

| Title | Trinitrobenzene sulfonic acid誘発腸炎モデルラットに対するヒト羊膜間葉系幹細胞投与とヒト羊膜間葉系幹細 胞由来培養上清の注腸投与の効果 |
|------------------|--|
| Author(s) | 宮本, 秀一 |
| Citation | 北海道大学. 博士(医学) 甲第12582号 |
| Issue Date | 2017-03-23 |
| DOI | 10.14943/doctoral.k12582 |
| Doc URL | http://hdl.handle.net/2115/65944 |
| Туре | theses (doctoral) |
| Note | 配架番号:2323 |
| File Information | Shuichi_Miyamoto.pdf |



学位論文

Trinitrobenzene sulfonic acid 誘発腸炎モデルラットに対するヒト 羊膜間葉系幹細胞投与とヒト羊膜間葉系幹細胞由来培養上清の 注腸投与の効果

(Therapeutic Effects of Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation and Conditioned Medium Enema in Rats with Trinitrobenzene Sulfonic Acid-induced Colitis)

> 2017年3月 北海道大学 宮本秀一

学位論文

Trinitrobenzene sulfonic acid 誘発腸炎モデルラットに対するヒト 羊膜間葉系幹細胞投与とヒト羊膜間葉系幹細胞由来培養上清の 注腸投与の効果

(Therapeutic Effects of Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation and Conditioned Medium Enema in Rats with Trinitrobenzene Sulfonic Acid-induced Colitis)

> 2017年3月 北海道大学 宮本秀一

目 次

| 発表論文目録および学会発表目録 ・・・・・・・ 1 頁 |
|-----------------------------|
| 緒言 2 頁 |
| 略語表 ・・・・・ 5 頁 |
| |
| 実験方法 |
| 実験結果 ・・・・・ 21 頁 |
| 考察 39 頁 |
| 総括 ・・・・・ 42 頁 |
| |
| 謝辞 •••••• 43 頁 |
| 引用文献 •••••• 44 頁 |
| |

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

 Shuichi Miyamoto, Shunsuke Ohnishi, Reizo Onishi, Ikuki Tsuchiya, Hidetaka Hosono, Takehiko Katsurada, Kenichi Yamahara, Hiroshi Takeda, and Naoya Sakamoto

Effects of Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation and Conditioned Medium Enema in Rats with Trinitrobenzene Sulfonic Acid-induced Colitis

American Journal of Translational Research (under review)

本研究の一部は以下の学会に発表した

 Shuichi Miyamoto, Shunsuke Ohnishi, Ikuki Tsuchiya, Reizo Onishi, Hidetaka Hosono, Hiroshi Takeda, Naoya Sakamoto

Effects of Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation and Conditioned Medium Enema in Rats with Trinitrobenzene Sulfonic Acid-induced Colitis

United European Gastroenterology Week, 2016/10/15~10/19 Vienna, Austria

緒言

炎症性腸疾患(IBD; inflammatory bowel disease)は、世界中で増加傾向にある疾患であ り、潰瘍性大腸炎とクローン病に大別される^{1,2}。クローン病は非連続性に分布する全 層性肉芽腫性炎症や瘻孔を特徴とする原因不明の慢性炎症性疾患で、腹痛や下痢、血 便、体重減少などを生じさせる疾患である³。口腔から肛門までの消化管のあらゆる 部位に発生するが、特に小腸や大腸、肛門周囲に好発する⁴。疾患パターンとして、 炎症型、瘻孔形成型、狭窄型の3通りに分類されることが提唱されている。また、消 化管に限らず強直性脊椎炎などの関節合併症、結節性紅斑や壊疽性膿皮症などの皮膚 合併症、強膜炎やぶどう膜炎などの眼合併症、また難病である原発性硬化性胆管炎な ど様々な病態を合併することが知られている。クローン病患者数は年々増加しており、 ヨーロッパや北米でのクローン病罹患率も上昇傾向にある^{2,5}。我が国での平成 25 年 度末での医療受給者証および登録者証交付件数は約4万人と類推されており、アジア では急速に患者数が増加している。

<本邦におけるクローン病患者の医療受給者証交付件数の推移> 公益財団法人 難病医学研究財団難病情報センター ホームページより抜粋





クローン病の病因として、常在菌に対する自然免疫の制御機構の破綻に関与していると考えられている。通常 Toll-like receptor(TLR) や nucleotide-binding-oligomerisation-domain(NOD)受容体などの細胞内外に発現する自然免疫受容体は常在菌に対する応答は抑制されているが⁶、TLR を介した腸内細菌抗原からの慢性的な刺激や⁷、機能喪失型変異である nucleotide-binding-oligomerisation-domain の変異⁸、IL-17やIL-22を産生するTh17細胞

の過剰誘導などにより発症すると考えられている²。現在も様々な病因が検討されて おり、近年は患者の遺伝的背景も解析が進んでいる。現在クローン病に関しては 140 箇所の遺伝子領域が同定されており、今後病態解明の手がかりとなることが期待され ている⁹。

クローン病は再燃・寛解を繰り返し、経過中に腸管狭窄や瘻孔などを合併すること も多く、診断から10年後には約50%の患者に合併する¹⁰。最近では診断時に既に18.6 ~37.9%の患者に狭窄などの腸管合併症を認めるといった報告がある¹¹⁻¹³。Greenstein らがクローン病に対する手術適応を分類しているが¹⁴、狭窄が半数を占めており、次 いで瘻孔形成が多い。外科的治療の原則は最小限の腸管切除とされており、適切な時 期に手術を行い、また、術後再発を予防しなくてはならないとされているが、再手術 率は術後5年で16~43%となっている¹⁵。

クローン病の重症度は Crohn's disease activity index(CDAI)・合併症の有無・炎症の程 度・治療に対する反応の程度から分類され、重症度ごとの治療内容がクローン病治療 指針に記載されている¹⁶。診断時や活動期の寛解導入を目的としたものと、寛解維持 を目的にしたものに大きく分けられる。軽症から中等症の場合は5-アミノサリチル酸 製剤や栄養療法が行われ、中等症から重症の場合は経口ステロイドや抗菌薬を使用し、 ステロイドから離脱できない場合はアザチオプリンや6-メルカプトプリンを併用する が、効果不十分な場合はインフリキシマブやアダリムマブなどの抗 Tumor necrosis factor (TNF)-α 抗体製剤を用いる。薬物療法などが無効あるいは適用できない場合は、 血球成分除去療法の併用を考慮する¹⁷。抗 TNF-α 抗体製剤が登場する以前はアザチオ プリンや6-メルカプトプリンなどが主に免疫抑制剤として用いられていたが、効果不 十分により外科的治療を要する症例も存在した。しかし、現在は抗 TNF-α 抗体製剤の 登場によりクローン病治療は大きく変化した¹⁸。炎症性サイトカインの1つである TNF-αがクローン病の病態形成に関与していることが判明し、1993年にステロイド抵 抗性の重症クローン病患者にキメラ型抗TNF-α抗体であるインフリキシマブが投与さ れ、有効であることが報告された¹⁹。その後、1999年に米国で承認され、本邦でも有 効性が証明され 2007 年からクローン病の寛解維持投与目的に保険適応となった。現在 では、完全ヒト型抗 TNF-α抗体製剤も開発され、抗 TNF-α抗体製剤の臨床的・内視鏡 的寛解維持効果や術後再発の予防効果などが報告されている^{18,20,21}。しかし、抗 TNF-α 抗体を用いた寛解維持療法中に、約30%~50%近くの患者に対して二次無効といった 効果の減弱をきたすといった問題もあり、さらなる新規治療薬の開発が望まれている 22-24

