

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09539

研究課題名(和文) 羊膜間葉系幹細胞によるステロイド抵抗性膠原病・膠原病類縁疾患に対する治療の確立

研究課題名(英文) Establishment of treated with MSC for steroid resistant connective tissue disease

研究代表者

松井 聖 (Matsui, Kiyoshi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：00291815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：全身性エリテマトーデス(SLE)モデルマウスである2種類の系統(NZBWF1)と(MRL/lpr)で検討した。24週齢のNZBWF1またはMRL/lprマウス(1群:n=10)をコントロール群、ヒト羊膜MSC移入(0.5x10<sup>6</sup>/mouse)、ヒト羊膜MSC移入群(2x10<sup>6</sup>/mouse)の3群で生存率を投与後から80日まで検討した。ヒト羊膜MSC移入群(2x10<sup>6</sup>/mouse)と同様に抑制効果はあるが、生存率で大きな有意差がでていなかった。今後、プリステン誘導SLEモデルマウスを用いて検討を行う予定である。動物モデルマウスの変更とヒトに対する検討を平行して進めて行く予定である。

研究成果の概要(英文)：We studied with two strains (NZBWF1) and (MRL / lpr) which are systemic lupus erythematosus (SLE) model mice. The survival rates of NZBWF1 or MRL / lpr mice (1 group: n = 10) of 24 weeks old were divided into three groups of control group, human amniotic membrane MSC transfection (0.5 × 10<sup>6</sup> / mouse), human amniotic membrane MSC transfection group (2 × 10<sup>6</sup> / mouse). We examined from the administration until 80 days. As with human amniotic membrane MSC transfection group (2 × 10<sup>6</sup> / mouse), there was suppression effect, but there was no significant difference in survival rate. In the future, we plan to investigate using a pristain-induced SLE model mouse. We plan to advance the examination by changing the animal model mouse and the examination on humans in parallel.

研究分野：リウマチ・膠原病・アレルギー

キーワード：MSC mouse model SLE transfection

## 1. 研究開始当初の背景

### 【研究の学術的背景】

#### (1) ステロイド抵抗性難治性膠原病・膠原病類縁疾患。

全身性エリテマトーデス(SLE)における中枢神経ループス、難治性抗リン脂質抗体症候群やループス腎炎( ISN/RPS 分類 IVG(A) )、皮膚筋炎(DM)に伴う間質性肺炎(clinical amyopathic DM(CADM))、膠原病に伴う間質性肺炎、ANCA 関連血管炎、難治性成人発症スチル病、特殊型ベーチェット病(神経型、血管型、消化管型)などは、ステロイド剤に抵抗性であり、難治性病態として治療法の開発が急務である。現在、免疫抑制剤や生物学的製剤の臨床応用によって治療成績は向上してきているが、免疫抑制による感染症の併発が多く、時に死亡に至る症例もあり、安全性や治療有効性が必ずしも確立された治療法ではない。

兵庫医科大学病院リウマチ・膠原病内科では血液内科と共同で先進医療として、全身性エリテマトーデスにおける難治性抗リン脂質抗体症候群に対して末梢血幹細胞移植を行い、その後、再燃なくステロイド剤減量に成功した症例の実績がある(Hashimoto N et al Bone Marrow Transplant. 33:863-866, 2004)。このように、以前より血液内科と共同研究で先進医療に取り組んでおり、兵庫医科大学病院輸血・細胞治療センターが設立されたことにより、先進医療に取り組みやすくなった。

#### (2) 間葉系幹細胞がもつ免疫抑制力：獲得免疫、自然免疫の両者を抑制する。

間葉系幹細胞(MSC)は当初骨髄で発見された体性幹細胞であり、その後、脂肪組織や胎児付属物でもその存在が証明されている(Pittenger MF et al 284(5411) 143-7, Science. 1999, Hass R et al, 14:9-12, Cell. Commun. Signal. 2011)。MSCは骨、軟骨、脂肪を含む中胚葉系細胞に分化する多能性を有する事が報告され、その特徴から再生医療の重要な細胞ソースと考えられている。MSCは、同種リンパ球と混合培養してもリンパ球増殖反応を惹起せず、細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte :CTL)、あるいはNK細胞(natural killer cell)による傷害からも免れるとの報告もあり(Rasmusson I, et al. 76(8):1208-13, Transplantation. 2003)、自身は低免疫原性である。この性質により、あらかじめ用意し

