

主論文の要旨

**Therapeutic effect of allogeneic bone marrow-derived
mesenchymal stromal cells on aortic aneurysms**

〔 他家間葉系幹細胞の大動脈瘤への治療効果 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 血管外科学分野

(指導：古森 公浩 教授)

秋田 直宏

【緒言】

大動脈瘤は主に高齢男性に多く発症し、破裂すると生命を脅かす疾患である。治療は手術が中心だが、従来の開胸開腹手術は侵襲が大きく、近年ではより低侵襲なステントグラフト治療も行われている。しかし解剖学的に適応となる患者に制限があることや、エンドリーク、マイグレーションに伴う遠隔成績低下といった問題があり、より低侵襲な新たな治療戦略が必要とされている。

近年、大動脈瘤の分子病態は、動脈硬化を主体とした局所の慢性炎症が原因であることが解ってきた。より低侵襲でユニークな治療法として、間葉系幹細胞(MSC)の「免疫抑制作用」「抗炎症作用」「傷害部位集積作用」を利用した幹細胞療法があるが、自己細胞を用いた場合、対象患者が高齢であり、細胞を量的、質的に保証できるかが問題となる。一方で、MSCは免疫寛容能を持っていることが知られており、他家細胞でも一定の効果が期待できる。本研究では他家MSCを用いて、大動脈瘤に対する治療効果を検討した。

【対象及び方法】

- 1) In vitro; C57BL6由来MSCおよびBALB/C由来MSCに対し、フローサイトメトリーによる細胞表面マーカー解析を行った。C57BL6リンパ球をマイトマイシンCで処理したC57BL6, BALB/Cのリンパ球、MSCと5日間共培養しリンパ球混合試験(MLR)で免疫寛容を検討した。
- 2) In vivo; 24週以上の雄のアポリポプロテインEノックアウトマウス(C57BL6由来)に対し浸透圧ポンプを使用してアンジオテンシンIIを連続28日間持続皮下注射しマウス大動脈瘤モデルを作製した。エコーで瘤形成を確認後、それぞれ10匹ずつ生食群(group S)、C57BL6 MSC群(group Au)、BALB/C MSC群(group Al)に分類し、それぞれ尾静脈から生食0.2mL、MSC 10^6 個を投与した。2週間後に大動脈瘤径、Elastica Van Gieson染色による瘤壁中膜のエラスチン評価、ザイモグラフィによる大動脈瘤壁のMMP活性、ELISAによる炎症性サイトカイン、瘤壁の免疫蛍光染色によるM1及びM2マクロファージの評価を行った。

【結果】

- 1) In vitro; 表面マーカーは両MSC間で差はなくSca-1, CD29, CD44およびCD106は陽性で、CD11b, CD34, MHCクラスII, CD80, CD86およびc-Kitは陰性であった。MLRでは自家リンパ球と各MSC群とで差はなく免疫寛容が示された(C57BL/6 lymphocytes vs BALB/C lymphocytes vs C57BL/6 MSCs vs BALB/C MSCs; 106 ± 1 vs 182 ± 11 vs 112 ± 12 vs 132 ± 9 %, $p < 0.01$)。
- 2) In vivo; S群と比較して、Au群とAl群では大動脈径が有意に縮小していた(group S vs Au vs Al; 2.2 vs 1.40 vs 1.36 mm, $p < 0.01$)。また、エラスチン分解が有意に抑えられ(group S vs Au vs Al; 45.8 ± 3.3 vs 58.4 ± 1.9 vs 56.2 ± 2.0 %, $p < 0.05$)、MMP-2およびMMP-9活性が低下し(active MMP-2: group S vs Au vs Al; 0.45 ± 0.07 vs 0.28