近年、治療抵抗性や重症のクローン病患者に対する、間葉系幹細胞(MSC; mesenchymal stem cell)を用いた細胞治療の効果が報告されている^{25,26}。MSC は胚性幹細胞(ES 細胞; embryonic stem cell)や人工多能性幹細胞(iPS 細胞; induced pluripotent stem

cell)とともに、再生医療材料として期待されている。MSC は主に骨芽細胞、軟骨細胞、 脂肪細胞などの間葉系の細胞に分化する能力を有する非神経系の組織幹細胞の一つで ある^{27,28}。最近では抗炎症作用や免疫調整作用にも注目が集まっている²⁹⁻³¹。骨髄や脂 防由来の MSC が再生医療材料として用いられることが多いが、これらの採取には身 体への侵襲を伴い、一度の採取で得られる細胞数は少量であることから、移植に必要 な細胞数を確保するには一定の培養期間を要する。またドナーが高齢だった場合や、 様々な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 獲得することは難しい可能性がある^{32,33}。

本研究では、ヒト羊膜には多量の MSC が含まれており、より若い細胞を大量に獲 得できるという利点があることから MSC ソースとして羊膜に注目した^{34,35}。卵膜は羊 膜と絨毛膜から構成されている。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、侵襲がなく採取でき、かつ倫理的問題を軽減できると考える。ま た、羊膜は造血細胞や血管が少ないことから collagenase 処理を行うことにより容易に MSC を分離することが可能である。以上の点から、羊膜は新たな細胞ソースとして期 待されており、実際にヒト羊膜由来 MSC (hAMSC; human amnion-derived MSC)が、 Dextran sulfate sodium 誘発腸炎モデル³⁶、放射線性直腸炎モデル³⁷、肝硬変モデル³⁸ などの様々なモデルラットに投与することにより腸炎や肝硬変の病態を改善すること が報告されてきた。また、hAMSC 由来培養上清 (hAMSC-CM; hAMSC-conditioned medium)は炎症細胞の活性化を抑制し、放射線照射から細胞を守る能力があることも 報告されている³⁷。本研究では、クローン病モデルシットに対する hAMSC と hAMSC-CM のそれぞれの投与効果を検討した。

略語表

- AMSC : Amnion-derived mesenchymal stem cell
- ANOVA : Analysis of variance
- APC : Allophycocyanin
- BSA : Bovine serum albumin
- CCL : chemokine (C-C motif) ligand
- CD : Cluster of differentiation
- CM : Conditioned medium
- COX-2 : Cyclooxygenase-2
- CXCL : Chemokine(C-X-C motif) ligand
- DAI : Disease activity index
- DNA: Deoxyribonucleic acid
- DSS: Dextran sulfate sodium
- EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
- FACS : Fluorescence activated cell sorter
- FBS: Fetal bovine serum
- FITC : Fluorescein isothiocyanate
- GVHD : Graft-versus-host disease
- HE : Hematoxylin and eosin
- HLA : Human leukocyte antigen
- IBD : Inflammatory bowel disease
- IFN: Interferon
- IL: Interleukin
- MEM : Minimal essential medium
- MPO: Myeloperoxidase
- MSC : Mesenchymal stem cell
- PBS: Phosphate-buffered saline
- PE : Phycoerythrin
- PGE2: Prostaglandin E2
- RNA: Ribonucleic acid
- RT-PCR : Reverse-transcription polymerase chain reaction
- SD : Sprague-Dawley
- SM : Standard medium
- TLR: Toll like receptor

TNBS: Trinitrobenzene sulfonic acid

TNF: Tumor necrosis factor

実験方法

1. 羊膜由来間葉系幹細胞の分離・培養

試薬及び材料

| Brightase | (Worthington | Biochemical | Corporation, | Lakewood, | NJ, | USA) |
|-----------------|--------------|-------------|-----------------|------------------|---------|----------|
| Dispase | | (Wa | ko Pure Chemica | ll Industries, C | saka, J | Japan) |
| FBS | | (I | Life Technologi | es, Carlsbad, | MD, | USA) |
| MEM-alpha | | | | (Life T | echno | logies) |
| PBS | | | | (Life T | echno | logies) |
| penicillin | | (Wako F | Pure Chemical | Industries, O | saka, | Japan) |
| streptomycin | | | (Wako P | ure Chemica | l Indu | ustries) |
| 0.5% trypsin-El | DTA | | | (Life T | echnol | logies) |

卵膜の採取は北海道大学大学院医学研究科における医の倫理委員会の承認(承認番号 8)を得て、同意を得られた妊婦から行った。

帝王切開で胎児を娩出後、卵膜を剪刃で 5 cm 四方に切り、用手的に羊膜と絨毛膜に 分けた。羊膜を PBS で洗浄したのち、結合組織を消化し細胞を分離するため Brightase と Dispase を添加し 37°C 下で 1 時間振盪した。10% FBS・penicillin (100 U/ml)・ streptomycin (100 µg/ml)を添加した MEM-alpha を用いて 15cm uncoated plastic dish に播 種し、室温 37°C・湿度 95%・5%二酸化炭素濃度下で培養を行った。プラスチック接着細 胞が 80%コンフルエントになるまで、3-4 日おきに MEM-alpha を交換し、接着していな い浮遊細胞を除いた。継代は 0.5% trypsin–EDTA を用いて接着細胞を剥離し、新たな培 養皿に 1.0×10^6 cells/cm²の濃度で播種し培養を継続した。

2. ヒト羊膜由来間葉系幹細胞の脂肪細胞・骨細胞への分化誘導

2-1 脂肪分化誘導

試薬及び材料

FBS

(Life Technologies)

hMSC Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation Medium

| (Lonza, Basel, Switzerland) |
|-------------------------------------|
| (Life Technologies) |
| (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) |
| (Life Technologies) |
| (Wako Pure Chemical Industries) |
| (Wako Pure Chemical Industries) |
| |

2-propanol (Wako Pure Chemical Industries)4% paraformaldehyde phosphate buffer solution (Wako Pure Chemical Industries)

4 継代目の hAMSC を 6-well plate に播種し、10% FBS・penicillin (100 U/ml)・ streptomycin (100 mg/ml)を添加した MEM-alpha を用いて 80%-90% confluent になるまで 培養した。つづいて PBS で洗浄後、分化誘導培地 hMSC Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation Medium で培養を行い、3 日おきに分化誘導培地を交換し、誘 導開始 3 週間後に Oil Red O 染色液で染色し観察を行った。

各 well を PBS で洗浄後、4% paraformaldehyde phosphate buffer solution を用いて 4°C 下で 60 分間浸漬した。PBS で洗浄後 60% 2-propanol で 1 分間浸漬し、Oil Red O 染色液 を用いて室温下で 20 分間浸漬した。60% 2-propanol で洗浄後、PBS で洗浄を行い、PBS を浸漬した well を光学顕微鏡 IX70 (Olympus, Tokyo, Japan)で観察した。

※Oil Red O 染色液作製

Oil Red O 75 mg を 25 ml の 100% 2-propanol に溶解し、distilled water を用いて 60%濃度 に希釈し作製した。

2-2 骨分化誘導

| 試薬及び材料 | |
|---|---------------------------------|
| Alizarin Red S | (Sigma-Aldrich) |
| FBS | (Life Technologies) |
| hMSC Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Diffe | erentiation Medium (Lonza) |
| MEM-alpha | (Life Technologies) |
| PBS | (Life Technologies) |
| penicillin | (Wako Pure Chemical Industries) |
| streptomycin | (Wako Pure Chemical Industries) |
| 2-propanol | (Wako Pure Chemical Industries) |
| 4% paraformaldehyde phosphate buffer solution | (Wako Pure Chemical Industries) |

4 継代目の AMSC を 6-well plate に播種し、10% FBS・penicillin (100 U/ml)・ streptomycin (100 mg/ml)を添加した MEM-alpha を用いて 80%-90% confluent になるま で培養し、その後 PBS で洗浄後、分化誘導培地 hMSC Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium で培養を行った。3 日おきに分化誘導培地を交換し、誘導開始 2 週間後に Alizarin Red S 染色液で染色し観察を行った。

各 well を PBS で洗浄後、4% paraformaldehyde phosphate buffer solution を用いて 4℃ 下で 30 分間浸漬した。PBS で洗浄後、Alizarin Red S 染色液を用いて室温下で 10 分間浸 漬した。PBS で洗浄を行い、PBS を浸漬した well を光学顕微鏡 IX70 で観察した。