た第三者由来のMSCを、HLAの一致・不一致を考慮せずに、必要とされる際に直ちに細胞移植することが可能となる。また、MSCは、T細胞からの炎症性サイトカインの分泌を抑制し、抗炎症性サイトカインの産生を増加させ(Aggarwal S et al. 105(4):1815-22, Blood. 2005) また、免疫反応をTh2細胞優位へシフトさせる作用があることも示唆されている。さらにT細胞の反応性抑制に関与する様々な液性因子を分泌することも報告されるなど(Kinnaird. T et al. 19:94(5)678-85, Circ. Res. 2004)、多様な作用によりT細胞活性化レベルを低下させ、同種異系間の免疫反応を抑制する、免疫調節作用を持つことが示唆されている。

#### (3) 羊膜MSCの細胞治療応用を目指した臨床研究：なぜ羊膜か

胎児付属物MSCは骨髄MSCと比較し、非侵襲的に採取可能であり、非常に多くの細胞を一度に得られ、細胞増殖能に優れ、免疫抑制効果も高い可能性があり(Ishikane S. et al. Stem Cells. 2008 Oct; 26(10):2625-33, J. Mol. Cell. Cardiol. 2010 Nov; 49(5): 753- 61)、細胞治療にとって有望な細胞ソースと考えられる。

## 2. 研究の目的

兵庫医科大学病院輸血・細胞治療センターでは同種羊膜間葉系幹細胞(MSC)を用いたGVHDの臨床応用を進めている。今回、同種羊膜間葉系幹細胞(MSC)の持つ免疫抑制力を利用し、ステロイド抵抗性難治性膠原病・膠原病類縁疾患の治療応用を考えた。実施に当たり、全身性エリテマトーデスモデル(NZBWF1)にヒト羊膜MSC移入し生存率と効果を検証する。

ヒト羊膜MSCをブタに移入し安全性を検証する。ヒト羊膜MSCの免疫抑制能を検証する。ステロイド治療を受けたステロイド抵抗性難治性膠原病・膠原病類縁疾患患者に対し、兵庫医科大学病院輸血・細胞治療センターにて調整された同種羊膜間葉系幹細胞(MSC)の静脈内投与を行い、その安全性評価を主たる評価項目とし、治療有効性を副次項目とする。

## 3. 研究の方法

SLEマウスモデル(NZBWF1)に経静脈的にヒト羊膜MSC移入し生存率とタンパク尿の発現時期を検証する。更に、機序を解明するた

めに Th1/Th2 バランスと Th17/Treg を解析し、病態の抑制機序を解明する。

ヒト羊膜 MSC をブタに移入し、毒性試験を行う。

ヒト羊膜 MSC の免疫抑制能を樹状細胞化とヒトリンパ球混合試験 (MLR) で検証する。

ステロイド治療を受けたステロイド抵抗性難治性膠原病・膠原病類縁疾患患者の中で、特に、ステロイド抵抗性ループス腎炎からヒト羊膜 MSC の臨床応用を始める。兵庫医科大学病院輸血・細胞治療センターでは既に GVHD において臨床応用が開始されており、共同研究にて、倫理審査委員会への申請を行い、臨床応用を開始し、その安全性評価を主たる評価項目とし、治療有効性を副次項目とする。

#### (1) 全身性エリテマトーデスモデルマウス (NZBWF1) にヒト羊膜 MSC 移入実験

NZBWF1 マウスは、タンパク尿、抗 DNA 抗体を産生し、全身性エリテマトーデスを 24 週で自然発症し、その後、80 日前後で死亡に至る動物モデルマウスである。ヒト羊膜 MSC を移入し、生存率を検証する。

