

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860515

研究課題名(和文) 卵膜由来間葉系幹細胞を用いた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 with fetal membrane-derived mesenchymal stem cells to inflammatory bowel disease

研究代表者

桂田 武彦 (Katsurada, Takehiko)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：90507592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、間葉系幹細胞(MSC)を用いた細胞治療が注目されており、その多くは自己骨髄由来のMSCが用いられている。しかしながら、急性期における必要な細胞数の確保、採取の際の身体への侵襲などの問題がある。一方、分娩時に通常廃棄されている卵膜にもMSCが存在し、非侵襲的に大量に得ることができる。本研究では、ラットdextran sulfate sodium (DSS)誘発腸炎モデルに対するヒト卵膜由来MSC移植の効果を検討した。ヒト卵膜由来MSCの投与により、DSSによる強い腸管粘膜障害が抑制されていることが示された。卵膜は細胞治療における新たな細胞ソースとして期待される。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) have been reported to be a valuable cell source in cell therapy, and bone marrow (BM) represents a major source of MSCs; however, there are several limitations when using BM-MSCs, including inadequate cell numbers, invasiveness and donor site morbidity. Recently, several studies have shown that MSCs can be easily isolated from human fetal membrane (FM), and a large amount of cells can be obtained. We thus examined the therapeutic effects of transplantation of human FM-derived MSCs (hFM-MSCs) in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in rats. Transplantation of hFM-MSCs provided significant improvement in a rat model of severe colitis, possibly through inhibition of monocyte/macrophage activity. FM-MSC would be considered as a new cell source for the treatment of severe colitis.

研究分野：消化器病学

キーワード：炎症性腸疾患 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

骨髄に存在する間葉系幹細胞(MSC)は多分化能を有し、かつ増殖能力が高いため、心筋血管などの組織再生のための細胞ソースとして注目され、国内でも臨床応用が開始されている。また、間葉系幹細胞は主要組織適合抗原(MHC) class II を発現しておらず、同種の免疫担当細胞に対する活性化抑制作用が最近明らかとなり、実際にクローン病や同種骨髄移植後の移植片対宿主病(GVHD)に対して、国内外で臨床試験が進められている(Lancet 371;1579:2008)。しかしながら、ドナーから骨髄を採取しなければならないため、長い経過を辿る慢性疾患に対して、自己のMSCを繰り返し投与することは侵襲をとめない倫理的にも問題がある。一方、分娩時に通常廃棄されている卵膜などの胎児付属物にも、MSCが豊富に含まれていることが最近明らかになり、この胎児付属物由来MSCが骨髄由来MSCにかわる新しい再生医療材料となる可能性がある。

一方、クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患は、近年の分子標的治療薬の出現によって治療成績が格段に向上した。しかし、一部の症例で重症化し、分子標的治療薬に抵抗性となったり、繰り返す炎症によって狭窄をきたし、腸切除を余儀なくされる症例も多い。したがって、さらなる有効な新規治療法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究では、炎症性腸疾患に焦点をあて、卵膜由来MSCの移植が有効であるかを動物モデルおよび培養細胞を用いて検討し、臨床応用への基盤を整えることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 倫理委員会の承認後、帝王切開による胎児娩出後の卵膜を母親の同意を得て採取し、羊膜由来MSC(AMSC)を分離・培養した。7週齢の雄性SDラットに対して8%DSSを5日間経口投与し、DSS投与開始2日目にAMSC(1×10^6 cells)を静注した。細胞投与後4日間の体重の変化および臨床的重症度を評価した後、屠殺して大腸の長さ、病理スコア、直腸の炎症性サイトカインの発現を定量的RT-PCR法で測定した。
- (2) RAW264.7細胞とAMSCを共培養もしくはAMSCの細胞上清(CM)を添加し、LPS刺激して24時間後に炎症性サイトカインの発現をRT-PCR法で測定し、ELISA法で細胞上清中の産生量を測定した。NF- κ B結合配列を付加したLuciferase plasmid DNAを導入したHEK293細胞を、

AMSCと共培養またはCMと培養させた後に、TNF- α またはLPSで6時間刺激しReporter Assayにて目的遺伝子の活性化を測定した。RAW264.7細胞をCMとのpre-incubation後に60分間LPSで刺激し、NF- κ Bを蛍光抗体で標識後、核内にNF- κ Bが移行した陽性細胞をカウントし評価を行った。HEK293細胞をCMとpre-incubationさせた後に、TNF- α またはLPSで刺激した。その後Western Blot法を用いてI κ Bとp-I κ Bの産生を評価した。

4. 研究成果

- (1) AMSC投与群はコントロール群と比較して、体重減少(図1)、臨床的重症度(図2)、大腸の長さの短縮および病理スコア(図3)が有意に改善していた。直腸におけるTNF- α 、IL-1 β 、MIFなどの炎症性サイトカインの発現が有意に減少していた。さらに免疫組織染色では、単球/マクロファージのマーカーであるCD68陽性細胞の浸潤が有意に抑制されていた(図4)。

