

令和 2 年 9 月 7 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09379

研究課題名(和文) カニクイザルを使用したMHCホモ接合体iPS細胞由来MSCによるDSS腸炎の治療

研究課題名(英文) Treatment of DSS colitis with MSCs derived from MHC-homozygous iPSCs with using cynomolgus macaque

研究代表者

小笠原 一誠 (Ogasawara, Kazumasa)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：20169163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：サルDSS腸炎に対して、サルiPS細胞由来間葉系幹細胞(iMSC)とサル骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)を投与し、内視鏡的、組織学的に、その治療効果を検討した。結果は、iMSCとBM-MSCともに治療効果は認められなかった。サルiMSCとサルBM-MSCでは、ヒトMSCと違い抗炎症性サイトカインであるIL-10の産生が認められなかったため、iMSCにIL-10を強制発現させたiMSC-IL10を作成し、同様に治療効果を検討した。iMSC-IL10を投与後、血中IL-10濃度の上昇を認め、組織学的改善をわずかに認めた。しかし内視鏡所見や症状の改善を認めず、更なる解析が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

- 1) 下剤の投与量と投与タイミングを調整することで、カニクイザルに対し、安定した下部消化管内視鏡を行うことができた。またDSSの投与量を工夫することで、世界で初めてカニクイザルDSS腸炎モデルを作製することができた。
- 2) iMSC-IL10を作成し、カニクイザルに投与したところ、末梢血中でのIL-10濃度の上昇を認めたことから、iMSCを担体としたcytokine deliver systemの可能性を示すことができた。
- 3) iMSC-IL10を投与後に、histological scoreにおいて若干の改善を認めたことから、さらなる検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Monkey iPS cell-derived mesenchymal stem cells (iMSCs) and monkey bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) were administered to a DSS colitis model of cynomolgus macaque, and the therapeutic effect on colitis was examined endoscopically and histologically. As a result, no therapeutic effect was observed for both iMSC and BM-MSC. Unlike human MSCs, monkey iMSCs and monkey BM-MSCs did not produce IL-10, which is one of anti-inflammatory cytokine. Therefore, iMSC-IL10 in which IL-10 was forcibly expressed in iMSCs were established and administered to treat monkey DSS colitis. Although IL-10 levels were elevated in the peripheral blood of cynomolgus monkeys treated with iMSC-IL10, no improvement in DSS colitis was observed. However, iMSC-IL10 histologically provided slight improvement of the colitis and then we ought to perform further experiments in future.

研究分野：Pathology

キーワード：DSS colitis MSC iPSC cynomolgus macaque

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD) はクローン病と潰瘍性大腸炎からなる原因不明の腸炎を来す疾患群であり、その発症には自己免疫的機序が考えられている。患者数は年々増加しており、近年では毎年 1 万人の患者が新たに発症している。治療法は免疫調整薬を用いる事が多く、また抗 TNF- $\alpha$  抗体等の生物学製剤も用いられているが治癒は困難で、患者の QOL は低い。一方で Dextran sulfate sodium (DSS) 腸炎はマウスやラットに於ける炎症性腸疾患 (IBD) のモデルとして広く用いられている動物モデルである(1)。この IBD モデルを用いて間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) の投与による治療効果判定の実験は、これまでも行われている(2)。

MSC は生体内に広く分布する細胞で、多分化能や免疫抑制能、血管新生の促進作用等の機能がある事が判っている。近年、臓器移植時の免疫反応の低減や移植片の生着、自己免疫疾患に於ける免疫反応の抑制、心筋梗塞等の組織の修復等に、MSC を用いた実験的な治療が多く行われている。これらの実験で用いられる MSC は、主に自己由来もしくは他人由来の MSC である。自己由来の MSC は増殖能や分化能に個人差があり、全ての患者細胞が同様の挙動を示さないという欠点がある。他人由来の MSC は安定した増殖と分化能を有するものの、拒絶反応や感染症の危険性がある。