※Alizarin Red S 染色液作製

Alizarin Red S 3.5 g を distilled water 25 ml に溶解し、1,500rpm で 3 分間遠心後、その上清 を回収し作製した。

3. Flow Cytometry 法によるヒト羊膜由来間葉系幹細胞の表面抗原解析

緩衝液の組成 FACS Buffer 0.5% BSA+0.05% NaN₃/PBS (-) 試薬及び材料 0.5% trypsin-EDTA (Life Technologies) FBS (Life Technologies) (Life Technologies) MEM-alpha (Life Technologies) PBS penicillin (Wako Pure Chemical Industries) streptomycin (Wako Pure Chemical Industries) 抗体 APC mouse anti-human CD73 抗体 (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) FITC mouse anti-human CD90 抗体 (BD) PE mouse anti-human CD44 抗体 (BD) PerCP-Cy5.5 mouse anti-human CD105 抗体 (BD) PE hMSC negative cocktail (BD) CD34 PE CD11b PE CD19 PE CD45 PE HLA-DR PE

hAMSC を培養している培養皿を PBS で洗浄し、0.5% trypsin-EDTA を添加し、37℃ 下で3分間 incubate した。続いて、trypsin を不活性化させるために 10% FBS・penicillin (100 U/ml)・streptomycin (100 mg/ml)を添加した MEM-alpha を加え、その懸濁液を 1,500 rpm で3分間遠心し、上清を吸引除去し FACS buffer で洗浄した。濃度が 1× 10⁷ cells/ml になるよう FACS buffer で調整し、microtube に 100 µl ずつ分注した。抗体を各 microtube に加え、室温、暗条件で 30 分間培養した後、FACS buffer 500 µl で 2 度洗浄し、FACS buffer 300 µl で再懸濁し、flow cytometer (FACS Canto II, BD)を用いて解析した。

上記抗体を以下の希釈濃度で使用した。

CD73 (dilution, 1:20)

CD90 (dilution, 1:20)

CD44 (dilution, 1:20)

CD105 (dilution, 1:20)

negative cocktail (dilution, 1:5)

MSC の基準 (抜粋)³⁹

| 1 | Adherence to plastic in standard culture conditions | | |
|---|---|--------------------------|-------------------------|
| 2 | Phenotype | Positive $(\geq 95\% +)$ | Negative $(\leq 2\% +)$ |
| | | CD105 | CD45 |
| | | CD73 | CD34 |
| | | CD90 | CD14 or CD11b |
| | | | CD79a or CD19 |
| | | | HLA-DR |

3 *In vitro* differentiation: osteoblasts, adipocytes, chondroblasts (demonstrated by staining of *in vitro* cell culture)

| 4. ヒト羊膜由来間葉系幹細胞由来培養上清ゲル | の作成 |
|-------------------------|---------------------------------|
| 試薬及び材料 | |
| FBS | (Life Technologies) |
| MEM-alpha | (Life Technologies) |
| PBS | (Life Technologies) |
| penicillin | (Wako Pure Chemical Industries) |
| streptomycin | (Wako Pure Chemical Industries) |
| carboxymethyl cellulose | (Wako Pure Chemical Industries) |

10% FBS・penicillin(100 U/ml)・streptomycin(100 µg/ml)を添加した MEM-alpha を用い て、hAMSC を 15 cm uncoated plastic dish に播種し、室温 37°C・湿度 95%・5%二酸化炭素 濃度下で培養を行った。80%コンフルエントの状態まで培養した時点で、上清を除去 し PBS で 2 度洗浄後、無血清の MEM-alpha を用いて室温 37°C・湿度 95%・5%二酸化炭 素濃度下で 48 時間培養し、回収したものを hAMSC-CM とした。

っづいて hAMSC-CM のゲル化を行った。回収した hAMSC-CM は使用されるまで -80°C で保存され、使用時に解凍し carboxymethyl cellulose を加え 2%濃度のゲルとして 用いた。ゲル化された hAMSC 由来培養上清を hAMSC-CM gel とし実験に用いた。

また、MEM-alpha 20 ml のみを室温 37℃・湿度 95%・5%二酸化炭素濃度下で 48 時間 保存したものを Standard Medium(SM)として回収し、hAMSC-CM gel 同様に carboxymethyl cellulose を加えて 2%濃度のゲルとし SM gel として実験に用いた。

5. 動物

以下の実験動物を購入し、実験に用いた。

10 週齢雄 SD ラット

(Japan SLC, Hamamatsu, Japan)

実験プロトコールは「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に則り、北 海道大学動物実験委員会の承認を得た。

SD ラットを室温24℃に維持された、12時間明期-12時間暗期の明暗サイクルの飼育 環境のもと不断給餌下で、1 ケージあたり3 匹のラットを飼育した。

6. TNBS 誘発腸炎ラットモデルの作製

試薬及び材料TNBS(Wako Pure Chemical Industrues, Osaka, Japan)Ethanol(Wako Pure Chemical Industrues, Osaka, Japan)経口投与チューブ(Natsume Seisakusho Co LTD, Tokyo, Japan)

Day0 に麻酔下で外径約 10 mm のテフロン製動物用経口投与チューブを肛門から結 腸内に約8 cm 挿入し、頭部を下に吊り下げた状態にした。チューブから TNBS 45 mg/kg を 30% Ethanol (ETH) 200 μl に溶解したものを投与し 10 秒間その状態を保ったのちに、 仰向けに寝かせ腸炎モデルラットを作製した。TNBS の投与量と Ethanol の投与濃度は 過去の報告^{40,41}と、事前実験結果をもとに TNBS 45 mg/kg, 30% Ethanol 200 μl とした。

・TNBS 誘発腸炎作製の流れ



<TNBS 投与量と Ethanol 投与濃度の調整>

TNBS (30mg/kg, 45mg/kg)と Ethanol(30%, 40%, 50%)を合計6種類の掛け合わせで溶解 し経肛門的に投与した。連日の体重測定を行い、投与1週間後に採血と腸管の採取を 行った後、屠殺した。体重変化率の推移と採取腸管の RNA 抽出、逆転写、定量的 RT-PCR を行い TNF-αの mRNA 発現量を比較した(10. ラット腸管からの RNA 抽出、 逆転写、定量的 RT-PCR の項目を参照)。

・プロトコール

 ① TNBS 30mg/kg + 30% ETH
 ④ TNBS 45mg/kg + 30% ETH

 ② TNBS 30mg/kg + 40% ETH
 ⑤ TNBS 45mg/kg + 40% ETH

 ③ TNBS 30mg/kg + 50% ETH
 ⑥ TNBS 45mg/kg + 50% ETH

(each: n=4)



体重変化率の推移



・mRNA 発現量(TNF-α)



7. TNBS 誘発腸炎ラットモデルを用いた実験プロトコール

7-1

hAMSC 経静脈的投与による治療効果の検討

ラットを以下3群に分けて検討を行った。

- ① Control 群: TNBS 投与は行わず、陰茎静脈より PBS 200 µl のみを投与した(n=6)。
- ② TNBS 群: TNBS 投与3時間後に陰茎静脈よりPBS 200 µl を投与した(n=9)。
- ③ TNBS + hAMSCs 群: TNBS 投与3時間後に陰茎静脈より hAMSC 1.0×10⁶ 個を浮 遊させた PBS 200 µl を投与した(n=9)。

Day7 に全てのラットの内視鏡による結腸観察および採血と腸管の採取を行い屠殺した。

・プロトコール



7-2

hAMSC-CM gel の経肛門的投与による治療効果の検討

ラットを以下3群に分けて検討を行った。

- ① Control 群 (n=6)
- ② TNBS + SM gel 群: TNBS 投与3時間後、Day1 および Day2 に肛門から SM gel 400 µl を投与した。(n=9)
- ③ TNBS + CM gel 群: TNBS 投与3時間後、Day1 および Day2 に肛門から hAMSC-CM gel 400 µl を投与した。(n=9)