##### **ヒト羊膜 MSC 移入による生存率の検討**

24 週齢の NZBWF1 マウス(1 群 : n=10)を、コントロール群、ヒト羊膜 MSC 移入群 (0.5x10<sup>6</sup>/mouse)、ヒト羊膜 MSC 移入群 (2x10<sup>6</sup>/mouse) の 3 群で生存率を検討する。観察期間は投与後から 80 日まで検討する。

ヒト羊膜 MSC 移入細胞数は GVHD マウスモデルで先行する論文から算定しており、結果がでると思われるが、本実験からの結果で、移入細胞数を検討する。

予想される結果であれば、経時的にタンパク尿と抗 DNA 抗体を測定し、病態を抑制的に作用しているかどうかを確認し、抑制機序を解析するために Th1/Th2, Th17/Treg の解析を行う。

##### (2) ヒト羊膜 MSC のブタへの移入実験

ブタを用いたヒト羊膜 MSC の単回静脈内投与毒性試験を行う。既に、先行しているヒトへの臨床応用として GVHD に対して、ヒト骨髄 MSC に使用している細胞数を参考に、ヒト羊膜 MSC の投与の細胞数を設定した。ヒト羊膜 MSC 2x10<sup>6</sup>細胞/kg を静脈内投与し、一般状態、心電図、心拍数、ヘモグロビン酸素飽和度、呼吸数の変化を観察する。

細胞数を増量する可能性も考えて、ブタに対するヒト羊膜 MSC 2x10<sup>6</sup>細胞/kg が問題なけ

れば、マウスを用いたヒト羊膜 MSC の単回静脈内投与毒性試験で、ヒト羊膜 MSC を 2.5x10<sup>6</sup>細胞/kg 増量した細胞数でも静脈内投与で検討する。更に、マウスで可能であれば、ブタで再度確認し、ヒトへの臨床応用をヒト羊膜 MSC 2x10<sup>6</sup>細胞/kg の量から検討していく。

##### (3) ヒト羊膜 MSC の免疫抑制能の検討

###### **樹状細胞(DC)分化抑制能の検討**

末梢血単核細胞 (PBMC) から接着細胞を選択し、GM-CSF と IL-4 を加えて常法どおり樹状細胞を分離する。細胞表面マーカー CD11c, CD209, HLA-ABC, HLA-DR と CD40 をフローサイトメトリーで確認し 90%以上陽性 4 日間培養して、DC 細胞として使用する。DC の分化には LPS(100ng/ml)と IFN- $\gamma$  (20ng/ml)を加えて 18 時間培養する。DC 細胞の確認は CD83 の発現と IL-12p70 の産生で確認する。この培養系にヒト羊膜 MSC を加えて、CD83 の発現と IL-12p70 の産生を検討することで、ヒト羊膜 MSC の樹状細胞分化能を抑制するか否かが検討できる。

###### **リンパ球混合試験(MLR)による免疫抑制能の検討**

で使用した PBMC の非接着性細胞を反応細胞として使用し、ヒト羊膜 MSC を抑制細胞として使用することで MLR の反応を検討できる。DC と PBMC を加えた培養系にヒト羊膜 MSC を加えることで増殖能が抑制されるか否かを検討する。

この の検討は輸血・細胞治療センターで調整されたヒト羊膜 MSC が機能しているかどうかを検討するものであり、海外では既にこの方法により確認されているので同様の方法で確認していく。

#### 4 . 研究成果

##### 全身性エリテマトーデスモデルマウス

(NZBWF1)のヒト羊膜 MSC 移入実験: NZBWF1 マウスは、タンパク尿、抗 DNA 抗体を産生し、全身性エリテマトーデスを 24 週で自然発症し、その後、80 日前後で死亡に至る動物モデルマウスである。ヒト羊膜 MSC を移入し、生存率を検証した。技術的な問題で、ヒト羊膜 MSC を移入に関して、ヒト血清が混入しているため、3 回目の投与でヒト血清に対するアナフィラキシーを起こすことが判明したため、先ず、マウス血清に置換した。これで、アナフィラキシーは起こさなくなった。

