

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860534

研究課題名(和文)血管内皮前駆細胞を用いた徐放化薬剤伝達システムによる炎症性腸疾患の治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method for therapy against inflammatory bowel disease with Endothelial Progenitor Cells as controlled-release preparation delivery system

研究代表者

柿本 一城 (KAKIMOTO, KAZUKI)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：20589816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患は、消化管に慢性炎症を来す難病で根本的な治療法はない。今回我々は血管内皮前駆細胞(Endothelial Progenitor Cells: EPC)の炎症部位への集積性に着目し、EPCを薬剤の担体として病変部位に集積させる治療法の開発研究を行った。マウス腸炎モデルを用いて実験を行った結果、EPCよりも脂肪由来幹細胞(Adipose-derived stem cell: AdSC)を動脈より移植した方が腸炎への集積率が高いことが判明した。よってAdSCにスタチンを徐放するナノ粒子を抱合し、マウス腸炎モデルに移植したところ、AdSCを単独で移植するよりも著明な炎症抑制効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory bowel disease (IBD) involves chronic inflammation of the digestive tract, and there is currently no cure for IBD. In the present study, we examined the anti-inflammatory action of murine Endothelial Progenitor Cells (EPC) and Adipose-derived stem cell (AdSC) in mice model of IBD, and examined the enhancing effect of the anti-inflammatory action when attached nanoparticle statins to AdSC. On examining EPC aggregation in tissue, there was no aggregation observed for transvenous and intraperitoneal transplantation. However aggregation was observed for transarterial transplantation of AdSC.

On examining the colitis inhibitory effect via the transarterial pathway, we observed a little inhibition of Disease activity index (DAI), Histological damage score (HDS) and cytokine levels in the AdSC group compared with PBS group. However, DAI, HDS and cytokine levels were significantly lower in the Sim-AdSC group than in the PBS group.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：炎症性腸疾患 脂肪由来幹細胞 ナノ粒子

## 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎と Crohn 病に代表される炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD) は、消化管に慢性的な炎症を来たす原因不明の難病であり、本邦での患者数は増加の一途をたどっている。根本的な治療はなく、現在ステロイドや免疫抑制剤などが治療の中心であるが、いずれも全身性の副作用が多く、長期的な使用はできず再発を繰り返すことが問題となる。近年、IBD に対する stem cell therapy が脚光を浴びており、将来的に IBD の治療を大きく変える可能性があるが、その有効性やメカニズムについては未解明な点が多く、今後のさらなる研究・開発が必須である。

血管内皮前駆細胞 (Endothelial Progenitor Cells: EPC) は骨髄において Hematopoietic stem cells から分化し、末梢血中へと移行する。そして虚血/炎症組織や腫瘍に集積性があり、血管内皮細胞に分化して脈管形成 (vasculogenesis) に寄与し、さらに angiopoietin-1 などのサイトカインを産生することで血管透過性の低下をもたらす炎症抑制に働く (Beat et al. Nature Medicine 2006)。また脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem cell: AdSC) も炎症や腫瘍組織への集積性を有しており、多様な組織への分化能に加えて免疫調整作用を併せ持っている。我々はこれまで EPC の組織集積性を利用し、EPC を薬剤の担体として病変部位に集積させる治療法の開発研究を行ってきた。

## 2. 研究の目的

本研究においては、EPC および AdSC の炎症組織への集積性を利用して炎症性腸疾患に対する新規治療法を開発する。すなわちスタチン製剤を抱合するナノ粒子をこれらの細胞に取り込ませ、炎症性腸疾患モデルマウスに移植して、細胞自体による抗炎症作用に加え、

病変部位選択的にスタチン製剤を作用させることによる相乗効果をもたらす、より安全で有効性の高い治療法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス骨髄より EPC を分離・培養

C57BL6/J マウスの大腿骨、骨盤、脊椎より骨髄細胞を採取し、10%FBS/DMEM medium にて 24hr 培養し、浮遊細胞を回収する。浮遊細胞を RepCell dish (Cell Seed) 上で 10%FBS/EGM2 medium にて培養し、day4 に付着細胞を回収し EPC enrich 細胞とする。

