

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08347

研究課題名(和文) ヒト羊膜MSCが持つ新規抗炎症物質の同定ならびに治療効果の検討

研究課題名(英文) Identification of novel anti-inflammatory factor secreted by amnion-derived mesenchymal stem cells and investigation of therapeutic effect

研究代表者

山本 桂子 (Yamamoto, Keiko)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：60791952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、羊膜MSCが多くの疾患で抗炎症効果を示すことを明らかにしてきたが、そのカギとなる抗炎症物質の存在は明らかにしていない。そこで、本研究では、羊膜MSCから新たに抗炎症物質を持つ候補物質を同定し、その抗炎症効果を細胞実験で明らかにした。また、腸炎マウスモデルを用いて、羊膜MSC由来新規物質を投与したところ、腸管における炎症性サイトカインの発現は低下していたが、炎症性細胞の浸潤や病理学的なスコアリングでは、有意な改善効果は認められなかった。これらのことから、羊膜MSC由来新規因子は、細胞実験では抗炎症効果を示す傾向にあったが、動物実験においては著しい腸炎発症抑制効果は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で用いる羊膜由来MSCは、身体への侵襲がなくかつ大量に分離培養できることから次世代の再生医療ソースとして期待されている。申請者は、羊膜MSCにいち早く着目し、その治療効果をさまざまな疾患動物モデルを用いて明らかにしてきた。近年、MSCから産生されている液性因子の存在が報告されているが、MSCがもつ治療効果を最大限に発揮している因子の特定には至っていない。本研究では、羊膜MSC由来の新規抗炎症因子の同定し、細胞実験でその抗炎症効果を明らかにしてきた。今後、さらなる研究により炎症性腸疾患を代表とする難治性疾患への新規治療薬開発の可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：The applicants have shown that amniotic MSCs exhibit anti-inflammatory effects in many diseases, but the key anti-inflammatory substances have not been identified. In this study, we identified a new anti-inflammatory factor from amniotic MSCs, and clarified its anti-inflammatory effect by cell-based experiments. Furthermore, in a mouse model of intestinal inflammation, administration of the novel factor derived from amniotic MSCs reduced the expression of inflammatory cytokines in the intestinal tract, but did not significantly improve inflammatory cell infiltration or pathological scoring. These results indicate that the amniotic MSC-derived novel factor tended to show anti-inflammatory effects, but its marked inhibition of the development of intestinal inflammation was not observed in animal experiments. Further validation, including dosage of amniotic MSC-derived novel factor, is needed in the future.

研究分野：消化器疾患

キーワード：羊膜MSC 新規抗炎症物質 炎症性腸疾患

## 1. 研究開始当初の背景

MSC は、骨髄、脂肪などに存在する体性幹細胞であり、骨、軟骨、脂肪などに分化する多分化能を有し、再生医療における有望な細胞として注目されている。申請者らは、出産時に廃棄される卵膜に着目し、その中の羊膜には他の組織に比べて多量の MSC が含まれていること、また、骨髄や脂肪組織由来の MSC と比較すると、採取時の侵襲がないことから、新規の再生医療ソースになる可能性が期待されている。これまでに申請者らは、ヒト T リンパ球と羊膜 MSC との共培養を行った結果、T リンパ球の増殖を著しく減少させること、また、移植片対宿主病 (GVHD) マウスモデルに対する羊膜 MSC の有用性を明らかにしてきた (Yamahara K, et al., *PLoS One* 2014)。一方で、羊膜 MSC は、炎症性細胞である Th1 細胞や Th17 細胞の分化を抑制することも知られていることから (*J Mol Cell Cardiol.* 2012)、羊膜 MSC は、生体における過剰な免疫反応を抑制する機能を有していることが示唆されている。近年、申請者らの研究室では、各種炎症性疾患動物モデルを用いて羊膜 MSC の病態改善効果を検討しており、腸炎 (*Am J Transl Res.* 2017., *Cell Transplant.* 2015)、膵炎 (*Pancreas.* 2016)、放射線直腸炎 (*Cytotherapy.* 2015)、ならびに、肝線維症 (*Transplant Direct.* 2015)において、強い抗炎症効果を有することで、病態を改善することを明らかにしてきた。しかしながら、これまで羊膜 MSC 由来のどのような液性因子が、さまざまな炎症性疾患を抑制しているのかの詳細は明らかにされていなかった。