(1)ヒト羊膜 MSC 移入による生存率の検討:24 週齢の NZBF1 マウス(1 群:n=10)を、1 コントロール群、2 ヒト羊膜 MSC 移入 (0.5x10<sup>6</sup>/mouse)3 ヒト羊膜 MSC 移入群 (2x10<sup>6</sup>/mouse)の 3 群間で生存率を投与後から 80 日 まで検討した。ヒト羊膜 MSC 移入細胞数は GVHD マウスモデルで先行する論文 から算定しており、結果がでていられるが、本実験から 移入細胞数を検討した。ヒト羊膜 MSC 移入群(0.5x10<sup>6</sup>/mouse)でもヒト羊膜 MSC 移入群(2x10<sup>6</sup>/mouse)と同様に抑制効果はあるが、生存率での大きな有意差がでないため動物モデルの検討を余儀なくされた。そこで、全身性エリテマトーデスモデルマウス (MRL/lpr) にヒト羊膜 MSC 移入実験を MRL/lpr マウスで検討した。その結果、統計学的有意差を持って移入した群間で SLE の発症は抑制できなかった。今後、プリステン誘導 SLE モデルマウスを用いて検討を行う予定である。動物モデルマウスの変更による検討とヒトに対する検討を平行して進めて行く予定である。

## 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 22 件 )

- 1) Furukawa T, Matsui K, et al  
Relationship between YKL-40 and Pulmonary Arterial Hypertension in Systemic Sclerosis. *Modern rheumatology in press*. ( 査読あり )
- 2 ) Matsui K, Maruoka M, Yoshikawa T, Hashimoto N, Nogami M, Sekiguchi M, Azuma N, Kitano M, Tsunoda S, Sano H. Assessment of 2012 EULAR/ACR new classification criteria for polymyalgia rheumatica in Japanese patients diagnosed using Bird ' s criteria. *Int J Rheum Dis*. 2018; 21(2):497-501. doi: 10.1111/1756-185X.13006. Epub 2017 Mar 6. ( 査読あり )
- 3) Matsui K, Sano H. T helper 17 cells in primary Sjögren ' s Syndrome. *J.Clin.Med*. 2017 6(7). pii: E65. doi: 10.3390/jcm 6070065. ( 査読あり )
- 4) Azuma K, Tamura M, Makino H, Sekiguchi M, Azuma N, Kitano M, Matsui K, Sano H.

