

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460975

研究課題名(和文) 骨髄 - 腸管連関の解明と治療応用

研究課題名(英文) Elucidation and therapeutic application of bone marrow-intestine coupling

研究代表者

山下 健太郎 (Yamashita, Kentaro)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：90381269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、傷害腸管組織に検出される骨髄由来細胞や骨髄間葉系幹細胞にまつわるさまざまな矛盾や問題点を整理することで、骨髄 - 腸管連関の謎を解明し、難治性腸管障害への適正な治療応用を目指した。腸炎では、造血幹細胞およびこれを支持するニッチ細胞が異常化し、腸管への過剰な炎症細胞浸潤を誘発する。骨髄間葉系幹細胞治療は、骨髄ニッチを正常化し、腸炎の重症化を抑制した。骨髄移植後のラットへ腸炎を惹起すると、死亡率が高率であること、移植片由来骨髄間葉系幹細胞の腸管生着が非常に低率なため、解析に耐えなかった。この点は今後の重要な研究課題である。

研究成果の概要(英文)：The research purpose of ours is elucidation of the bone marrow-intestine coupling and an optimal therapeutic application of findings to intractable intestinal disorders. We confirmed that hematopoietic stem cells and supporting niche cells became dysregulated in colitic rats, leading to excessive inflammatory-cell infiltration to the colon. Administered mesenchymal stem cells (MSCs) could normalize bone marrow niche resulting in suppression of inflammatory cell infiltration, or aggravation of colitis. Unfortunately, bone marrow transplantation-recipient rats which were induced colitis carried a significant morbidity. Furthermore, graft-derived MSCs in the recipient rats seldom repopulated in the colitic tissues. These obstacle made it impossible for meaningful scientific analysis in this model. The issue remains a future challenge to resolve the enigma of therapeutic efficacy of MSCs therapy.

研究分野：消化器病学

キーワード：骨髄 - 腸管連関 間葉系幹細胞 ニッチ 腸炎 骨髄移植

1. 研究開始当初の背景

1993年,併存する血液悪性疾患のために骨髄移植を施行された炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) 患者が,移植後,IBD治療をせずに長期寛解を維持することがはじめて報告された(Drakos et al, Am J Hematol 43: 157, 1993). 以来,同種骨髄移植では,宿主の“免疫環境”や“遺伝的素因”がドナーのそれに置換されることが,その有効性の機序と考えられてきた.しかし,移植片対宿主病(GvHD)をきたした傷害腸管に骨髄由来細胞が生着し,腸上皮細胞(Okamoto et al. 2002 Nat Med 8:1011),上皮筋線維芽細胞(ISEMF)(Brittan et al. 2002 Gut 50:752),あるいは,血管内皮細胞(Jiang et al. 2004 PNAS 101:16891)などに分化あるいは細胞融合する可能性が次々に報告された.一方,齧歯類では,さまざまな条件下での骨髄移植実験の結果,骨髄由来細胞は宿主の腸上皮細胞,ISEMF,Cajal間質細胞,血管内皮細胞,血管平滑筋細胞,あるいは,周皮細胞に分化転換したり細胞融合したりすることが様々報告されている.すなわち,異種・同種・同系移植のみならず,野生型と遺伝子改変あるいは免疫不全マウス間の移植,異なるドナー細胞の検出法(GFPや異性間移植におけるY染色体をマーカーとする免疫蛍光法やFISH法),生着率のばらつき(0~60%),幅のある観察期間(6週間から11か月間),さらには骨髄移植後に実験腸炎を誘発した検討まで含まれており,得られた結果には許容しがたい“ばらつき”が認められる(Alison et al, Transplantation 93: 565, 2012). 少なくともこれらの結果は,ヒトや齧歯類において骨髄由来細胞が傷害腸管組織の回復過程において,何らかの重要な役割を果たしていることを示唆している.しかし,骨髄細胞の由来やレシピエント腸組織での分化・細胞運命およびその機序は,現在もおおきくわめて混沌としている.

