

令和 4 年 4 月 27 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17318

研究課題名(和文) 脂肪由来幹細胞の自家移植による乾癬の根治的治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of radical treatment method for psoriasis using adipose-derived stem cells

研究代表者

荻野 龍平(Ogino, Ryohei)

広島大学・医系科学研究科(薬)・助教

研究者番号：00816035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪由来幹細胞(ASC)移植の乾癬への有効性が報告されているが、基礎的検討は行われておらず、その治療メカニズムは不明である。本研究ではASC移植による乾癬治療法確立に向け、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎モデルマウスに対して、通常または食事誘発性肥満マウスに由来するASCを移植することで、その治療メカニズムを検討することを目的とした。しかし、肥満マウスより採取した脂肪組織では脂肪細胞様の細胞への分化が著しく、必要数のASCが得られなかった。ASC移植時に対照群とする、抗IL-23p19抗体による治療効果については検討を行い、ASCの培養が完了し次第、目的の実験にとりかかる体制を構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾癬には根治的治療法がなく、対症療法となることから、患者は長期間にわたり治療を続ける必要がある。近年登場した抗IL-23p19抗体などの生物学的製剤は高い治療効果を示しているが、それでも効果は完全ではない。本研究においても、抗IL-23p19抗体はIL-23により活性化されるTh17細胞に関連するサイトカインを効果的に抑制したが、IL-36や脾臓の肥大など、抑制できていない炎症反応が存在した。これまでの報告から脂肪由来幹細胞が慢性炎症性疾患に示す治療効果は多面的であるため、Th17細胞の活性化抑制にとどまらず、生物学的製剤では抑制できない炎症反応に効果を示すことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The effectiveness of adipose-derived stem cells (ASC) in psoriasis have been reported in several papers, but mechanisms of ASC therapy are unclear. In this study, to reveal the mechanisms underlying the therapeutic effects of ASC transplantation for psoriasis, we tried to culture and transplantation of ASCs derived from lean or diet-induced obesity mouse. However, because large amount of adipocyte-like cells were included in stromal vascular fraction from diet-induced obesity mouse, we could not obtain ASCs from obese mouse. We also planned to use anti-IL-23p19 antibody as a therapeutic control in imiquimod-induced psoriasisiform dermatitis in mice, and confirmed anti-IL-23p19 antibody could suppress gene expression of cytokines in IL-23/Th17 axis, but not IL-36. Although our experiments are still preliminary, we established a system to start the desired experiment as soon as the ASC culture method is improved.

研究分野：医療薬学

キーワード：イミキモド誘発乾癬様皮膚炎 乾癬モデル 抗IL-23p19抗体 脂肪由来幹細胞 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

乾癬患者は世界的に増加傾向にあるが、その根治的治療法は確立されていない。近年では、乾癬に深く関与することが知られる Th17 細胞に関連するサイトカインを標的とする生物学的製剤が登場し、高い効果を示している。しかし、乾癬による皮膚の変化や痒みを完全に抑制することは難しく、長期間に及び治療を高価な生物学的製剤を使用して行うことによる医療経済的な問題も残されている。

2000 年ごろに報告された造血幹細胞移植による乾癬寛解例、その反対の乾癬患者をドナーとする造血幹細胞移植による乾癬の発症例などから、乾癬の根底には機能異常となった幹細胞の存在が示唆されている。また、乾癬とメタボリックシンドローム、特に肥満についてその関係性が指摘されており、腹部肥満では乾癬発症のオッズ比が 2.1-3.8 となると報告されている。¹⁾

脂肪由来幹細胞 (ASC) は、脂肪組織内の間質血管画分に含まれる間葉系幹細胞であり、脂肪細胞・骨芽細胞・軟骨細胞などに分化する多分化能と、サイトカインの分泌と免疫調節能による抗炎症作用、抗線維化作用などを持つとされる。ASC やその分泌物の投与による創傷治癒の促進や関節リウマチ、炎症性腸疾患、リンパ浮腫などへの効果が研究されており、乾癬についても 2 施設で 3 名の患者に投与され、乾癬が一時的に寛解したことが報告されている。^{2,3)}

