

令和元年6月17日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09667

研究課題名(和文)造血幹細胞移植における脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた細胞療法の可能性の検討

研究課題名(英文)The potentiality of adipose tissue-derived stem cells in hematopoietic stem cell transplantation

研究代表者

早川 潤 (HAYAKAWA, JUN)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：10386196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪由来間葉系幹細胞(ADSC)は未だその生物学的特性は未知であるが、少ない侵襲で大量の幹細胞を採取することができ、多様な臨床応用の可能性が注目されている。ADSCが血管炎などの炎症性疾患の回復時ならびに造血幹細胞移植後どのように生態に関与するか評価し治療成績の向上につなげることを目標とした。

安定した脂肪組織間葉系幹細胞を樹立することに成功し、マウスに投与することでIL-17やTNF- α などの炎症関連サイトカインを抑制し冠動脈などの大動脈での抗炎症効果があることを証明できた。しかし造血幹細胞移植時の造血回復への関与に関しては十分な解析をすることができず今後の課題として残された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

安定した脂肪由来間葉系幹細胞(ADSC)を樹立し生態に投与することで生体内での働きを評価した。マウスから樹立した脂肪幹細胞をマウス血管炎モデルに投与したところ、ADSCが造血回復の際に血管炎の抑制に寄与することを示した。ADSCはIL-17やTNF- α といった炎症関連サイトカインを抑制することで冠動脈などの大動脈での炎症の改善に貢献し抗炎症効果をもたらすことを証明できた。しかし、本研究で目標とした骨髄不全症疾患などの造血幹細胞移植時における脂肪幹細胞の有用性の評価と造血回復への関与に関しての十分なdataは得ることができず今後の課題として残された。

研究成果の概要(英文)：Although Mesenchymal stem cells (MSCs) regulate in immune response and bone marrow recovery, adipose-tissue derived mesenchymal stem cells (ADSCs) are still not well defined. Similar possibility was expected by ADSCs as alternated tool of MSCs. The harvest of ADSCs was less invasive and more safe. We tried to evaluate the behavior of ADSCs in vivo mice model. In vasculitis model, we demonstrated that ADSCs has anti-inflammatory and immune regulatory functions by suppressed cytokines such as IL-1 β and TNF- α , IL10, IL-13, IL-17. Our pathological data also suggested ADSCs do not act directly on the site of inflammation, suppressing pro-inflammatory related cytokines causes reduction of vasculitis by acting indirectly through some factors.

Further studies required to clarify the role of ADSCs, ADSCs could potentially lead to unique tools in therapeutic strategies of vasculitis and bone marrow recovery.

研究分野：小児科学

キーワード：脂肪幹細胞 間葉系幹細胞 血管炎 抗炎症効果

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織由来間葉系幹細胞 (**ADSCs: adipose-tissue derived mesenchymal stem cells**) の有用性について

間葉系幹細胞(**MSC:mesenchymal stromal/stem cell**)は骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞など間葉系に所属する細胞への分化能をもつとされる細胞で、再生医療への応用が試みられている。また免疫抑制作用もあり細胞療法のツールとしても期待されている。従来骨髄細胞中に含まれる **MSC** を利用した研究が展開されてきたが、その数は有核細胞数の **0.001~0.01%** と極めてまれであり、また加齢にともない細胞の分裂能が低下することも判明した。骨髄由来 **MSC(BMSC:bone-marrow derived MSC)**を治療に使用するためには、自己の細胞を使用するのが最適と考えるが、採取が侵襲的で特に化学療法中の疲弊した骨髄から治療に必要な細胞を確保するのが大変困難であり、また腫瘍細胞の混入も否定できず、**BMSC** が移植医療の現場に日常的に応用されるには問題が山積している。そこで、脂肪組織から樹立される脂肪組織由来間葉系幹細胞 (**ADSCs: adipose-tissue derived mesenchymal stem cells**) が注目されるようになった。**ADSCs** は脂肪吸引で容易に採取することができる。わずか数グラムで **10⁷** 個レベルの **ADSCs** を確保することが可能であり、皮下脂肪組織はアクセスが容易であることも相まって自己の細胞療法の強力なツールになることが期待できる。また抗原性が低いため、第三者の脂肪組織を使用することも容易といわれる。我々の研究グループでは **10** 年以上も以前からこの **ADSCs** の有用性に着目し、その樹立法を確立し、形成外科領域をはじめ多くの領域での臨床応用の可能性を検討してきた。(Ogawa R. *BBRC*,2004313(4))。血液疾患領域においては、**BMSC** は骨髄微小環境を構築するソースとなり得ること、移植時に拒絶反応の軽減と血液学的回復が早まることが他の施設から報告されてきた。我々も以前 **BMSC** は経静脈的に投与しても生着率は極めて低いが、**hydroxyapatite** を造血の場としてレシピエントマウスに埋め込み移植するとドナー由来の **BMSC** が生着し骨髄支持細胞を再構築することを証明した。(Ueda T,et al. *Pediatric Res*.2010,68(1))。さらに **ADSCs** をもちいて同様な移植実験をおこない、**ADSCs** もレシピエントマウスで **hydroxyapatite** に生着し、人工骨髄として機能し造血を支持することを証明した。(Ueda T,Cell BiolInt.2014 38(6))

