

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09214

研究課題名(和文) 羊膜由来間葉系幹細胞がもつEPA-レゾルビン産生と早産予防効果の検討

研究課題名(英文) Effect of EPA-resolvin secreted from amnion-derived mesenchymal stem cells on premature birth

研究代表者

大西 俊介(Ohnishi, Shunsuke)

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：10443475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)は、骨髄、脂肪などに存在する体性幹細胞であり、骨、軟骨、脂肪などに分化する多分化能を有し、再生医療における有望な細胞として注目されている。本研究では、羊膜MSCから分泌される液性因子の解析から、エイコサペンタエン酸の代謝産物であるレゾルビンE1を同定した。また、LPS誘発早産ラットモデルに対してEPAを投与したところ、早産が抑制され、羊水中のEPAならびにレゾルビンE1の濃度も回復していた。以上のことから、EPAがレゾルビンE1を介して早産を予防している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞は再生医療材料として注目されており、その作用機序の解明は重要な課題である。本研究では、羊膜由来間葉系幹細胞から分泌される液性因子の解析から、早産予防に寄与する生理活性脂質であるレゾルビンE1を同定した。エイコサペンタエン酸(EPA)を早産モデルラットに投与することで、EPAならびにその代謝産物であるレゾルビンの羊水中濃度が上昇し、早産が予防された。EPAの投与が早産の予防につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells have been reported to be a promising cell source in regenerative medicine. We analyzed secretory factors from amnion-derived mesenchymal stem cells, and identified eicosapentaenoic acid (EPA) and its metabolite resolvin E1 (RvE1). When we administered EPA to LPS-induced premature birth model rats, it improved premature birth, and the concentrations of EPA and RvE1 in amniotic fluid were recovered. These results suggest that EPA prevents preterm birth via RvE1.

研究分野：再生医療

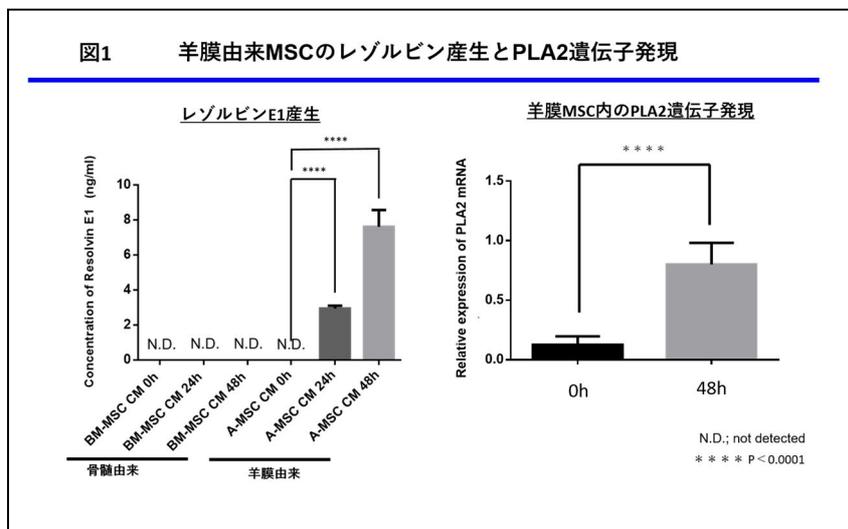
キーワード：間葉系幹細胞 早産 レゾルビン 羊膜 エイコサペンタエン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