しかし、乾癬に対する ASC の治療効果について基礎的な検討はほとんど行われておらず、その治療メカニズムは明らかでない。また、肥満や糖尿病状態のドナーに由来する ASC は、創傷治癒促進効果などが低下することが報告されている。⁴⁾ 乾癬患者における ASC 治療を行う場合には患者自身の細胞を移植する場合でも、脂肪吸引術を受けるドナーから移植を受ける場合でも、ASC のドナーが肥満である可能性は高いと考えられる。ASC 移植による乾癬の治療メカニズムを明らかにし、さらに肥満における ASC の変化とその機能回復に必要な因子を探索することが、有効な ASC 移植を行うために重要となる。

2. 研究の目的

本研究では、脂肪由来幹細胞の自家移植による乾癬治療に向けた基礎的データを得ることを目的とする。そのために、研究の目的を以下の 3 つのステップに分けて設定した。

(1) 乾癬モデルマウスの作製と、既存の治療法による治療を行い、適切なモデル作製と治療効果判定が行えることを確認すること。

(2) 通常マウス由来 ASC の移植による治療効果を既存の治療法との比較により検討し、その治療メカニズムの主要経路を解明すること。

(3) 高脂肪食摂取マウス由来 ASC と通常マウス由来 ASC について、その治療効果の比較を行い、肥満ドナー由来 ASC に変化をもたらす因子と、その機能を回復させる方法について、探索すること。

3. 研究の方法

(1) 目的 (1) の達成に向け、C57BL/6J マウスの背部の毛を剃毛後に 5%イミキモドクリーム (IMQ) を Day 1 から Day 5 まで 1 日 1 回、5 日間連続で塗布することにより作製される IMQ 誘発乾癬様皮膚炎モデルマウスを、乾癬のモデルマウスとして使用した。

また、既存の治療法として、100 µg の抗 IL-23p19 抗体を IMQ 塗布の前日から 2 日に 1 回、腹腔内投与した (Day 0、Day 2、Day 4)。対照群として、親水クリーム塗布+PBS 腹腔内注射群、IMQ 塗布+Isotype control 抗体腹腔内投与群を作製した。IMQ の最終塗布から 24 時間後にマウスを安楽死させ、背部の皮膚と脾臓を採取した。

(2) 目的 (2、3) の達成に向け、C57BL/6J マウスに対して 8 週齢から 18 週齢までの 10 週間高脂肪食を摂取させ肥満を誘導し、単径皮下脂肪を回収して間質血管画分を分離した。対照として、通常食を摂取させた同週齢のマウスの単径皮下脂肪より間質血管画分を分離した。間質血管画分を培養・継代をすることにより、増殖速度と培養容器への接着性から ASC が選別される。

4. 研究成果

(1) 乾癬モデルマウスの作製と、既存の治療法 (抗 IL-23p19 抗体療法) の治療効果

IMQ の塗布により皮膚の赤みやフケが出現し、表皮の肥厚、Th17 細胞関連サイトカインの発現量増加といった乾癬に近い炎症状態が惹起される。さらに、IMQ の塗布は脾臓の肥大を引き起こすことから、皮膚における局所的な炎症のみでなく、全身性の炎症反応を引き起こすと考えられている。

今回作製したモデルにおいても、IMQ 塗布+Isotype control 抗体投与群においては Day 3 ごろから外観的な変化として皮膚の赤みやフケが確認でき、この変化は経時的に悪化した。その一方で、IMQ 塗布+抗 IL-23p19 抗体投与群においては、わずかに赤みが見られるものの、フケの増加も緩やかであり、抗 IL-23p19 抗体による外観上の治療効果が確認された (図 1)。

