

京都大学	博士（医学）	氏名	藤井紀恵
論文題目	GVHD amelioration by human bone marrow mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles is associated with peripheral preservation of naive T cell populations (ヒト骨髄間葉系幹細胞由来細胞外小胞は末梢のナイーブT細胞分画を保持することにより急性移植片対宿主病を緩和する)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>同種造血幹細胞移植後のステロイド抵抗性急性移植片対宿主病 (graft versus host disease: GVHD) に対して、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow mesenchymal stromal/stem cell: BM-MSc) を用いた細胞治療の有効性が示されている。しかしながら、その治療効果の発現機序は完全には明らかにされていない。本研究では、細胞間情報伝達物質である細胞外小胞 (extracellular vesicle: EV) に着目し、ヒト BM-MSc 由来 EV が抗 GVHD 効果を示し、個体内に免疫学的変化を誘導するかをマウスモデルを用いて検討した。</p> <p>【方法】 EV はヒト BM-MSc 培養上清からポリマー沈殿法を用いて分離し、イムノブロットによるテトラスパニン分子 CD63/CD81 の発現、透過型電子顕微鏡による小型膜小胞の存在および qNano を用いた調節可能抵抗パルスセンシング法による小胞のサイズ分布によりその存在を確認した。In vitro の実験では、ヒト末梢血単核球を抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、EV が T 細胞亜分画に与える影響を検討した。マウス GVHD モデルは、全身放射線照射 (8Gy) BDF1 マウス (H-2^{b/d}) に C57BL/6 マウス (H-2^{b/h}) 脾細胞を経静脈的に移植して作成した。GVHD マウスに BM-MSc 由来 EV を尾静脈的に全身投与することで、生存期間、GVHD 関連症状、GVHD 標的組織障害および末梢 T 細胞亜分画動態におよぼす影響を解析した。さらにマイクロアレイ解析によって BM-MSc 由来 EV に含まれる micro RNA の網羅的発現解析を行った。</p> <p>【結果】 BM-MSc 由来 EV は、CD3/CD28 刺激によるヒト末梢血 CD8+ および CD4+ T 細胞の増幅を抑制し、CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺FOXP3^{low} ナイーブ制御性 T 細胞 (Treg) を保持した。BM-MSc 由来 EV の投与を受けた GVHD マウスは、生存期間が有意に延長し、GVHD 関連症状と大腸・皮膚における組織障害の軽減が認められた。末梢血では CD62L⁺CD44⁺エフェクター T 細胞が減少し、CD62L⁺CD44⁻ナイーブ T 細胞は増加していた。また、CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg は保持されていた。T 細胞の機能分化が抑制されており、これらの臨床的、病理組織学および免疫学的変化は正常ヒト皮膚線維芽細胞 (normal human dermal fibroblast: NHDF) 由来 EV では認められなかった。NHDF 由来 EV を対照として BM-MSc 由来 EV に含まれる micro RNA の網羅的発現解析を行ったところ、mir-125a-3p の発現が上昇し、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway 解析や Gene Ontology (GO) 解析で細胞増殖や細胞死、GVHD に関わる pathway が抑制されていた。</p> <p>【結論】 BM-MSc 由来 EV はその母細胞である BM-MSc と同様に抗 GVHD 効果を示した。免疫学的メカニズムとして T 細胞増殖抑制とナイーブ T 細胞分画の保持作用と、BM-MSc 由来 EV に含まれる microRNA プロファイルが関連することが示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

同種造血幹細胞移植後のステロイド抵抗性急性移植片対宿主病 (GVHD) に対して、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSc) を用いたセルセラピーの有効性が示されているが、その治療効果の発現機序は完全には明らかにされていない。

本研究では、細胞間情報伝達物質である細胞外小胞 (EV) に着目し、ヒト BM-MSc 由来 EV が抗 GVHD 効果を示し、個体内に免疫学的変化を誘導するかをマウスモデルを用いて検討した。その結果、EV 投与群は非投与群と比較し、生存期間が延長し、GVHD 関連症状と大腸・皮膚組織障害が軽減した。また、末梢 CD4⁺および CD8⁺ T 細胞の抑制、CD62L⁺CD44⁺T 細胞の減少、CD62L⁺CD44⁻T 細胞の増加、および CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞の保持が認められた。

以上から、BM-MSc 由来 EV は臨床的・組織学的に抗 GVHD 効果を有し、免疫学的に末梢 T 細胞増殖を抑制しナイーブ T 細胞分画を保持することが示された。正常ヒト線維芽細胞を陰性対照としたマイクロアレイ解析で得られた BM-MSc 由来 EV の microRNA プロファイルはこれらの結果を支持するものであった。

本研究はヒト骨髄間葉系幹細胞の急性移植片対宿主病に対する治療効果発現メカニズムの解明に貢献し、様々な免疫異常や組織障害に対する BM-MSc 由来 EV によるセルフリーセラピーの開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成30年 2月14日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降