

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26501001

研究課題名(和文) 卵膜由来間葉系幹細胞の分泌する低分子生理活性物質を用いた再生医療の開発

研究課題名(英文) Regenerative medicine with the low-molecular-weight secretory factors from fetal membrane-derived mesenchymal stem cells

研究代表者

大西 俊介(Ohnishi, Shunsuke)

北海道大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10443475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト卵膜由来間葉系幹細胞が産生する低分子の生理活性物質に着目し、再生医療に有効な生理活性物質を同定して、細胞を用いない新規の再生医療へ向けて臨床応用の基盤を整えることを目標とした。卵膜由来間葉系幹細胞の培養上清の低分子分画に抗炎症作用があることが明らかとなり、新規に低分子生理活性脂質を同定することができた。また、非アルコール性脂肪性肝炎モデルに対する効果を確認できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, I focused on the secretory factors from fetal membrane-derived mesenchymal stem cells, and found that low-molecular-weight fraction of conditioned medium had an anti-inflammatory effect. In addition, I identified a novel secretory lipid that attenuates rats with non-alcoholic steatohepatitis.

研究分野：再生医療

キーワード：間葉系幹細胞 卵膜

1. 研究開始当初の背景

骨髄に存在する間葉系幹細胞は多分化能を有し、かつ増殖能力が高いため、様々な組織の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行われている。また、骨髄移植後に発症する移植片対宿主病 (GVHD) やクローン病などの炎症性疾患に対する間葉系幹細胞の同種移植の効果も最近注目され、臨床試験が国内外で行われている。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、間葉系幹細胞が豊富に含まれており、この胎児付属物由来間葉系幹細胞が骨髄由来間葉系幹細胞にかわる新しい再生医療材料となる可能性がある。

申請者はこれまでに、前任の国立循環器病研究センター研究所において、間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生保護療法の基礎研究およびトランスレーショナル・リサーチ、さらには実際に臨床研究も行ってきた。具体的には、以下の点について検討し明らかにしてきた。

- (1) 骨髄由来間葉系幹細胞の投与が、急性心筋炎や完全房室ブロックの動物モデルに対して、炎症抑制作用や線維化抑制作用によって病態を改善することを明らかにした (Yokokawa M, Ohnishi S, et al. Cell Transpl 2008;17:1145-55, Ohnishi S, et al. J Mol Cell Cardiol 2007;42:88-97)。
- (2) 新たな再生医療材料として脂肪組織由来間葉系幹細胞にも注目し、ヒト皮下脂肪と内臓脂肪では間葉系幹細胞の増殖能や分化能が異なることや、増殖や分化を制御する新規分子を同定し報告した (Ohnishi S, et al. Cell Prolif 2009;42:309-16)。
- (3) ラット卵膜由来間葉系幹細胞の分離・培養法を確立し、その同種移植が下肢虚血モデルに対して血管新生を促進して病態を改善することを明らかにした (Ishikane S, Ohnishi S, et al. Stem Cells 2008;26:2625-33)。

また、平成 23 年度より北海道大学大学院医学研究科において、卵膜由来間葉系幹細胞を用いた消化器疾患の再生医療の研究を開始し、炎症性腸疾患モデルに対するヒト卵膜由来間葉系幹細胞移植の効果が確認されたため、平成 25 年度より厚生労働省の臨床研究中核病院整備事業の研究テーマに選定され、クローン病を対象とした第 I 相の臨床試験へむけた準備を進めている。

申請者は最近、卵膜由来間葉系幹細胞の作用機序を解析していく中で、間葉系幹細胞が分泌する生理活性物質のうち 3 kDa 以下の分画が、5 倍に濃縮された 3 kDa 以上の分画よりも強い炎症抑制効果やアポトーシス抑制効果を示すことを、*in vitro* のいくつかの実験系で見いだした。

そこで申請者は、この卵膜由来間葉系幹細胞の培養液中に分泌される分子量 3 kDa 以

下の生理活性物質が、細胞治療にかわる新たな再生医療の方法として有用なのではないかと考えた。すなわち、患者に細胞投与を行わずに、細胞から分泌される低分子生理活性物質の“カクテル”を投与することが、種々の炎症性疾患に対して有効なのではないかと考えた。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果のもとに、本研究では、ヒト卵膜由来間葉系幹細胞が産生する低分子の生理活性物質に着目し、再生医療に有効な生理活性物質を同定して、細胞を用いない新規の再生医療へ向け臨床応用の基盤を整えることを目標とする。

3. 研究の方法

- (1) 卵膜由来間葉系幹細胞が分泌する分子量 3 kDa 以下の分画について、さらによくつかの *in vitro* の実験系で炎症抑制作用や抗アポトーシス作用を確認し、その機序を明らかにする。
- (2) 卵膜由来間葉系幹細胞が分泌する分子量 3 kDa 以下の分画について、炎症抑制や組織再生に重要な因子を探索し同定する。
- (3) 卵膜由来間葉系幹細胞が分泌する分子量 3 kDa 以下の分画を用いて、炎症性消化器疾患モデルに投与してその効果を確認する。

4. 研究成果

- (1) 卵膜由来間葉系幹細胞の低分子分画の培養上清が、抗炎症作用や高アポトーシス作用を有することを、*in vitro* のけいで明らかにした。すなわち、lipopolysaccharide (LPS) による炎症刺激 (図 1) や、TNF- $\alpha$  による細胞障害 (図 2) に対し、低分子の培養上清が保護的に作用することが *in vitro* の系で示された。

