

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 大西礼造

### 学位論文題名

#### ラット dextran sulfate sodium 誘発腸炎モデルに対する ヒト羊膜由来間葉系幹細胞投与の効果 (Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Severe Colitis in Rats)

##### 【背景】

近年、様々な疾患領域において細胞を用いた再生医療研究がすすめられており、骨髄、脂肪などに存在する間葉系幹細胞(MSC)も細胞ソースの一つとして期待されている。

MSC は中胚葉由来の体性幹細胞であり、自己複製能を有し、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞など様々な細胞へ分化することができる。また免疫調整作用を有していることも最近明らかとなり、組織再生療法だけではなく、炎症性疾患や自己免疫疾患などへの有効な治療法の一つとして国内外で臨床試験が進められている。再生医療材料として最も多く用いられている MSC は、骨髄由来のものである。しかし、骨髄から採取する場合、身体への侵襲を伴い、一度の採取で得られる細胞数はごくわずかであることから、移植に必要な細胞数を確保するには長期の培養期間を要する。さらに MSC の増殖能は加齢に伴い低下することが報告されており、ドナーが高齢であった場合や、疾患を持った患者から採取する場合などは、治療に必要な量の質の高い細胞を獲得することは困難であることが予想され、細胞治療における大きな障害となる。これらの問題点は脂肪組織由来の MSC も同様である。

そこで新たな細胞ソースとして羊膜に注目した。ヒト羊膜には豊富に MSC が含まれていることが知られており、より若い細胞を大量に獲得できるという利点を持っている。また羊膜を含む卵膜そのものは医療廃棄物として出産後に廃棄されてしまうことから、倫理的問題を軽減できると考えられる。よって羊膜由来 MSC (AMSC)は新たな再生医療材料として期待できる。

今回想定した治療対象疾患であるクローン病は、口腔から肛門にいたるまでの消化管のどの部位にも炎症や潰瘍を引き起こし、腹痛や下痢、血便、体重減少などを生じさせる疾患である。これまでクローン病発症には常在菌に対する自然免疫の制御機構の破綻が関わっていると想定され、腸内細菌抗原による慢性的な刺激や、免疫担当細胞の過剰誘導などが原因の一つと考えられている。若年層での発症が顕著で、本邦においては患者数は増加の一途をたどっている。TNF- $\alpha$ 阻害薬などの新規治療薬が開発され、良好な治療効果が報告されているものの、既存の治療が奏功しない重症例では、腸管切除や腸瘻増設術といった外科的治療を必要とする場合も少なくない。

各種疾患動物モデルに対する MSC 投与の効果は報告されているが、MSC の抗炎症効果のメカニズムに関しての報告は多くはない。前述したクローン病発症の要因として、常在菌に対する自然免疫の制御機構の破綻について述べたが、細菌抗原による刺激は下流の NF- $\kappa$ B signaling pathway を活性化する。つまり炎症性腸疾患における腸管粘膜の炎症には NF- $\kappa$ B が深く関与している。NF- $\kappa$ B は阻害蛋白質 inhibitor  $\kappa$ B と結合することで不活性化状態で細胞質に存在している。そこへ細胞表面受容体に抗原刺激が加わることで酵素複合体である inhibitor  $\kappa$ B kinase が活性化され、inhibitor  $\kappa$ B が分解されると、NF- $\kappa$ B が表在化し核内に移行することで目的遺伝子の転写活性化が起こるとされている。

##### 【目的】

重症クローン病に対するヒト AMSC の同種移植療法の確立を最終目標とし、本研究においては、dextran sulfate sodium (DSS)誘発腸炎モデルラットに対し、ヒト AMSC 投与の効果の検討を行った。また *in vitro* において AMSC の抗炎症効果とその作用機序解明のため検討を行った。