滋賀医科大学では、特定の主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex, MHC) ハプロタイプである Mafa-HT1 が homozygous のカニクイザルと heterozygous のカニクイザルを十数頭飼育している。理論的に Mafa-HT1 homozygous カニクイザルの細胞は、Mafa HT1 heterozygous カニクイザルに拒絶反応なく移植可能である。

これまでに申請者らは、Mafa-HT1 homozygous カニクイザル iPS 細胞から間葉系幹細胞 (iMSC) の誘導に成功している。iMSC は活発な増殖能を持つ一方、iMSC は混合リンパ球反応を抑制しており、これまで報告されている MSC と同様に、in vivo において免疫を抑制する作用があるものと予想された (図 1)。

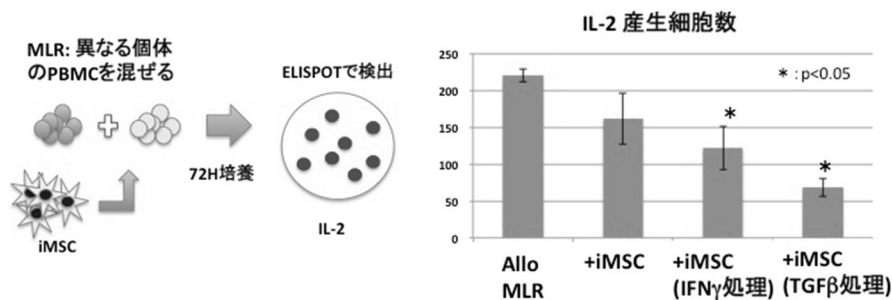


図 1: ELISPOT 法による MLR。iMSC を添加する事で Allo MLR 反応は抑制される。

## 2. 研究の目的

移植可能な MHC 制御 iPS 細胞から誘導した MSC (iMSC) を用いて、炎症性腸疾患 (IBD) 動物モデルであるカニクイザル DSS 腸炎の治療を行い、その効果を検討する。

## 3. 研究の方法

iMSC の有用性を明らかにするために、以下の実験を行うこととした。

1. カニクイザル下部内視鏡手技の確立
2. カニクイザル DSS 腸炎の作製

### 3. iMSC と自家 MSC の投与による DSS 腸炎治療効果の比較

DSS 腸炎治療効果の比較の際は、内視鏡的、組織学的検討を加える。また GFP 蛍光色素導入 MSC を投与する事により、MSC の in vivo での動態の解析も併せて行った。

### 4. 研究成果

1. カニクイザルに下部消化管内視鏡を行うために、ナトリウム・カリウム配合剤散(ニフレック®)を、無麻酔保定下で 100mL/回×6回(合計 600mL、30分毎)を内服させ、腸洗浄を行った。その後4時間～5時間後に麻酔下にて、内視鏡を挿入し検査を行うことができた。内視鏡はヒト用の上部消化管内視鏡を用いて行い、回盲部まで挿入する全結腸内視鏡検査を行うことができた。

2. カニクイザルに DSS を投与することで慢性腸炎急性増悪モデルを作成した。投与に際して、当初は飲料水に DSS を溶かして投与していたが、カニクイザルが飲料水を飲まなくなり、DSS の1日投与量が安定せず、腸炎も安定して起こすことができなかった。そこで DSS を餌に混ぜて1日2回与えたところ、1日投与量が安定し、low dose (150mg/Kg/day)の DSS を2週間投与後に、high dose(250mg/Kg/day)の DSS を投与することで、安定して腸炎を起こすことができた。