骨髄不全状態にある患者の造血幹細胞移植の問題点

日常の臨床において、骨髄不全症は造血細胞の減少に基づく骨髄機能低下によって発症する。先天性疾患として **Fanconi 貧血** や **dyskeratosis congenital(DKC)**、後天性疾患として再生不良性貧血(**AA: aplastic anemia**)や骨髄異形成症候群があげられる。また繰り返す強力な化学療法や放射線照射の後の造血系腫瘍患者(白血病や悪性リンパ腫など)や結核などの炎症性疾患、膠原病および骨疾患などでは二次性に骨髄支持組織が低下し繊維化することが知られている。これら造血支持組織が疲弊している、ないしは低形成な患者に対して造血幹細胞移植を施行することにより生着不全や生着遅延を高頻度に認める。特に造血支持細胞が少ない再生不良性貧血は、病態に關与するリンパ球や輸血の感作により生着不全が起こりやすいと考えられてきたが、抗胸腺グロブリン (**anti-thymocyte globulin: ATG**)・フルダラピンを中心とする免疫抑制効果に優れた移植前処置法の開発で生着不全は減少してきた。しかし、**HLA** 一致同胞以外の移植では、生着不全の危険性は依然高く、今後さらなる治療法の革新が必要である。

2. 研究の目的

近年、脂肪組織にも骨髄由来間葉系幹細胞と同様な働きを持つ細胞群の存在が知られてきた。脂肪組織由来間葉系幹細胞 (**ADSCs: adipose-tissue derived mesenchymal stem cells**) はその生物学的活性は未知数であるが、少ない侵襲で容易に大量の幹細胞を採取することができるため注目されている。また抗炎症作用・免疫抑制作用・組織修復作用などが指摘されていて造血幹細胞移植にも応用できる可能性があり研究の進展を待望されている。しかしその特性は未知な点が多く、我々は血管炎モデルマウスに投与することで炎症回復時の **ADSCs** の生体内での動態と抗炎症作用・免疫抑制作用・組織修復作用の有無を検討した。

また造血幹細胞移植において、特に再生不良性貧血や骨髄線維症など造血支持細胞に異常がある疾患、治療に難渋し度重なる強力な化学療法や放射線療法で二次的に造血支持細胞の機能が低下している患者などに対する移植は、生着不全や生着までの時間遅延をたし、治療成績に改善の余地がある。近年、移植成績の向上のために骨髄由来間葉系幹細胞を移植時に併用する試みがされているが、我々はその細胞ソースとして骨髄由来細胞より樹立が容易で増殖力もある脂肪組織由来間葉系幹細胞(**ADSCs:adipose-derived MSC**)を併用することにも注目した。**ADSCs** の抗炎症作用・免疫抑制作用・組織修復作用が移植時に **ASC** 移植を併用することで、造血回復時にどうなるのか、特に骨髄不全症の移植後骨髄回復の迅速化と拒絶反応の軽減に影響を及ぼすかを検討事項とした。

3. 研究の方法

近年、脂肪組織にも骨髄由来の間葉系幹細胞と同じような働きをもつ細胞の存在が報告される。脂肪由来間葉系幹細胞(Adiposed tissue-derived stem cell : ADSCs)は未だ多くの生物学的特性は未知であるが、少ない侵襲で骨髄由来の間葉系幹細胞に比べて大量の幹細胞を採取す

ることができるため、非常に注目されている。本研究の第一の目的は脂肪幹細胞が骨髄不全症など移植後の造血回復にどの程度関与するか評価し造血幹細胞移植に組み合わせることで移植成績の向上につながるかを検討することである。

1) 安定した脂肪幹細胞の樹立

まずは *in vitro* での安定したマウス由来脂肪組織間葉系幹細胞の樹立である。従来から報告のあった方法で樹立を目指したが、純分な細胞数が得られない、培養が上手くいかない等で苦戦した。サイトカインの組み合わせ、培養液や MEDIUM の組成を工夫したのに加えコラゲナーゼ処理と反応時間を工夫することで安定してきて再現性が担保された。脂肪幹細胞の樹立は細胞間接着が問題になることと考えた。