## 【材料と方法】

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、用手的に卵膜を羊膜と絨毛膜に剥離した。羊膜を細切後、コラゲナーゼ処理し、10%胎仔ウシ血清を用いて培養した。8週齢の雄性SDラットに対して、DSSをミネラルウォーターに溶解し8%濃度にしたDSS溶解液を自由飲水させる形で5日間経口投与し、持続する非常に強い腸炎を発症させた。AMSCは、DSS溶解液投与開始2日目に $1 \times 10^6$ 個を200  $\mu$ lの生理食塩水に浮遊させ陰茎静脈より投与した。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を計測し、DSSによる腸管粘膜障害の強い直腸の病理スコア評価を行った。また、同部位からmRNAを抽出し、炎症性サイトカイン・ケモカインの発現を定量的RT-PCR法で測定した。ラット血清を用いて、ELISA法で血中MCP-1濃度を測定した。直腸標本をmyeloperoxidase染色や抗CD68抗体、抗CD163抗体、抗CD3抗体を用いた免疫染色を行い評価した。

マウスマクロファージ細胞(RAW264.7)とAMSCを共培養もしくはAMSCの培養上清(CM)を添加し、LPS刺激を行って24時間後に炎症性サイトカインの発現を定量的RT-PCR法およびELISA法で測定した。NF- $\kappa$ 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で培養させた後に、TNF- $\alpha$ またはLPSで6時間刺激しルシフェラーゼ・アッセイにて測定した。RAW264.7をCMとのpre-incubation後に60分間LPSで刺激し、NF- $\kappa$ Bの核内への移行を蛍光免疫染色で評価した。その後Western Blot法を用いてI $\kappa$ Bのリン酸化を評価した。

## 【結果】

AMSC投与群は、DSS誘発腸炎群と比較して、体重減少、臨床的重症度の悪化、炎症による大腸の短縮が有意に抑制され、病理スコアが有意に改善していた。直腸におけるTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインの発現が有意に減少しており、血中MCP-1濃度は有意に低下した。さらに直腸の免疫組織染色では、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。

AMSCとの共培養またはAMSCのCM添加によって、RAW264.7におけるTNF- $\alpha$ やMCP-1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NF- $\kappa$ Bの活性化は抑制され、CM添加によってNF- $\kappa$ Bの核内への移行がRAW264.7において抑制されていた。しかしながら、HEK293におけるI $\kappa$ Bのリン酸化はCMの添加では抑制されなかった。

## 【考察】

本研究では、以下4つの結果が得られた。(1)AMSCの投与が、体重低下の抑制、臨床的重症度の低下、腸管の短縮抑制に寄与した。(2)AMSCの投与が病理スコアを改善し、腸管での炎症性サイトカイン発現を抑制した。(3)AMSCとの共培養、もしくは培養上清はマクロファージの炎症反応を抑制した。(4)AMSCの培養上清はNF- $\kappa$ Bの核移行を抑制した。

既報よりもより重篤な腸炎モデルを作製するため、8%という非常に高濃度のDSSを用いて検討を行い、各パラメータから非常に重症な腸炎が惹起されが、AMSCを投与することで、病態を改善させる結果となった。腸管粘膜に浸潤した炎症細胞はマクロファージや好中球が主体であり、このモデルではマクロファージの浸潤がAMSC投与によって著明に抑制されることが示された。

AMSC投与はラット直腸中のTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MIFといった炎症メディエーターを抑制し、血清中MCP-1値を抑制することが示されたが、MIFやMCP-1はマクロファージを活性化させるサイトカインとして知られていることから、AMSCは免疫担当細胞の中でもよりマクロファージに対する抑制効果を発揮する可能性が示された。

AMSCとの共培養、CM添加はRAW264.7細胞における炎症性サイトカインの発現を有意に抑制することが示されたが、CMがNF- $\kappa$ B転写活性を抑制したこと、そしてTNF- $\alpha$ またはLPSによるI $\kappa$ Bのリン酸化が抑制されなかったことから、CMはNF- $\kappa$ Bの核移行を抑制することで抗炎症効果を発揮する可能性が示された。

## 【結論】

ヒトAMSCの投与は、DSSによる強い腸管粘膜障害を抑制し、その効果の一因として、AMSCによるマクロファージに対する活性化抑制が関与していることが示された。さらにAMSCの抗炎症効果はNF- $\kappa$ Bの核移行を抑制することで発揮する可能性が示唆された。羊膜は新たな細胞ソースとして期待され、AMSC投与は治療的戦略の一つとして有用と考えられる。