Day 6 の皮膚において背部皮膚を採取し、乾癬に関連することが知られるサイトカインの発現を mRNA レベルで測定すると、IL-17A、IL-17F、IL-22、IL-23 といった Th17 細胞に関連するサイトカインについては IMQ 塗布により増加し、抗 IL-23p19 抗体の投与により発現が抑制される傾向にあることが判明した。その他、全般的な炎症反応のマーカーである IL-1、IL-6 についても同様の傾向を示した。その一方で、表皮角化細胞と真皮樹状細胞から主に産生されることが知られている IL-36 と IL-36 については、抗 IL-23p19 抗体による抑制効果が見られなかった (図 2)。

さらに、脾臓についても過去の報告と一致して、IMQ 塗布によりその大きさと体重当たりの重さが増加することが確認されたが、抗 IL-23p19 抗体は脾臓の肥大に対して影響を与えなかった (図 3)

これらの結果から、IMQ の 5 日間連続塗布により乾癬における皮膚の典型的な症状である紅斑、浸潤、鱗屑 (フケ) が発生し、乾癬に深く関与する Th17 細胞関連サイトカインの発現が増加することが示された。本モデルは 2009 年に van der Fits らから報告されて以来、乾癬の臨床的な病態を反映したモデルとして広く使用されている。⁵⁾ また、IL-23 は未成熟な T 細胞を Th17 細胞へと分化・成熟させるための主要なサイトカインであり、抗 IL-23p19 抗体は Th17 細胞の成熟そのものを抑制するため乾癬に対して高い治療効果を示すと考えられている。本研究においても、抗 IL-23p19 抗体の投与は Th17 細胞に関連するサイトカインである、IL-17A、IL-17F、IL-22、IL-23 を遺伝子発現レベルで抑制した。しかし、Th17 細胞とは異なる経路である表皮角化細胞や真皮樹状細胞より主に分泌されると考えられている IL-36、IL-36 に加えて、脾臓の肥大についても抑制効果を示さず、乾癬に伴う炎症性反応のすべてを抑制できるわけではないことも示された。IMQ 塗布モデルに対する ASC の移植においては、脾臓の肥大が抑制されることが報告されている。⁶⁾ ASC の移植により、抗 IL-23p19 抗体の投与では抑制できない炎症性反応が抑制され、相乗的な治療効果を示す可能性も考えられる。