2) ADSCs が生体内の投与で血管炎の回復時にどのように関与するか

次に確立した ADSCs を用い従来からいわれている ADSCs には抗炎症・免疫抑制作用・組織修復作用を持つことを *in vivo* モデルで実証を試みた。川崎病は全身性血管炎の代表的疾患であるがすでに我々のグループで確立した川崎病血管炎モデルマウスに ADSCs 投与し、炎症回復時における ADSCs の振る舞い、血管炎の抑制を図れるか検証した。レシピエントマウス (DBA/2) に CAWS (*Candida albicans* water-soluble functions) を投与することでマウスに血管炎を引き起こすことが知られており、モデルマウス作成に使用した。 (N. Hirata, et al., *Yakugaku Zasshi*, 2006)

その評価方法は

炎症面積

CAWS 投与開始から 29 日目にマウスから心臓を摘出した。摘出した心臓をホルマリン固定後、パラフィン包埋し、ミクロトームで 4 μm に薄切し HE 染色した病理検体を用いた。

顕微鏡で観察および撮影後、Luminar Vision にて好中球浸潤の強い部分を炎症部位として面積測定を行ない、各群間の比較を行なった。

サイトカイン

心臓摘出時に採血を行い、血清保存を行なった。

保存した血清を用いて Bio-Plex 200® (BIO-RAD 社) を使用し Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Standard 23-Plex, Group 1 キットを用いてサイトカイン測定を行なった。

測定したサイトカインは下記の 23 種類あり、今回は炎症関連サイトカインに注目し、各群間の比較を行なった。

(IL-1 , IL-1 , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- , KC, MCP-1, MIP-1a, MIP-1 , RANTES, TNF-)

体重および脾臓・心臓の重量

心臓摘出時に、体重および脾臓・心臓の重量を測定し、各群間で比較を行なった。

3) 造血幹細胞移植において ADSCs が骨髄回復にどのように関与するか

難しい造血回復時の骨髄自体の評価の前段階として移植後のレシピエントマウスの造血回復時の末梢血解析と皮膚 GVHD や血管炎の状況を検討した。骨髄の状態も評価しようとした。実際には移植後 4 週間たったマウスから血液採取し造血回復をチェックすることとサイトカインアレーをもちいて炎症性サイトカインの動きをバイオプレックスを使用して評価した。また病理学的評価も検討した。

ヒト臍帯血でヒト化マウスを作成して移植時に ADSC を使用することであるが、ヒト細胞を用いるので倫理委員会への実験計画の提出を準備しその前の予備実験を検討している段階で終了した。

4 . 研究成果

1) 安定した ADSCs の作成

安定したマウス由来脂肪組織間葉系幹細胞 (ADSC) の樹立に関しては、サイトカインの組み合わせや培養液を試しコラゲナーゼ処理を行いその反応時間を工夫することで細胞間接着の影響がとれ安定した細胞を得ることに成功した。現在成功率はおよそ 60% 前後である。

以下我々の ADSCs の作成法である

- ・ 大腿皮下から摘出した脂肪を PBS で洗浄後、ミンチし、コラゲナーゼ処理 (0.01%) を行う。
- ・ 37 25 min. 時折振盪しながら恒温槽で加温する。
- ・ 10%FBS DMEM を加え反応停止させ、70 μm の cell strainer で濾過後、1300rpm 5 min 遠心分離を 2 回行う。
- ・ 10%FBS 入りの DMEM で、6 well culture plate にて培養開始する。
- ・ 2 回継代をした細胞を -80 で凍結保存した。

2) ADSCs が生体内の投与で血管炎の回復時にどのように関与するか

1) で確立した ADSCs を使用した。4 週齢のマウスに CAWS (*Candida albicans* water-soluble functions) 0.5mg を腹腔投与して全身性血管炎マウス (川崎病モデルマウス) を作成し、血管

炎の活動期に ADSCs を投与して生体内での反応を観察した。CAWS0.5mg を 5 日連続で腹腔内投与し ADSCs 1×10^5 を実験開始 8 日目に投与した。コントロール群には PBS を投与した。評価日を移植後 29 日に設定した。

評価方法は以下に記す。

- ・ 炎症面積

CAWS 投与開始から 29 日目にマウスから心臓を摘出した。摘出した心臓をホルマリン固定後、パラフィン包埋し、ミクロトームで $4 \mu\text{m}$ に薄切し HE 染色した病理検体を用いた。

顕微鏡で観察および撮影後、Luminar Vision にて好中球浸潤の強い部分を炎症部位として面積測定を行ない、各群間の比較を行なった。

- ・ サイトカイン

心臓摘出時に採血を行い、血清保存を行なった。

保存した血清を用いて Bio-Plex 200® (BIO-RAD 社) を使用し Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Standard 23-Plex, Group 1 キットを用いてサイトカイン測定を行なった。

