor
(HGF)、major histocompatibility complex, class I, E (HLA-E)、indoleamine
2,3-dioxygenase 1 (IDO1)などの免疫制御関連因子や、class II, major
histocompatibility complex, transactivator (CIITA)、CD40 など免疫原性関連因子
の mRNA 発現を解析した。フローサイトメーターでは、免疫制御を司る programmed
death ligand 1 (PD-L1, B7-H1)と PD-1、免疫原性を司る HLA-DR と cluster of
differentiation (CD)40 の細胞表面抗原の発現を解析した。

【結果】

1. 胎児付属物由来幹細胞の細胞表面抗原プロファイル

WJ-MSC、AMC、AECともにHLA-ABC陽性、MSC マーカーであるCD73、CD90、
CD105、CD13、CD44、CD29、CD54、CD47 が陽性で、HLA-DR 陰性、血液細胞マ
ーカーであるCD34、CD45、CD11b 陰性、造血前駆細胞マーカーであるCD38、
CD133 陰性であった。これらプロファイルは MSC の minimal criteria¹²⁾に一致し、細
胞間で明らかな差異は認めなかった。

2. Tリンパ球増殖反応に対する胎児付属物由来幹細胞共培養の効果(リンパ球増殖抑制試験)

WJ-MSC、AMC、AEC や Fibroblast と共培養すると、刺激後リンパ球コロニー数が減少する傾向が認められた。CFSE アッセイでは蛍光ピークの左方シフトが抑制されピーク数が減少する傾向にあり、T リンパ球の増殖が抑制されていることが示された。特にWJ-MSCとAECで蛍光ピークの右方シフトが強く認められた。ドナーごとに比較すると、直接共培養では細胞濃度依存性にリンパ球増殖が抑制され、ドナー間で多少の差はあるがリンパ球増殖抑制作用は WJ-MSC で高く、AMC と Fibroblast で低い傾向を認めた。一方、ドナー#2 のように WJ-MSC が高い抑制効果を示さず、逆に AEC が高い抑制効果を示すといった、個体差が存在することも明らかとなった。間接共培養では、抑制効果はあるものの同じ細胞濃度の直接共培養に比べすべての細胞で減弱する傾向を認めた。これは細胞と Tリンパ球との直接接触による相互作用 (cell-cell contact) が抑制効果の一助となっていることが示唆された。細胞ごとの比較では、WJ-MSC、AEC、AMC、Fibroblast はいずれもリンパ球増殖抑制作用を示すが、特に WJ-MSC で抑制効果が高いことが示唆された。

3. 免疫制御関連因子の発現

免疫制御関連因子の mRNA 発現を解析した結果、リンパ球増殖抑制効果が高かった WJ-MSC において高発現を認めた因子として、基礎発現では、PTGS2, TGF- β 1, TRAIL が、IFN γ 刺激下では、HGF、HLA-E、NOS2、PD-L1 が、TNF α 刺激下では、CCL2 が他の細胞に比べて有意に高値を示した。T リンパ球の増殖を負に制御する因子で B7 ファミリー分子のひとつである PD-L1 発現が WJ-MSC で高く、Fibroblast で低いことから、胎児付属物由来幹細胞の cell-cell contact による T リンパ球増殖抑制効果は高い可能性が示唆された。

4. 免疫原性関連因子の発現解析

CIITA の mRNA の基礎発現は非常に低く、IFN γ 刺激で著明に増強した。IFN γ 感受性は Fibroblast で高く、胎児付属物由来幹細胞で低い傾向があり、IFN γ 誘導性 HLA-DR の細胞表面抗原の発現も同様の結果であった。CD40 は胎児付属物由来幹細胞より Fibroblast で発現が高かった。

【考察】

WJ-MSC、AMC、AEC はいずれも免疫制御能を有するが、WJ-MSC がもっとも強く、これには PTGS2 や HGF、HLA-E、IDO1、PD-L1 などの免疫制御関連因子が高発現していることが関与していると考えられた。胎児付属物由来幹細胞は Fibroblast よ

り免疫原性が低いことが明らかとなり、拒絶されにくい細胞であることが考えられた。

免疫制御能の高さと免疫原性の低さから、胎児付属物由来幹細胞の中でも

WJ-MSC がもっとも免疫細胞治療ソースとしての有用な特徴をもつと考えられた。

【引用文献】

- 1) Deeg HJ How I treat refractory acute GVHD. *Blood* 2007; **109**:4119–4126.
- 2) Remberger M, Aschan J, Barkholt L *et al.* Treatment of severe acute graft-versus-host disease with anti-thymocyte globulin. *Clin Transplant* 2001; **15**:147–153.
- 3) Pidala J, Anasetti C Glucocorticoid-refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; **16**:1504–1518.
- 4) Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B *et al.* Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; **363**:1439–1441.
- 5) 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.
- 6) Prasad VK, Lucas KG, Kleiner GI *et al.* Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; **17**:534–541.

- 7) Izumi M, Pazin BJ, Minervini CF *et al.* Quantitative comparison of stem cell marker-positive cells in fetal and term human amnion. *J Reprod Immunol* 2009; **81**:39–43.
- 8) Bieback K, Brinkmann I Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World journal of stem cells* 2010; **2**:81–92.
- 9) Nagamura-Inoue T, He H Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World journal of stem cells* 2014; **6**:195–202.
- 10) Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR *et al.* Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PloS one* 2010; **5**:e9016.
- 11) Deuse T, Stubbendorff M, Tang-Quan K *et al.* Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 2011; **20**:655–667.
- 12) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; **8**:315–317.