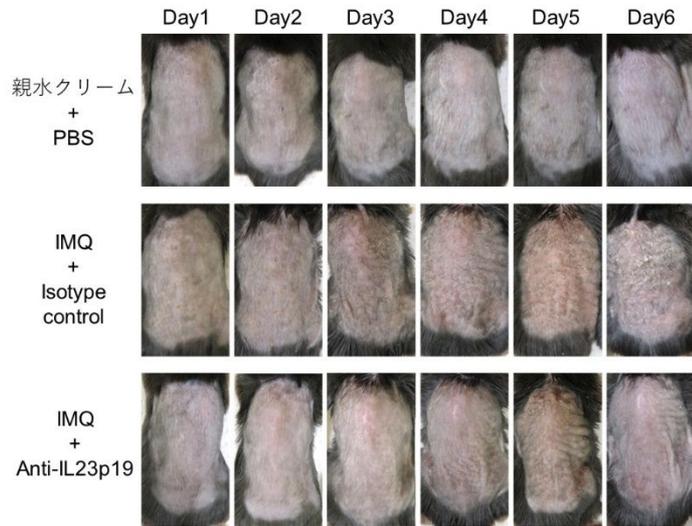


図 1. イミキモド塗布と抗 IL-23p19 抗体腹腔内投与時の皮膚の外観変化

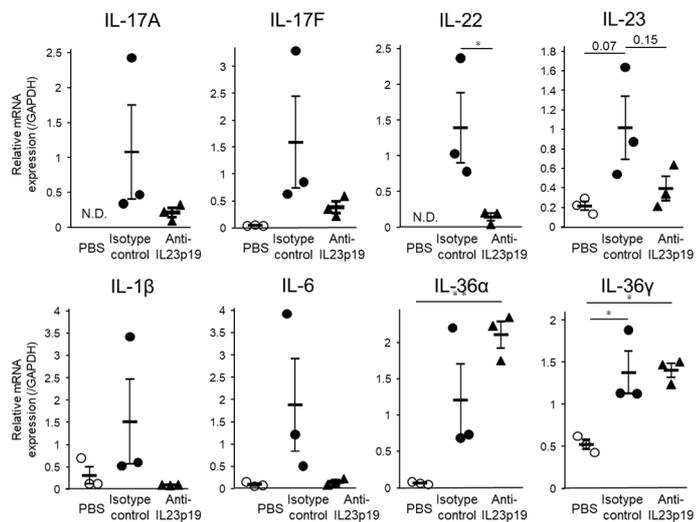


図 2. イミキモド塗布皮膚における mRNA 発現量解析

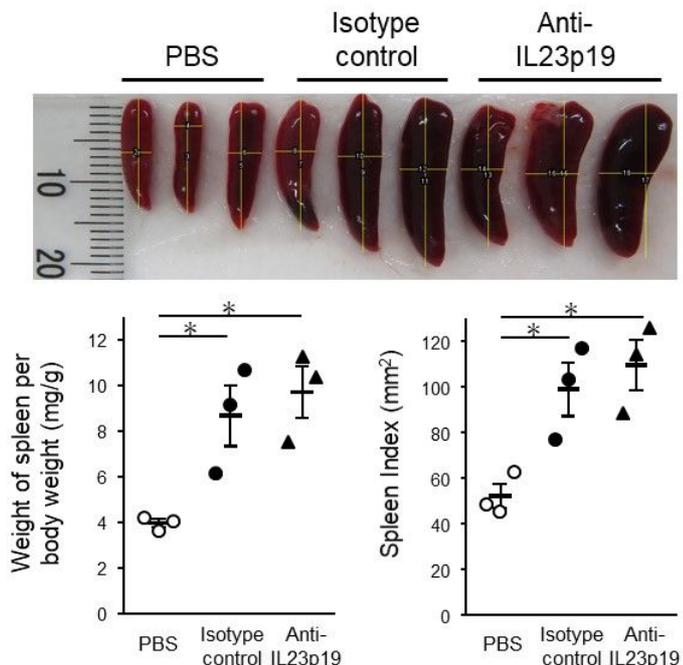


図 3. 脾臓の外観と肥大の評価

$$\text{Spleen index} = \text{長径 (mm)} \times \text{短径 (mm)}$$

(2) 高脂肪食摂取 18 週齢マウス由来 ASC の培養

肥満ドナーに由来する ASC の IMQ 誘発乾癬様皮膚炎モデルマウスに対する治療効果を検討するため、マウスに対して高脂肪食を 10 週以上摂取させ、食事誘発性肥満マウスとした。マウスの単径部皮下脂肪組織を回収して細切後、0.1% collagenase type I+1% BSA+2 mM CaCl₂にて 37、60 分のインキュベート後、培養用培地 (DMEM+10% FBS+ペニシリン/ストレプトマイシン) を使用して 2 度洗浄し、間質血管画分を T25 フラスコに播種した。

その結果、播種の 4 日後には ASC と思われる線維芽様の細胞とともに、脂肪細胞のような丸く、小胞を持つ細胞が出現し、継代後にもそれらの細胞が残存した。その後培養を継続してもこれらの脂肪細胞様細胞が増殖し、ASC を得ることはできなかった (図 4)。

