

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23983

研究課題名（和文）iPS細胞由来間葉系幹細胞の免疫修飾作用を用いた炎症性腸疾患の治療効果と機序解明

研究課題名（英文）Therapeutic effects and mechanisms of inflammatory bowel disease using immunomodulatory effects of iPS cell-derived mesenchymal stem cells

研究代表者

関 晃裕（Akihiro, Seki）

金沢大学・医学系・特任助教

研究者番号：00733859

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,200,000円

研究成果の概要（和文）：炎症が関与する消化器疾患として、炎症性腸疾患が知られ、近年本邦においても増加している。一方で、治療としては抗炎症作用を期待し生物学的製剤が開発され、一定の効果を認めているものの、臨床的改善率は5割前後にとどまり、重篤な副作用のリスクもあるため、安全で効果の高い新しい治療法の開発が重要な課題となっている。間葉系間質細胞群に含まれる間葉系幹細胞(MSC)は、多分化能に加え、炎症修飾作用を有することが知られている。このため、炎症修飾効果を有するMSCを用いる炎症性腸疾患治療への応用の可能性が示唆されてきた。本研究は、MSCを用いた炎症性腸疾患に対する新規治療確立に向けた基盤の形成を目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞(MSC)の炎症性腸疾患に対する治療効果を確認した。さらに均一な細胞の安定的な供給を目的としてiPS細胞からMSCへの分化誘導と培養を確立した。同様に炎症が疾患を惹起する非アルコール性脂肪肝炎モデルマウスを用い、MSCが肝臓の間質の細胞に対し、抑制的に働くことにより、間質細胞を介した実質細胞障害を回避する新たな機序の詳細を解明し、第107回日本消化器病学会総会の主題演題として報告した。現在は以上の成果を踏まえ、炎症性腸疾患モデルマウスの腸管において間質細胞を介した腸管炎症の軽減機序の解析を行っており、MSCを用いた炎症性腸疾患に対する新規治療確立に向けた基盤の形成が期待される。

研究成果の概要（英文）：Inflammatory bowel disease (IBD) is one of the most common gastrointestinal diseases caused by inflammation, and its incidence has been increasing in Japan, recent years. Biologics have been developed for the treatment of IBD because of their anti-inflammatory effects, and although they have shown some efficacy, the clinical improvement rate is only about 50%. Mesenchymal stem cells (MSCs), which are part of the mesenchymal stromal cell population, are known to possess not only multipotency but also inflammation modifying properties. In this study, we investigated the effect of MSCs on inflammatory bowel disease. The purpose of this study was to establish the basis for the establishment of a novel therapy for inflammatory bowel disease using MSCs.

研究分野：消化器内科

キーワード：間葉系幹細胞 炎症性腸疾患 iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞(MSC)は間葉系間質細胞群に含まれ、種々の間葉系細胞への分化能に加えて炎症修飾作用を有する。これまでに申請者は脂肪組織由来の間葉系間質細胞群を用いる治療法の基礎的検討を行った。間葉系間質細胞群に含まれる MSC が、肝疾患組織に局在する T 細胞や単球を標的とし、炎症及び線維化の改善に有用であることを見出し、世界に先駆け報告した。(Seki et.al. Hepatology 2013)

近年、潰瘍性大腸炎とクローン病からなる炎症性腸疾患は増加の一途をたどっている。過去 15 年で罹患者数が倍増し、現在罹患者は 20 万人を超え、指定難病に登録されている。治療として抗 TNF 製剤や抗 IL-6 製剤等生物学的製剤が開発され、一定の効果を認めたものの、臨床的改善率は 5 割前後にとどまり、かつ重篤な副作用のリスクもある。このため、安全で効果の高い新しい治療法の開発が必要とされている。

この背景より、炎症修飾効果を有する MSC を用いる炎症性腸疾患治療への応用の可能性が示唆されている。しかし MSC による治療の確立には、学術的な問題点として全能性幹細胞である iPS 細胞から MSC を大量に調整は可能であるが、iPS 細胞由来 MSC の特性の詳細は依然不明である。充分数の細胞を調整し、間葉系幹細胞投与による炎症性腸疾患治療の有用性を評価し、炎症性腸疾患に対する新規治療の基礎的検討を行う。