- A case of axial spondyloarthritis acute onset as opportunity tonsil foci infection. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2017;40(6):460-466. doi: 10.2177/jsci.40.460. Japanese. ( 査読あり )
- 5) Tamura M, Kitano M, Azuma K, Tsuboi K, Abe T, Ogita C, Yokoyama Y, Furukawa T, Yoshikawa T, Saito A, Nishioka A, Sekiguchi M, Azuma N, Tsunoda S, Hosono Y, Nakashima R, Ohmura K, Matsui K, Mimori T, Sano H. A case of anti-PL-7 antibody positive polymyositis with thrombotic microangiopathy. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2017;40(6):450-455. doi: 10.2177/jsci.40.450. Japanese ( 査読あり )
  - 6) Tamura M, Matsui K, Kobayashi Y, Ogita C, Tsuboi K, Kusakabe M, Azuma K, Abe T, Yoshikawa T, Sekiguchi M, Azuma N, Kitano M, Sano H. A case of eel collagen allergy. *Allergol Int*. 2018 Jan;67(1):138-140. doi: 10.1016/j.alit.2017.04.012. Epub 2017 Jun 2. ( 査読あり )
  - 7) Ogita C, Matsui K, Kisida D, Yazaki M, Nakamura A, Kaku S, Makino H, Tadokoro R, Azuma K, Tsuboi K, Tani M, Tamura M, Yoshikawa T, Morimoto M, Nishioka A, Sekiguchi M, Azuma N, Kitano M, Tsunoda S, Sawai H, Sano H. A retrospective analysis of 7 cases of familial mediterranean fever. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2017;40(1):21-27. doi: 10.2177/jsci.40.21. Review. Japanese. ( 査読あり )
  - 8) Azuma K, Tamura M, Kurajoh M, Hosono Y, Nakajima R, Tsuboi K, Abe T, Ogita C, Yokoyama Y, Furukawa T, Yoshikawa T, Saito A, Nishioka A, Sekiguchi M, Azuma N, Kitano M, Tsunoda S, Omura K, Koyama H, Matsui K, Mimori T, Sano H. A case of anti-aminoacyl tRNA synthetase antibody syndrome complicated by hemophagocytic syndrome. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2016;39(6):538-544. doi: 10.2177/jsci.39.538. Review. Japanese. ( 査読あり )
  - 9) Abe T, Tsunoda S, Nishioka A, Azuma K, Tsuboi K, Ogita C, Yokoyama Y, Furukawa T, Maruoka M, Tamura M, Yoshikawa T, Saito A,

Sekiguchi M, Azuma N, Kitano M, Matsui K, Hosono Y, Nakashima R, Ohmura K, Mimori T, Sano H. Reliability and clinical utility of Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibody. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 2016;39(2):140-4. doi: 10.2177/jsci. 39.140. Japanese. (査読あり)

10) Ogita C, Matsui K, Kisida D, Kakudou M, Yazaki M, Nakamura A, Azuma K, Tsuboi K, Abe T, Yokoyama Y, Furukawa T, Maruoka M, Tamura M, Yoshikawa T, Saito A, Nishioka A, Sekiguchi M, Azuma N, Kitano M, Tsunoda S, Hashimoto-Tamaoki T, Sano H. A case of familial Mediterranean fever who complained of periodic fever and abdominal pain diagnosed by MEFV gene analysis. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 2016;39(1):72-7. doi:10.2177/jsci. 39.72. Japanese. (査読あり)

〔学会発表〕(計 122 件)

1)Yokoyama Y, Iwasaki T, Kitano S, Furukawa T, Satake A, Matsui K, et al. IL-21C suppresses CIA in mice by the th1/th17 immune responses due to enhancement of both treg numbers and treg functions. The Annual European Congress of Rheumatology 2017.

2)Tsunoda S, Nishioka A, Abe T, Kitano M, Matsui K, et al. Neopterin as a serological marker of disease activity in patients with anti-melanoma differentiation- associated gene 5 antibody positive clinically amyopathic dermatomyositis. The Annual European Congress of Rheumatology 2017.6

3)Tamura M, Matsui K, et al. Association of serum interleukin-6, TNF receptor and interleukin-17 levels with disease activity in Japanese patients with SAPHO syndrome. 19<sup>th</sup> Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress 2017.

4)Furukawa T, Matsui K, et al. Sensitivity and specificity of YKL-40

for the presence of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. The 83rd Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology 2017.

1) 松井 聖, 他. RA 高齢者の腎機能と治療の現状と問題点. (シンポジウム); 高齢 RA 患者に対するマネジメント. 第 32 回日本臨床リウマチ学会 2017.

〔図書〕(計 3 件)

1) 松井 聖 他、中外医学社 臨床生殖免疫学 2018 708 頁

2) 松井 聖. 他 メディカ出版 最新知識と事例がいっぱい リウマチケア入門 - リウマチ治療はここまで変わった! . 2017 223 頁

3) 松井 聖, 他 最新医学社 全身性エリテマトーデス 2016 254 頁

〔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

松井 聖 (MATSUI, Kiyoshi)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 00291815

(2)研究分担者

藤盛 好啓 (FIJIMORI, Yoshihiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：20229058

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )