

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791714

研究課題名（和文） 脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた難治性炎症性腸疾患に対する
新規治療法の開発研究課題名（英文） Development of a novel treatment for inflammatory bowel disease with
Dedifferentiated fat cell (DFAT)

研究代表者

小沼 憲祥 (KONUMA NORIYOSHI)

日本大学・医学部・専修医

研究者番号：50553103

研究成果の概要（和文）：

C57BL/6Jマウスから採取した末梢血 T 細胞を CD3/28 抗体、IL-2 で増殖刺激を行い、B6 マウスから作製した DFAT と共培養することで、T 細胞増殖抑制効果がみられた。また、同様の DFAT を IFN γ 、TNF α にて刺激すると免疫制御に関する遺伝子の発現がみられた。生体における DFAT の T 細胞抑制効果を検討するために腸管炎症モデルを作製し、DFAT と PBS の静脈投与で比較すると DFAT の静脈投与において腸管炎症の改善が見られた。

研究成果の概要（英文）：

We stimulated peripheral blood T-cells from C57BL/6J mouse with CD3/28 antibody or IL-2. We extracted DFAT from the fat of C57BL/6J mouse, and analyzed the effect of DFAT for the proliferation of the stimulated T-cells. DFAT down-regulated the stimulated T-cells, and showed the high expression levels of the immunosuppressive genes (TRAIL, IDO1, NOS2, HGF, PEG2) stimulated by IFN γ or TNF α . To investigate the effect of T cell suppression in vivo, we intravenously administrated DFAT or PBS to the inflammatory bowel model in mice. Pathologically, DFAT group showed the low grade of the infiltration of T-cells, compared with PBS group.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：脱分化脂肪細胞、炎症性腸疾患、免疫抑制

1. 研究開始当初の背景

小児外科領域の難治性疾患とされる炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD)

は二つの疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病が存在する。我が国では食生活の欧米化などから近年増加傾向にあり、若年者層に多く、有

効な治療法が確立していないのが現状である。消化管は食餌や腸内細菌叢など外界からの抗原が常に存在する臓器であり、独特の免疫システムを持つ。

2000年代初頭、ヘルパーT (Th) 細胞には Th1、Th2 とは異なる Th17 というサブセットが見い出され、IBD の病態に関与していることが示された。一方で、T 細胞活性を抑制する制御性T細胞 (Regulatory T cell: Treg) や、その Treg を誘導する免疫寛容原性の樹状細胞が消化管に多く存在することも知られている。また、消化管においては腸内細菌叢の存在が腸管の宿主免疫に免疫寛容を成立させ、正常腸管においては上記のような免疫システムがバランスを取り合い恒常性を保っている。

MSC は免疫応答バランスの異常、特に過剰な免疫応答を抑制する能力を持つことが認められている。腸管炎症の病態に対する MSC 使用の妥当性は、腸管免疫システムが他の生体免疫システムと異なり免疫原性と免疫寛容原性の割合を後者に傾けている点である。MSC はエフェクターT細胞への直接作用だけでなく、Treg、樹状細胞、NK 細胞の活性制御や B 細胞のクラススイッチに影響を与える。治療の分子標的の見地からも、様々な機序が関与している病態に薬物のような1分子標的作用剤とは異なり、生体において免疫寛容原性を付与し、多くの作用点に働く MSC は IBD のような病態により有効であると考えられる。

2. 研究の目的

近年、移植片対宿主病 (GVHD) をはじめとした免疫システムの異常を伴う疾患の細胞治療に骨髄間葉系ストローマ細胞 (MSC) の有効性が確認されているが、難治性炎症性腸疾患においても動物実験、臨床治験等で MSC の効果が検討されている。本研究申請者はこれまで、骨髄 MSC に代わる細胞源として成熟脂肪細胞から脱分化させた MSC 様細胞 「DFAT」 (Dedifferentiated fat cell) を開発し、臨床応用を目指し研究してきた。そこで当該研究では、DFAT による免疫抑制作用、免疫寛容原性を検討し、更に、マウス慢性腸炎モデルに対する DFAT の治療有効性を検討することとした。

3. 研究の方法

(1) マウス末梢血 T 細胞増殖に対する DFAT 共培養の影響

T細胞活性の抑制検討をCD3 磁気ビーズで分離したマウスCD3 陽性T細胞とDFATの共培養にて行なう。T細胞の増殖刺激をCD3/28 抗

体 (5ul/well) とマウス IL-2 (20ng/ml) にて行い、DFATの播種細胞数はCD3 陽性T細胞 1×10^5 に対し、それぞれ 1/2、1/5、1/10 とした。評価をT細胞の播種から1日間培養した後、ELISA法にて検出した。

(2) DFAT の T細胞活性に対する制御分子の発現検討

これまで、MSC が発現する T細胞活性を制御する分子としては様々なものが報告されているが、それらの分子のうち主要な機能分子グループに焦点をあてて DFAT における遺伝子発現を Real-time PCR 法を用いて検討した。

① DFAT 培養条件

- 1) コントロール (サイトカイン未暴露)
- 2) インターフェロン γ (100U/mL)
- 3) TNF α (10ng/mL)

② Real-time PCR 法において検討する標的遺伝子

- 1) TRAIL, 2) IDO1, 3) NOS2, 4) HGF, 5) PEG2

(3) 腸管炎症モデルを作製し、DFAT 投与による炎症改善の効果を検証する。

既存の報告によると、主に用いられている腸管炎症モデルは薬剤性障害によるものがほとんどであり、当該研究ではデキストラン硫酸 (DSS) の自由飲水で腸管炎症を惹起させた。また、腸管再生に関与するとされている内在性 MSC の関与を排除するために、骨髄抑制を目的に Busulfan の腹腔内投与を前処置として行った。

