

氏 名 李 佳麗 (Li Jiali)
り かれい

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 156 号

学位授与年月日 平成 27 年 3 月 24 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 **Human Amnion-derived Stem Cells have Immunosuppressive Properties on NK cells and Monocytes.**
(ヒト羊膜由来細胞は NK 細胞と単核球に対する免疫抑制効果を持つ)

論文審査委員

(主査) 教授 近藤 隆
(副査) 教授 齋藤 滋
(副査) 教授 山本 善裕
(副査) 教授 林 篤志
(指導教員) 教授 二階堂 敏雄

論文内容の要旨

〔目的〕

Human amniotic cells are considered to be a promising cell source for their potential clinical use in tissue engineering and regenerative medicine because of their proliferation and differentiation ability. It has been proved that human amniotic cells express CD59 and HLA-G, implying that they may have an immunosuppressive function. In this study, the immunosuppressive activity of human amniotic cells on NK cell and monocyte was investigated.

〔方法〕

1. Fresh amnion epithelial cells (fHAEs), fresh amnion mesenchymal cells (fHAMs), immortalized human amnion mesenchymal cells (iHAMs), immortalized human amnion epithelial cells (iHAEs), HAM α , a subpopulation from fHAM, K562 cells, NK-92MI cells (NK cells) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were used.
2. To detect the immunosuppressive activity of amniotic cells to NK cells, the cytotoxicity of NK cells against K562 cells was assessed by quantifying apoptosis of K562 by FACS.
3. To investigate the expression of activated NK receptors, IFN- γ and anti-inflammatory factors, total RNAs from amnion-derived cells and NK cells were extracted and RT-PCR were performed.
4. To detect the production of IL-10 and PGE₂ in the supernatant from amniotic cell and NK cell coculturing, the protein expression of IL-10 or PGE₂ was analyzed by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

To detect the immunosuppressive activity of amniotic cells to monocytes, the production of TNF- α and IL-6 in monocytes was analyzed by FACS.

〔成績〕

1. Immunosuppressive activity of amniotic cells to NK cells

- 1) Detection of the cytotoxicity of NK to K562 cells

Amniotic cells inhibited NK cytotoxicity with an amniotic cell/NK cell ratio of 10:1, declining with lower amniotic cell content. Amniotic cells suppressed NK cytotoxicity in a dose-dependent manner.

- 2) Investigation of the expression of activated NK receptors, IFN- γ and anti-inflammatory factors

The expression of NKp46, NKp30, NKp44, NKG2D and CD69, cytokine IFN- γ in NK cells was significantly decreased after coculturing, and the expression of IL-10 and COX-2 in amniotic cells was remarkably increased after coculturing. The production of IL-10 and PGE2 in amniotic cells may inhibit NK cytotoxicity.

- 3) Detection the production of IL-10 and PGE₂

The secretion of IL-10 and PGE2 from amniotic cells was increased after coculturing with NK cells. IL-10 and PGE2 may involve in the immunosuppressive activity of amniotic cells.

- 4) Block of IL-10, PGE₂ and thioredoxin with specific inhibitors

The addition of IL-10 or thioredoxin antibody had the tendency to recover NK cytotoxicity that had been decreased by amniotic cells. The addition of indomethacin, PGE2 inhibitor, blocked the inhibition to NK cells from interaction with amniotic cells. The function of IL-10 and PGE2 in the immunosuppressive activity of amniotic cells was confirmed.

- 5) Recovery of NK cytotoxicity

After interaction with amniotic cells, NK cells were cultured alone prior to exposure to K562 cells. Extending the incubation without amniotic cells significantly restored NK cytotoxicity. Therefore, the decreased NK cytotoxicity by amniotic cells was not because NK cells were damaged by coculturing. Amniotic cells suppressed NK cytotoxicity.

2. Immunosuppressive activity of amniotic cells to monocytes

The level of TNF- α and IL-6 in PBMCs after coculturing with amniotic cells was significantly decreased. The amniotic cells suppressed monocytes activity with cytokine production.

〔総括〕

Amniotic cells inhibited NK cytotoxicity in a dose-dependent manner. The inhibition was recovered by continuous culturing without amniotic cells. The inhibition of NK cytotoxicity was related to the decrease of the expression of the activated NK receptors and the

production of IFN- γ , as well as the increase of the expression of IL-10 and PGE₂ in amniotic cells. The addition of antibody to IL-10 or PGE₂ inhibitor tended to increase NK cytotoxicity. Amniotic cells suppressed the activity of cytokine production in monocytes analyzed with TNF- α and IL-6. Taking it all together, these data suggested that amniotic cells have immunosuppressive activity.