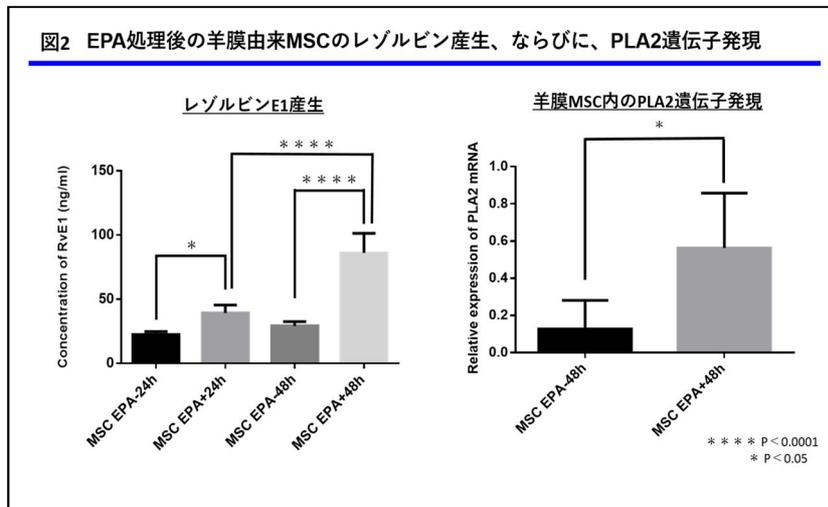
### 1. 研究開始当初の背景

MSCは、骨髄、脂肪などに存在する体性幹細胞であり、骨、軟骨、脂肪などに分化する多分化能を有し、再生医療における有望な細胞として注目されている。申請者らは、出産時に廃棄される卵膜に着目し、その中の羊膜には、他の組織に比べて多量のMSCが含まれていること、また、骨髄ならびに脂肪組織由来のMSCと比較すると、採取時のヒトにおける侵襲がないことから、新規の再生医療ソースになる可能性が期待されている。これまでに申請者らは、ヒトTリンパ球と羊膜MSCとの共培養を行った結果、Tリンパ球の増殖を著しく減少させること、また、移植片対宿主病 (GVHD)マウスモデルを用いて、羊膜MSCの有用性を明らかにしてきた (Yamahara K, et al., PLoS One 2014)。一方で、羊膜MSCは、炎症性細胞であるTh1、ならびに、Th17細胞の分化を抑制することも知られていることから (J Mol Cell Cardiol. 2012)、羊膜MSCは、生体における過剰な免疫反応を抑制する機能を有していることが示唆されている。近年、申請者らは、各種炎症性疾患動物モデルを用いて羊膜MSCの病態発症抑制効果を検討しており、腸炎 (Miyamoto S, Ohnishi S et al., Am J Transl Res. 2017., Ohnishi R, Ohnishi S et al, Cell Transplant. 2015)、膵炎 (Kawakubo K, Ohnishi S et al., Pancreas. 2016)、放射線直腸炎 (Ono M. Ohnishi S et al., Cytotherapy. 2015)、ならびに、肝臓の線維化 (Kubo K. Ohnishi S. et al. Transplant Direct. 2015)において、強い抗炎症効果を有することで、病態を改善することを明らかにしてきた。しかしながら、羊膜MSC由来のどのような液性因子が、さまざまな炎症性疾患を抑制しているのかの詳細は未だ明らかにされていない。

近年、魚油などに含まれるエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸 (DHA)などの多価不飽和脂肪酸は、人体で合成されない必須脂肪酸として知られており、これらの多価不飽和脂肪酸は、主に生体内では細胞の脂質二重膜に存在し、細胞膜の柔軟性などを規定している。細胞膜への刺激が加わると、EPAならびにDHAはホスホリパーゼA2 (PLA2)により膜から細胞質内に遊離され、細胞質内の脂肪酸代謝酵素により代謝されることが示唆されている (Burckley CD et al., Immunity 2014.; Serhan CN. Nature. 2014)。細胞質内に遊離された多価不飽和脂肪酸は、細胞内でEPA由来レゾルビン、ならびに、DHA由来プロテクチンに代謝され、これらの代謝物における抗炎症効果が知られている (Schwab J.M et al., Nature 2007)。さらに近年、炎症性早産誘導性マウスモデルにおいて、EPAならびにその代謝物であるレゾルビンの投与が早産を有意に抑制させることが報告され (Yamashita A et al., Sci Rep. 2013)、生体における



EPA、ならびに、レゾルビンの摂取が早産を予防する重要な因子であると想定される。申請者らはこれまでに、複数の組織由来MSCを培養すると、正常羊膜由来MSCのみで時間依存的にレゾルビンの産生量が増加すること、また、EPA



の代謝に重要な因子である PLA2 の遺伝子発現が培養時間とともに上昇することを世界に先駆けて明らかにしている (図 1、図 2)。しかしながら、正常羊膜由来 MSC のみから産生されるレゾルビンが生体の恒常性維持にどのように関わっているのかは不明であった。