Day7 に全てのラットの内視鏡による結腸観察および採血と腸管の採取を行い屠殺 した (下図)。

・プロトコール



8. ラット腸管の内視鏡的評価

内視鏡システム

AVS 最細内視鏡システム (1.6 mm in diameter; Tesala, AVS, Tokyo, Japan)

試薬及び材料

クリスタルバイオレット

(Wako Pure Chemical Industries)

プロトコールに則り、すべてのラットを Day7 に麻酔下で開腹した後、内視鏡を経 肛門的に挿入し結腸内を観察した。結腸粘膜の障害の程度は過去の報告を用いて評価 した⁴²。また、内視鏡観察時に最も粘膜障害を認めた腸管部位に腸管切除時の目印と してクリスタルバイオレットを用いて漿膜側を染色した。(9. ラット腸管の病理組織 学的評価参照)

<内視鏡スコア⁴²>

| Parameters | 0 (absent) | 1 (present) |
|---------------------------------|---------------|----------------|
| Changes of the vascular pattern | | |
| Mucosal granularity | | |
| Strictures | | |
| Bleeding | | |
| Ulcers | | |
| Total | | |

9. ラット腸管の病理組織学的評価
9-1. HE 染色
試薬及び材料
formaldehyde saline
HE
PBS

(Wako Pure Chemical Industries)(Wako Pure Chemical Industries)(Life Technologies)

プロトコールに則り、全てのラットを Day7 に屠殺し、内視鏡観察時に最も粘膜障害 を認めた腸管部位 (クリスタルバイオレット染色で目印されている部位)の前後 1.5cm ずつの腸管を 3cm 切離し、それを垂直方向に切開し PBS で洗浄した。ゴム板を伸展板 として腸管を不錆針を用いて伸展・固定した。その検体を 40 g/l formaldehyde saline で固 定、paraffin で包埋し、薄切し5 μ m厚の切片を作成した。HE を用いて染色後、independent observer に病理組織学的評価を依頼した。評価方法は過去の報告を用いて、腸炎の程度 を評価した ⁴³。

・内視鏡観察から腸管切除までの流れ



・病理スコア(抜粋)43

| Grade of colitits | Microscopic findings |
|-------------------|---|
| 0 | Histological findings identical to normal |
| | rats |
| 1 | Mild mucosal and/or submucosal |
| | inflammatory infiltrate (admixture of |
| | neutrophils) and oedema. Punctate mucosal |
| | erosions often associated with capillary |
| | proliferation. Muscularis mucosae intact. |
| 2 | Grade 1 changes involving 50% of the |
| | specimen. |
| 3 | Prominent inflammatory infiltrate and |
| | oedema (neutrophils usually |
| | predominating) frequently with deeper |
| | areas of ulceration extending through the |
| | muscularis mucosae into the submucosa. |
| | Rare inflammatory cells invading the |
| | muscularis propriae but without muscle |
| | necrosis. |
| 4 | Grade 3 changes involving 50% of the specimen |
| 5 | Extensive ulceration with coagulative |
| - | necrosis bordered inferiorly by numerous |
| | neutrophils and lesser numbers of |
| | mononuclear cells. Necrosis extends deeply |
| | into the muscularis propria |
| 6 | Grade 5 changes involving 50% of the |
| | specimen. |

9-2. 免疫染色

抗体

anti-rat CD68 monoclonal antibody

anti-rat CD3 antibody

anti-rat myeloperoxidase antibody

(AbD Serotec, Kidlington, United Kingdom) (BD) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

マクロファージ、好中球、T リンパ球の腸管への浸潤を評価するために免疫染色を 行った。腸管の未染切片を上記試薬で浸し40分間静置して染色した。

CD68は単球/マクロファージの、CD3はTリンパ球の代表的な表面マーカーである。 MPOは好中球に多く存在する蛋白の一つとして知られている。

光学顕微鏡 BX50 (Olympus)を用いて、検体 1 つあたり low power field で 10 視野中の 陽性細胞浸潤数を計測した。

各試薬は以下希釈濃度で使用した。

CD68 (dilution, 1:5)

CD3 (dilution, 1:50)

myeloperoxidase (dilution, 1:300)

10. ラット腸管からの RNA 抽出、逆転写、定量的 RT-PCR

試薬及び材料2-mercaptoethanol(Wako Pure Chemical Industries)PBS(Life Technologies)Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)QuantiTect Reverse Transcription Kit(Qiagen)RNase free water(Millipore, Bedford, MA, USA)

RNase free water RNeasy Mini Kit

(Qiagen, Hilden, Germany)

RNA 用の検体として、伸展板に固定したラット腸管の一部をメスで切離し、採取した。

・RNA の抽出

RNeasy Mini Kit を用いて以下の方法で行った。

- 検体を PBS で洗浄し、Buffer RLT 600 µl・2-mercaptoethanol 6 µl・5.0 mm ジルコニア ビーズを加えた 2.0 ml 破砕用 tube に検体を入れる。ビーズクラッシャー(µT-01, TITEC, Koshigaya, Japan)にて 60 秒間腸管組織を破砕した。
- 破砕した組織を、15,000rpm で 3 分間遠心する。上清を microtube に移し、70%
 ethanol 600 μl を加えピペッティングにより混和した。
- 700 μl のサンプルを 2 ml collection tube 中にセットした RNeasy スピンカラムにア プライし、8,000g で 15 秒間遠心し、ろ液を廃棄した。
- 700 μl の Buffer RW1 を RNeasy スピンカラムに添加し、8,000g で 15 秒間遠心し、 ろ液を廃棄した。
- 5. 500 µl の Buffer RPE を RNeasy スピンカラムに添加し 8,000g で 15 秒間遠心し、ろ 液を廃棄し、同作業を計 2 度行った。
- RNeasy スピンカラムを新しい microtube にセット後、40 μl の RNase free water を直接スピンカラム・メンブレンに添加し、8,000g で1分間遠心し、RNA を含む溶出液を回収した。

濃度測定は、分光高度計(Nano Drop 2000, Thermo Scientific)を用いて行った。

・逆転写

QuantiTect Reverse Transcription Kit を用いて以下手法にて行った。

まず、gDNA Wipeout Buffer 4 μl·RNA サンプル 2 μg·RNase free water がトータル 28 μl になるように調整し、42°C で 2 分間インキュベートし、氷上で冷却した。

次に、Quantiscript Reverse Transcriptase 2 µl·Quantiscript RT Buffer 8 µl·RT Primer Mix 2µl を加え、42°C で 2 分間インキュベートを行い、つづいて 95°C で 3 分間インキュベート し Quantiscript Reverse Transcriptase の不活性化を行った。200 µl microcentrifuge tube に、 Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX 25 µl·Forward primer 1 µl·Reverse primer 1 µl·total RNA 1 µg を加え、トータル 50 µl になるよう RNase free water で調整し た。50°C 2 分間、95°C 2 分間の後、95 °C 15 秒間・60°C 30 秒間を 40 サイクルの条件にて、 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて定量的 RT-PCR を行った。

遺伝子発現レベルはβ-actin を内在性コントロールとして用いて、comparative threshold cycle (ddCt) method で計算した。データは Sequence Detection Systems software (Applied Biosystems)を用いて解析した。使用した primer は全て Qiagen 社より以下を購入した。

| β-actin | Rn_Actb_1_SG QuantiTect Primer Assay |
|---------|---------------------------------------|
| TNF-α | Rn_Tnf_1_SG QuantiTect Primer Assay |
| CCL2 | Rn_Ccl2_1_SG QuantiTect Primer Assay |
| CXCL-1 | Rn_Cxcl1_1_SG QuantiTect Primer Assay |