3. この DSS 腸炎モデルに、MHC の一致した allo の iPS 細胞由来の間葉系幹細胞(以下、iMSC)を静脈内投与し、DSS 腸炎の治療を試みた。DSS 投与2週間後に、これまでの報告に倣い、iMSC  $5 \times 10^6$  個を PBS 5mL に浮遊させた細胞液を1週間毎に2回静脈内投与し、投与前後での臨床症状、内視鏡所見、生検組織所見を比較して、治療効果を調べた。対象として、iMSC の代わりに PBS 5mL を投与した場合、骨髄から単離した Auto の間葉系幹細胞(以下、BM-MSC)を投与した場合と比較した。結果は、PBS を投与した場合と比べて、iMSC を投与した場合では disease activity index; DAI (3) / histological score (4) のいずれにおいても腸炎の改善を認めなかった。また BM-MSC および iMSC-IL10 を投与した場合、histological score でわずかに改善を認めたが、DAI はコントロールとなる PBS に比べ高値であった(図2、図3)。カニクイザルにおいて、BM-MSC、iMSC とともに、従来報告されている MSC に比べ、in vivo での免疫抑制機能が不十分であったと考えられた。

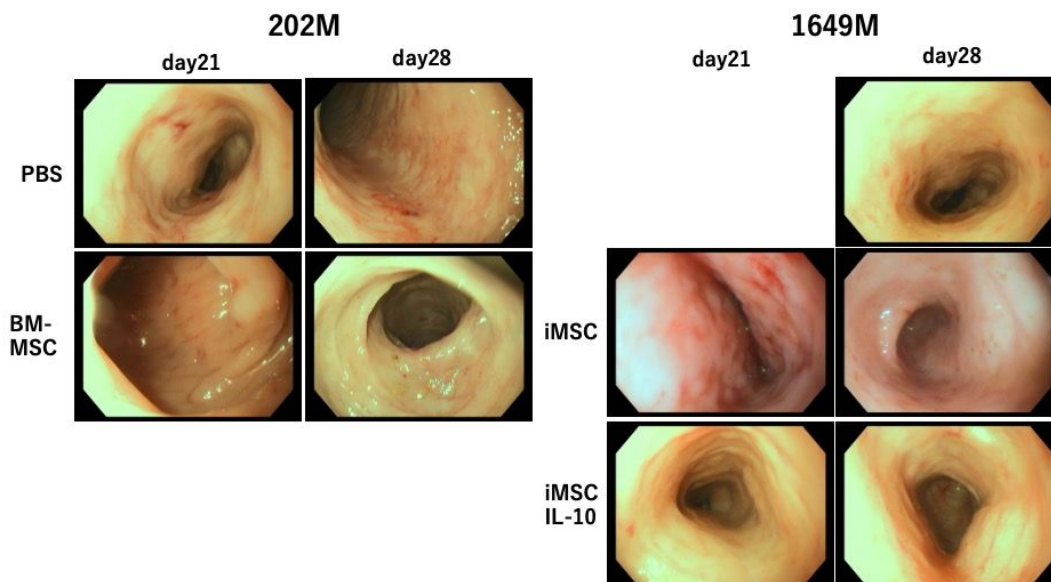


図2：2頭のカニクイザル(202M、1649M)における内視鏡所見。内視鏡観察は、day21、day28の二回行なった。

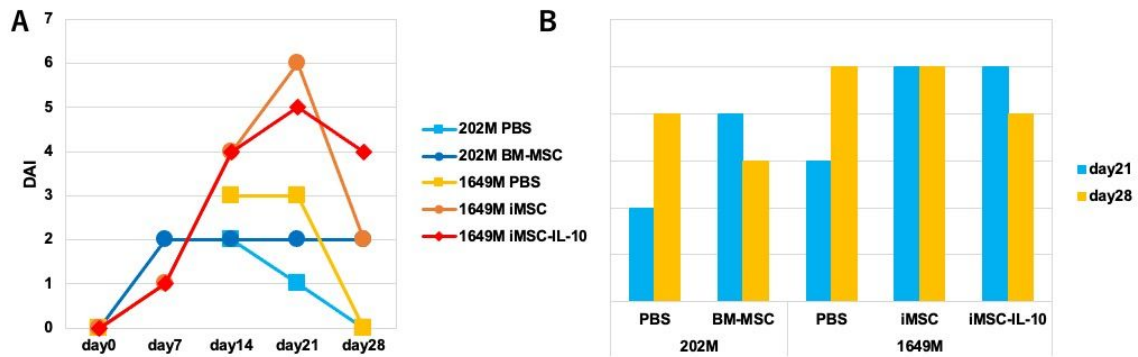


図3：腸炎の活動性の評価。A: disease activity index (DAI); B: histological score。Histological scoreはday21、day28の生検組織にて評価した。

