

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659401

研究課題名（和文）炎症性腸疾患に対する献体の未固定標本を活用した骨髄間葉系幹細胞治療の前臨床試験

研究課題名（英文）Preclinical study of stem cell therapy using mesenchymal stem cell derived from fresh cadavers.

研究代表者

山下 健太郎 (Kentaro Yamashita)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90381269

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、炎症性腸発癌に対する骨髄間葉系幹細胞（MSC）の役割の解明および GLP 準拠した前臨床試験を行うことであった。MSC はアゾキシメタン関連発癌に対し、①O6 メチルグアニン付加体を減じ、②アポトーシスを免れた細胞を G1 期停止に導くことでイニシエーションを解除した。Cadaver 由来 MSC は、これまで 2/9 例で継代が可能であったが、今後、さらに分離・培養法を確立する必要がある。

研究成果の概要（英文）：

The purposes of the study were to elucidate a role of MSC on inflammatory carcinogenesis and to conduct preclinical studies according to GLP. MSC reduced O⁶MeG adducts and colonic epithelial cells escaped from acute apoptotic response of genotoxic azoxymethane (AOM) finally induced G1 arrest on the cell cycle or apoptosis, which resulted in partially cancel AOM-induced tumor initiation. In the two of nine fresh cadavers, MSCs derived from cadavers could cultivate up to three passages. It is necessary to establish more efficacious isolation and cultivation methods from cadavers' MSCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000 円	840,000 円	3,640,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：fresh cadaver, 骨髄間葉系幹細胞 (MSC), AOM (azoxymethane)

1. 研究開始当初の背景

ラット MSC を用いたこれまでのわれわれの検討では、急性期腸炎に対する MSC の移植効果は認められず、BU (busulfan) 骨髄不全下に惹起した腸炎においてのみ有効であった。MSC は、BU により腸上皮細胞 (IEC) 域への生着が促進され、IEC のアポトーシス抑制、細胞回転促進、タイトジャンクション再構成によるバリア機能の回復に寄与した

(J Pathol 2009; 218: 350). 回復期腸炎では、MSC は筋線維芽様細胞に分化して粘膜固有層間質に生着し、未熟再生上皮細胞の杯細胞への分化と粘膜修復反応を促進した (J Gastroenterol 2010; Sep 17). Xenograft を用いた検討では、MSC は perivascular niche に保持され、興味深いことに VEGF 低産生の大腸癌においてのみ腫瘍血管新生を促進した (論文投稿中)。さらに、AOM

(azoxymethane)/DSS モデルの腸炎関連発癌 (colitis-associated cancer, CAC) に対し、MSC は発癌の initiation を抑制する傾向が認められた (研究進行中)。しかし、われわれを含めこれまでの基礎研究では、用いた MSC の品質管理、最適化、有効性機序の解析および proof-of-concept 試験が十分とはいえない。治療効果を予測しうるバイオマーカーもないまま MSC 治療は過大な期待のもと数多くの臨床試験が進行している。その中で、最近、Osiris 社による GVHD に対する Prochymal™ (MSC) 治療の第三相試験の予備的解析結果が公表された。プライマリーエンドポイントの完全寛解には有意差が認められず、層別解析によってのみ肝および消化管 GVHD にその有効性が示された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の 2 点に大別される。1) 炎症性腸疾患における傷害腸管粘膜の修復・再生・発癌における骨髄とくに間葉系幹細胞 (MSC) の役割の解明と新規治療法開発への応用および詳細な機序解析を実施すること。2) 橋渡し研究として GLP 基準に則った慎重な前臨床試験 (動物実験) を行うこと。前者では、MSC が腸組織に生着する機序、単一細胞レベルでの生着部位や細胞運命の決定およびそれに対応する微小環境 cue を解明する。後者では、ヒト MSC のソースとして、未固定の「早期献体」(fresh cadaver) 標本を有効活用し、これまでのわれわれの知見に対する proof-of-concept 試験を行う。安全性薬理試験、毒性試験に用いる MSC は GMP 基準に則り培養調整し、網羅的メチル化解析による品質管理基準を設定する。その際、MSC 治療反応性を予測するバイオマーカーを探索する。