11. 統計的解析

データは平均値と標準誤差で表した。グループ間のパラメーターは、一元配置分散 分析(one-way ANOVA)で群間の有意差の有無を検討し、Newman–Keuls method により それぞれの群間の差を検定した。体重の推移に関しては、二元配置分散分析(two-way ANOVA)にて検討した。

p<0.05を統計的有意差があると判断した。

結果

1.1 hAMSCs の多分化能の証明

脂肪細胞・骨細胞への分化誘導を行い、hAMSCの多分化能を評価した。

脂肪分化誘導を行った結果、小円形の脂肪滴を hAMSC の細胞膜内に認めた。続いて、Oil Red O 染色を行い、この胞体は赤色に染色された。よって、hAMSC が脂肪細胞へ分化誘導されたことが確認された。

骨分化誘導を行った結果、細胞外基質の分泌や石灰沈着が hAMSC の周囲に出現した。続いて、Alizarin Red S 染色を行った結果、これらが橙色に染色された。よって、 hAMSC が骨細胞へ分化誘導されたことが確認された。

Figure 1 hAMSCs の多分化能の証明

脂肪細胞への分化は Oil Red O で染色される脂肪滴の出現により確認された(左図)。 Scale bar は 500 μm を示す。

骨細胞への分化は Alizarin Red S で染色される石灰沈着の出現により確認された(右 図)。 Scale bar は 200 μm を示す。

 Adipocytes
 Osteocytes

1.2 細胞表面抗原の解析

MSC の基準は国際細胞治療学会より提唱されている。基準に従い Flow cytometer を 用いて hAMSCs の細胞表面抗原を解析した。

hAMSCs は MSC の陽性マーカーである CD44、CD73、CD90、CD105 の発現を認めた。また、陰性マーカーである CD34、CD11b、CD19、CD45、HLA-DR を発現していなかった。

Figure 2 細胞表面抗原の解析

hAMSCs の細胞表面抗原を Flow cytometry 法にて解析した。

MSC の陽性マーカーである CD44、CD73、CD90、CD105 の発現を認め、陰性マー カーである CD11b、CD19、CD34、CD45、HLA-DR の発現は認めなかった。

Closed area は特異抗体で染色されたものを、Open area は isotype control の抗体で染色されたものを示す。



2 hAMSCs 経静脈的投与による治療効果の結果

2.1 体重の推移

体重は連日測定し評価した。TNBS 群では Day2 まで体重の減少を認め、その後増 加を認めた。TNBS + hAMSCs 群では Day1 まで体重の減少を認めたが、その後改善し、 Day7 には TNBS 群より有意差をもって体重の増加を認めた (Figure 2)。

Figure 3 hAMSCs 投与後の腸炎ラットの体重の推移

体重は連日測定された。Day7 に TNBS + hAMSCs 群は TNBS 群と比較し、有意差を もって体重の増加を認めた。統計値は平均値 ± 標準誤差で示した。

*: p < 0.05 versus TNBS 群



2.2 内視鏡的評価

すべてのラットを Day7 に麻酔下で開腹した後、内視鏡を経肛門的に挿入し結腸内 を観察した。

TNBS 群では狭窄を伴う全周性の潰瘍を認めたが、TNBS + hAMSCs 群では狭窄は認めず浅い潰瘍が多かった (Figure 4A)。内視鏡スコアでの評価では、TNBS + hAMSCs 群は TNBS 群より有意差をもってスコアの改善を認めた (Figure 4B)。

Figure 4 A hAMSCs 投与後の結腸の内視鏡像

TNBS 群では狭窄を伴う全周性の潰瘍を認めたが、TNBS + hAMSCs 群では浅い潰瘍 を認めるのみで狭窄は認めなかった。



TNBS

TNBS+hAMSCs

Figure 4 B hAMSCs 投与後の結腸の内視鏡学的評価

内視鏡スコアでの評価では、TNBS + hAMSCs 群は TNBS 群より有意差をもってス コアの改善を認めた。統計値は平均値 ± 標準誤差で示した。

**: p < 0.01 versus TNBS 群

^{††}: p < 0.01 versus Control 群



2.3 ラット腸管の病理学的評価

HE 染色では、TNBS 群では潰瘍形成、炎症細胞浸潤、腺窩の消失、筋層の肥厚、粘膜下層での出血を認め(Figure 5A)、TNBS + hAMSCs 群と比較して、非常に高度な炎症を認めた。Histological score では、TNBS + hAMSCs 群は TNBS 群と比較してスコアの改善を認めた。

免疫染色では抗 myeroperoxidase (MPO)抗体、CD68 モノクローナル抗体、抗 CD3 モ ノクローナル抗体を用いて検討した。MPO 陽性好中球、CD68 陽性単球/マクロファー ジ、CD3 陽性 T リンパ球の組織への浸潤細胞数を測定したところ、TNBS + hAMSCs 群では TNBS 群と比較して、CD68 陽性単球/マクロファージと MPO 陽性好中球の細 胞数は有意に低下していた(Figure 5B, 5C)。有意差は認めないものの CD3 陽性 T リン パ球の細胞数は低くなる傾向であった(Figure 5D)。

Figure 5 A

ラット腸管のパラフィン切片を HE 染色し、Histrological Score で評価した。hAMSCs 投与群は、TNBS 群と比較して、Histrological Score はやや改善傾向を示した。 low power field で撮影した。Scale bar は 100 μm を表す。 統計値は平均値 ± 標準誤差で示した。

^{††}: p < 0.01 versus Control 群



TNBS + hAMSCs





Figure 5 B

抗 MPO 抗体を用いて染色した。MPO 陽性好中球の組織への浸潤細胞数を測定した ところ、hAMSCs 投与群では、TNBS 群と比較して、有意に低下していた。 low power field で撮影した。Scale bar は 100 µm を表す。 統計値は平均値 ± 標準誤差で示した。 ***:p<0.01 versus TNBS 群 ^{††}:p<0.01 versus Control 群

Control

TNBS



TNBS + hAMSCs

Figure 5 C

抗 CD68 モノクローナル抗体を用いて染色した。CD68 陽性単球/マクロファージの 組織への浸潤細胞数を測定したところ、hAMSCs 投与群では、TNBS 群と比較して、 有意に低下していた。

low power field で撮影した。Scale bar は 100 µm を表す。

統計値は平均値 ± 標準誤差で示した。

*:p<0.05 versus TNBS 群

^{††}: p < 0.01 versus Control 群

Control

TNBS



TNBS + hAMSCs



Figure 5 D

抗 CD3 抗体を用いて染色した。CD3 陽性 T リンパ球の組織への浸潤細胞数を測定 したところ、hAMSCs 投与群では TNBS 群と比較して、やや少ないが大きな差は認め なかった。

low power field で撮影した。Scale bar は 100 μm を表す。 統計値は平均値 ± 標準誤差で示した。

[†]: p < 0.05 versus Control 群

Control

TNBS



TNBS + hAMSCs



TNBS 群では TNF-a、CXCL1、CCL2、IL-6 といった inflammatory mediator の発現が 上昇していた(Figure 6)。

hAMSCs 投与群では TNBS 群と比較して、TNF-α、CXCL1、CCL2、IL-6 の発現が 抑制されていた(Figure 6)。

Figure 6

hAMSCs 投与の効果を、ラット腸管における inflammatory mediator の mRNA 発現量 にて各群で比較検討した。

TNBS 群では TNF-α、CXCL1、CCL2、IL-6 といった inflammatory mediator の発現が 上昇していた。hAMSCs 投与群では TNBS と比較して、TNF-α、CXCL1、CCL2、IL-6 の発現が抑制される傾向を示した。統計値は平均値 ± 標準誤差で示した。



3 hAMSC-CM gel の経肛門投与による治療効果

<u>3.1 体重の推移</u>

体重は連日測定し評価した。TNBS + CM gel 群では Dayl に体重減少を認めるが、 Day2、3 では緩やかな体重の減少となり、その後増加を認めた。TNBS + SM gel 群で は Day2 まで体重の減少を認めたが、その後改善した。TNBS + CM gel 群と TNBS + SM gel 群は体重変化率の推移において差は認めなかった (Figure 7)。

