

論文の内容の要旨

氏名：金 澤 剛 二

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：ヒト胎児付属物由来幹細胞の培養上清中に存在する Exosome の免疫抑制能の検討

【目的】間葉系幹細胞（MSC）が細胞外小胞（Exosome）を分泌し、含有するマイクロ RNA（miRNA）を標的細胞へ運搬することで、組織修復や免疫抑制能をもたらすことが明らかにされているが、胎児付属物由来 MSC から分泌される Exosome が免疫抑制能をもつかは明らかでない。本研究では胎児付属物より羊膜間質由来 MSC（AM-MSC）および臍帯 Wharton' s Jelly 由来 MSC（WJ-MSC）から分泌された Exosome を抽出して、それらの含有する miRNA の網羅的解析と T 細胞増殖抑制能や制御性 T 細胞（Treg）の分化に関わる効果を検討した。

【方法】AM-MSC、WJ-MSC の培養上清から Exosome を抽出し、透過電子顕微鏡による形態観察とウェスタンブロット法による Exosome 特異的マーカー（CD63）の検出を行った。また、それぞれの Exosome（AM-MSC Exo、WJ-MSC Exo）から RNA を抽出し、含有する miRNA の発現を miRNA マイクロアレイにて解析した。また PKH67 で蛍光標識された AM-MSC Exo、WJ-MSC Exo をヒト T リンパ球へ添加し Exosome の取り込み能を評価した。AM-MSC Exo、WJ-MSC Exo を CFSE 標識したヒト末梢血単核球に添加し、抗 CD3/28 抗体と IL-2 含有培地にて 4 日間培養後、T 細胞増殖能をフローサイトメーターで評価した。次に AM-MSC Exo、WJ-MSC Exo をヒト臍帯血 CD4 陽性 T 細胞に添加し、抗 CD3/28 抗体と IL-2 含有培地にて 4 日間培養後、ナイーブ T 細胞から Treg 細胞へ分化した割合を定量評価した。

【結果】AM-MSC、WJ-MSC 培養上清の抽出液中には、高純度の Exosome の存在を確認することができた。また AM-MSC、WJ-MSC 由来 Exosome 中には多くの miRNA が存在し、T リンパ球の増殖抑制や Treg 細胞の分化に関わると報告される複数の miRNA の発現が認められた。AM-MSC Exo と WJ-MSC Exo に発現する miRNA を比較した結果、WJ-MSC の方が AM-MSC に比べて T 細胞増殖抑制に関わる miRNA が強く発現していた。AM-MSC Exo、WJ-MSC Exo は、ヒト T リンパ球へ効率良く取り込まれ、濃度依存性にヒト T リンパ球の増殖を抑制した。AM-MSC、WJ-MSC との共培養、または AM-MSC-Exo、WJ-MSC-Exo 添加は、ヒト臍帯血ナイーブ T 細胞から Treg 細胞への分化を促進した。

【結論】AM-MSC や WJ-MSC から分泌された Exosome には免疫制御に関わる複数の miRNA を含有し、T 細胞に効率良く取り込まれ、T 細胞増殖抑制作用やナイーブ T 細胞から Treg 細胞の分化促進作用を示すことが明らかとなった。