一方,骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)は,柔軟な分化の可塑性,旺盛な増殖能,強力な免疫抑制作用,低い免疫原性,毒性のため,“免疫学的特権細胞”や“ユニバーサルドナー細胞”ともいわれ注目されている.組織傷害部位,炎症部位,癌組織へ集積する特性のため,骨髄移植に替わる再生医療への応用が最も期待される体性幹細胞の一つである.MSCの作用機序は,細胞補充,免疫抑制,組織修復作用に大別される.実験腸炎に対するMSC移植は,おおむね有効との報告が多いが,傷害組織内でのMSCの生着効率が低く,前述の骨髄由来細胞と同様,その由来(骨髄由来か,あるいは傷害組織近傍のperivascular niche由来か),レシピエント組織でのMSCの生着,増殖,分化などの細胞運命がその有効性(細胞補充,免疫抑制および組織修復)にどのようにかわるか依然として不明のままである.さらにMSCの細胞運命を決定する刺激は多岐にわたり,その検討

を困難にしている.炎症性腸疾患などの良性疾患に対する治療として骨髄移植のrisk-benefitバランスは微妙であり実臨床での応用は困難とされてきた.その代替としてMSC移植は,その作用機序に基づく最適化が全くなされないまま,過剰な期待のもと,すでにヒトに対しての臨床応用が試みられているのが現状である.以上より,本研究では,上述したような傷害腸管組織に検出される骨髄由来細胞やMSCにまつわるさまざまな矛盾や問題点を整理することにより,骨髄-腸管連関の謎を解明し,難治性腸管障害への適正な治療応用を目指した.

2. 研究の目的

本研究は,IBDをはじめとする難治性腸管障害に対する骨髄幹細胞治療の新規開発が一般目標である.そのために,(1)骨髄-腸管連関の全容解明を目指すこと,(2)前臨床試験としてMSC移植治療の最適化を目指すこと,(3)腸炎をきたした生体における内因性骨髄細胞の異常性を解明すること,の3点を研究期間内における本研究の行動目標としている.

すなわち,骨髄-腸管連関を解明し,それを応用することで,epithelial restitution,上皮の増殖・分化からなる傷害腸管の創傷治療機転そのものを促進させ,同時に難治性腸炎における骨髄ニッチ細胞の異常を是正する新規再生治療の開発を目指している.

3. 研究の方法

本研究は,炎症性腸疾患をはじめとする難治性腸管障害に対する骨髄幹細胞治療の新規開発が一般目標である.そのために,(1)骨髄-腸管連関の全容を解明すること,(2)前臨床試験としてMSC移植治療の最適化を目指すこと,(3)腸炎をきたした生体における内因性骨髄の異常性を解明すること,の3点をめざした.具体的な計画・方法を以下に略記する.

骨髄-腸管連関解明のため,同系,同種,異種骨髄移植を含めた様々な条件下での骨髄移植を施行し,傷害腸管に生着した骨髄由来細胞を追跡評価する.MSC移植最適化のためには,内因性(骨髄由来および周皮由来)および外因性MSCを異なるマーカーで標識し,その動態を把握し,治療効果との関連を検討する.腸炎により惹起された骨髄の異常性に関しては,HSCおよびNC両者の量的および質的異常を定量的に検討する予定である.

4. 研究成果

平成26年度は,当初の予定を変更し,主に上記(3)の腸炎をきたした生体における内因性骨髄細胞の異常性の解明を目指した.すなわち,「腸炎においては,HSCおよびこれを支持するNCが異常化し,腸管組織への過剰な炎症細胞浸潤を誘発する.これに対して,MSC治療は,骨髄ニッチを正常化することで,腸炎の重症化を抑制する」という仮説を検証した.腸炎を惹起したモデルにおける造血幹細胞や骨髄ニッチの異常を明らかにし,これ

らの異常が外因性に投与した MSC により是正されることを明らかにした。DSS 腸炎を惹起した際、骨髄における各分化段階の HSC, すなわち, long-term reconstituting HSC (LT-HSC), short-term reconstituting HSC (ST-HSC), および multipotent progenitor cell (MPP) の構成割合を FACS により解析した。その結果, DSS 腸炎により, LT-HSC や ST-HSC 数の減少が認められた。その際, LT-HSC の自己複製能の指標である Fzd4 および Tie2 の発現低下を伴っていたが, これらの変化が MSC 治療により一部回復することを確認した。同時に骨髄におけるネスチン発現細胞数も同様に増減した。これらの結果は, 炎症により骨髄の微小環境である NC に質的および量的変化をきたし, HSC の分化が促進されて過剰な炎症細胞浸潤をきたすこと, MSC 治療により, これらの一部が是正されたことを示唆した。