Figure 7 hAMSC-CM gel 投与後の腸炎ラットの体重の推移

体重は連日測定された。TNBS + CM gel 群と TNBS + SM gel 群は体重減少では差は 認めなかった。統計値は平均値 ± 標準誤差で示した。



3.2 内視鏡的評価

すべてのラットを Day7 に麻酔下で開腹した後、内視鏡を経肛門的に挿入し結腸内 を観察した。

TNBS + SM gel 群では狭窄を伴う全周性の潰瘍や出血が観察され、TNBS + CM gel 群では出血は認めず、浅い潰瘍を認めるのみで狭窄はなかった (Figure 8 A)。内視鏡ス コアでの評価では、TNBS + CM gel 群は TNBS + SM gel 群より有意差をもってスコア の改善を認めた (Figure 8 B)。

Figure 8 A hAMSC-CM 投与後の結腸の内視鏡像

TNBS+SM gel 群では狭窄を伴う全周性の潰瘍や出血を観察された。TNBS+CM gel 群では出血は認めず、浅い潰瘍を認めるのみで狭窄は認めなかった。



Control

TNBS+SM gel

TNBS+CM gel

Figure 8 B hAMSC-CM 投与後の結腸の内視鏡学的評価

内視鏡スコアでの評価では、TNBS + CM gel 群は TNBS + SM gel 群より有意差をもってスコアの改善を認めた。統計値は平均値 ± 標準誤差で示した。

**: p < 0.01 versus TNBS 群

^{††}: p < 0.01 versus Control 群



4.3 ラット腸管の病理学的評価

HE 染色では、TNBS + SM gel 群では潰瘍形成、炎症細胞浸潤、腺窩の消失、筋層の 肥厚、粘膜下層での出血を認めた(Figure 9A)。TNBS + CM gel 群と比較して、非常に 高度な炎症を認めた。Histological score では、TNBS + CM gel 群は TNBS + SM gel 群と 比較して低下していた。

免疫染色では抗 myeroperoxidase (MPO)抗体、CD68 モノクローナル抗体、抗 CD3 モ ノクローナル抗体を用いて検討した。MPO 陽性好中球、CD68 陽性単球/マクロファー ジ、CD3 陽性 T リンパ球の組織への浸潤細胞数を測定したところ、TNBS + CM gel 群では TNBS + SM gel 群と比較して、CD68 陽性単球/マクロファージ、MPO 陽性好中 球と CD3 陽性 T リンパ球の細胞数は有意に低下していた(Figure 9B, C, D)。

Figure 9 A

ラット腸管のパラフィン切片を HE 染色し、Histological Score で評価した。TNBS + CM gel 群は、TNBS + SM gel 群と比較して、Histological Score は改善傾向を示した。 low power field で撮影した。Scale bar は 100 μm を表す。 統計値は平均値 ± 標準誤差で示した。

^{††}: p < 0.01 versus Control 群

Control

TNBS + SM gel





TNBS + CM gel



Figure 9 B

抗 MPO 抗体を用いて染色した。MPO 陽性好中球の組織への浸潤細胞数を測定したところ、TNBS + CM gel 群では TNBS + SM gel 群と比較して、有意に低下傾向を示した。

low power field で撮影した。Scale bar は 100 μm を表す。 統計値は平均値 ± 標準誤差で示した。 **: p < 0.01 versus TNBS + SM 群

^{††}: p < 0.01 versus Control 群

Control

TNBS + SM gel





Figure 9 C

抗 CD68 モノクローナル抗体を用いて染色した。CD68 陽性単球/マクロファージの 組織への浸潤細胞数を測定したところ、TNBS + CM gel 群では、TNBS + SM gel 群と 比較して、有意に低下していた。

low power field で撮影した。Scale bar は 100 µm を表す。

統計値は平均値 ± 標準誤差で示した。

**: p < 0.01 versus TNBS + SM 群

^{††}: p < 0.01 versus Control 群

ControlTNBS + SM gelImage: Distribution of the second of





Figure 9 D

抗 CD3 抗体を用いて染色した。CD3 陽性 T リンパ球の組織への浸潤細胞数を測定 したところ、TNBS + CM gel 群では、TNBS + SM gel 群と比較して、有意に低下して いた。low power field で撮影した。 Scale bar は 100 µm を表す。統計値は平均値 ± 標準誤差で示した。 ***:p<0.01 versus TNBS + SM 群

^{††}: p < 0.01 versus Control 群

Control

TNBS + SM gel



TNBS + CM gel



TNBS + SM gel 群では TNF-a、CXCL1、CCL2、IL-6 といった inflammatory mediator の発現が上昇していた(Figure 10)。

TNBS + CM gel 群では TNBS + SM gel 群と比較して、TNF-α、CXCL1、CCL2、IL-6 の発現が抑制されていた(Figure 10)。

Figure 10

hAMSC-CM gel の移植の効果を、ラット直腸における inflammatory mediator の mRNA 発現量にて各群で比較検討した。

TNBS + SM gel 群では TNF-α、CXCL1、CCL2、IL-6 といった inflammatory mediator の発現が上昇していた。TNBS + CM gel 投与群では TNBS と比較して、TNF-α、CXCL1、 CCL2、IL-6 の発現が抑制される傾向を示した。 統計値は平均値 ± 標準誤差で示した。





考察

TNBS 誘発腸炎ラットに対してのhAMSCs 経静脈的投与とhAMSC-CM gel 経肛門的 投与の治療効果を検討し、次の結果が得られた。(1) hAMSCs 経静脈的投与により、体 重の低下を抑制した。(2) hAMSCs 経静脈的投与により内視鏡スコアの改善、及び炎症 細胞浸潤の抑制を認めた。(3) hAMSC-CM gel 経肛門的投与により、内視鏡スコアの改 善、及び炎症細胞浸潤の抑制を認めた。

クローン病に近似したモデルとして知られる TNBS 誘発腸炎は、エタノールに溶解 した TNBS を結腸内に投与することで作製する。まずエタノールが腸管粘膜のバリア を破壊し、つづいて種々のタンパク質と非特異的に結合するハプテンである TNBS に よって免疫応答が生じ腸炎が発生するものと考えられている。よって、エタノールの 濃度と TNBS 投与量が作製される腸炎の程度に関与する。過去の報告ではエタノール 濃度が 30%~50%、TNBS 30mg/kg~45mg/kg と様々であるため^{40,41,44}、本研究では事 前実験としてこれらの組み合わせを用いて腸炎の程度を確認した。エタノール濃度が 40%や 50%の高濃度に TNBS 45mg/kg を掛け合わせると炎症が強すぎ腸管穿孔が発生 して死亡するラットが出現したため、最終的に TNF-αの mRNA 発現量と体重推移か ら判断し、30% エタノール 200 μl に TNBS 45 mg/kg を溶解したものを直腸内に投与 することで今回の実験に適切な炎症の程度の腸炎を作製した。また治療開始のタイミ ングとして TNBS 誘発腸炎の最も炎症が強く惹起される TNBS 投与3時間後とした⁴⁵。

本研究では、TNBS 誘発腸炎ラットに対する hAMSCs 経静脈的投与により好中球、 単球・マクロフージ、T リンパ球の数が抑制され、腸管における炎症性サイトカイン の発現も抑制されることを確認した。内視鏡的評価では、hAMSsC 投与群は潰瘍を認 めるものの非投与群より内視鏡スコアの改善を認めており、非投与群のような全周性 潰瘍による狭窄や出血などは認めなかった。また病理的評価でも hAMSCs 投与群のほ うが結腸の炎症が軽減されていた。

TNBS 誘発腸炎に対する骨髄由来・脂肪由来・臍帯由来 MSC の投与による腸炎改善効果は多数報告され、投与方法も経静脈的投与・腹腔内投与・経肛門的投与など様々である⁴⁶⁻⁴⁸。骨髄由来 MSC 投与が脂肪由来 MSC 投与よりも TNBS 誘発腸炎ギニアピッグモデルの腸管神経障害や神経叢炎を抑えるといった報告も認め⁴⁷、MSC のソースによっての違いも報告されているがいずれも腸炎の改善を認めている。

