HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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［全文の要約］
Author(s)	大西, 礼造
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。　配架番号：2136 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11654号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59015
Type	doctoral thesis
File Information	Reizo_Onishi_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文（要約）

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)

2015 年 3 月

北 海 道 大 学

大 西 礼 造

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 ····· 7 頁
実験結果 ····· 25 頁
考察 ····· 33 頁
総括 ····· 36 頁

謝辞 ····· 37 頁
引用文献 ····· 38 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学会に発表した

1. 大西礼造、大西俊介、東亮佑、山原研一、渡利道子、小林和夏、桂田武彦、武田宏司、坂本直哉
ラット dextran sulfate sodium 誘発腸炎モデルに対するヒト卵膜由来間葉系幹細胞投与の効果
第 12 回日本再生医療学会総会
2013 年 3 月 21 日~3 月 23 日　パシフィコ横浜(横浜市)

2. Reizo Onishi, Shunsuke Ohnishi, Ryosuke Higashi, Michiko Watari, Waka Kobayashi, Takehiko Katsurada, Hiroshi Takeda, Naoya Sakamoto
Transplantation of human fetal membrane-derived mesenchymal stem cell ameliorates dextran sulfate sodium-induced severe colitis in rats
Digestive Disease Week 2013
2013/5/18~5/21 Orlando, Florida, USA

3. 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
2014 年 10 月 3 日~10 月 4 日　京都大学構内(京都市)

緒　言

近年、臓器障害の修復や、難治性疾患に対する再生医療が世界中で注目されるようになってきており、その中で幹細胞を用いた細胞治療は新規の治療として期待されている。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、間葉系幹細胞(MSC; mesenchymal stem cell)は新しい再生医療材料としてよく知られた存在である。MSC は非造血系の未分化細胞であり、自己複製能を有し、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞といった系統への分化能を持った体性幹細胞であり [1,2]、骨髄や脂肪組織に存在する間葉系幹細胞は有用な細胞ソースとして様々な研究がなされている [3,4]。MSC はその多分化能から、組織再生療法への応用を期待され、国内外で臨床研究が盛んに行われているが、最近では増殖因子や抗炎症因子の産生によって障害を受けた組織の再生を促す能力にも注目が集まっている [5,6,7]。

MSC は間葉系組織に存在していると考えられており [2]、再生医療材料としては骨髄由来 MSC が多用されている。しかしながら、骨髄採取を行う場合、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。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 [8,9]、ドナーが高齢であった場合や、また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く、細胞治療において障害となる可能性がある。これらの問題点は脂肪細胞由来 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。胎児を包む卵膜は、羊膜と絨毛膜から構成されている。受精後着床した胚盤胞に含まれる内部細胞塊に由来する羊膜芽細胞から羊膜は形成される [10]。ヒト羊膜には非常に豊富な MSC が含まれていることが知られ [11,12]、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。さらに羊膜は造血細胞や血管が少なく細胞成分が均一であり、膜状構造であるため酵素を用いて容易に MSC を分離出来るメリットを持つ。よって羊膜は新たな細胞ソースとして期待されている。実際、羊膜由来 MSC (AMSC; amnion-derived MSC)は、下肢虚血モデル [13]、心筋炎モデル [14,15]、糸球体腎炎モデル [16]、腎虚血再灌流障害モデル [17] など、様々な疾患のラットモデルにおいて、血管新生促進や抗炎症効果を発揮することで病態を改善させることが明らかとなってきた。