### (2) マウス脂肪組織より AdSC を分離・培養

8 週齢の C57BL6/J マウスの皮下脂肪を採取し、コラゲナーゼ・ディスパーゼ処理および比重遠心法により単核球分画を分離する。その細胞を間葉系幹細胞専用培地で培養・増幅することにより得られる接着細胞を AdSC として実験に用いる。

### (3) マウス IBD モデルに対し EPC および AdSC を移植して、腸管病変への細胞集積を検討する

8 週齢の C57BL/6J マウスを用い 2.5%DSS を 5 日間飲水させて DSS 腸炎を作製し、蛍光ラベルした EPC および AdSC を経静脈的、経動脈的、腹腔内に移植し、細胞投与後 3 日目に腸管組織への細胞集積を蛍光顕微鏡下で観察し、適切な細胞投与経路を決定する。

(以下の実験については、より組織集積性を示した AdSC を用いて実験を行った)

### (4) スタチン内包 PLGA 抱合 AdSC を作製

生体分解性ポリマーである PLGA (poly lactic/glycol acid) を基質としてスタチン製剤を抱合した薬剤徐放化ナノ粒子を、まずリポソームに内包させてから AdSC と共培養することにより細胞に抱合させる。

(5) IBD モデルマウスにスタチン内包 PLGA 抱合 AdSC を移植し、炎症抑制効果を検討する  
DSS 腸炎マウスに対し、以下の 3 群に分けて移植治療実験を行う。

PBS、 薬剤非抱合 PLGA 内包 AdSC、  
スタチン内包 PLGA 抱合 AdSC

AdSC 投与 3 日後にマウスを屠殺して以下の検討を行なう。

- a. 肉眼的検討： 大腸の腸管長、Disease Activity Index score(体重減少、便の性状など)
- b. 組織学的検討：凍結切片を作製し、Histological damage score を測定する(HE 染色)
- c. 発現分子の比較検討：定量 PCR により腸炎に関連するサイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-1, 2, 4, 6, 10, 17, IFN- $\gamma$  など) を測定する。

#### 4 . 研究成果

C57BL6/J マウスの骨髄より EPC を、脂肪組織より AdSC を分離・培養した。DSS 腸炎マウスに対し、採取した EPC および AdSC を細胞数を振りながら移植した結果、経静脈的および腹腔内投与では腸管組織に集積を認めなかった。しかし AdSC を経動脈的に投与したところ腸管炎症組織への集積が確認できたため、以後の実験では AdSC を用いて行った。

PLGA を基質としてスタチン製剤を抱合した薬剤徐放化ナノ粒子を、AdSC と共培養して細胞に抱合させ、スタチン内包 PLGA 抱合 AdSC を作製した。

次に、 PBS、 薬剤非抱合 PLGA 内包 AdSC、

スタチン内包 PLGA 抱合 AdSC の 3 群に分けて DSS 腸炎マウスに対し経動脈的に移植し、腸炎抑制効果を評価したところ、AdSC 単独移植にても腸管長、Disease Activity Index score、Histological damage score、炎症性

サイトカイン遺伝子発現解析 (IL1b, IL-17, TNFa, IL-6) において有意な改善効果が認められたが、Sim-AdSC 群ではさらに著明な炎症抑制効果が確認できた。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 柿本一城、他  
脂肪組織由来幹細胞を用いた徐放化薬剤伝達システムによる炎症性腸疾患モデルマウスに対する炎症抑制効果の検討  
第 53 回 日本消化器免疫学会  
2016 年 7 月 15 日 大阪

(2) 柿本一城、他  
スタチン封入 PLGA ナノ粒子抱合脂肪幹細胞による炎症性腸疾患モデルマウスに対する治療効果の検討  
第 58 回 日本消化器病学会総会  
2016 年 11 月 4 日 神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：炎症性疾患治療用幹細胞の機能増強用スタチン封入ナノ粒子製剤、及びそれを含有する炎症性疾患治療用機能増強幹細胞

発明者：伊井正明、田畑泰彦

権利者：伊井正明、田畑泰彦

種類：特許出願

番号：CP01150

提出日 平成 28 年 5 月 6 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

特になし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

柿本一城 ( KAKIMOTO, Kazuki )

大阪医科大学 医学部 講師

研究者番号 : 26860534

### (2)研究協力者

伊井正明 ( II, Masaaki )

大阪医科大学 研究支援センター

実験動物部門 副部門長