

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15761

研究課題名(和文) 脂肪組織由来幹細胞とスタチン製剤併用による強皮症の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Statin-polymer nanoparticles enhance the anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of adipose-derived stem cell transplantation in a mouse model of bleomycin-induced scleroderma

研究代表者

永井 孝治(Nagai, Koji)

大阪医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：30572458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：シンバスタチンPLGAナノ粒子(SimNP)は、脂肪組織由来間葉系幹細胞(AdSCs)の遊走能、生存能を促進し、AdSCsが合成する抗炎症と抗線維化に働く因子の遺伝子合成を促進した。SimNP抱合AdSCsの治療効果を確認するin vivoの実験を行った。SimNP-AdSCs投与群は、細胞単独投与群と比較して、ブレオマイシン(BLM)誘発強皮症モデルマウスの皮膚の炎症と線維化を有意に抑制した。強皮症の肺病変である間質性肺炎を想定して、BLM誘発間質性肺炎マウスモデルにも同様のSimNP-AdSCs投与実験を行い、SimNP-AdSCsの抗炎症及び抗線維化効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、SimNP-AdSCsはAdSCs単独より高い抗炎症効果と抗線維化効果が得られたことから、強皮症や合併する臓器病変である間質性肺炎に対する将来的に有望な治療候補になり得る可能性がある。この結果は、AdSCsの投与細胞数を減らし肺塞栓のリスク低減につながるという点で、より臨床応用に近づいたと言えるのではないかと、AdSCsの細胞機能を更に高める方法の開発が今後も求められる。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the effects of simvastatin-conjugated nanoparticles (SimNPs) on the functions of adipose-derived mesenchymal stem cells (AdSCs) and the therapeutic effect of SimNP-AdSCs in mice models of scleroderma. The cellular functions of AdSCs from Balb/c mice conjugated with different concentrations of statins was observed, and the optimum simvastatin dose was selected. Mice were assigned to four groups: bleomycin (BLM) alone group, NP-AdSC group, SimNP group, and SimNP-AdSC group, and the treatments were performed on day 7. SimNPs significantly promoted migration activity, viability, and up-regulated immunomodulatory factors in in vitro assays. Inflammation and fibrosis in skin were significantly suppressed in the SimNP-AdSC group. The gene expression levels of TNF-alpha and IL-4 were significantly lower and the MMP-9/TIMP-1 ratio was higher in the SimNP-AdSC group than the NP-AdSC group.

研究分野：膠原病

キーワード：強皮症 脂肪幹細胞 間質性肺炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

強皮症 (systemic sclerosis: SSc) は、炎症、線維化、血管内皮障害が主な病態であり、皮膚硬化、末梢循環障害、間質性肺炎、消化管障害などを主徴とする全身の自己免疫疾患である。また、間質性肺炎、肺高血圧症、消化管病変は予後に関わる症状であり、進行例にはステロイドや免疫抑制剤が使用されるが、効果は限定的であり未だ有効な治療法に乏しい。効果と副作用の観点からより優れた治療を開発することが求められている。

脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cells: AdSCs) は数年前頃より、脂肪細胞のみならず他系統細胞への多分化能を有することが明らかにされ、臨床応用を目指した細胞移植治療研究が行われつつある。また、AdSCs は免疫抑制作用を有しており、組織片対宿主病、クローン病などで免疫抑制療法として開発研究が進められており、有望な結果が報告されている。更に、膠原病領域でも、AdSCs による Goodpasture 症候群のモデルマウスにおける腎炎の抑制効果が報告されている。

スタチン製剤は血管内皮前駆細胞 (EPC) を骨髄から動員し血管新生促進作用を示すことが知られているため、AdSCs 移植と併用することにより、EPC を介した血管新生による移植 AdSCs に対する血流補充が期待できるとともに、スタチンによる AdSCs の血管系細胞分化促進効果も期待できる。また、スタチンは T cell や NK cell の活性化を抑制し、更に fibrotic synthesis を抑制することによる抗線維化作用も有している。