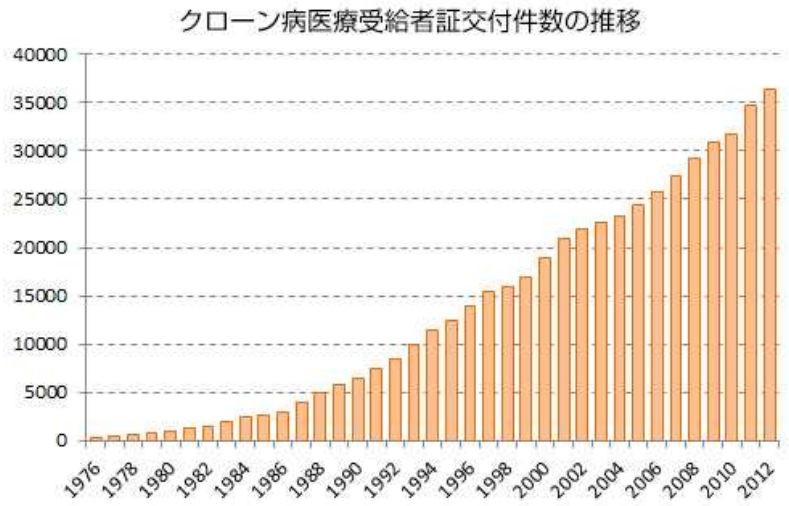
本研究では、炎症性腸疾患を治療対象疾患として想定し、とりわけクローン病に注目した。

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 [18-20]。歴史的には、潰瘍性大腸炎は 1875

年、英国の Wilks らによる報告が初めとされ、本邦では 1928 年に報告された[21]。クローン病は 1932 年に米国の Crohn らにより報告され、本邦では 1970 年代以降急激に増加してきた。潰瘍性大腸炎は 1975 年、クローン病は 1976 年より難病として厚生労働省の特定疾患治療研究対象に指定されている。

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[22]。病態は消化管に限らず関節症状や皮膚症状、眼症状、難病である原発性硬化性胆管炎を合併することが知られている。これまでクローン病の原因として様々なものが考えられてきたが、常在菌に対する自然免疫の制御機構の破綻が大きく関わっていると想定され、腸内細菌抗原による Toll-like receptor を介した慢性的な刺激や、機能喪失型の nucleotide-binding-oligomerisation-domain の変異、TH17 細胞の過剰誘導などが関与していると考えられている[23]。若年層での発症が顕著で、欧米先進国での患者数が圧倒的に多い疾患であったが、稀な疾患として認識していた本邦においても増加の一途をたどっている。

＜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



クローン病の治療は、mesalazine の内服のほか、重症度に合わせて prednisone、azathioprine、methotrexate、mercaptopurine といった免疫調整薬を用いて治療することが一般的である[24]。栄養療法の有効性も報告され、重要な治療の一環として位置づけられている[25-27]。さらに TNF inhibitor が登場し、クローン病治療は劇的に変化した。キメラ型抗 TNF-α抗体は、1999 年に米国で承認され、2002 年には本邦において承認された抗体医薬品であり、現在では完全ヒト型抗 TNF-α抗体も開発され、多くの IBD 患者に使用されている。この抗 TNF-α抗体を使用した数々の臨床試験では、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[28-31]、抗体療法の登場によって治療が大きく変化した。しかしながら、抗 TNF-α抗体を用いた寛解導入療法は、約 1/3 の患者に対して奏功しないとの報告があり[32]、たとえ寛解導入に至っても、その患者の約 30～50%が維持療法継続中に効果減弱をきたすといった問題も存在する[33-35]。現行の治療に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が必要とされる[24]。したがって、現在の限られた治療薬の中で効果を最大限持続させる投与法の検討だけでなく、新規治療薬の開発が模索されている。

最近、重症でかつ上記治療に抵抗性のクローン病患者に対する、自己の MSC や健常人から提供を受けた同種の MSC を用いた細胞治療の成果が数多く報告され[36,37]、奏功した患者は外科的治療の回避や臨床症状の改善が確認されている。

＜クローン病に対して行われている間葉系幹細胞を用いた細胞治療＞
米国臨床試験登録システム(www.clinicaltrials.gov from National Institutes of Health)より引用し改変

状況	開始日	細胞由来	ドナー	Phase	Responsible Party
Completed	2006.2.	骨髄	健常者	II	Osiris Therapeutics Inc.
Recruiting	2013.6.	骨髄	健常者	I	Royan Institute
Active, not recruiting	2010.6.	脂肪	自己	I, II	Clinica Universidad de Navarra
Recruiting	2012.2.	骨髄	健常者	I, II	University Hospital of Liege
Completed	2007.10.	骨髄	健常者	III	Osiris Therapeutics Inc.
Recruiting	2007.5.	骨髄	健常者	III	Osiris Therapeutics Inc.
Recruiting	2010.9.	骨髄	健常者	III	Osiris Therapeutics Inc.
Recruiting	2012.2.	脂肪	健常者	III	Cellerix
Enrolling by invitation	2012.2.	骨髄	健常者		Osiris Therapeutics Inc.
Active, not recruiting	2012.6.	脂肪	自己		Anterogen Co., Ltd
Recruiting	2013.7.	脂肪	自己	I	Mayo Clinic

