

## 論 文 要 旨

氏 名	張 香梅
論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)	
Local delivery of mesenchymal stem cells with poly-lactic-co-glycolic acid nano-fiber scaffold suppress arthritis in rats (ポリマー乳酸・グリコール酸ナノファイバー担体を利用した間葉系幹細胞の局所投与によるラット関節炎の抑制)	
論文要旨	
<p>研究の目的: 関節リウマチは多関節炎を主座とする全身性自己免疫疾患である。関節リウマチでは、自己免疫寛容の破綻による自己応答性 T 細胞や B 細胞の活性化、および、滑膜線維芽細胞や破骨細胞による骨・軟骨組織の破壊等により関節機能が不可逆的に低下する。間葉系幹細胞 (MSC) は、骨芽細胞および軟骨細胞、筋細胞、脂肪細胞など関節を構成する細胞への多分化能を有する。また、疾患モデル動物では、MSC は免疫抑制作用を有することも報告された。しかし、MSC を治療に用いるには大量の細胞数を要し、臨床応用への障害となっている。本研究では、ラット関節炎モデルに於いてナノファイバー担体を足場として MSC を局所投与し、関節炎や関節破壊の制御の可能性を解明することを目的とした。</p>	
<p>方法: ポリ乳酸グリコールから構成される微細繊維系素材、ナノファイバーを用いて MSC の局所投与のための足場とした。II 型コラゲン誘導性関節炎 (CIA) ラットに於いて、ヒト骨髄由来 MSC を関節内注射、腹腔内注射、およびナノファイバーに播種して足関節移植の異なる 3 経路で投与した。6 週間後、関節炎スコアによる臨床評価、X 線画像診断、HE 染色による病理学的組織所見にて、ヒト MSC による CIA への抑制効果を評価した。MSC をナノファイバー播種して試験管内で 3 週間培養し、TGF-<math>\beta</math>1 等の産生量を測定した。</p>	
<p>結果: (1) ラットに於いてコラゲン誘導性関節炎は 11 日目に顕著に誘導されたが、MSC を関節内注射、または、腹腔内注射しても関節炎には殆ど影響を及ぼさなかった。一方、ナノファイバー播種 MSC 移植により、CIA による関節炎、関節破壊は、肉眼所見、関節炎スコア、X 線画像診断、さらには、病理学的組織所見のいずれにおいても顕著に抑制された。また、ナノファイバー播種 MSC 移植による関節炎の抑制は、移植していない前足でも認められた。(2) CIA ラットでは顕著な脾腫、リンパ節腫大を認めた。また、これらの組織では多発性肉芽腫形成とリンパ球の集積が特徴的で、胚中心の形成が示唆された。しかし、ナノファイバー播種 MSC 移植により、脾腫、リンパ節腫大、また、夫々の病理組織所見が著明に改善したが、関節内注射や腹腔内注射では影響がなかった。また、ナノファイバー播種 MSC 移植によりこれらの組織から産生される IL-1<math>\beta</math> が著明に低下した。さらに CIA ラットの血清中に検出される抗 II 型コラゲン抗体 IgG 量は、ナノファイバー播種 MSC 移植により有意に抑制された。(3) 次に、投与したヒト MSC の分布を確認するために、GFP プラスミドを導入した MSC を投与した。その結果、ナノファイバー播種 MSC 移植では、GFP シグナルは移植近傍組織にのみ検出され、ナノファイバー担体への局在が維持されていることが示唆された。(4) さらに、CIA ラットのリンパ節より抽出した CD4 陽性 T 細胞を試験管内にて PHA で刺激すると、細胞増殖と IL-17 や IFN-<math>\gamma</math> 等のサイトカイン産生が検出された。しかし、ナノファイバー播種 MSC を移植したラットのリンパ節由来の T 細胞は、増殖反応とサイトカイン産生の双方が抑制され、一方で、抑制性 T 細胞の増加が検出された。(5) 最後に、ヒト MSC をナノファイバー播種して試験管内にて培養すると、TGF-<math>\beta</math>1 の産生が RNA および蛋白レベルで誘導された。</p>	
<p>考察: CIA ラットにおいては、MSC はナノファイバー担体を足場にして関節局所に留まり、他の組織に移動しないため、関節病変部に集積した作用が期待できる。また、TGF-<math>\beta</math>1 は強力な抗炎症作用と免疫抑制作用を有するが、ヒト MSC のナノファイバー播種により何らかのメカニズムにより TGF-<math>\beta</math>1 の産生が誘導され、関節炎症のみならず、リンパ球の活性化を介した抗体産生をも抑制した可能性が示唆される。さらに、1.0 cm<sup>2</sup> のナノファイバー担体に僅か <math>2 \times 10^5</math> の MSC を播種して移植することにより抗炎症作用と免疫抑制作用が誘導され、関節炎、関節破壊が制御されたとの結果は、少量の MSC で臨床応用可能であることを示唆するものである。</p>	
<p>結論: CIA モデルラットに於いてナノファイバー担体に播種した MSC は移植した関節近傍に局在し、TGF-<math>\beta</math>1 の産生を介して抗炎症作用と免疫抑制作用が誘導され、関節炎、関節破壊が制御されたと考えられる。</p>	