Yanfen らは骨髄由来 MSC を投与することにより TNBS 誘発腸炎モデルの Wnt シグ ナル経路が抑えられていることを報告しており、MSC 投与により抗炎症効果があるこ とを報告している⁴⁹。抗炎症作用の機序の一つとして、MSC が産生する様々な液性因 子の関与が考えられ、それらの効果により腸炎が抑制されているものと考えられてい る^{50,51}。Gholamrezanezhad らは¹¹¹In-oxine でラベリングされた骨髄由来 MSC を投与し たところ、肝臓や脾臓などの全身に拡散することを確認している ⁵²。本研究では、放射性腸炎ラットモデルに対して、経静脈的に投与した hAMSCs が肺に蓄積されることを確認したが、同時に直腸の腸炎を改善することを確認した ³⁷。つまり、hAMSCs による直接の影響だけでなく、hAMSCs が産生する液性因子が腸炎の改善に関与していることが考えられた。最近、prostaglandin E2 (PGE2)が MSC から産生されることが注目されている。PGE2 は炎症性 M1 macrophages を抗炎症性 M2 macrophages に再分極化させることから、MSC が産生する抗炎症作用の主な因子として報告されている ²⁸。 骨髄由来や臍帯由来の MSC が PGE2 を産生することが確認されており、M2 macrophages は免疫抑制機構をもつIL-10 サイトカインを放出することにより組織修復や抗炎症作用を認める ^{53,54}。我々のグループは過去に羊膜由来 MSC が他組織由来のものよりも PGE2 を多く産生することを確認しており、抗炎症作用が働いたことが考えられる ⁵⁵。

今回、hAMSC-CM gel の経肛門投与により、hAMSCs 経静脈的投与と同様に TNBS 誘発腸炎に対して腸炎抑制効果があることを我々は確認した。内視鏡的評価・病理学 的評価はともに改善傾向を示し、好中球、単球・マクロフージ、T リンパ球の数を抑 制し、腸管における炎症性サイトカインの発現を抑制した。MSC-CM は vascular endothelial growth factor (VEGF)、CCL2、また、basic fibroblast growth factor (bFGF)や hepatocyte growth factor (HGF)などのサイトカインを豊富に含んでいることが報告され ており、これらの関与によって腸炎が抑制されているものと考えられている 50。それ ぞれ、VEGF は腸管損傷に対する組織修復に⁵⁶、CCL2 は再生上皮の産生⁵⁷、bFGF は 組織修復、HGF は組織修復や再生を促すなどの効果が報告されている^{58,59}。また、 MSC-CM の投与方法として、経肛門、経静脈、経腹腔内投与と様々な方法が報告され ている。Robinson らは、TNBS 誘発腸炎に対して骨髄由来 MSC-CM の経肛門的1回投 与により腸炎改善効果があったと報告しており⁶⁰、Watanabe らは骨髄由来 MSC-CM の腹腔内投与が結腸の腸管神経叢を維持することにより、腸管神経障害や腸管機能障 害を緩和するとしている⁵⁰。本研究では hAMSC-CM gel を経肛門に投与した。経肛門 的投与は簡便で侵襲が少なく、実臨床でも5-アミノサリチル酸製剤やステロイドの注 腸が行われている点からも有用な方法と考える。また今回我々は腸管内に長時間付着 させるためにゲル化した CM を用いた。ゲル化 CM と通常 CM での効果の差について は、比較検討されたものがないため明らかではないが、ゲル作製は容易でかつ投与方 法も通常 CM と変わらないため今後 MSC-CM の投与方法の一つとしてさらなる検討 が望まれる。

本研究では MSC のソースとして羊膜を用いた。羊膜は卵膜から得られるが、卵膜 は通常帝王切開時に廃棄されるものであり、羊膜を得るための侵襲は発生しない点が 優れていると考える。また1gの羊膜から約1.9×10⁶個の MSC が採取することができ、 またそれらを3継代することにより1×10¹⁰ 個程度の大量のMSC 得ることができ、1 回の羊膜採取で大量の細胞が得られる点も大きな利点と考える。また、hAMSCs をス テロイド抵抗性のGVHDに対するhAMSCsを投与した結果では骨髄由来のMSC 投与 と同等の治療成績が得られており⁶¹、他組織由来のMSC と比較しても効果があるこ とがわかっている。骨髄や脂肪などから採取する場合は侵襲があることなども考慮す ると、羊膜はMSC 治療における今後期待できる細胞ソースと考えられ、さらなる検 討が望まれる。

TNBS 誘発腸炎ラットに対して、hAMSCs 経静脈的投与と hAMSC-CM gel 経肛門 的投与は腸炎の改善を認めた。hAMSCs は侵襲なく採取できることから、新しい治療 方法として今後様々な疾患に応用されることが期待される。

総括

本研究において、以下の知見が得られた。

- 1. hAMSC の経静脈的投与は、TNBS により誘発された腸炎ラットモデルにおいて、 体重低下を抑制する。
- hAMSCsの経静脈的投与は、TNBSにより誘発された腸炎ラットモデルにおいて、 内視鏡スコアを改善する。
- 3. hAMSCsの経静脈的投与は、TNBSにより誘発された腸炎ラットモデルにおいて、 炎症細胞浸潤を抑制する。
- 4. hAMSC-CM gel の経肛門的投与は、TNBS により誘発された腸炎ラットモデルにおいて、内視鏡スコアを改善する。
- 5. hAMSC-CM gel の経肛門的投与は、TNBS により誘発された腸炎ラットモデルにおいて、炎症細胞浸潤を抑制する。

本研究において、hAMSCのTNBS誘発腸炎ラットモデルに対する治療効果が示され、有用な細胞ソースであることが示された。現在、MSCを用いた研究では、様々な 組織から採取されたMSCが用いられているが、今回我々が用いた羊膜由来MSCは採 取時の侵襲もなく、また一度の採取で大量に細胞得ることが可能な点からも有用であり、今後再生医療材料としてさらなる検討が期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導・御助言をいただきました北海道大学大学院医 学研究科内科学講座消化器内科学分野 坂本直哉教授に深く感謝いたします。

研究する機会を与えていただいたこと、また研究に対する取り組み方から論文作成 まで、すべての面において御指導・御支援頂きました北海道大学大学院医学研究科内 科学講座消化器内科学分野 大西俊介准教授には感謝の念に堪えません。厚く御礼申 し上げます。

実験の開始にあたり、実験方法の検討から実地まですべての面でご指導いただきました、北海道大学大学院薬学研究院臨床病態解析学研究室 土谷郁貴君、北海道大学 大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野 大西礼造先生、細野秀崇特任助教に 深謝いたします。

最後に、本研究に尊い生命を提供して頂きました実験動物諸霊に深く感謝いたしま す。

2017年3月

宮本 秀一

引用文献

- 1 Burisch, J. & Munkholm, P. Inflammatory bowel disease epidemiology. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **29**, 357-362 (2013).
- 2 Baumgart, D. C. & Carding, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet (London, England)* **369**, 1627-1640 (2007).
- 3 Feagan, B. G., Vreeland, M. G., Larson, L. R. & Bala, M. V. Annual cost of care for Crohn's disease: a payor perspective. Am. J. Gastroenterol. 95, 1955-1960 (2000).
- 4 Podolsky, D. K. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* **347**, 417-429 (2002).
- 5 Kaplan, G. G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 720-727 (2015).
- 6 Honda, K. & Taniguchi, T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 644-658 (2006).
- 7 Nenci, A. *et al.* Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* **446**, 557-561 (2007).
- Philpott, D. J., Sorbara, M. T., Robertson, S. J., Croitoru, K. & Girardin, S.
 E. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 9-23 (2014).
- 9 Jostins, L. *et al.* Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* **491**, 119-124 (2012).
- 10 Louis, E. *et al.* Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut* **49**, 777-782 (2001).
- 11 Solberg, I. C. *et al.* Clinical course in crohn's disease: results of a Norwegian population-based ten-year follow-up study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 5, 1430-1438 (2007).
- 12 Tarrant, K. M., Barclay, M. L., Frampton, C. M. & Gearry, R. B. Perianal disease predicts changes in crohn's disease phenotype-results of a population-based study of inflammatory bowel disease phenotype. Am. J. Gastroenterol. 103, 3082-3093 (2008).