平成 27-28 年度は, 骨髄移植のプロトコル確立のため, 骨髄移植前処置 (放射線照射およびブスルファン) の条件決める基礎的研究を施行した。前処置のうちブスルファン (BU) + 全身放射線照射 (TBI) では, TBI 10Gy が至適と考えられた。放射線照射単独であっても, 総線量を 12-14Gy-15Gy へ上昇させると死亡率が激増すること, 分割照射も様々な条件 (6Gy × 2, 7.5 × 2 等) に振ったが, HSC 移植でレスキューできなかった。われわれの以前のデータである BU 20mg/kg 単独腹腔内投与に TBI 10Gy に併用すると, やはり毒性が強く HSC 移植ではレスキューできなかった。そこで, 併用する BU の容量を漸減していくと, TBI 10Gy + BU 5mg/kg では移植関連死を認めず, 末梢血では移植後 Day14 に芽球が約 20% 出現し, 移植後 Day56 の FACS 解析では HSC の置換率が 80-88% と, TBI 10Gy 単独の 70% 程度よりも有望な結果を得た。これらの骨髄移植ラットは, 移植後半年経過しても, GVHD 症状を認めず, 生存していることから, 有望な結果と思われた。しかし, 骨髄移植後のラットへの腸炎惹起に関しては, 死亡率が高率であること, 移植片由来の MSC の腸管生着が非常に低率なため, 解析に耐えないことより断念せざるを得なかった。

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 8 件)

1. Shimizu H, Arimura Y, Onodera K, Takahashi H, Okahara S, Kodaira J, Oohashi H, Isshiki H, Kawakami K, Yamashita K, Shinomura Y, Hosokawa M. Malignant potential of gastrointestinal cancers assessed by structural equation modeling. PLoS ONE 2016;11:e0149327 (査読有)。

2. Onodera K, Arimura Y, Isshiki H, Kawakami K, Nagaishi K, Yamashita K, Yamamoto E, Niinuma T, Naishiro Y, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y. Low-frequency

IL23R coding variant associated with Crohn's disease susceptibility in Japanese subjects identified by personal genomics analysis. PLoS ONE 2015;10:e 0137801 (査読有)。

3. Nakagaki S, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Nasuno M, Watanabe S, Idogawa M, Yamashita K, Naishiro Y, Adachi Y, Suzuki H, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Contextual niche signals towards colorectal tumor progression by mesenchymal stem cell in the mouse xenograft model. J Gastroenterol 2015;50:962-974 (査読有)。

4. Nagaishi K, Arimura Y, Fujimiya M. Stem cell therapy for inflammatory bowel disease. J Gastroenterol 2015;50:280-286 (査読有)。

5. Nagaishi K, Ataka K, Echizen E, Arimura Y, Fujimiya M. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic hepatocyte damage in mice by inhibiting infiltration of bone marrow-derived cells. Hepatology 2014;59: 1816-1829 (査読有)。

1. 永石歆和, 山下健太郎, 有村佳昭, 仲瀬裕志。骨髄 腸管連関の解明と治療応用。Medical Science Digest 2017;43: 72-75 (査読無)。

2. 川上賢太郎, 永石歆和, 有村佳昭。間葉系幹細胞を用いた消化管再生医療。Medical Science Digest 2016;42: 65-68 (査読無)。

3. 有村佳昭, 小野寺 馨, 一色裕之, 川上賢太郎。間葉系幹細胞による消化管再生医療。G.I. Research 2014;22: 435-442 (査読無)。
[学会発表](計 3 件)

1. 川上賢太郎, 一色裕之, 有村佳昭, 小野寺馨, 永石歆和, 山下健太郎, 藤宮峯子, 仲瀬裕志。ラット大腸 3 次元培養における間葉系幹細胞のニッチ作用。日本消化器関連学会週間 (JDDW) 2016, 2016 年 11 月 05 日, 神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)

2. 小野寺馨, 有村佳昭, 柴浪洋介, 横山佳浩, 山本至, 一色裕之, 川上賢太郎, 久保俊之, 山下健太郎, 仲瀬裕志。パーソナルゲノム解析を通じた日本人クローン病感受性遺伝子の探索。日本消化器関連学会週間 (JDDW) 2016, 2016 年 11 月 05 日, 神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)

3. 有村佳昭。日本人の IBD 感受性遺伝子。第 154 回日本消化器内視鏡学会東北支部例会 (ランチョンセミナー)(招待講演)。2015 年 02 月 06 日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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・講師
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・研究員
研究者番号：80305218

仲瀬 裕志 (Hiroshi Nakase)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：60362498