

# Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid lineage and CD4+ T-cell suppression

著者	東元 真実
著者別表示	Higashimoto Mami
journal or publication title	博士論文要旨Abstractおよび要約Outline
学位授与番号	13301甲第4093号
学位名	博士（医学）
学位授与年月日	2014-06-30
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/42046">http://hdl.handle.net/2297/42046</a>

doi: <https://doi.org/10.1002/eji.201343531>



## 論文の内容要旨

### 主論文題名

Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4<sup>+</sup> T-cell suppression

European Journal of Immunology 第43巻 第11号 2956頁～2968頁 平成25年9月掲載

専攻部門 環境医科学専攻 恒常性制御学

氏名 東元 真実

(主任教員 金子 周一教授)

間葉系幹細胞(Mesenchymal Stromal Stem Cell:MSC)は骨髄、臍帯、脂肪組織間質などに豊富に存在し、多分化能、抗炎症効果を有することから、乳房再建、虚血性心疾患、肝疾患をはじめとしたさまざまな臓器再生療法への応用研究が行われている。ほとんどの肝疾患は炎症が関与しており、MSCを用いた肝疾患への再生療法開発においては、炎症に対する免疫修飾効果、詳細な機序を明らかにすることが重要である。Concanavalin A(ConA)は、齧歯動物において急性肝炎を誘導する。本研究では、C57BL/6マウスにおけるConA誘導肝炎における、MSCを含む脂肪組織由来間質細胞(Adipose tissue derived stromal stem cell:ADSC)の治療効果機序を検討した。ADSCはマウスの鼠径部から採取した脂肪を酵素処理にて分離、継代培養し獲得した。C57BL/6マウス(10-12週齢、雌)にConA(300 µg)を尾静脈注射し、ConA投与の同時および3時間後にADSC(1x10<sup>5</sup>個)を尾静脈より投与した。

まず、ConA誘導肝炎の病態を解析した。ConA投与による肝内炎症、重症度について、免疫染色による肝臓内のCD4<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>、Gr-1<sup>+</sup>およびF4/80<sup>+</sup>細胞の集簇、血清ALT活性値およびLDH活性値測定により評価した。CD4<sup>+</sup>細胞の集簇はConA投与6時間後にピークに達し、CD11b<sup>+</sup>細胞とGr-1<sup>+</sup>細胞の集簇はConA投与3時間後から始まり12時間後にピークに達し、それぞれ24時間後まで持続した。F4/80<sup>+</sup>細胞の集簇はConA投与6時間後に増加し、24時間後にはConA投与前のレベルまで減弱した。血清ALTおよびLDH活性値は、ConA投与12時間後にピークに達した。また、ConA誘導肝炎マウスの肝内炎症細胞においてmyeloid-derived suppressor cell(MDSC)が増加することが確認された。クロドロネート投与、モノクローナル抗体投与により、単球マクロファージ系細胞、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞をdepleteしたマウスにConA投与を行い、肝炎の重症度を血清ALT活性値およびLDH活性値測定により比較したところ、単球マクロファージ系細胞をdepleteしたマウスで肝炎が著明に抑制され、CD4<sup>+</sup>T細胞をdepleteしたマウスで抑制される傾向を認めた。

次にADSCのConA誘導肝炎に対する抗炎症効果を検討した。C57BL/6マウスへのConA投与と同時に投与後3時間後にADSCを投与した場合、24時間後の血清ALT活性値およびLDH活性値の低下が認められ、治療効果および予防効果があることが明らかとなった。ConA誘導肝炎マウスに投与したADSCの生体内分布を検討した。GFP発現ADSCをConA投与と同時に投与し、ConA投与6時間後と24時間後の肺組織および肝組織を免疫染色にて評価したところ、肺への分布は双方で確認されたが、肝臓にはConA投与3時間後にADSCを投与した場合のみ分布し、ADSCが肝内炎症によってリクルートされることが示唆された。ConA投与3時間後にADSCを投与したマウスの肝組織における炎症細胞集簇について、免疫染色による評価を行ったところ、CD4<sup>+</sup>細胞集簇への影響は明らかではなかったが、CD11b<sup>+</sup>細胞集簇は減弱し、Gr-1<sup>+</sup>およびF4/80<sup>+</sup>細胞集簇は著明に抑制された。肝内MDSCの頻度は、ADSCによって増加しなかった。肝組織および肝内炎症細胞について、DNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。ADSCをConA投与と同時に投与したマウスと、ADSC非投与ConA誘導肝炎マウスの肝組織について、両群に発現量に有意差のあった遺伝子はそれぞれ589遺伝子および309遺伝子あり、ADSC投与により多数の遺伝子発現が減弱していた。ConA投与後3時間にADSCを投与したマウスの肝組織において、発現が減弱した遺伝子は、Gr-1とMac-1(CD11b)に関連していることが示唆され、ADSCによる抑制効果はミエロイド系細胞に影響を与えていることが明らかとなった。また、ConA誘導肝炎マウスから採取した肝内CD4<sup>+</sup>細胞およびCD11b<sup>+</sup>細胞とADSCを共培養したところ、ConAによりミエロイド系細胞およびCD4<sup>+</sup>T細胞により誘導されるサイトカイン、ケモカイン発現は、ADSCによって抑制された。

以上より、ConA肝炎におけるADSCの抗炎症効果機序は、活性化したミエロイド系細胞およびCD4<sup>+</sup>T細胞を抑制であることが明らかとなった。