そこで本研究では、羊膜を新たな細胞ソースとした MSC 治療の臨床応用を目標として、ラット重症腸炎モデルに対する AMSC 投与の効果を検討し、さらに病態改善のメカニズムや AMSC の抗炎症効果の機序を明らかにすることを目的とした。

略 語 表

AMSC：Amnion-derived mesenchymal stem cell
ANOVA：Analysis of variance
APC：Allophycocyanin
BSA：Bovine serum albumin
CD：Cluster of differentiation
CM：Conditioned medium
COX-2：Cyclooxygenase-2
CXCL：Chemokine(C-X-C motif) ligand
DAI：Disease activity index
DAPI：4′,6-diamidino-2-phenylindole
D-MEM：Dulbecco's modified Eagle Medium
DNA：Deoxyribonucleic acid
DSS：Dextran sulfate sodium
EDTA：Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA：Enzyme-linked Immunosorbent assay
FACS：Fluorescence activated cell sorter
FBS：Fetal bovine serum
FITC：Fluorescine isothiocyanate
GVHD：Graft-versus-host disease
HE：Hematoxylin and eosin
HLA：Human leukocyte antigen
IBD：Inflammatory bowel disease
IFN：Interferon
IL：Interleukin
LPS：lipopolysaccharide
M.W.：Molecular weight
MCP：Monocyte chemotactic protein
MEM：Minimal essential medium
MIF：Macrophage migration inhibitory factor
MPO：Myeloperoxidase
MSC：Mesenchymal stem cell
PBS：Phosphate-buffered saline
PE：Phycoerythrin

PGE2：Prostaglandin E2

PVDF：P polyvinylidene difluoride

RNA：Ribonucleic acid

RT-PCR：Reverse-transcription polymerase chain reaction

SD：Sprague-Dawley

SDS-PAGE：Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

TBS：Tris-buffered saline

TLR：Toll like receptor

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

collagenase type III	(Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA)
FBS	(Life Technologies, Carlsbad, MD, USA)
MEM-alpha	(Life Technologies)
PBS	(Life Technologies)
penicillin	(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)
streptomycin	(Wako Pure Chemical Industries)
0.5% trypsin–EDTA	(Life Technologies)

卵膜の採取は北海道大学大学院医学研究科および札幌天使病院における倫理委員会の承認を得て行った。また卵膜を提供していただいた全ての妊婦の同意を得て行った。

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 で洗浄後、collagenase type III(200 U/ml)を添加し 37°C 下で 1 時間振盪することで結合組織を消化し細胞を分離した。10%FBS･penicillin(100 U/ml)･streptomycin(100 mg/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 6.8×10^3 cells/cm^2 の濃度で播種し培養を継続した。

2. 動物

メーカーより以下の実験動物を購入した。

8 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°C 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 1 匹のラットを飼育した。

3. DSS 誘発重症腸炎ラットモデルの作製と評価

試薬及び材料

DSS (M.W. = 36,000–50,000; MP Biomedicals, Solon, OH, USA)

重症腸炎は、市販のミネラルウォーターにDSSを8%濃度で溶解し、Day0からDay5にかけてラットに自由飲水させる形で経口投与し作製した。腸炎の疾患活動性(DAI)の評価は、「体重の低下」「便の性状」「血便」の 3 項目で行い、毎日測定した。DAI は 3 項目の総和で示され(point scale：0-12)、過去に論文で報告された scoring system にもとづいて決定された [38]。

Disease activity index

Score	Rectal bleeding	Stool consistency	Weight loss
0	Normal	Normal	None
1			1-5%
2	Slight bleeding	Loose stools	5-10%
3			10-20%
4	Gross bleeding	Watery diarrhea	>20%