± 0.03 vs 0.23 ± 0.05 units/ml, $p < 0.05$; active MMP-9: group S vs Au vs Al; 0.34 ± 0.06 vs 0.15 ± 0.03 vs 0.16 ± 0.04 units/ml, $p < 0.05$)、IL-6 および MCP-1 の発現が低下し (IL-6: group S vs Au vs Al; 3399.5 ± 644.5 vs 1475.6 ± 329.6 vs 937.5 ± 178.8 pg/ml, $p < 0.05$; MCP-1: group S vs Au vs Al; 352.7 ± 61.0 vs 208.0 ± 22.6 vs 165.1 ± 24.9 pg/ml, $p < 0.05$)、IGF-1 および TIMP-2 の発現が上昇していた (IGF-1: group S vs Au vs Al; 2.0 ± 0.6 vs 4.7 ± 1.0 vs 5.7 ± 0.4 pg/ml, $p < 0.05$; TIMP-2: group S vs Au vs Al; 4.0 ± 0.6 vs 9.5 ± 1.0 vs 11.1 ± 2.3 pg/ml, $p < 0.05$)。さらに、Au 群と Al 群の瘤壁で有意に M1 マクロファージが低下し (group S vs Au vs Al; 23.3 ± 3.9 vs 12.5 ± 1.2 vs 14.5 ± 1.1 %, $p < 0.05$)、Al 群で M2 マクロファージが有意に増加していた (group S vs Al; 14.5 ± 1.7 vs 25.2 ± 2.1 %, $p < 0.05$)。各結果は、Au 群と Al 群との間に差はなかった。

【考察】

我々は以前にも動脈瘤に対する MSC 療法の可能性を検討し、C57BL/6 マウスから得た自家 MSC を静脈内注射することで動脈瘤が縮小することを報告した。本研究では、BALB/C マウスから得られた他家 MSC を使用し、動脈瘤に対する治療効果を自家 MSC と比較した。各 MSC は、大動脈瘤壁において、IL-6, MCP-1 および MMP-2 の減少、IGF-1 および TIMP-2 の増加をもたらした。また本研究では、M2 マクロファージの割合は Al 群の方が S 群よりも有意に高かったが、Al 群と Au 群では有意差はなかった。これらの結果から、他家 MSC と自家 MSC は同等の抗炎症作用と治療効果を示していることが明らかになった。

我々の *in vitro* の結果は、C57BL/6 と BALB/C の両方の MSC において、細胞表面抗原である MHC クラス II, CD80 および CD86 の発現レベルが非常に低いことを示している。MSC 上での MHC クラス II および補体分子の発現の欠如は、ヘルパー T および細胞傷害性 T 細胞の両方の増殖を抑制し、炎症性サイトカインの産生を減少させ、ナチュラルキラー細胞の活性化を阻害し、抗原および補体分子の発現を減少させることが知られている。さらに、本研究のリンパ球増殖アッセイでは、C57BL/6 リンパ球の増殖は BALB/C リンパ球によって誘導されたが、BALB/C または C57BL/6 の MSC によっては誘導されなかったことが示された。これらの結果は、他家 MSC は治療中に免疫応答を誘発しなかったことを示唆している。

私たちは、自家 MSC の投与が動脈瘤に対して有効な治療法であることを報告してきた。しかし動脈瘤は高齢者に多い疾患であるため、動脈瘤患者から自家 MSC を採取することは困難な場合があり、これが自家細胞療法の大きな欠点の一つとなっている。他家 MSC の利点としては、健康な若いドナーから事前に採取し、凍結保存して将来の使用に備えることができる点が挙げられ、これらの細胞は自家 MSC よりも動脈瘤の治療に有用である可能性が示唆されている。

我々の研究にはいくつかの限界がある。第一に、投与細胞数と細胞注入の適切な時期、回数に関しては依然として不明であり、現在のところ、この問題に関する研究

は非常に少なく明確な方法は確立されていないこと。第二に、他家 MSC は完全に免疫寛容されていない可能性があること。これまでの多数の研究では、他家 MSC は、我々の結果で示されたものと同様に免疫寛容と免疫調整が示されていた。しかし、いくつかの *in vitro* 研究は、他家 MSC が低レベルの免疫反応を誘発する可能性を指摘している。他家 MSC が免疫反応を誘発するかどうかは、現在も議論の余地があり、今後更なる研究の必要がある。

【結論】

本研究により、アポリポプロテイン E ノックアウトマウスによる大動脈瘤モデルにおいて、他家 MSC 投与で、免疫反応もなく自家 MSC と同等の治療効果が得られた。本研究により、他家 MSC 治療が新たな大動脈瘤の治療法となる可能性が示唆された。