### 2. 研究の目的

全身性强皮症は、線維化や血管内皮障害による皮膚硬化、末梢循環障害、間質性肺炎などを主徴とする全身性の自己免疫疾患であり、未だ有効な治療に乏しく、進行性で難治性の疾患である。脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cells: AdSCs) は容易かつ多量に分離でき、血管系細胞などの間葉系細胞への分化能を有し、再生医療への応用が期待されている。また、免疫抑制作用も有することから、治療抵抗性の免疫疾患に対する細胞療法剤として有望視されている。スタチン製剤は、血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC) を骨髄から動員し血管新生促進作用を示すことが知られており、免疫抑制作用も有している。AdSCs 移植とスタチン製剤を併用し、全身性强皮症モデルマウスにおいて抗炎症及び抗線維化効果を検討する。

### 3. 研究の方法

#### マウス AdSCs の細胞機能を最も高めるスタチン濃度の検討

シンバスタチン PLGA ナノ粒子を作製した後に、AdSCs に包含させ、細胞機能を更に評価する。評価する AdSCs 細胞機能は、遊走能、生存能、抗炎症・抗線維化因子の合成能を予定しており、Balb/c マウス由来 AdSCs の細胞機能を最も高めるシンバスタチン濃度を検討する。

#### シンバスタチン PLGA 粒子包含 AdSCs の移植による SSc モデルマウスの皮膚炎症及び線維化に対する抑制効果の検討

< プレオマイシン誘発性 SSc モデル作成と AdSCs 移植治療 >

SSc モデルマウスの作成：8 週齢の Balb/c 雌マウスの後背部皮下にプレオマイシン (BLM) 100  $\mu$ g を 3 週間連日皮下注入することにより、SSc モデルマウスを作成する。

mAdSC の採取：8 週齢の Balb/c マウスの皮下脂肪を採取し、コラゲナーゼ処理にて AdSCs を分離する。P3 まで継代培養した AdSCs を、組織集積する最小細胞数に調整し、BLM 皮下注射開始後 1 週間のタイミングで尾静脈より移入する。BLM 投与開始 3 週の時点でマウス皮膚を摘出し、病理学的、免疫染色、real-time RT-PCR 解析の手法を用い、AdSCs の炎症・線維化に対する効果の評価を総合的に行う。

治療群： シンバスタチン包含 PLGA ナノ粒子 (SimNP) 投与群、細胞 (AdSCs) 単独移入群、  
+ 同時投与移入群、PBS 投与 (control) 群の 4 群を比較検討群として設定する。シンバスタチン濃度は上記の実験結果により決定する。

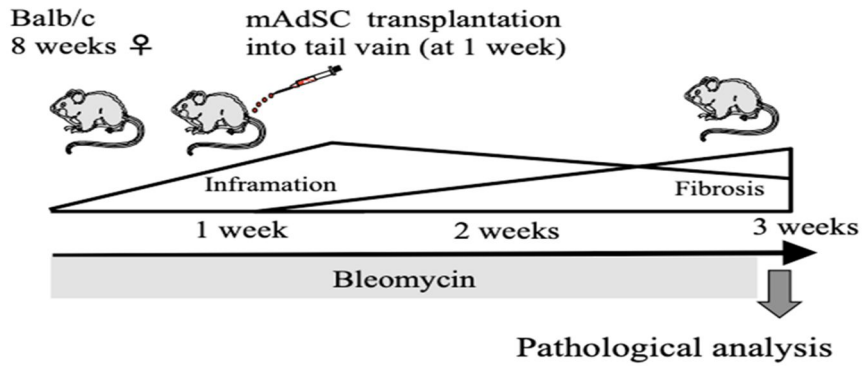
評価項目：

A: 皮膚病理評価：HE 染色による形態評価、マッソントリクローム染色による線維化定量を行う。

B: 免疫染色による浸潤炎症細胞の評価：抗 CD3 抗体、抗 F4/80 抗体、抗 Gr-1 抗体を用いた皮膚浸潤炎症細胞 (リンパ球、マクロファージ、好中球) の定量評価を行う。