4. DSS 誘発腸炎ラットモデルを用いた実験プロトコール

ラットを以下 3 群に分けて検討を行った。

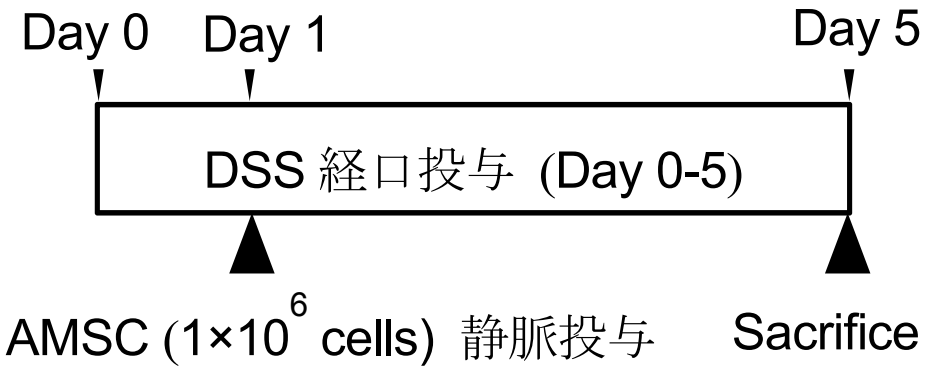
「①コントロール群(n=6)」「②DSS 誘発腸炎ラット群(n=8)」「③DSS 誘発腸炎ラット・AMSC 投与群(n=8)」

① :ミネラルウォーターを与え、day1 に陰茎静脈より PBS 200 μl を投与した。

② :8%DSS 溶液を与え、day1 に陰茎静脈より PBS 200 μl を投与した。

③ :8%DSS 溶液を与え、day1 に陰茎静脈より AMSC 1×10^6 個を浮遊させた PBS 200 μl を投与した。

Day5 に全てのラットを屠殺し、採血と腸管の採取を行った (下図)。



5. 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

5-1 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)

MEM-alpha (Life Technologies)

Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

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)

2 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 Adipogenic 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 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。

5-2 骨分化誘導

試薬及び材料

Alizarin Red S (Sigma-Aldrich)

FBS (Life Technologies)

hMSC Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation 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)

5 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°C 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。

6. Flow Cytometry 法による AMSC の表面抗原解析

緩衝液の組成

FACS Buffer	0.5% BSA+0.05% NaN_3/PBS (-)

試薬及び材料

0.5% trypsin–EDTA	(Life Technologies)
FBS	(Life Technologies)
MEM-alpha	(Life Technologies)
PBS	(Life Technologies)
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

AMSC を培養している培養皿を PBS で洗浄後、0.5% trypsin–EDTA を添加し、37°C 下で 3 分間 incubate し、10% FBS・penicillin (100 U/ml)・streptomycin (100 mg/ml)を添加した MEM-alpha を加え、trypsin を不活性化させた。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 1×10^7 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)

参照)
MSC の基準 (抜粋) [39]

1	Adherence to plastic in standard culture conditions		
2	Phenotype	Positive (≥95%+)	Negative (≤2%+)
		CD105	CD45
		CD73	CD34
		CD90	CD14 or CD11b
			CD79α or CD19
			HLA-DR
3	*In vitro* differentiation: osteoblasts, adipocytes, chondroblasts (demonstrated by staining of *in vitro* cell culture)		

7. ラット腸管の病理組織学的評価

7-1. HE 染色

試薬及び材料

formaldehyde saline (Wako Pure Chemical Industries)

HE (Wako Pure Chemical Industries)

PBS (Life Technologies)