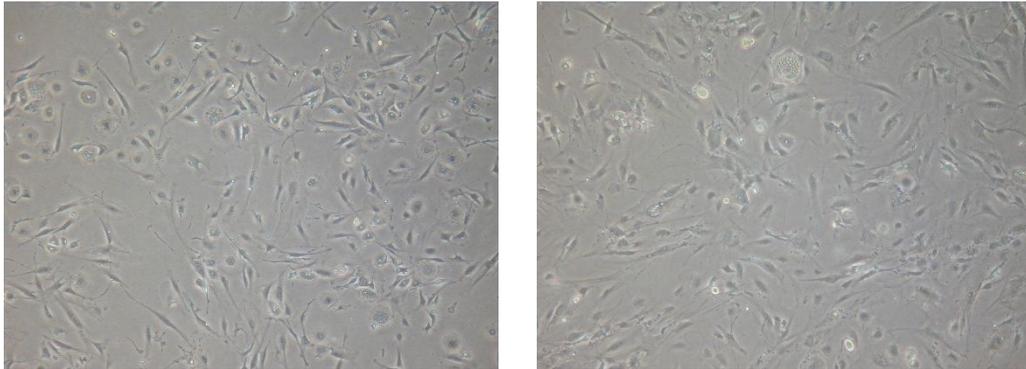


図 4. 肥満マウス脂肪組織由来細胞

(左) 間質血管画分播種 4 日後、(右) 1 度目の継代から 3 日後

肥満状態では脂肪組織にて慢性的な炎症、マクロファージの浸潤等が発生し、その細胞集団や微小環境は、通常食摂取マウスの脂肪組織とは異なると考えられる。また、多くの ASC 採取実験では 10 週齢前後のマウスを使用するのに対し、食事誘発性肥満モデルではおおよそ 10 週以上の高脂肪食摂取が肥満状態の定着に必要となるため、今回の設定では ASC 採取を行う週齢が高くなる。

これらの要因により、肥満マウスの脂肪組織に由来する ASC の培養には成功しなかったものと考えている。現在は、より若齢のマウスから採取できるよう、5 週齢からの高脂肪食摂取を開始したほか、間質血管画分を得る際のコラゲナーゼ処理時間の短縮や洗い回数の検討を行っている。

目的とする ASC を得られ次第、(1) のように作製した IMQ 誘発乾癬様皮膚炎モデルマウスにて、その治療効果を検討する予定である。

<引用文献>

- 1) Gisondi P, Fostini AC, Fossà I, Girolomoni G, Targher G. Psoriasis and the metabolic syndrome. *Clin Dermatol*. 2018 Jan-Feb;36(1):21-28.
- 2) De Jesus MM, Santiago JS, Trinidad CV, See ME, Semon KR, Fernandez MO Jr, Chung FS. Autologous Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Psoriasis Vulgaris and Psoriatic Arthritis: A Case Report. *Cell Transplant*. 2016 Nov;25(11):2063-2069.
- 3) Seetharaman R, Mahmood A, Kshatriya P, Patel D, Srivastava A. Mesenchymal Stem Cell Conditioned Media Ameliorate Psoriasis Vulgaris: A Case Study. *Case Rep Dermatol Med*. 2019 May 2;2019:8309103.
- 4) Cianfarani F, Toietta G, Di Rocco G, Cesareo E, Zambruno G, Odorisio T. Diabetes impairs adipose tissue-derived stem cell function and efficiency in promoting wound healing. *Wound Repair Regen*. 2013 Jul-Aug;21(4):545-53.
- 5) van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, Kant M, Boon L, Laman JD, Cornelissen F, Mus AM, Florencia E, Prens EP, Lubberts E. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol*. 2009 May 1;182(9):5836-45.
- 6) Rokunohe A, Matsuzaki Y, Rokunohe D, Sakuraba Y, Fukui T, Nakano H, Sawamura D. Immunosuppressive effect of adipose-derived stromal cells on imiquimod-induced psoriasis in mice. *J Dermatol Sci*. 2016 Apr;82(1):50-3.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogino Ryohei, Hayashida Kenji, Yamakawa Sho, Morita Eishin	4. 巻 21
2. 論文標題 Adipose-Derived Stem Cells Promote Intussusceptive Lymphangiogenesis by Restricting Dermal Fibrosis in Irradiated Tissue of Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21113885	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林田 健志、荻野 龍平、山川 翔
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞を用いた放射線照射部におけるリンパ管再生
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------