## 2. 研究の目的

本研究では、iPS 由来間葉系幹細胞を作成すること、および間葉系幹細胞による炎症性腸疾患モデルに対する治療効果を評価し、iPS 由来 MSC を用いた炎症性腸疾患の新規治療を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) iPS 細胞由来 MSC の作成。

ヒト末梢血単核球に対して、細胞の初期化遺伝子を組み込んだウイルスやプラスミドを導入しリプログラミングを行い、iPS 細胞を作成する。MSC への分化誘導は、iPS 細胞を FGF などのサイトカインを添加した MSC 培地で行う。更により効率的な MSC の分化誘導についての基礎的な検討を行う。

### 2) MSC 投与による炎症性腸疾患に対する治療効果の評価。

DSS を用い腸炎を誘導した DSS 誘導性炎症性腸疾患モデルに対して MSC を投与する。体重推移および組織学的な評価から治療効果の検討を行ない、MSC の炎症性腸疾患に対する有用性を明らかにする。

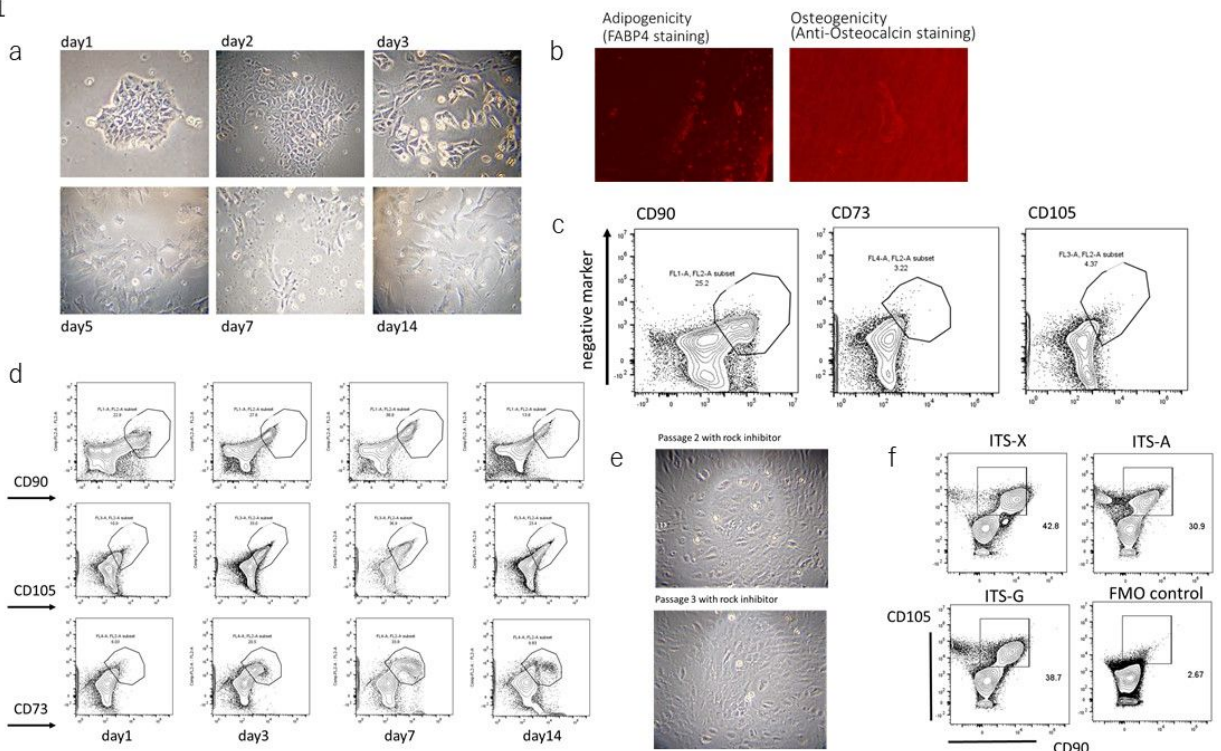
## 4. 研究成果

### (1) iPS 由来 MSC の作成

ヒト由来 iPS 細胞に対して過去の既報を(Giuliani M e. al. Blood. 2011)を参考に DMEM/F12 (Invitrogen) medium, supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Hyclone)に以下を添加することで MSC の作成に成功した。1 ng/mL b-FGF, 0.1mM nonessential amino acids, 1mM l-glutamine, 0.1mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 1x penicillin-streptomycin。作成した細胞の形態を図 1-a に示す。