測定したサイトカインは下記の 23 種類あり、今回は炎症関連サイトカインに注目し、各群間の比較を行なった。

(IL-1 , IL-1 , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- , KC, MCP-1, MIP-1a, MIP-1 , RANTES, TNF-)

- ・ 体重および脾臓・心臓の重量

心臓摘出時に、体重および脾臓・心臓の重量を測定し病理学的な評価をした、各群間で比較を行なった。

結果

炎症面積

病理学的考察では大動脈弁周囲を中心に炎症面積は PBS 投与群と比較して有意差をもって、ADSC 投与群で縮小傾向を認めた。

サイトカイン測定

炎症関連サイトカインである IL-1 , TNF- , IL-13, IL17 が PBS 投与群と比べて ADSC 投与群で有意差をもって、低下を認めた。

体重および脾臓・心臓の重量

ADSC 投与群と PBS 投与群では有意差を認めなかった。

PBS 群の体重は Control 群と比べて有意に重くなった。

脾臓および心臓の重量は PBS 投与群では Control 群と比較して、有意に大きくなっていたが、Control 群と ADSC 投与群では有意差は認めなかった。

本モデルマウスの解析から ADSC は IL-17 や TNF- などの炎症関連サイトカインを抑制することによって冠動脈での炎症を改善していると考えられた。

今回の実験結果から、ADSC は血管炎モデルマウスに対して抗炎症効果を認めることが確認できた。

3) 造血幹細胞移植において ADSCs が骨髄回復にどのように関与するか

血管炎モデルマウスの血管炎回復時には ADSC を投与して脂肪幹細胞の炎症部位への関与ならびに造血支持組織への関与することが認められたため造血回復時にも有効であることが推測された。レシピエントマウスでは炎症性サイトカインである IL-1b, TNF-a, IL-13, IL17 が ADSC 投与群で有意差をもって、低下を認めた。骨髄破壊的処置をしたあとドナーマウス骨髄と ADSCs を移植に併用する群、しない群での検討をしようとしたがマウスの骨髄移植実験の DATA から経時的な骨髄回復の追跡が困難であり、有意差がでるための ADSCs の投与量を検討するのみで終了した。マウスの骨髄細胞の造血細胞の細胞周期は早く、Day8 には移植細胞の生着が確認でき、その後急速にレシピエント細胞に置き換わるため半破壊的放射線照射が状況を把握するには良いかと考えるが、さらなるけんとうが必要である。移植マウスの骨髄の確保は微少であることもあり困難である。フローサイトメーターを用いた解析などを検討した。サイトカインアレーを使用し ADSC 投与時にどのような血清の変化が起こるのか？それが GVHD にどのように関与するのもも病理学的考察の後には検討したい。

また本研究でもっとも重要でかつ難渋するところは骨髄の病理検体の扱いである。骨髄不全症の造血幹細胞の生着を阻害している最も重要なところは支持組織の未熟性で有り、ADSC はその支持組織の回復に寄与することが予想されるが、骨髄組織を病理的に考察する、とくに細胞内マトリックスを見るための免疫染色の方法など骨髄の病理学的評価は非常に難しい。造血支持組織の評価を進めたいが我々の施設では経験が無い。また現在は移植後 4 週間までの早期の評価であるが、マウスの移植後の T 細胞系の造血再構築が遅延しがちなので慢性期の GVHD の影響を見るためには今後 3 ヶ月、6 ヶ月のマウスでも評価する必要があると考えている。また申請書にあったヒト臍帯血を用いた脂肪由来骨髄細胞のアッセイ系の実験には至ることができなかった。本プロジェクトを通して ADSCs の可能性の一部を垣間見ることができたが、ヒト化モデルマウスを用いた研究など骨髄回復に関与する実験は十分にできなかったため今後とも継続

していきたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)
現在投稿中

〔学会発表〕(計 3 件)

1) 学会名 日本小児科学会総会

発表年 2019年

発表標題 川崎病血管炎モデルマウスに対する脂肪由来間葉系幹細胞の効果検証

発表者名 内村僚一

2) 学会名 Asian Society for Pediatric Research (国際学会)

発表年 2019 年

発表課題 ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF ADIPOSE TISSUE-DERIVED STEM CELLS IN A KAWASAKI DISEASE MOUSE MODEL

発表者名 Ryouichi Uchimura

3) 1) 学会名 日本小児血液がん学会総会

発表年 2018年

発表標題 マウス脂肪由来間葉系幹細胞の抗炎症作用についての検証-血管炎モデルマウスを用いて-

発表者名 内村僚一

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：植田 高弘

ローマ字氏名：**UEDA TAKAHIRO**

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：20322505

(2)研究協力者

研究協力者氏名：内村 僚一

ローマ字氏名：Uchimura Ryoichi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。