3. 研究の方法

本研究は 2 つの柱に支えられた以下の 6 つのテーマから構成される。1) まず炎症性腸疾患における傷害腸管粘膜の修復・再生における骨髄とくに間葉系幹細胞の役割に着目した再生医学の観点からの新規 MSC 治療法の開発とその詳細な機序解析である。2) 次に橋渡し研究として GLP 基準に則った慎重な前臨床試験である。以下に 6 つのテーマを羅列する。1. 内因性 MSC と外因性 MSC をそれぞれ異なる分子で標識をする。2. Fresh cadaver 由来 MSC の有効性、安全性を確認する。3. MSC の腸組織への生着機序およびその cue を明らかにする。4. MSC 治療の信頼性を向上し、治療の有効性機序を検討する。5. *in vitro* 細胞融合および *in vivo* eGFP/LacZ 陽性細胞の再プログラム化を証明する。6. 炎症と発癌における MSC の役割を解明する。しかし、実際には Cadaver 由来 MSC の分離・

培養は、これまでに 9 例の採取を行い、2 例のみで passage 3 までの継代が可能であった。死後 6 時間以内、常温搬送が重要で、培養には 20%FBS を要した。今後、MSC の分離・培養法を確立し、MSC の特性を評価する。その上で改めて上記 1-5 を遂行する必要がある。以上の経緯より、本研究は上記 6 に関して検討された。変更後の研究方法を以下に示す。

(1) 本研究では、以下の 3 つの動物実験モデルと、IEC-6 を用いた各種条件下の共培養実験により、AOM 関連発癌に対する MSC の作用を検討した。① AOM/DSS 発癌に対する MSC の作用の解明; Lew ラット (n = 39) に AOM を腹腔内投与 (15 mg/kg, day 0) し、day 7-day 14 に 2.5% DSS を自由飲水させて腸炎関連癌を誘発した。MSC 投与の有無およびタイミングにより、MSC 非投与; MSC(-), MSC day 0 投与; MSC Day0, MSC day 9 投与; MSC Day9 群の 3 群に分けた。MSC(-)群は、day 0, day 9 に PBS を尾静脈より静注するコントロール群、MSC 投与群は、day 0 または day 9 におおの MSC 2×10^4 個/g を尾静脈より静注した治療群である。day 14 以降は DSS を中止し、AOM 投与より 20 週後に形成された腫瘍数とサイズ (長径) および Wnt/ β -catenin 経路に及ぼす影響を検討した。腫瘍 β -catenin 発現と、 β -catenin のリン酸化の変化を WB 法にて検討した。また、核酸シーケンス解析により、 β -catenin の点突然変異に与える MSC の影響を検討した。さらに、代表的な腫瘍において WNT シグナル経路 PCR アレイにて網羅的に解析した。① Tgf- β /Smad シグナルに及ぼす影響; Smad2 のリン酸化を WB 法にて検討した。また、腫瘍組織の免疫染色を行い、Smad2, β -catenin の発現を解析した。

(2) Aberrant Crypt Foci (以下 ACF) に対する MSC の効果; Lew ラット (n = 15) に対して day 0, day 7 に各々 AOM 15 mg/kg を腹腔内投与し、MSC 投与の有無およびタイミングにより、MSC 非投与; MSC(-)、MSC day -1 投与; MSC Day-1, MSC day 8 投与; MSC Day8 群の 3 群に分けた。MSC 投与群は、 2×10^4 個/g を尾静脈より静注した。day 28 に大腸を摘出し、proximal, middle, distal に 3 等分した。ホルマリン固定後に 0.2% メチレンブルー染色を行い、実体顕微鏡下に観察した。aberrant crypts は ACF の密度、および 1 focus 当たりの aberrant crypts 数を評価した。また、Smad2 リン酸化による Tgf- β /Smad 経路の活性化を WB 法にて検討した。

(3) Acute apoptotic response to genotoxic carcinogen (以下 AARGC) に及ぼす MSC の効果; Lew ラット (n = 20) に対して、AOM 15 mg/kg を腹腔内投与し、合計 5 ポイントで各々大腸を摘出した。また MSC 投与

の有無およびタイミングにより計4群に振り分けた(AOM投与開始を0hとし、MSC 2×104個/gを-24h、-2h、+2hに各々単回投与した治療群3群とコントロール群)。直腸遠位端は、各種免疫組織化学的検討やアポトーシス検出に用いた。残存腸管は、RNA、タンパク抽出に用いた。①細胞増殖、AARGC、O⁶-methylguanine (O⁶MeG)に及ぼすMSCの作用；パラフィン切片において、Ki67 labeling index, TUNEL法によるapoptosis indexを算出し、O⁶MeGの免疫染色を行い、MSCの抗腫瘍効果を検討した。②MSCによるMgmt発現量の変化；リアルタイムRT-PCR法にて解析した。③Tgf-β/Smad経路、NFκB経路、apoptosis、cell cycleに及ぼすMSCの作用；Smad2、リン酸化Smad2、IKKβ、IκBα、Bcl-2、Bcl-xL、cIAP-2、p21、Bax、Cdk4、cyclin D2、Rb、リン酸化Rbの発現をWB法にて検討した。