<実験方法>

C57BL/6Jマウスに対してBusulfanの腹腔内投与を行いday5 からDSSの自由飲水を開始した。細胞投与はday7 にて尾静脈より投与し、day10 で炎症の評価を行った。また、 1×10^6 /bodyでDFATを尾静脈投与し、Negative controlをPBSとして、DFAT投与との比較検討を行った。炎症評価は体重変化、肉眼的所見、組織学的所見でスコア化して評価した。

4. 研究成果

(1) マウス末梢血 T細胞増殖に対する DFAT 共培養の影響

B6 マウスの脾臓から末梢血T細胞を抽出し、マウスCD3/28 抗体、マウスIL-2 にて増殖刺激を行った。T細胞を 1×10^5 にて播種し、C57BL/6Jマウスの脂肪より作製されたマウスDFATを 1:2 (5×10^4)、1:5 (2×10^4)、1:10 (1×10^4) で共培養したところ、マウスDFATの濃度依存性にT細胞の増殖抑制効果がみられた。

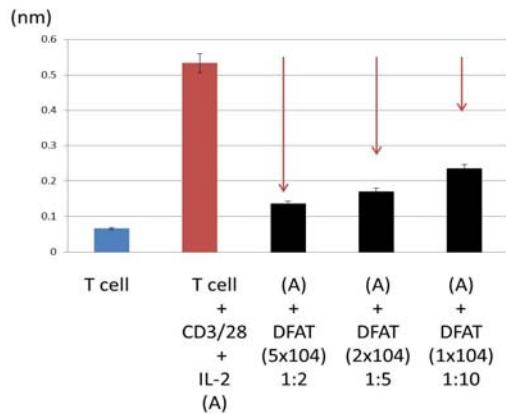


図1 DFAT の T 細胞増殖抑制効果

(2)DFAT における T 細胞活性に対する制御分子の発現検討

C57BL/6J マウスの脂肪から作製されたマウス DFAT をインターフェロン γ 、TNF α で二日間刺激し、DFAT の遺伝子発現を検討した。インターフェロン γ 刺激では、IDO1, TRAIL, HGF の発現が優位に上昇しており、TNF α 刺激では、PGE2, NOS2 の発現が優位に上昇していた。

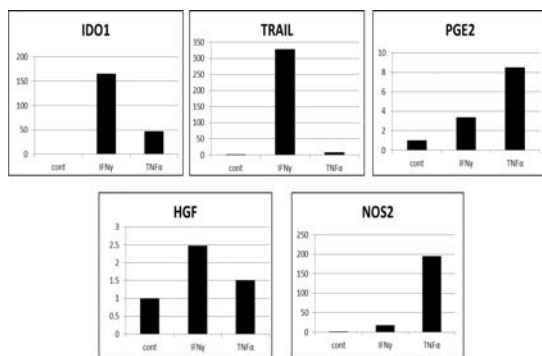


図2 各種サイトカイン刺激による DFAT の遺伝子発現

(3)腸管炎症モデルに対する DFAT 投与による炎症改善の効果検討

C57BL/6J マウスに Busulfan 腹腔内投与で前処置を行い、DSS の自由飲水にて腸管炎症を惹起する。day7 にて DFAT $1 \times 10^5 / 400 \mu\text{l}$ を尾静脈投与し、コントロール (PBS: $400 \mu\text{l}$) と比較した。DFAT 投与されたマウスは PBS 投与群と比較すると体重減少が軽減された。HE 染色では、粘膜肥厚や炎症性細胞の浸潤にも差がみられた。

(基準: DSS 飲水開始日)

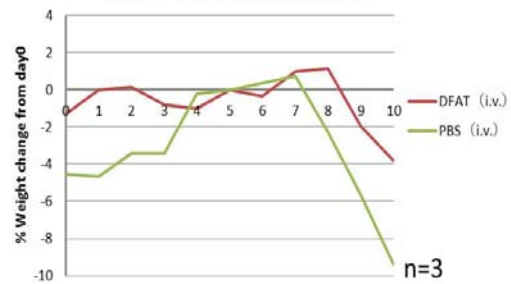


図3 DFAT 投与されたマウスと PBS 投与されたマウスの体重変動

(1)~(3)より DFAT の免疫抑制能が確認された。今後、T 細胞増殖抑制の機序に関わる詳細な検討が必要になると思われるが、自己免疫性疾患並びに免疫イベントの関与する様な難治性炎症性腸疾患などへの DFAT を用いた治療への応用が期待される。

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 3)

①益子貴行, 小沼憲祥, 麦島秀雄, 松本太郎. 腸管上皮再生における骨髄由来細胞の関与の検討. 日大医学雑誌. 査読有, 70(4), 197-202, 2011

②益子貴行, 小沼憲祥, 松本太郎. ES細胞から作成した腸管用構造の内腔を覆う上皮細胞および上皮幹細胞について. 小児外科. 査読有, 43(1), 10-14, 2011

③Sugito K, Uekusa S, Kawashima H, Masuko T, Furuya T, Konuma N, Ohashi K, Inoue M, Ikeda T, Koshinaga T. Effect of combined treatment with FK506, FTY720, and ex vivo graft irradiation in rat small bowel transplantation: expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1. Pediatric Transplantation. 査読有, 14(5), 614-617, 2010

[学会発表] (計 6 件)

①石岡茂樹, 小沼憲祥, 池田太郎, 入部雄司, 松本太郎, 越永従道. 炎症性腸疾患に対する DFAT 投与による治療効果の検討. 第 111 回日本外科学会定期学術集会 2011/05/26-2011/05/28, 東京 (地震により紙面開催)

[図書] (計 0)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0)

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
()

研究者番号：

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：