4. 投与した iMSC、BM-MSC は、ともに間葉系幹細胞の定義を満たすマーカーを細胞表面に発現し、軟骨、骨、脂肪組織にそれぞれ分化することができたが、これまでの報告とは違い、抗炎症作用を持つサイトカインである IL-10 産生能が見られなかった。そこで、IL-10 をレンチウイルスベクターで強制発現する iMSC (以下、iMSC-IL10) を作成し、DSS 腸炎の治療を試みた。iMSC-IL10 は *in vitro* において多量の IL-10 を産生しており、投与したカニクイザルの末梢血中においても多量の IL-10 を産生した(図4)。また iMSC-IL10 を投与した場合、histological score において軽度の改善を認めたが、DAI はコントロールに比べ高値であった(図2、図3)。原因として、iMSC-IL-10 投与後の IL-10 濃度が DSS 腸炎を収束させるには十分でなかった可能性、腸管における局所的な IL-10 濃度の上昇を引き起こせなかった可能性などが考えられた。

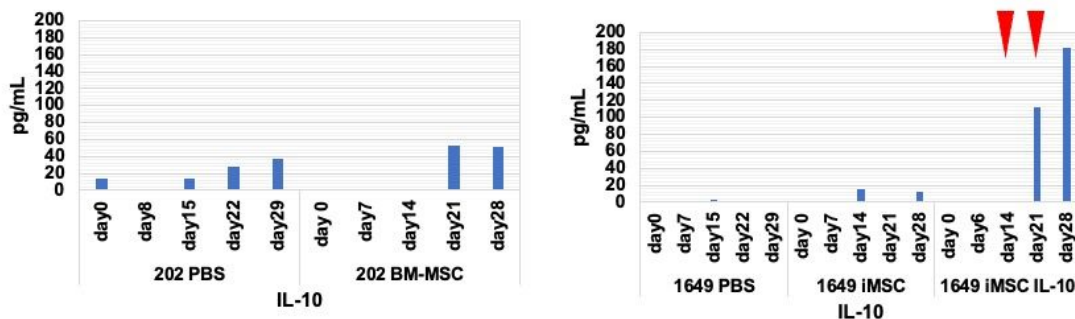


図4：末梢血中の IL-10 濃度。1 週間毎に採血を行い、その血漿を用いて測定した。iMSC-IL10 は day14 と day21 に投与した(矢頭)。

今回我々は、カニクイザルにおいて、DSS 腸炎モデル作製し、内視鏡的に観察することができた。また iMSC-IL10 投与により、カニクイザル末梢血中の IL-10 濃度を上昇させることができ、iMSC を担体とした cytokine deliver system の可能性を示すことができた。iMSC-IL10 を投与後に、DSS 腸炎の内視鏡所見を含めた症状の改善は見られなかったものの、histological score において若干の改善を認めたことから、さらなる検討が必要と考えられた。

#### Reference

1. Chassing B, et al. Curr Protoc Immunol, 2015
2. Hoffman Af, et al. Stem Cell. 2016
3. F. Obermeier et al. Clin Exp Immunol. 1999

4. Kim JJ, et al. J Vis Exp. 2012

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊藤 靖  (Itoh Yasushi)  (90324566)	滋賀医科大学・医学部・教授    (14202)	
研究分担者	石垣 宏仁  (Ishigaki Hirohito)  (90432301)	滋賀医科大学・医学部・助教    (14202)	