

Title	Development of PET Imaging to Visualize Activated Macrophages Accumulated in the Transplanted iPSc-Derived Cardiac Myocytes of Allogeneic Origin for Detecting the Immune Rejection of Allogeneic Cell Transplants in Mice
Author(s)	檜山, 紀幸
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61537
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"＞ 大阪大学の博士論文について ＜/a＞ をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏名 Name	檜山 紀幸
論文題名 Title	Development of PET Imaging to Visualize Activated Macrophages Accumulated in the Transplanted iPSc-Derived Cardiac Myocytes of Allogeneic Origin for Detecting the Immune Rejection of Allogeneic Cell Transplants in Mice (マウス同種他家iPS細胞由来心筋細胞移植における免疫拒絶同定のための活性化マクロファージ可視化するPET画像の開発)
論文内容の要旨	
[目的(Purpose)]	
<p>当科ではバンク化された他家由来の誘導多能性幹細胞 (iPSC) を心筋細胞に分化誘導し、シート化して不全心に貼る新しい心不全治療の臨床応用を目指している。現時点の課題は、必然的に生じる免疫学的拒絶反応をどのようにコントロールし、評価するかである。臓器移植で用いる組織生検では十分な評価が出来ないため、簡便かつ低侵襲な画像診断が注目されている。その中で、活性化マクロファージ (MΦ) のミトコンドリアの外膜に高発現しているTranslocator protein (TSPO)をターゲットとした陽電子放射断層撮影 (PET) 画像は、定量的に活性化MΦの集積を同定することが出来、既に臨床応用出来る画像技術として報告されている。今回、マウスiPSC由来心筋細胞 (CM) の同種他家移植において、$[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$-PET画像によりレシピエントの心臓に集積する活性化MΦを可視化し、免疫拒絶反応を評価できるか検討した。</p>	
[方法 (Methods)]	
<p>① iPSC細胞由来心筋細胞の分化誘導・純化と心筋シート作製実験 C57BL/6マウス由来のiPS細胞 (959A2-1) をBIO(GSK3β inhibitor : 0.2 μM)を添加した培地で培養することで心筋細胞へ分化誘導する。また、無糖乳酸添加培地を使用することで純化し、温度感応性培養皿を使用し、シート化する。</p> <p>② F^{18}-DPA714の正常マウスにおける生理的取り込みの検討 合成したF^{18}-DPA714をマウスに尾静脈投与し、30分後にPETを撮像する。Acquired timeは10分とした。得られたPET/CTの画像をOSIRIXで解析した。また、PET撮像後の心臓組織でオートラジオグラフィを行い、PET画像で得られた心臓のSUVmaxとの相関を調べた。</p> <p>③ F^{18}-DPA714-PET/CT撮像時期の検討 ルシフェラーゼ遺伝子を導入したiPS細胞由来心筋細胞 (B/6由来) をマウス (Balb/cとB/6) の心臓表面に移植し、IVIS (ルシフェリン150mg/kg腹腔内投与6分後に撮影し、5分間integrationする) を使って経時的に発光強度を評価した。</p> <p>④ F^{18}-DPA714-PET/CT画像のiPS細胞由来心筋細胞移植モデルにおける比較実験 iPS細胞由来心筋細胞をマウスの心臓表面に移植し、F^{18}-DPA714-PETを撮影後得られた画像からUptake ratio (左室前壁のSUVmax/心室中隔のSUVmax) を計算し、群間で比較した。</p> <p>⑤ 組織学的な免疫細胞の浸潤の比較検討 CD68陽性MΦとCD3陽性Tリンパ球の移植部位への浸潤を免疫染色標本にて定量評価 (細胞数/High power field×3視野の平均) した。</p> <p>⑥ 組織における遺伝子発現の比較によるMΦの活性化や免疫学的拒絶反応とPET/CT画像の相関関係の検討 PET撮像後にマウスを犠牲死させ、心筋組織からRNAを抽出し、RT-PCRを行った。</p>	
[成績(Results)]	
<p>① Troponin I陽性、α-アクニチン陽性の心筋細胞の分化に成功し、90%以上の心筋細胞に純化することができた。</p> <p>② F^{18}-DPA-714は、心臓にも生理的取り込みを認め、心臓組織に取り込まれたtracerはPET画像で測定したSUVmaxと有意に相関した。</p> <p>③ 経時的なBioluminescence画像において、同種他家移植群では、移植後7日目以降に移植細胞が有意に減少し、強い免疫拒絶反応が生じていることが示唆された。</p> <p>④ $[^{18}\text{F}]\text{-DPA714}$-PET画像において、同種他家移植群の7日目と10日目におけるUptake ratioは他群と比較して有意に高かった。</p> <p>⑤ 同種他家移植群の7、10日目におけるマクロファージやTリンパ球の浸潤は他群と比較して有意に強かった。</p> <p>⑥ また、同種他家移植群の7日目における心臓組織におけるマクロファージ活性 (MCP-1, TSPO) や免疫学的拒絶反応を示すサイトカイン (IL-1β, IL-2) の発現は、他群と比較して有意に高く、PET画像におけるuptake ratioと活性化マクロファージのマーカーは有意な相関を認めた。</p>	
[総括(Conclusion)]	
<p>DPA-714-PET画像は同種他家iPS細胞移植における活性化マクロファージの集積を定量的に可視化し、免疫学的拒絶反応の評価に有用である可能性が示唆された。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 榎山 紀幸

	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授 澤 芳お子
	副 査	大阪大学教授 坂田 泰史
	副 査	大阪大学教授 中谷 敏

論文審査の結果の要旨

重症心不全の根治治療として心臓移植が確立された治療法であるが、ドナー不足という深刻な問題がある。その中で、心筋細胞の再生治療が期待され、重症心不全に対する筋芽細胞シート移植が昨今、保険償還された。さらに多分化能をもつiPS細胞から作製した心筋細胞は、さらなる心機能改善効果が期待されている。iPS細胞を臨床応用する上で、問題となるのが、免疫学的拒絶反応である。安全性と有効性を担保するための時間とコストの関係から、他家由来のready-madeiPS細胞を使用することが想定されており、必然的に免疫学的拒絶反応が生じるため、これをいかにしてコントロールし、評価するかが課題となっている。本研究では、画像診断によりこの問題を解決使用と試みている。注目したのは、ミトコンドリアの外膜に存在するトランスロケータープロテイン (TSP0) という蛋白質であり、これは活性化マクロファージで高発現していることがこれまで研究でわかっている。免疫拒絶反応部位でマクロファージが浸潤することから、iPS細胞由来神経細胞移植における慢性拒絶の同定に既に実験的に報告されている。従って、本研究では、iPS細胞由来心筋細胞移植においてもTSP0をターゲットとしたPET/CT画像により活性化マクロファージの集積を同定し、免疫拒絶反応を評価出来ること仮説としている。PET-tracerとしてDPA-714というTSP0リガンドを使用した。結果として、同種他家移植において、DPA-714は移植後7日目以降に移植部位に取り込みが有意に高く、組織学的に、マクロファージやTリンパ球の浸潤も強いことがわかった。また、移植後7日目の組織におけるマクロファージや免疫反応を示すサイトカインの遺伝子発現が同種他家移植群で有意に高く、DPA714の取り込みの程度と有意な相関が見られることから、このDPA-714-PET/CT画像が活性化マクロファージが集積する部位を同定出来、細胞移植における免疫学的拒絶反応を同定するのに有用である可能性が示唆された。この研究は、自然免疫を担うマクロファージの動態を評価する方法として有用であり、iPS細胞の臨床応用を支持する重要な研究であり、学位に値すると考える。