

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19741

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞による皮膚炎抑制の研究

研究課題名(英文) Therapeutic effects of mesenchymal stem cells (MSCs) for dermatitis

研究代表者

山本 雅章 (YAMAMOTO, MASAOKI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：60624640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：MSCは、間葉に由来する体性幹細胞であり、間葉系に属する細胞への分化能を持つだけでなく、獲得免疫・自然免疫のどちらの反応も強力に抑制する作用があることが判明し、特にMSCはIL-17を産生するTh17細胞への分化を抑制することが注目されている。そこで、本研究では、臍帯血由来 MSCs を用いて検討を行った。IL-8は尋常性乾癬の表皮が高発現し、好中球などのエフェクター細胞を遊走させるケモカインとして乾癬の病態の中心的な存在である。臍帯血由来 MSCsの培養上清は、TNF で誘導されるケラチノサイト(NHEK)のIL-8の産生を抑制することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Cell-based therapies using mesenchymal stem cells (MSCs) are emerging as a treatment strategy of intractable inflammatory disorders. The therapeutic effect of MSCs on psoriatic dermatitis (PsD) has been tested; the effect of MSC-conditioned medium (MSC-CM) on chemokine production was tested in cultured normal human epidermal keratinocytes (NHEK). Interestingly, MSC-CM significantly reduced IL-8 production induced by IFN- γ or TNF- α in NHEK. Hence, MSCs might be beneficial for treatment of psoriasis and clinical trial for psoriasis will help elucidate the efficacy of cell-based therapy using MSCs.

研究分野：乾癬

キーワード：MSC 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

MSC は、間葉に由来する体性幹細胞であり、間葉系に属する細胞への分化能を持つ (Pittenger MF, Science 284: 143-147, 1999)。そのため、iPS 細胞や ES 細胞のように、今までは MSC から種々の臓器を作る研究がなされ、関節軟骨の再生では既に兵庫医科大学でも関節軟骨損傷患者への投与が開始され安全性が確立されつつある。

ところが近年、MSC に単なる幹細胞としての役割だけではなく、獲得免疫・自然免疫のどちらの反応も強力に抑制する作用があることが判明し、特に MSC は IL-17 を産生する Th17 細胞への分化を抑制すること、樹状細胞の分化や増殖を抑制することが注目されている (Tatara R, Cytotherapy, 13: 686-94, 2011)。MSC の免疫抑制作用の応用については、白血病治療などにおける移植後急性移植片対宿主病 (GVHD) は Th17 細胞の関与が大きいため、MSC による治療効果が期待されている (Le Blanc K: Lancet, 371: 1579-86, 2008)。乾癬も同様に、樹状細胞から産生されるサイトカインとそれによって Th17 細胞などから遊離される IL-17 がその病態に関与する疾患である。しかし、MSC が乾癬を抑制できるかどうかは動物実験などがなされていないため未解決であり、MSC がケラチノサイトを直接抑制できるのかなど、皮膚免疫への関与についても不明である。なお、兵庫医大のグループが利用している胎児付属物由来 MSC は、増殖性が良く、拒絶反応が起こらないため他人に移植可能であるなど利点があり、骨髄由来間葉系幹細胞よりもヒトに臨床応用しやすいため、Th17 疾患であるクローン病や GVHD に対する細胞治療薬として、兵庫医科大学病院で基礎・臨床的研究も予定されているところであった。

乾癬は慢性の皮膚炎を伴って表皮細胞の過剰増殖と不全角化を特徴とする皮膚疾患で、難治性のため、患者の QOL を著しく低下させる疾患である。乾癬の原因は不明であるが、その病態に IL-17 や IL-23 が関与することが明らかになり、これらサイトカインを標的とする生物学的製剤も実用化された。しかし、乾癬治療において、適応や副作用、効果減弱に問題があった。

2. 研究の目的

本研究では MSC の IL-17 制御作用に着目し、乾癬などの炎症性皮膚疾患が MSC によって抑制できるかどうか、乾癬マウスモデル (in vivo) や、ケラチノサイトと MSC の共培養の実験系 (in vitro) を用いて検証する。本研究により MSC による乾癬抑制のメカニズムが明らかになることで、乾癬の新規治療手段の開