(4) IEC-6を用いたMSCの*in vitro*腫瘍抑制効果の検討；IEC-6細胞をAOMにて72h刺激し、さらにMSCと共培養した際のIEC-6の細胞増殖能、apoptosis、細胞周期変化を各々、Ki67 labeling index, TUNEL法, FACSにて解析した。また、Tgf-β中和抗体の投与やMSC-CMの処理が細胞増殖に与える影響を、MTTアッセイにて定量的に検討した。

4. 研究成果

(1) AOM/DSS発癌に及ぼすMSCの作用；①1匹当たりの大腸腫瘍の平均個数は、MSC Day0群がコントロール群と比較し有意に低値であった(9.2個 vs 4.2個, $P = 0.023$)。Day9群とコントロール群との間には有意差は認められなかった。また、腫瘍の平均径は3群間で有意差は見られなかった。②腫瘍のβ-catenin発現に有意差は見られなかったが、Day0群におけるβ-cateninのリン酸化率がコントロール群と比較し有意に高率であった。また、β-cateninのシークエンス解析においてMSC Day0群ではコントロール群と比較してコドン32のミスセンス変異(GAT to AAT)の頻度が高かった。WNT PCRアレイ解析では、MSC Day0群においてWNT関連分子の発現が大部分(88.8%)で低下していた。腫瘍のリン酸化Smad2発現に有意差は認められなかった。しかし、Smad2、β-catenin二重染色にて、コントロール群ではSmad2は細胞質と一部の核が、β-cateninは主に細胞膜と細胞質が強く染色されるのに比較し、MSC Day0群ではいずれも細胞膜のみが染色された。

(2) ACFに対するMSCの効果；ACF密度および1AC/Focusの数は、コントロール群と比較しMSC Day-1群、Day8群でいずれも減少が認められた。WB法によるSmad2/リン酸化Smad2発現解析では、MSC Day8群

でのみリン酸化Smad2発現がわずかに亢進していた。

(3) AARGCに対するMSCの効果；①MSC-24h群において、AOM投与後4hでのKi67 labeling indexの低下、8hでのアポトーシス(AARGC)の抑制効果が認められた。

O⁶MeG陽性細胞はAOM投与後8hの時点でコントロール群と比較しMSC-24hr群において著明な減少が認められた。②MSC-24h群で、AOM投与後8hのMgmt発現が相対的に上昇する傾向が認められた。③MSC-24h群でのIκBα(4h)およびp21(4-8h)mRNAの発現上昇が認められ、これらはタンパクとしてもMSC-24h群においてAOM投与後の経過とともに発現上昇していた。Cdk4、リン酸化RbはMSC-24h群でその発現が低下する傾向が認められた。

(4) 共培養実験におけるMSCの*in vitro*抗腫瘍効果；72hのAOM刺激下におけるMSC共培養により、IEC-6細胞株は、G1 arrestをきたし、細胞増殖が抑制されるのみならず、アポトーシスが促進した。この作用は、MSC培養上清(MSC-CM)を加えることで失われるのみならず、IEC-6細胞増殖がむしろ亢進した。しかし、抗Tgf-β中和抗体を加えると、MSCの*in vitro*抗腫瘍効果は完全に打ち消された。

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5件)

1. Ohashi H, Adachi Y, Yamamoto H, Taniguchi H, Noshio K, Suzuki H, Arimura Y, Imai K, Carbone DP, Shinomura Y. Insulin-like growth factor receptor expression is associated with aggressive phenotypes and has therapeutic activity in biliary tract cancers. *Cancer Sci*, 査読有, 103, 2012, 252-61.

2. Arimura Y, Nagaishi K, Hosokawa M, Dynamics of claudins expression in colitis and colitis-associated cancer in rat, *Methods Mol Biol*, 査読なし, 762, 2011, 409-425.

3. Ii M, Li H, Adachi Y, Yamamoto H, Ohashi H, Taniguchi H, Arimura Y, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y, The efficacy of IGF-I receptor monoclonal antibody against human gastrointestinal carcinomas is independent of k-ras mutation status, *Clin Cancer Res*, 査読有, 17, 2011, 5048-5059.

4. Li H, Adachi Y, Yamamoto H, Min Y, Ohashi H, Ii M, Arimura Y, Endo T, Lee CT, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y. Insulin-like growth factor-I receptor

blockade reduces tumor angiogenesis and enhances the effects of bevacizumab for a human gastric cancer cell line, MKN45. Cancer, 査読有, 117, 2011, 3135-47.