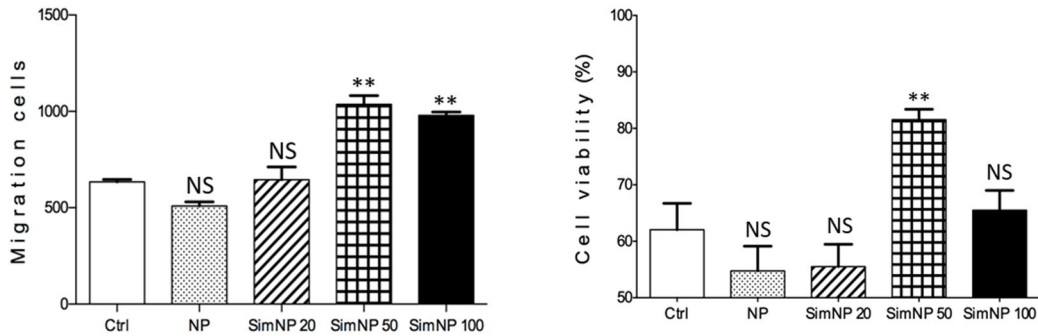
C: real-time RT-PCR 解析：皮膚組織から mRNA を抽出し逆転写反応により cDNA を精製する。TGF- $\beta$ 1, Col-1, TIMP1, 炎症性サイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-6, IL-4, IL-1) の遺伝子発現を解析する。

D. Sircol collagen assay kit を用いて、皮膚病変の collagen contents を定量評価する。

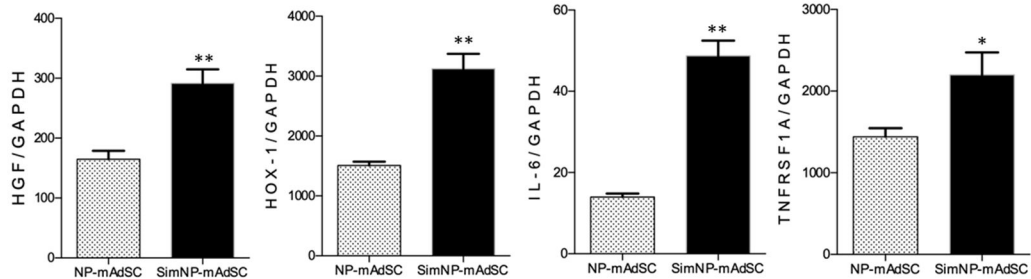


#### 4. 研究成果

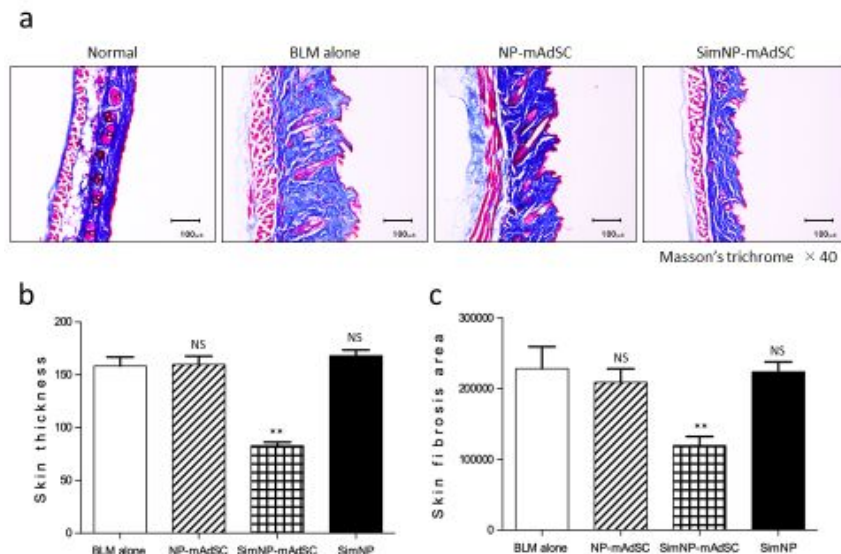
AdSCs の遊走能及び生存能は、SimNP 50  $\mu\text{g}/50000$  細胞で有意差をもって最も亢進していた。用いる SimNP は 50  $\mu\text{g}/50000$  細胞に決定した。