近年、申請者らは液体クロマトグラフ質量分析系 (LC/MS/MS) を用いて羊膜 MSC の培養上清に含まれる既知の抗炎症物質の同定を網羅的に検証したところ、生理活性脂質であるパルミトイルエタノールアミド (PEA) が大量に含まれていること、さらに、四塩化炭素誘発肝線維症モデルを用いて PEA の治療効果の検討を行ったところ、炎症細胞の浸潤ならびに炎症性サイトカインの産生を有意に減少させたほか、TGF- $\beta$ 1/SMAD 経路を抑制させることで肝線維化の進展に重要な肝星細胞の活性化をも抑制させる新たなメカニズムを明らかにした (*Front Pharmacol.* 2018)。

一方で、羊膜 MSC の培養上清に含まれる新規の生理活性物質の同定を行うために、羊膜 MSC の類似細胞である線維芽細胞の培養上清を比較対象にした抗炎症効果を検討したところ、羊膜 MSC 由来培養上清では lipopolysaccharide (LPS) 刺激によるマクロファージからの TNF- $\alpha$  の産生が著しく低下していたが、線維芽細胞由来培養上清では抗炎症効果がないことから、線維芽細胞由来の培養上清が抗炎症効果のある羊膜由来 MSC の適切なコントロールであることが示唆された。さらに、これらの培養上清を用いて質量分析 (LC/MS/MS) により未知物質について検証したところ、抗炎症効果のない線維芽細胞由来培養上清に比べて羊膜 MSC 由来培養上清で 10 倍以上濃度の高い物質が存在することを明らかにしている。申請者らは、羊膜 MSC から産生される新規物質が抗炎症効果を発揮し、炎症性疾患を抑制していると想定しており、現在明らかになっている新規物質についてその特性などについて詳細に検証することで、これまで不明であった羊膜 MSC が持つ抗炎症物質の同定ならびに難治性炎症性疾患に対する新規治療薬の開発を試みる。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、羊膜 MSC から産生される抗炎症効果に関与する未知物質の同定を行い、炎症性腸疾患に対する安全かつ有効な新規治療薬の開発を目的とする。申請者らは、これまでに肝炎、膵炎、炎症性腸疾患などの動物モデルを作成し、羊膜 MSC ならびにその培養上清を投与することで疾患の発症を抑制することを明らかにしてきた。また、近年申請者らは、これまで不明で

あった羊膜 MSC から産生される抗炎症効果に関連した未知物質の存在を明らかにしており、現在までに国内外を含め類似する研究はなされていない。申請者らは、これらの抗炎症効果に関連した新規物質を同定することで難治性疾患に対する新規治療薬の開発を世界に先駆けて実施する予定であり、学術的独自性ならびに創造性の高い研究であると考えられる。

### 3. 研究の方法

本研究では、羊膜 MSC がもつ抗炎症効果を示す新規物質の同定ならびにその物質を用いた治療効果の検証を行った。具体的に期間内に以下のことを評価した。

#### (1) ヒト羊膜 MSC から産生される抗炎症性未知物質の同定 (令和2年度)

**方法**; ヒト由来胎児付属物を細切して、コラゲナーゼ(200 U/ml)を添加し、37℃で1時間振盪した。その後、10%胎児ウシ血清含有培養液にて培養し MSC を分離培養した。また、対象細胞としてヒト皮膚由来線維芽細胞を購入し同様な方法で培養した。培養後、細胞を 100%コンフルエントにし、1xHBSS(-)で2回洗浄後、無血清培地を添加して0時間、24時間ならびに48時間培養後、上清を回収した。培養上清試料に含まれる代謝物候補を絞り込むために、LC-NanoMate-高分解能 MS/MS システムを用いて、LC 分離をしながら分取・MS 解析の同時測定を実施した。溶出時間ごとに回収した各フラクションを用いて、LPS (100 ng/ml)で刺激したマクロファージの培地に添加し、抗炎症効果のあるフラクションの特定を行った。各フラクションに含まれる代謝物の MS スペクトルはすでに取得済みであることから、抗炎症活性が確認されたヒト羊膜 MSC および対象となるヒト線維芽細胞由来のフラクションで得られた代謝物ピークの比較解析を行うことで、候補となる MS スペクトルの絞込みを実施する。その後、高分解能 MS スペクトル情報をもとに、化学組成の決定を行うとともに、その MS/MS スペクトルから部分構造の情報を取得した。さらに、代謝物データベースをもとに既知化合物との類似性等を考慮して候補化合物の構造推定を実施した。この時点で、構造推定ができた場合は、候補化合物の化学合成を行い、LC/MS/MS にて比較検証を行った。