発につながることを期待される。

3. 研究の方法

間葉系幹細胞 (MSC) のマウス乾癬モデルにおける *in vivo* の治療効果を検討する。具体的には、マウスの乾癬モデルで IL-17 が関与するものに、IL-23 皮内注射モデル、イミキモド外用モデルなどがあげられる。これらマウス乾癬モデルの皮膚炎に MSC を局注または静注し、乾癬様皮膚炎に対する抑制効果などの影響を検討する。さらに、皮膚炎部位への MSC の遊走や、どのようなサイトカインが抑制されるのかなど、その効果を観察し、乾癬の病態における MSC を用いた皮膚炎治療の可能性を明らかにする。次に、間葉系幹細胞 (MSC) のケラチノサイトに対する作用を検討する。具体的には、MSC は T 細胞や樹状細胞を抑制するが、ケラチノサイトに直接抑制する作用があるかは不明である。乾癬の病変形成において、IL-17 や IL-22 といった Th17 サイトカインは、ケラチノサイトから CXCL1、IL-8、TNF α といった好中球遊走に関与するケモカインや炎症性サイトカイン産生を誘導させ、ケラチノサイトの増殖にも関与している。そこで、ケラチノサイトのケモカイン・サイトカイン産生や増殖が、MSC の培養上清との共培養によって抑制できるかどうか *in vitro* の実験により検討する。

4. 研究成果

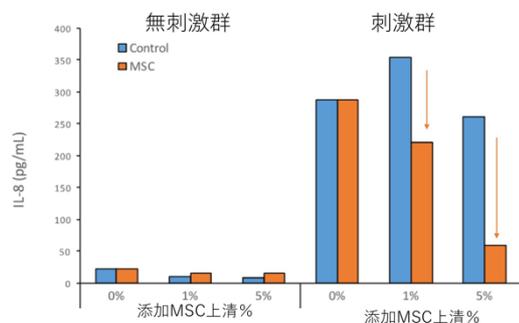


図1) 臍帯由来 MSC の培養上清成分はヒト皮膚角化細胞に直接作用して乾癬関連サイトカイン (IL-8) を抑制できた。

我々は当初、臍帯血由来 MSCs を用いて検討を行った。IL-8 は尋常性乾癬の表皮が高発現し、好中球などのエフェクター細胞を遊走させるケモカインとして乾癬の病態の中心的な存在である。臍帯血由来 MSCs の培養上清は、TNF α で誘導されるケラチノサイト (NHEK) の IL-8 の産生を抑制することを見いだした (図1)。そこで、臍帯血由来 MSCs の投与が *in vivo* で有効かどうか検討したところ、図2に示すように、マウス耳介皮膚に IL-23 を局

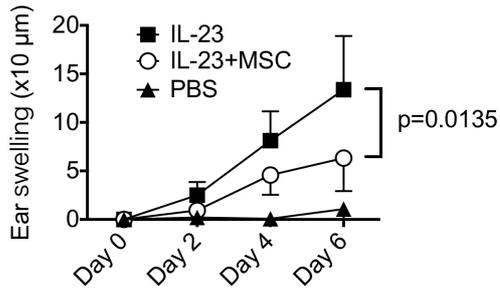


図2) IL-23 誘導性マウス乾癬モデルにおける、マウス耳の耳介腫脹。

注することで誘導される実験的乾癬において、IL-23 と臍帯血由来 MSC を混ぜて注射すると乾癬は減弱することを見いだした。ところが、これらマウス乾癬モデル(psoriasiform dermatitis, PsD)がヒトの臍帯血由来 MSCs で治療可能であるということは、先に他の研究者から類似データの発表があった(Lee YS, Biochem Biophys Rep 2016; Sah SK, Antioxid Redox Signal 2016, Kim JY, J Tissue Eng Regen Med 2017)。今後の研究の計画としては、このまま帯血由来 MSCs で研究を続行しても上記のように既に他の研究者から論文発表があり新規性に欠けるため、MSCの種類をヒト羊膜由来(hAMSCs)に変更して研究を継続予定である。我々が用いるhAMSCsは、ラット colitis モデルで有効であることが既に示されているものである(Miyamoto S, Am J Transl Res 2017)。hAMSCsは羊膜に含まれるMSCの数が豊富なこと、元々医療廃棄物であるため侵襲的手技を必要としないといった、臨床応用がしやすいという他のMSCに無い利点がある。なお、ヒト乾癬患者へのMSC投与の有効性の臨床応用に関してはumbilical cord blood-derived MSC(Chen H. The American journal of medicine. 2016)や、Adipose-Derived MSC(De Jesus MM, Cell Transplantation, 2016)を用いた有効性が既に症例報告されているため、この結果から類推するに、同様にhAMSCにおいても、ヒトの乾癬治療への応用が期待できる可能性も示唆されうる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① 井上 裕香子, 夏秋 優, 山本 雅章, 羽田 孝司, 今井 康友, 山西 清文, 西井 理恵, 松永 寿人. 皮疹の軽快後に抑うつ状態を発症したカルバマゼピンによる

非典型型DIHSの1例. 皮膚の科学. (1347-1813)16巻2号 Page129-132 (2017.04) (査読有)