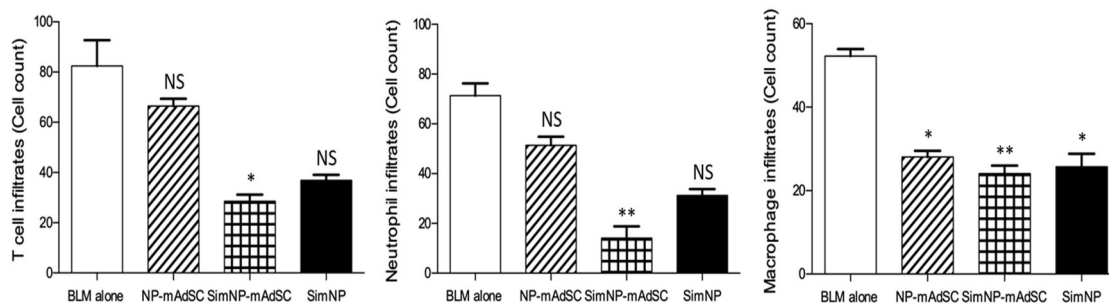
SimNP を抱合した AdSCs (SimNP-AdSCs) の抗炎症及び抗線維化因子の遺伝子発現を、細胞単独 (NP-AdSCs) と比較検討した。その結果、HGF, HOX-1, IL-6, TNFRSF1A の遺伝子発現が細胞単独と比較して SimNP-AdSCs で亢進していた。



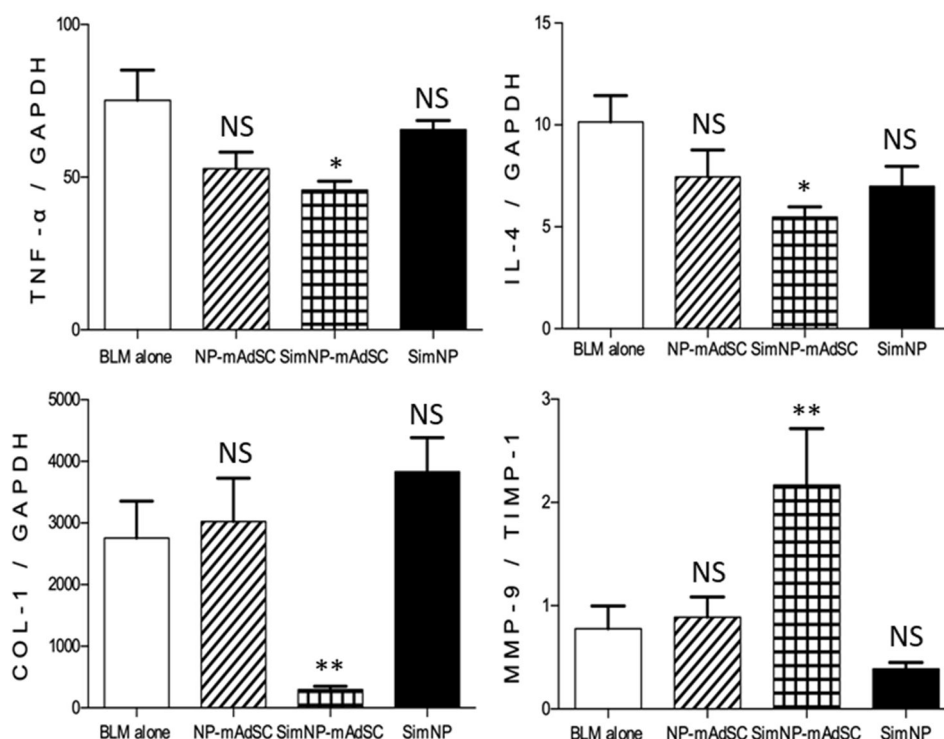
次に、SimNP-AdSCs の治療効果を確認する *in vivo* の実験を行った。治療群は、SimNP-AdSCs 投与群、細胞単独 (NP-AdSCs) 投与群、疾患群 (コントロール)、SimNP 投与群を設定した。その結果、SimNP-AdSCs 群は細胞単独群と比較して、有意に皮膚の線維化を抑制していた。