細胞は培養開始翌日より全体に広がりを見せ、5 日目には MSC ように細胞免疫染色期の増大を示した。培養開始 7 日目には MSC 様の突起を伴う細胞形態を示し、14 日目まで維持されていた。同細胞に対して分化能評価のため、間葉系細胞への分化誘導を行ない、Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Marker Antibody Panel を用いて、分化を確認した。iPS より作成した MSC は脂肪細胞および骨細胞への誘導を示し、多分化能を有することが示された。(図 1-b) 引き続き、同細胞における表面抗原についてフローサイトメーターを用いて評価した。iPS 細胞は間葉系幹細胞の表面マーカーのうち 25%の分画において CD90 を発現していたが、CD105 抗原、CD73 抗原の発現は認めなかった。(図 1-c) これらの表面抗原は培養経過で増加し、培養開始 7 日後において最も発現しており、14 日後には発現が減少傾向にあり、幹細胞としての機能の低下が疑われた(図 1-d)。第 7 培養日の細胞の継代を行ったところ、継代後の細胞増殖能の低下を認めていたが、ラミニンなどの足場や各種阻害剤を用い検討したところ、ATP 拮抗的に作用する Rho-associated coiled-coil forming kinase inhibitor (ROCK 阻害剤)の使用により、継代後の良好な細胞増殖を得ることができた(図 1-e)。より効率的な誘導を検

討するため、文献(Li, et al. Stem cells int 2017;737615)を参考に各種 Insulin-Transferrin-Selenium(ITS)を用いて誘導を行った。結果、ITS およびピルビン酸を加えた ITS(ITS-A)と比べ、エタノールアミンを加えた ITS(ITS-X)においてより MSC 抗原の誘導を示した。(図 1-e) 以上より、本研究における目的の一つである、