## 2. 研究の目的

羊膜由来間葉系幹細胞は、出産時に廃棄される羊膜に存在していることが知られており、次世代の再生医療材料として期待されている。申請者らは、ヒト羊膜から短期間で間葉系幹細胞 (MSC) を分離培養する技術を確立し、その細胞を炎症性疾患誘導動物モデルに投与したところ、その病態を有意に抑制しており、羊膜 MSC が高い抗炎症効果を発揮することを明らかにしてきた。また、近年、羊膜 MSC の培養上清中には、エイコサペンタエン酸 (EPA) 由来の代謝産物であるレゾルビンが培養時間とともに増加することを世界で初めて明らかにしており、羊膜 MSC が持つ抗炎症効果の中核を担っていると考えられている。そこで本研究課題では、胎児、ならびに、母体にも多大なる影響をもたらす炎症性早産に着目し、正常、ならびに、早産由来ヒト羊膜 MSC 内 EPA-レゾルビン経路の詳細を明らかにすることで、早産の予防法の開発につなげることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、EPA の存在の有無が決定する早産の新規発症メカニズムならびにその予防法を探索するため、ヒト羊膜 MSC 内 EPA の含有量ならびに代謝物の網羅的解析を ELISA 法、液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) ならびに超臨界流体クロマトグラフィー質量分析 (SFC/MS) を用いて検討した。また、同様に EPA 投与後の妊娠ラット羊膜 MSC 内 EPA の含有量、ならびに、羊水中の代謝物の網羅的解析を ELISA 法、液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) ならびに超臨界流体クロマトグラフィー質量分析 (SFC/MS) を用いて検討した。さらに、LC-MS ならびに SFC/MS にて羊膜 MSC 内 EPA の含有量、羊水中の EPA 由来代謝物の変化を解析した。さらに、ヒト由来正常および早産由来羊水中代謝産物との比較解析を行い、早産リスクを事前に予測できる早期診断バイオマーカー候補の探索を行った。

## 4. 研究成果

これまでに、ヒト羊膜から間葉系幹細胞 (MSC) を分離培養し、その培養上清中に産生される網羅的解析を行ったところ、培養時間依存的にレゾルビン E1 の産生が増加していることが明らかとなった。さらに、EPA からレゾルビン E1 の代謝に関連している遺

伝子発現について定量的 PCR 法を用いて検討した結果、PLA2G2D、PLA2G5、PLA2G6、PLA2G10、PLA2G12A ならびに PLA2G12B の発現が培養時間依存的に増加していることが明らかとなった。そこで、EPA ならびにその代謝産物がもたらす早産予防効果の可能性を探索するために、液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) ならびに超臨界流体クロマトグラフィー質量分析 (SFC/MS) を用いて MSC 内に含まれる EPA を解析した。結果、MSC 内には、EPA が存在していること、また、それに付随した代謝物の存在が明らかとなった。一方で、ヒト早産由来 MSC ならびに羊水の解析については、対象ドナーの検体が確保できなかった。

次に、妊娠 7 日目のラットを用いて、10mg の EPA を 1 日 1 回の割合で 妊娠 17 日目まで連続投与した。その後、ラットの羊膜を採取し、MSC を分離培養後、MSC、ならびに、その培養上清を回収し、LC-MS、ならびに、SFC/MS を用いて MSC 内ならびにその培養上瀬中に産生される脂質メディエーターについて網羅的に解析を行った。結果、妊娠ラットモデルに EPA を投与すると EPA の代謝物であるレゾルビンの産生がコントロール群に比較して高い上昇傾向を示していた。これにより EPA の投与が羊膜 MSC 内 EPA の含有量を高める結果、レゾルビンの産生を促進し抗炎症効果を発揮している可能性が示唆された。

次に、妊娠ラットを用いて 100-500ng の LPS をラットに投与し、早産を誘発させた。その後、正常ならびに早産由来ラット羊膜 MSC ( $1 \times 10^7$  個) と羊水 (100  $\mu$ l) を経時的に採取し、ELISA 法、LC-MS ならびに SFC/MS にて羊膜 MSC 内 EPA の含有量、ならびに、羊水中の EPA 由来代謝物の変化を解析した。結果、LPS 投与後の妊娠ラットは、17 日程度で早産が認められたのに対し、EPA を投与した早産ラットでは、正常ラットと同程度の 21-22 日程度で出産が認められた。また、羊水、ならびに、羊膜から MSC を分離培養し、その培養上清中に産生される代謝物の網羅的解析を行ったところ、早産ラットでは、複数の炎症性脂質メディエーターが産生されていたが、EPA 投与後のラットでは、それらの炎症性脂質メディエーターの産生が抑制されていた。さらに、早産ラットの羊膜 MSC、ならびに、羊水中には、EPA 含有量が低下傾向にあり、その EPA 代謝産物である抗炎症性レゾルビン E1 の産生も有意に低下していた。一方で、EPA 投与後の早産ラットの羊膜 MSC、ならびに、羊水中には、EPA 投与による EPA 含有量が高い傾向を示したほか、その代謝産物である抗炎症性レゾルビン E1 の産生も有意に高かった。これらのことから、EPA 投与による抗炎症性レゾルビン E1 の産生が早産発症を抑制している可能性が示唆され、羊水中に含まれる抗炎症性レゾルビン E1 の強弱が早産発症の早期診断バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	山本 幸司  (Yamamoto Koji)  (70608322)	北海道大学・大学病院・特任助教    (10101)	

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