5. Tanaka H, **Arimura Y**, Yabana T, Goto A, Hosokawa M, Nagaishi K, Yamashita K, Yamamoto H, Sasaki Y, **Fujimiya M**, Imai K, Shinomura Y, Myogenic lineage differentiated mesenchymal stem cells enhance recovery from dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat, J Gastroenterol, 査読有, 46, 2011, 143-152.

[学会発表] (計 9 件)

1. 那須野正尚, **有村佳昭**, 渡邊秀平, 中垣卓, 永石歆和, 苗代康可, **山下健太郎**, 山本博幸, 今井浩三, 篠村恭久. 骨髄間葉系幹細胞は azoxymethane による発癌のイニシエーションを一部解除する. JDDW2012, 2012 年 11 月 11 日, 神戸.
2. **Yoshiaki Arimura**. Genetic Characteristics of Japanese IBD. Asian IBD Symposium 2012/11/2, Seoul, Korea.
3. 那須野正尚, **有村佳昭**, 渡邊秀平, 中垣卓, 永石歆和, 苗代康可, **山下健太郎**, 山本博幸, 今井浩三, 篠村恭久. 骨髄間葉系幹細胞は azoxymethane による発癌のイニシエーションを一部解除する. 第 49 回日本消化器免疫学会総会, 2012 年 7 月 6 日, 鹿児島.
4. Kanna Nagaishi, Shuhei Watanabe, Yasuyoshi Naishiro, **Kentaro Yamashita, Yoshiaki Arimura, Mineko Fujimiya**, Yasuhisa Shinomura. Pleiotropic Action of Gut Tropic Factors Derived from Conditioned Mesenchymal Stem Cells. DDW2012, 2012/5/19, San Diego, US.
5. Kanna Nagaishi, Shuhei Watanabe, Yasuyoshi Naishiro, **Kentaro Yamashita, Yoshiaki Arimura, Mineko Fujimiya**, Yasuhisa Shinomura, Kohzoh Imai, Pleiotropic Action of Gut Tropic Factors Derived from Conditioned Mesenchymal Stem Cells, 6th Japan-Korea IBD Symposium, 2012/1/28, Tokyo.
6. 渡邊秀平, **有村佳昭**, 永石歆和, 那須野正尚, 篠村恭久, 骨髄間葉系幹細胞由来 Gut Trophic Factor はラット実験腸炎の回復を促進する, 第 53 回日本消化器病学会大会, 2011 年 10 月 20 日, 福岡.
7. 永石歆和, 渡邊秀平, 那須野正尚, 苗代康可, **有村佳昭**, 篠村恭久, MSC 由来 Gut trophic factor のラット DSS 腸炎における役割, 第 48 回日本消化器免疫学会総会,

2011 年 7 月 21 日, 金沢.

8. Kanna Nagaishi, **Yoshiaki Arimura**, Masanao Nasuno, Yasuhisa Shinomura, Reciprocal relation between MSC-dependent angiogenesis and VEGF expression in colorectal cancer, DDW2011, 2011/5/10, Chicago, US.
9. Kanna Nagaishi, **Yoshiaki Arimura**, Daisuke Suzuki, Koji Ataka, Yasuhisa Shinomura, **Mineko Fujimiya**, Reciprocal relation between tumor angiogenesis and MSC-dependent growth in colorectal cancer, 第 116 回日本解剖学会総会, 2011 年 3 月 30 日, 横浜.

[図書] (計 2 件)

1. 渡邊秀平, **有村佳昭**, 今井浩三, 日本臨床社, 炎症性腸疾患 - 病因解明と診断・治療の最新知見 -, 炎症性腸疾患における発癌機序, 2012, 518-522.
2. 那須野正尚, **有村佳昭**, 今井浩三, メジカルビュー社, IBD (炎症性腸疾患) を究める, II. 炎症性腸疾患の病因・病態組織修復・再生, 2011, 51-55.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 間葉系幹細胞 (MSC) の培養上清を含む腸炎の予防・治療剤。

発明者: 有村佳昭, 永石歆和, 渡邊秀平

権利者: 札幌医科大学

種類: 特許願

番号: 51101427046

出願年月日: 2011 年 7 月 13 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 健太郎 (Kentaro Yamashita)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90381269

(2) 研究分担者

有村 佳昭 (Yoshiaki Arimura)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 80305218

藤宮 峯子 (Mineko Fujimiya)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10199359