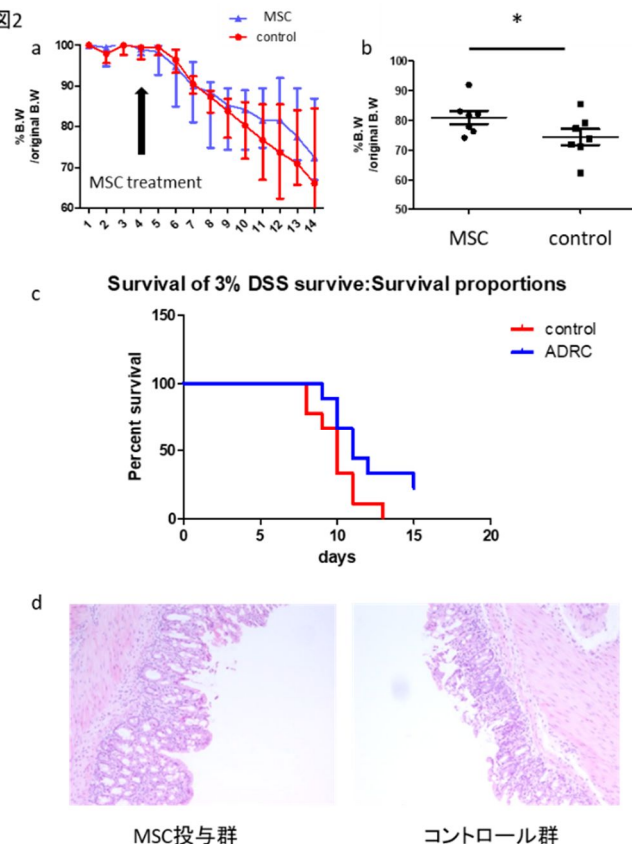
図1



2) MSC 投与による炎症性腸疾患に対する治療効果の評価。

8 週齢の C57Bl/6j マウスに対して、3%DSS を飲料水に添加し給水させることにより、炎症性腸疾患モデルを作成した。給水開始後 4 日目に同モデルマウスに対して C57Bl/6j マウスの鼠径皮下脂肪組織より採取した MSC を含む間葉系間質細胞群の投与を経尾静脈的に行った。給水開始後第 9 日目より間葉系間質細胞群を投与したマウスにおいて体重減少が軽減傾向を示し(図 2-a), 給水開始後第 12 日目にはコントロール群と比較して間葉系間質細胞群を投与したマウスにおいて有意に体重減少が少なかった(図 2-b)。更に MSC を投与したマウスにおいて生存率も改善傾向を示していた(図 2-c)。更に病理組織像では間葉系間質細胞を投与したマウスの腸管粘膜はコントロール群と比較して粘膜損傷が軽減されており(図 2-d)、MSC を含む間葉系間質細胞群の投与は腸管の炎症に対して抑制的に働く可能性が示唆された。

図2



MSC投与群

コントロール群

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Torres Joana, Hu Jianzhong, Seki Akihiro, , , , , , , , , , , Mehandru Saurabh, Colombel Jean-Frederic, Peter Inga	4. 巻 69
2. 論文標題 Infants born to mothers with IBD present with altered gut microbiome that transfers abnormalities of the adaptive immune system to germ-free mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 42 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2018-317855	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Chen Han, Nio Kouki, Yamashita Taro, Okada Hikari, Li Ru, Suda Tsuyoshi, Li Yingyi, Doan Phuong Thi Bich, Seki Akihiro et.al	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 BMP9 ID1 signaling promotes EpCAM positive cancer stem cell properties in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 XX
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.12963	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ho Tuyen Thuy Bich, Nasti Alessandro, Seki Akihiro, Komura Takuya, Inui Hihiro, Kozaka Takashi, Kitamura Yoji, Shiba Kazuhiro, Yamashita Taro, Yamashita Tatsuya, Mizukoshi Eishiro, Kawaguchi Kazunori, Wada Takashi, Honda Masao, Kaneko Shuichi, Sakai Yoshio	4. 巻 8
2. 論文標題 Combination of gemcitabine and anti-PD-1 antibody enhances the anticancer effect of M1 macrophages and the Th1 response in a murine model of pancreatic cancer liver metastasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e001367 ~ e001367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jitc-2020-001367	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakai Yoshio, Fukunishi Shinya, Takamura Masayuki, Inoue Oto, Takashima Shinichiro, Usui Soichiro, Seki Akihiro et.al	4. 巻 9
2. 論文標題 Regenerative Therapy for Liver Cirrhosis Based on Intrahepatic Arterial Infusion of Autologous Subcutaneous Adipose Tissue-Derived Regenerative (Stem) Cells: Protocol for a Confirmatory Multicenter Uncontrolled Clinical Trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JMIR Research Protocols	6. 最初と最後の頁 e17904 ~ e17904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2196/17904	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akihiro Seki, Yoshio Sakai, Kazunori Kawaguchi, Kosuke Ishida, Masatoshi Yamato, Alessandro Nasti, Takashi Wada, Shuichi Kaneko
2. 発表標題 Regenerative effect of adipose tissue-derived stromal cell administration in non-alcoholic steatohepatitis mice was mediated via Notch signaling system
3. 学会等名 2020 Keystone Symposia Conference Q5: Stromal Cells in Immunity and Disease (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関 晃裕, 酒井 佳夫, 金子 周一
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎マウスの小胞体ストレスと脂肪組織由来間質細胞投与による治療効果機序の検討
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会 総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihiro Seki, Yoshio Sakai, Alessandro Nasti, Masatoshi Yamato, Kosuke Ishida, Hiroyuki Inui, Tuyen Thuy Bich Ho, Kazunori Kawaguchi, Takashi Wada and Shuichi Kaneko
2. 発表標題 ADIPOSE TISSUE-DERIVED STROMAL CELLS OF STEATOHEPATITIS MICE ARE USEFUL FOR TREATMENT OF FIBROSIS-PROGRESSIVE NASH
3. 学会等名 AASLD Liver meeting 2020
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------