図 1: 間葉系幹細胞の培養上清の各分画による LPS 刺激後の MCP-1 発現抑制効果

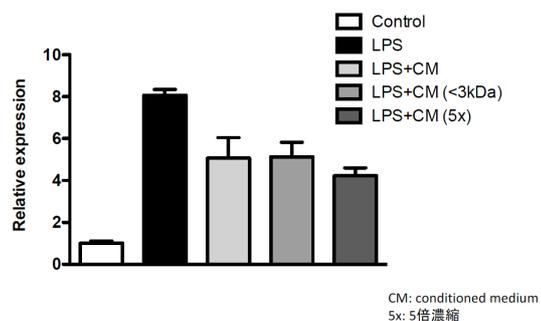
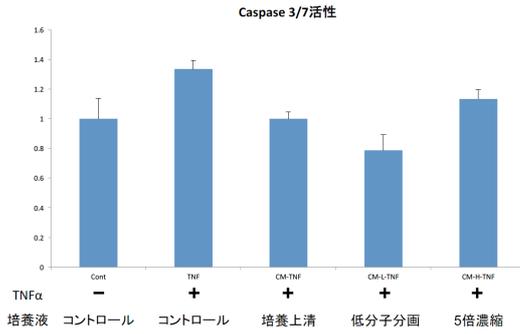
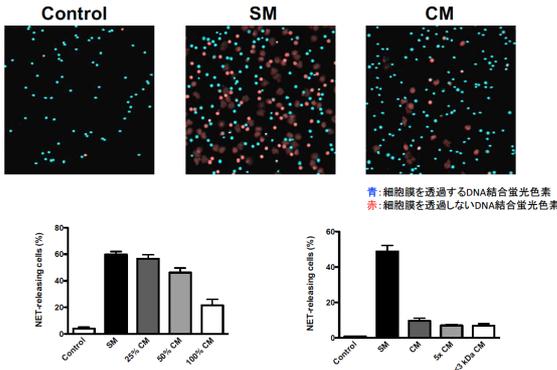


図2: 膵腺房細胞におけるTNF $\alpha$ 刺激によるアポトーシス誘導に対するMSC培養上清の各分画による抑制効果



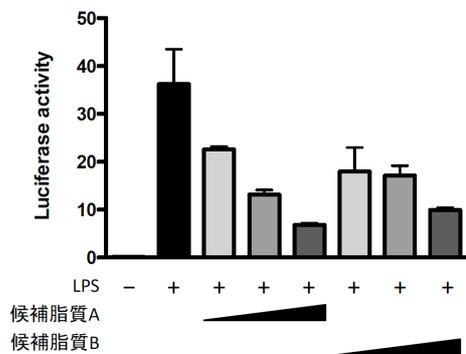
(2) また、好中球が異物を捕捉する際に細胞の内容物を放出する現象(neutrophil extracellular trap (NET))を間葉系幹細胞の培養上清が抑制した(図3)。間葉系幹細胞の新たな炎症抑制のメカニズムとして重要と考えられた

図3: 間葉系幹細胞の培養上清の各分画によるNETosis抑制効果



(3) さらに、間葉系幹細胞の培養上清に含まれる、抗炎症作用を示す新たな生理活性脂質を同定した。これらはいずれもLPS刺激によるNF- $\kappa$ Bの転写活性を抑制していた(図4)。

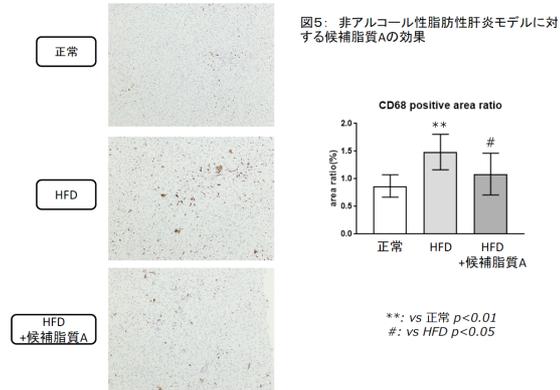
図4: 候補脂質A, BによるLPS刺激後のNF- $\kappa$ B転写活性抑制効果



(4) ブタ食道粘膜下層剥離術後の食道狭窄モデルを作成し、候補脂質Aを投与して検討したが、食道狭窄の予防効果は認め

られなかった。

(5) 高脂肪食による非アルコール性脂肪性肝炎ラットモデルに対し、候補物質Aを投与して検討したところ、kupffer細胞の浸潤が有意に抑制された。



以上の結果から、卵膜由来間葉系幹細胞の培養上清の低分子分画に抗炎症作用があることが明らかとなり、新規に低分子生理活性脂質を同定することができた。また、非アルコール性脂肪性肝炎モデルに対する効果を認認できた。今後は更なる機序の解析を行っていく。

## 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0件)  
該当なし

〔学会発表〕(計0件)  
該当なし

〔図書〕(計0件)  
該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)  
該当なし

○取得状況(計0件)  
該当なし

〔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

大西俊介 (Shunsuke Ohnishi)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 10443475

(2) 研究分担者  
該当なし

(3) 連携研究者  
該当なし

(4) 研究協力者  
森 政寛 (Masahiro Mori)