## 学位論文審査結果要旨

氏 名	張 香梅				
論文審査委員	主査	所属	障害機構系	災害外科部門	酒井 昭典
	副査	所属	生体適応系	生体構造部門	菊田 彰夫
			生体情報系	生理情報部門	尾辻 豊
			系	部門	
			系	部門	

**論文題目**

Local delivery of mesenchymal stem cells with poly-lactic-co-glycolic acid nano-fiber scaffold suppress arthritis in rats

(ポリマー乳酸・グリコール酸ナノファイバー担体を利用した間葉系幹細胞の局所投与によるラット関節炎の抑制)

**学位論文審査結果要旨**

関節リウマチは、自己免疫寛容の破綻により自己応答性 T 細胞が活性化し、炎症性サイトカインによる刺激を受けて関節破壊が生じる全身性の疾患である。間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell : MSC) は、多分化能とともに免疫抑制能を有することが報告されている。しかし、MSC を治療で用いるには、多くの細胞数を必要とする問題点がある。それを克服するためには、細胞の足場となる担体が必要である。申請者らは、「免疫機序により発症した関節炎状態において、MSC を担体に播種して移植すると、MSC による免疫抑制機序を介して、関節炎と関節破壊が抑制される。」という仮説を立てた。

そこで、申請者らは、II 型コラーゲン誘発性関節炎ラットを用いて、ポリマー乳酸・グリコール酸からなる微細繊維系素材であるナノファイバーを担体として MSC を移植し、関節炎と関節破壊が抑制されるメカニズムに関して、以下の実験結果を得た。

1. 関節炎スコア、関節の X 線像、関節の組織像を評価した結果、MSC を関節内注射あるいは腹腔内注射で投与しても関節炎は抑制されないが、ナノファイバー播種の MSC 移植により関節炎は抑制された。移植近傍の関節炎だけでなく、移植部位から離れた関節炎も抑制された。
2. 関節内注射あるいは腹腔内注射で MSC を投与したラットと比較して、ナノファイバー播種で MSC を移植したラットでは、脾腫、リンパ節腫大、関節破壊が著明に改善し、リンパ節から産生される IL-1 $\beta$  量、血清中の抗 II 型コラーゲン抗体 IgG 量が有意に減少した。
3. GFP プラスミドを導入した MSC を投与した結果、ナノファイバー播種により移植した MSC は移植近傍組織のみに認められた。
4. ナノファイバー播種により MSC を移植したラットでは、リンパ節から抽出した CD4 陽性 T 細胞の PHA 刺激下での細胞増殖とサイトカイン (IL-17、IFN- $\gamma$ ) 産生の双方が抑制され、一方、制御性 T 細胞 (Foxp3 陽性細胞) 数が増加していた。
5. MSC をナノファイバーに播種して培養すると、TGF- $\beta$ 1 (抗炎症作用と免疫抑制作用を有する) の産生が mRNA とタンパクレベルで誘導された。

以上の事実は、申請者らの仮説を支持した。MSC をナノファイバー担体に播種して移植すると、効率よく局所に留まり、全身性にサイトカイン産生および免疫能が抑制されることによって関節炎が抑制されたことを示唆するものである。関節リウマチの新しい治療法の開発に大きく寄与する可能性がある。よって、本学の学位論文として適格であると判断した。