- ② Wada Y, Kusakabe M, Nagai M, Yamamoto M, Imai Y, Ide YH, Hirota S, Yamanishi K. A mild case of congenital ichthyosiform erythroderma with periodic exacerbation: Novel mutations in ABCA12 and up-regulation of calprotectin in the epidermis, *J Dermatol* 44:e282-e283, 2017. doi:10.1111/1346-8138.13976. (査読有) [学会発表] (計11件)

- ① Imai Yasutomo, Nagai Makoto, Yamamoto Masaaki, Yasuda Koubun, Nakanishi Kenji, Yoshimoto Tomohiro, Yamanishi Kiyofumi, Depletion of basophils alleviates ILC2-dependent atopic dermatitis-like inflammation in mice overexpressing interleukin-33 in the skin. (Plenary 講演) The 42th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (JSID2017), Kochi city culture plaza Culport (KOCHI, Japan). 2017. 12. 15~17 (発表日: 12月17日)
- ② 和田 吉弘, 山本 雅章, 永井 諒, 今井 康友, 夏秋 優, 山西 清文. プロメライン軟膏によるアナフィラキシーショックの一例(一般)第47回日本皮膚アレルギー・接触皮膚学会総会学術大会 かがしま県民交流センター(鹿児島県, 鹿児島市) 2017年12月8日~10日(発表日: 12月9日)
- ③ 和田 吉弘, 山本 雅章, 永井 諒, 今井 康友, 山西 清文. 顆粒球吸着療法で加療した疱疹状膿痂疹の一例(一般)第32回日本乾癬学会学術大会 品川プリンスホテル(東京都, 港区) 2017年9月8日~9日(発表日: 9月8日)
- ④ 永井 諒, 中川 登, 和田 吉弘, 山本 雅章, 伊藤 孝明, 山西 清文. 局所麻酔とTLA法を用いたhigh risk症例における全身麻酔回避(一般)第32回日本皮膚外科学会総会・学術集会 大宮ソニックシティ(埼玉県, さいたま市) 2017年7月22日~23日(発表日: 7月22日)
- ⑤ 和田 吉弘, 今井 康友, 山本 雅章, 山西 清文. IVIGで加療した後天性表皮水疱症の1例(一般)第9回関西皮膚自己免疫疾患談話会 ホテルグランヴィア大阪(大阪府, 大阪市) 2017年6月23日
- ⑥ 今井 康友, 山本 雅章, 山西 清文. 兵庫医科大学病院皮膚科における乾癬に対するセクキヌマブ投与例の検討.(一般)第279回日本皮膚科学会東海地方会 ホテルグリーンパーク津(三重県, 津市) 2017年3月11日~12日(発表日: 3月12日)
- ⑦ 和田 吉弘, 今井 康友, 山本 雅章, 山

西 清文. 抗VII型コラーゲン抗体の測定が診断と病勢評価に有用であった後天性表皮水疱症の1例. (一般) 第79回日本皮膚科学会沖縄地方会 沖縄県医師会館 (沖縄県, 島尻郡) 2017年1月28日~29日 (発表日: 1月28日)

- ⑧ 今井 康友, 安田 好文, 山本 雅章, 羽田 孝司, 永井 諒, 善本 知広, 山西 清文. IL-33 を表皮で過剰に発現するマウスのアトピー性皮膚炎の発症には好塩基球も関与している. (一般) 第46回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 京王プラザホテル (東京都, 新宿区) 2016年11月5日~6日 (発表日: 11月6日)
- ⑨ 伊藤 孝明, 中川 登, 永井 諒, 井上 裕香子, 草壁 みのり, 和田 吉弘, 山本 雅章, 羽田 孝司, 夏秋 優, 山西 清文. 局所麻酔手術の周術期管理. (その他: テーマ演題) 第31回日本皮膚外科学会総会・学術集会 プラザ ヴェルデ ふじのくに千本松フォーラム (静岡県, 沼津市) 2016年9月9日~10日 (発表日: 9月10日)
- ⑩ 和田 吉弘, 山本 雅章, 今井 康友, 山西 清文. ウステキヌマブで治療した乾癬の親子例. (一般) 第31回日本乾癬学会学術大会 ホテル東日本宇都宮 2016年9月2日~3日 (発表日: 9月2日)
- ⑪ 井上 裕香子, 山本 雅章, 伊藤 孝明, 中川 登, 夏秋 優, 山西 清文. 大伏在静脈上行性血栓性静脈炎の1例. (一般) 第455回日本皮膚科学会大阪地方会 朝日生命ホール (大阪府, 大阪市) 2016年5月21日

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 雅章 (YAMAMOTO, Masaaki)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60624640

(2) 連携研究者

山西 清文 (YAMANISHI, Kiyofumi)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10182586

今井 康友 (IMAI, Yasutomo)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10529514

(3) 研究協力者

實川 織江 (JITSUKAWA, Orië)
兵庫医科大学・医学部・実験補助