学位論文審査の要旨

【目的】

羊膜由来細胞は増殖能と分化能を有することから再生医学や組織工学の分野で臨床応用が期待される移植細胞源である。羊膜由来細胞は CD59 と HLA-G を発現していることから、免疫抑制機能を保持しており、移植拒絶を回避できる可能性が高い。本研究ではヒト羊膜由来細胞の NK 細胞と単核球に対する免疫抑制効果について調べ、羊膜由来細胞を用いた細胞治療の可能性を検討した。

【方法】

1. 羊膜由来細胞（羊膜由来上皮細胞；fresh amnion epithelial cells：fHAEs、羊膜由来間葉系細胞 fresh amnion mesenchymal cells：fHAMs、不死化羊膜上皮細胞：immortalized HAEs：iHAEs、不死化羊膜間葉系細胞：immortalized HAMs：iHAMs および fHAM から由来する HAM α 細胞）の免疫抑制効果を見るために、NK 細胞（NK-92MI 細胞）および末梢単核球の免疫効果を対象に、K562 細胞を標的細胞として用い実験を行った。
2. NK 細胞に対する効果は、FACS にて K562 細胞の致死率を測定し、NK 細胞の K562 細胞に対する殺細胞効果として評価した。
3. エフェクター細胞側の変化は NK 細胞の活性化受容体とサイトカイン IFN- γ の発現で評価した。羊膜由来細胞側の作用は抗炎症因子の発現で確認するために、ナチュラルキラー（NK）細胞、羊膜由来細胞それぞれから RNA を抽出し、RT-PCR を行った。
4. 羊膜由来細胞の液性因子に対する効果を検討するために上清中の IL-10 と PGE₂ の産生を Enzyme-linked Immunosorbent Assay（ELISA）により測定した。
5. 羊膜由来細胞の単核球に対する免疫抑制効果について、単核球中の TNF- α と IL-6 の産生細胞について FACS を用いて測定した。
6. 実験的自己免疫性脳脊髄炎 EAE（Experimental autoimmune encephalomyelitis）モデルマウスを用い、生体に対する羊膜由来細胞の細胞治療効果を検討した。

【結果と考察】

1. 羊膜由来細胞の NK 細胞に対する免疫抑制効果を以下の項目について評価した。

1) NK 細胞の K562 細胞に対する殺細胞効果

羊膜由来細胞は、細胞混合比が 10 : 1 (羊膜由来細胞 : NK) の時に最も強く殺細胞効果を抑制した。またこの効果は、羊膜由来細胞の混合率の増加に相関して抑制された。

2) 活性化 NK 受容体、IFN- γ および抗炎症因子の発現

NK 細胞中の NKp46, NKp30, NKp44, NKG2D, CD69, IFN- γ の発現は共培養により減弱した。羊膜由来細胞中の IL-10 および Cox2 の発現は共培養により増強した。

3) IL-10 と PGE₂ の産生

羊膜由来細胞からの IL-10 と PGE₂ の分泌量は NK 細胞との共培養により増加した。IL-10 と Cox2 およびその下流の PGE₂ が羊膜由来細胞の NK 細胞に対する免疫抑制効果に関与している可能性が示唆される。

4) IL-10 および PGE₂ の阻害効果

抗 IL-10 抗体および PGE₂ 阻害剤であるインドメタシンの添加により、羊膜由来細胞により抑制されていた NK 細胞の細胞傷害性は回復する傾向を示した。

5) NK 細胞の細胞傷害性の回復

羊膜由来細胞と共培養後 NK 細胞のみを培養し、K562 細胞に対する細胞傷害性を検討した。羊膜由来細胞と共培養後、NK 細胞のみを 2 日間培養すると NK 細胞が活性を回復した。本現象は、共培養システムが NK 細胞を傷害したのではなく、羊膜由来細胞が NK 細胞の免疫抑制作用発現能を有することを示唆する。

2. 羊膜由来細胞の単核球に対する免疫抑制効果を調べたところ、羊膜由来細胞との共培養後、末梢単核球中の TNF- α と IL-6 の発現量は有意に減少していた。羊膜由来細胞が単核球の活性をサイトカイン産生によって抑制する可能性を示した。

3. 疾患モデルマウスによる検討では、羊膜由来細胞を投与後一日経過した EAE モデルマウスの運動能が顕著に改善した。

【総括】

羊膜由来細胞は量依存的に NK 細胞の細胞殺傷性を抑制した。この抑制は羊膜由来細胞非存在下で培養することにより回復した。NK 細胞の細胞殺傷性の抑制は NK 細胞における活性化 NK 受容体と IFN- γ の発現の減少、羊膜由来細胞における IL-10 と PGE₂ の産生の増加と相関していた。抗 IL-10 抗体、PGE₂ 阻害剤の添加により NK 細胞の細胞傷害

性は上昇する傾向を示した。さらに羊膜由来細胞は単核球中の TNF- α と IL-6 の発現を抑制した。これらの結果から羊膜由来細胞は NK 細胞および単核球に対して免疫抑制作用を有することが示唆される。更に、疾患モデルマウスにおいて顕著な改善効果を示した。本研究はヒト臨床への応用には課題を残すものの、羊膜由来細胞による NK 細胞や単核球の免疫抑制作用を示した点で、学術性が高く、また自己免疫疾患に対する細胞治療として臨床応用の新たな可能性を示し優れた内容と思われる。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。