#### (2) 培養細胞を用いた羊膜 MSC 由来新規物質処理後の抗炎症効果の検証 (令和3年度)

**方法**; 候補となる羊膜 MSC 由来新規物質の抗炎症効果を明らかにするために、マウス由来マクロファージを用いて、LPS (100 ng/ml)の刺激後、各々の合成物を1~10 µg/mlの濃度で処理することで産生される複数の炎症性サイトカインを ELISA で検証した。さらに炎症性サイトカインの産生に重要な転写因子の活性化を評価した。

#### (3) 炎症性腸疾患動物モデルを用いた羊膜 MSC 由来未知物質の治療効果の検討 (令和4年度)

**方法**; 6週齢のマウスを用いてミネラルウォーターに3.5%のデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を自由飲水させ腸炎モデルを作成した。4日後、上記の新規物質を連日マウスに投与し、体重変化、便の性状、血便ならびに副作用の有無について連日観察した。DSS 投与10日後、マウスを処置し、腸の長さおよび病理学的検討により炎症性評価を実施した。また、腸管組織に対する免疫染色を行い、炎症性細胞浸潤の程度を評価した。さらに、腸組織から RNA 抽出を行い、TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$ などの複数の炎症性サイトカインの発現について定量的 PCR 法を用いて評価した。

### 4. 研究成果

本研究では、これらの培養上清を用いて質量分析(LC/MS/MS)により羊膜 MSC 由来新規抗炎症物質の同定について検証したところ抗炎症効果と関連の深い新規物質の存在を明らかにした。また、この新規候補物質の抗炎症効果を明らかにするために、マウス由来マクロファージを用いて、LPS の刺激後、羊膜 MSC 由来新規候補物質を処理することで産生される複数の炎症性サイトカインを ELISA で検証した。結果、LPS 刺激後のマウス由来マクロファージでは、炎症性サイト

カインの発現が亢進していたが、羊膜 MSC 由来新規物質を投与すると複数の炎症性サイトカインの発現が抑制されていた。さらに、炎症性サイトカインの産生に重要な NF- $\kappa$ B などの転写因子の活性化を評価したところ、LPS 刺激後のマウス由来マクロファージでは、転写因子の発現が促進されていたが、羊膜 MSC 由来新規物質を投与するとその発現が低下していた。さらに、動物実験モデルを用いて羊膜 MSC 由来新規物質の抗炎症効果を明らかにするために、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を自由飲水させ腸炎モデルを作成し、このマウスに羊膜 MSC 由来新規物質を投与した。結果、羊膜 MSC 由来新規物質を投与した群では、DSS による体重減少、腸管の短縮、ならびに、血便等も抑制されていた。また、腸管から RNA を回収して炎症性サイトカインの発現について確認を行ったところ、羊膜 MSC 由来新規物質を投与では、いくつかの炎症性サイトカインの発現が低下していた。

一方で、病理学的検討において、腸管内の炎症性細胞浸潤について評価したところ、羊膜 MSC 由来新規物質を投与した群では、炎症性細胞浸潤は抑制されておらず、腸管における炎症スコアリングにおいても DSS 単独群と比較して有意な差は認められなかった。これらの結果から、細胞実験においては羊膜 MSC 由来新規物質の投与により抗炎症効果を示す傾向はあったが、腸炎発症動物モデルにおいては、著しい腸炎の発症抑制効果は認められなかった。よって、羊膜 MSC 由来新規物質の適切な投与量を検討する必要があると考えられる。

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〕

北海道大学大学院医学研究院内科学講座消化器内科学教室ホームページ  
<https://halo.med.hokudai.ac.jp/>

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	大西 俊介  (Ohnishi Shunsuke)  (10443475)	北海道大学・医学研究院・准教授    (10101)	
研究 分 担 者	山本 幸司  (Yamamoto Koji)  (70608322)	北海道大学・大学病院・特任助教    (10101)	
研究 分 担 者	和泉 自泰  (Izumi Yoshihiro)  (70622166)	九州大学・生体防御医学研究所・准教授    (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------