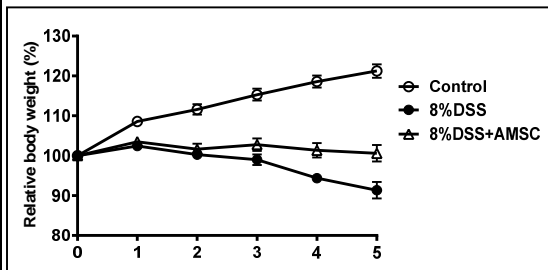


図1: 体重の変化

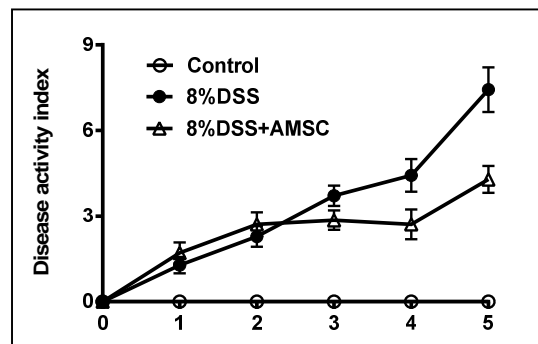


図2: 臨床的重症度の変化

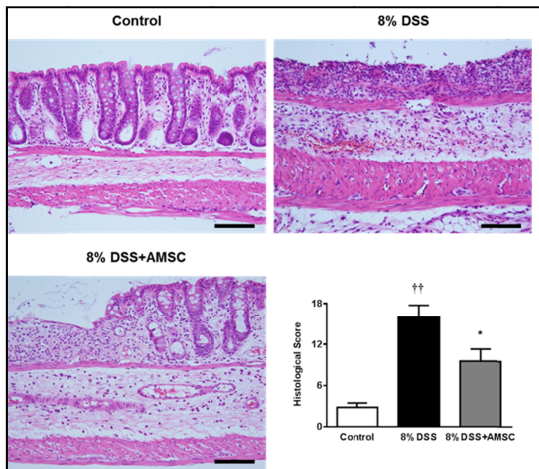


図 3 : 病理スコア

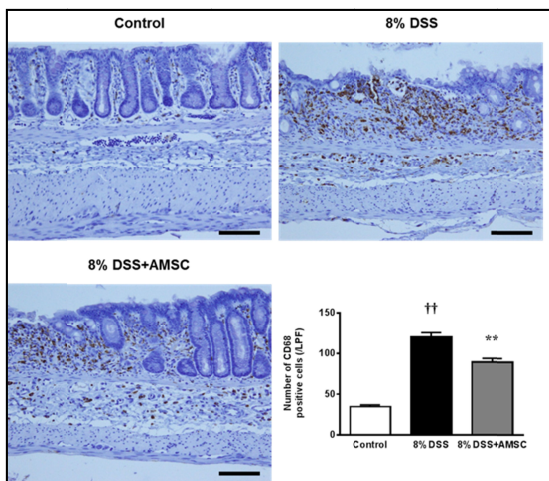


図 4 : CD68 陽性マクロファージの浸潤

- (2) AMSC との共培養または AMSC の CM 添加によって、RAW264.7 細胞における炎症性サイトカインの発現、産生が抑制された。AMSC との共培養または CM 添加によって、HEK293 細胞における target gene の活性化は抑制され、CM 添加によって NF- κ B が核内に移行した RAW264.7 細胞の数は減少していた (図 5)。しかしながら、HEK293 における p-I κ B の産生は CM の添加では抑制されなかった (図 6)。

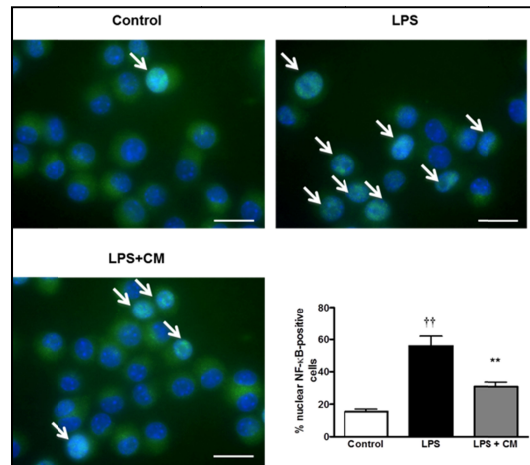


図 5 : NF- κ B の核内移行

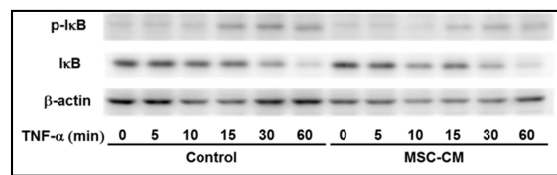


図 6 : I κ B のリン酸化

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 1 件)

Onishi R, Ohnishi S, Higashi R, Watari M, Yamahara K, Okubo N, Nakagawa K, Katsurada T, Suda G, Natsuzaka M, Takeda H, Sakamoto N. Human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates dextran sulfate sodium-induced severe colitis in rats. *Cell Transplantation* 2015;24(12):2601-14 (査読有)。

〔学会発表〕(計 2 件)

大西礼造、大西俊介、東亮佑、山原研一、吉松淳、桂田武彦、大久保直登、中川宏治、武田宏司、坂本直哉。羊膜由来間葉系幹細胞による炎症シグナルの制御。第 22 回日本胎盤学会学術集会 平成 26 年 10 月 4 日、芝欄会館 (京都)

Reizo Onishi, Shunsuke Ohnishi, Ryosuke Higashi, Michiko Watari, Waka Kobayashi, Takehiko Katsurada, Hiroshi Takeda, Naoya Sakamoto. Transplantation of human fetal membrane-derived mesenchymal stem cells improves severe colitis induced by dextran sulfate sodium in rats. Digestive Disease Week 2013. May 21, 2013, (Orlando, USA)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桂田 武彦 (Takehiko Katsurada)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：90507592

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：