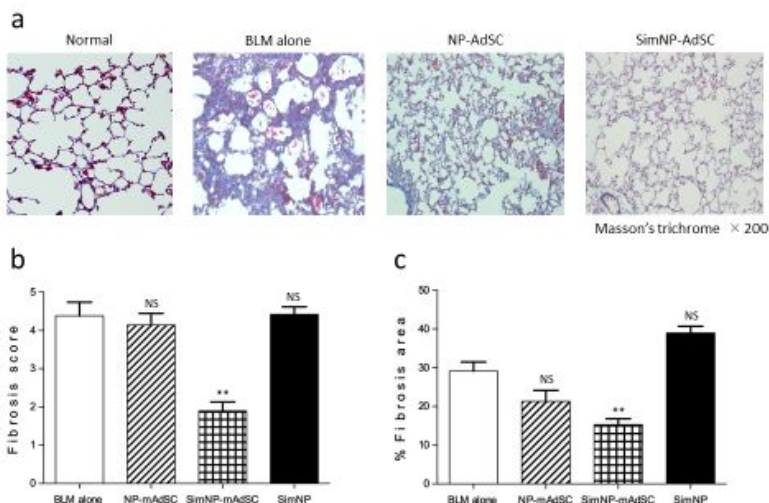
皮膚病理のT細胞、マクロファージ、好中球の浸潤を免疫染色で評価したところ、細胞単独群と比較して SimNP-AdSCs 群で有意に炎症が抑制されていた。



皮膚病変の組織を用いた定量 PCR では、細胞単独群と比較して SimNP-AdSCs 群の方が、肺炎症 (TNF- $\alpha$ , IL-4) と線維化 (Col-1, MMP-9) 因子の遺伝子発現を抑制していた。



以上の結果から、SimNP-AdSCs 投与群は、細胞単独投与群と比較して、強皮症モデルマウスの皮膚の炎症と線維化を有意に抑制した。強皮症の肺病変である間質性肺炎を想定して、BLM 誘発間質性肺炎マウスモデルにも同様の SimNP-AdSCs 投与実験を行い、SimNP-AdSCs の抗炎症及び抗線維化効果を確認した。



以上の結果は、2019年度の日本再生医療学会総会で1演題、ヨーロッパリウマチ学会で2演題を発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takayasu Suzuka, Takuya Kotani, Koji Nagai, Yumiko Wada, Masaaki Ii, Tohru Takeuchi, Shigeki Arawaka
2. 発表標題 Anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of intravenous adipose-derived stem cell transplantation in a mouse model of bleomycin-induced scleroderma
3. 学会等名 欧州リウマチ学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Kotani <sup>1</sup> , Masaaki Ii, Takayasu Suzuka, Yumiko Wada, Koji Nagai, Tohru Takeuchi, Shigeki Arawaka.
2. 発表標題 Simvastatin-conjugated nanoparticle enhances the therapeutic effect of adipose-derived stem cells on interstitial lung disease
3. 学会等名 欧州リウマチ学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小谷 卓矢, 鈴鹿隆保, 永井孝治, 和田祐美子, 武内 徹, 荒若 繁樹, 伊井 正明
2. 発表標題 シンバスタチンPLGA粒子抱合脂肪組織由来幹細胞の間質性肺炎モデルマウスに対する治療効果の検討
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

〔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
研究協力者	小谷 卓矢  (Kotani Takuya)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鈴木 隆保  (Suzuka Takayasu)		
研究協力者	武内 徹  (Takeuchi Tohru)		