- Thia, K. T., Sandborn, W. J., Harmsen, W. S., Zinsmeister, A. R. & Loftus, E.
 V., Jr. Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. *Gastroenterology* 139, 1147-1155 (2010).
- Greenstein, A. J. *et al.* Perforating and non-perforating indications for repeated operations in crohn's disease: evidence for two clinical forms. *Gut* 29, 588-592 (1988).
- 15 Williams, J. G., Wong, W. D., Rothenberger, D. A. & Goldberg, S. M. Recurrence of crohn's disease after resection. *Br. J. Surg.* **78**, 10-19 (1991).
- 16 Ueno, F. et al. Evidence-based clinical practice guidelines for Crohn's disease, integrated with formal consensus of experts in Japan. J. Gastroenterol. 48, 31-72 (2013).
- 17 Sands, B. E. *et al.* A randomized, double-blind, sham-controlled study of granulocyte/monocyte apheresis for active ulcerative colitis. *Gastroenterology* **135**, 400-409 (2008).
- 18 Rutgeerts, P. *et al.* Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N. Engl. Med.* **353**, 2462-2476 (2005).
- 19 Derkx, B. *et al.* Tumour-necrosis-factor antibody treatment in crohn's disease. *Lancet (London, England)* (1993).
- 20 Hanauer, S. B. *et al.* Maintenance infliximab for crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet (London, England)* **359**, 1541-1549 (2002).
- 21 Rutgeerts, P., Van Assche, G. & Vermeire, S. Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **126**, 1593-1610 (2004).
- 22 Gisbert, J. P. & Panes, J. Loss of response and requirement of infliximab dose intensification in Crohn's disease: a review. Am. J. Gastroenterol. 104, 760-767 (2009).
- 23 Ben-Horin, S. & Chowers, Y. Review article: loss of response to anti-TNF treatments in Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **33**, 987-995, (2011).
- 24 Billioud, V., Sandborn, W. J. & Peyrin-Biroulet, L. Loss of response and need for adalimumab dose intensification in Crohn's disease: a systematic review. Am. J. Gastroenterol. 106, 674-684 (2011).
- 25 Duijvestein, M. et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal

stromal cell treatment for refractory luminal crohn's disease: results of a phase I study. *Gut* **59**, 1662-1669 (2010).

- 26 Liang, J. *et al.* Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in seven patients with refractory inflammatory bowel disease. *Gut* **61**, 468-469 (2012).
- 27 Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)* **284**, 143-147 (1999).
- 28 Le Blanc, K. & Mougiakakos, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 383-396 (2012).
- 29 Meirelles Lda, S., Fontes, A. M., Covas, D. T. & Caplan, A. I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* **20**, 419-427 (2009).
- 30 Doorn, J., Moll, G., Le Blanc, K., van Blitterswijk, C. & de Boer, J. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. *Tissue Eng. Part. B. Rev.* **18**, 101-115 (2012).
- 31 Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 726-736 (2008).
- 32 Wong, R. K., Hagg, E. U., Rabie, A. B. & Lau, D. W. Bone induction in clinical orthodontics: a review. *Int. J. Adult Orthodon. Orthognath. Surg.* 17, 140-149 (2002).
- 33 Stolzing, A. & Scutt, A. Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. *Aging Cell* 5, 213-224 (2006).
- 34 Alviano, F. *et al.* Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC developmental biology* **7**, 11 (2007).
- 35 In 't Anker, P. S. *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem cells* **22**, 1338-1345 (2004).
- 36 Onishi, R. *et al.* Human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates dextran sulfate sodium-induced severe colitis in rats. *Cell transplantation* **24**, 2601-2614 (2015).
- Ono, M. *et al.* Effects of human amnion-derived mesenchymal stromal cell transplantation in rats with radiation proctitis. *Cytotherapy* 17, 1545-1559 (2015).
- 38 Kubo, K. *et al.* Human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates liver fibrosis in rats. *Transplantation Direct* **1**,

1-9 (2015).

- 39 Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317 (2006).
- 40 Tomasello, G. *et al.* Validation of a modified model of TNBS-induced colitis in rats. How to induce a chemical colitis in rats. *Acta Biomed* **86**, 92-96 (2015).
- 41 Reinshagen, M. *et al.* Protective role of neurotrophins in experimental inflammation of the rat gut. *Gastroenterology* **119**, 368-376 (2000).
- 42 Castelo-Branco, M. T. *et al.* Intraperitoneal but not intravenous cryopreserved mesenchymal stromal cells home to the inflamed colon and ameliorate experimental colitis. *PloS one* **7**, e33360 (2012).
- 43 Ameho, C. K. *et al.* Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut* **41**, 487-493 (1997).
- 44 Tang, Y. *et al.* Combinatorial intervention with mesenchymal stem cells and granulocyte colony-stimulating factor in a rat model of ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* **60**, 1948-1957 (2015).
- 45 Pontell, L. *et al.* Structural changes in the epithelium of the small intestine and immune cell infiltration of enteric ganglia following acute mucosal damage and local inflammation. *Virchows Arch.* **455**, 55-65 (2009).
- 46 Liang, L. *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate mice trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis. *Cell transplantation* **20**, 1395-1408 (2011).
- 47 Stavely, R. *et al.* Human adult stem cells derived from adipose tissue and bone marrow attenuate enteric neuropathy in the guinea-pig model of acute colitis. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 244 (2015).
- 48 Xie, M. *et al.* Comparison of adipose-derived and bone marrow mesenchymal stromal cells in a murine model of crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* (2016).
- 49 Xing, Y. *et al.* Expression of Wnt and Notch signaling pathways in inflammatory bowel disease treated with mesenchymal stem cell transplantation: evaluation in a rat model. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 101 (2015).

- 50 Watanabe, S. *et al.* Conditioned mesenchymal stem cells produce pleiotropic gut trophic factors. *J. Gastroenterol.* **49**, 270-282 (2014).
- 51 Kim, S. Y. *et al.* Mesenchymal stem cell-conditioned media recovers lung fibroblasts from cigarette smoke-induced damage. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **302**, L891-908 (2012).
- 52 Gholamrezanezhad, A. *et al.* In vivo tracking of 111In-oxine labeled mesenchymal stem cells following infusion in patients with advanced cirrhosis. *Nucl. Med. Biol.* **38**, 961-967 (2011).
- 53 Nemeth, K. *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat. Med.* **15**, 42-49 (2009).
- 54 Ji, Y. R. *et al.* Mesenchymal stem cells support proliferation and terminal differentiation of B cells. *Cell Physiol. Biochem.* **30**, 1526-1537 (2012).
- 55 Yamahara, K. *et al.* Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. *PloS one* **9**, e88319 (2014).
- 56 Ando, Y. *et al.* Subcutaneous adipose tissue-derived stem cells facilitate colonic mucosal recovery from 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in rats. *Inflamm. Bowel. Dis.* **14**, 826-838 (2008).
- 57 Low, Q. E. *et al.* Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. *Am. J. Pathol.* 159, 457-463 (2001).
- 58 Danieli, P. *et al.* Conditioned medium from human amniotic mesenchymal stromal cells limits infarct size and enhances angiogenesis. *Stem Cells Transl. Med.* **4**, 448-458 (2015).
- 59 Kim, H. G. & Choi, O. H. Neovascularization in a mouse model via stem cells derived from human fetal amniotic membranes. *Heart Vessels* 26, 196-205 (2011).
- 60 Robinson, A. M. *et al.* Mesenchymal stem cells and conditioned medium avert enteric neuropathy and colon dysfunction in guinea pig TNBS-induced colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **307**, G1115-1129 (2014).
- 61 Ringden, O. *et al.* Fetal membrane cells for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Stem cells* **31**, 592-601 (2013).