プロトコールに則り、全てのラットを Day5 に屠殺し、盲腸から肛門に至る腸管を摘出し、長径を計測した。肛門より 4cm 口側までの腸管を切離し、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 μm 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。評価方法は以下 parameter の総計(A)に percentage involvement の scale で掛けたもの(40-point scale)とした [40-42]。

parameter	
inflammation severity	0-3
inflammation extent	0-3
crypt damage	0-4
amount of points	**A** (0-10)

percentage involvement	
0%–25%	1
25%–50%	2
50%–75%	3
75%–100%	4

7-2. 免疫染色

抗体

anti-rat CD68 monoclonal antibody (AbD Serotec, Kidlington, United Kingdom)

anti-rat CD163 monoclonal antibody (AbD Serotec)

anti-rat CD3 antibody (BD)

anti-myeloperoxidase antibody (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

monocytes/macrophages、neutrophils、T lymphocytes 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 は炎症性 M1 monocytes/macrophages の、CD163 は抗炎症性 M2 monocytes/macrophages の、CD3 は T lymphocytes の代表的な表面マーカーである。

MPO は neutrophils 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)

CD163 (dilution, 1:150)

CD3 (dilution, 1:50)

myeloperoxidase (dilution, 1:300)

8. 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)
RNeasy Mini Kit	(Qiagen, Hilden, Germany)

伸展板に固定したラット腸管の一部を再度メスを用いて垂直方向に切離し、RNA 用の検体を採取した。

RNA の抽出は、RNeasy Mini Kit を用いて以下の方法で行った。検体を PBS で洗浄後、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、ビーズクラッシャー(µT-01, TITEC, Koshigaya, Japan)を用いて腸管組織を破砕した。15,000rpm で 3 分間遠心し、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。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。

逆転写の過程はQuantiTect Reverse Transcription Kitを用いて以下手法にて行った。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。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し、Quantiscript Reverse Transcriptaseを不活性化するために95°Cで3分間インキュベートした。

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
IL-1b	Rn_Ilb_1_SG QuantiTect Primer Assay
MIF	Rn_Mif_1_SG QuantiTect Primer Assay
IL-6	Rn_Il-6_1_SG QuantiTect Primer Assay
MCP-1	Rn_Ccl2_1_SG QuantiTect Primer Assay
CXCL-1	Rn_Cxcl1_1_SG QuantiTect Primer Assay
CXCL-2	Rn_Cxcl2_1_SG QuantiTect Primer Assay
IFN-g	Rn_Ifn-g_SG QuantiTect Primer Assay

9. ラット血清中の MCP-1 の測定

試薬及び材料

Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

ラットの屠殺時に、下大静脈より採血行った。採血スピッツを3,000rpmで5分間遠

心し、血清を分離した。

ラット血清中の MCP-1 濃度は、Quantikine ELISA Kit を使用し、以下手法にて行った。ラット血清は、Calibrator Diluent RD5-3 を用いて 4 倍に希釈して使用した。microplate の各 well に Assay Diluent RD1W 50 µl を加え、希釈したラット血清 50 µl を加え、1 分間タッピングにて混和し、plate cover をして室温下で 2 時間静置した。各 well あたり Wash Buffer 400 µl を用いて 5 回洗浄した。Mouse JE/MCP-1 Conjugate 100 µl を加え、plate cover をして室温下で 2 時間静置した。再び、Wash Buffer を用いて 5 回洗浄した。Substrate Solution 100 µl を加え、暗条件室温下で 30 分間静置した。Stop Solution 100 µl を加えた後、450 nm における吸光度を GloMax®-Multi Detection System (Promega, Fitchburg, WI, USA)を用いて測定した。

10. AMSC から得られる馴化培地(CM)の作製

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)

10%FBS･penicillin(100 U/ml)･streptomycin(100 mg/ml)を添加した MEM-alpha を用いて、AMSC を 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。80%コンフルエントになった時に、上清を除去し PBS で 2 度洗浄後、無血清の MEM-alpha 20 ml で 48 時間培養し、回収したものを CM とし下記実験で使用した。

11. macrophage に対する AMSC の抗炎症効果の検討

11-1　AMSC との共培養での検討

細胞

RAW264.7 細胞

(immortalized murine macrophage cell, American Type Tissue Collection, Manassas, VA, USA)

試薬及び材料

D-MEM	(Wako Pure Chemical Industries)
FBS	(Life Technologies)
PBS	(Life Technologies)
LPS	(Sigma-Aldrich)

6-well plate に RAW264.7 細胞 4 × 10^5 cells/well の細胞濃度で播種し、同時に RAW264.7 の 1/10 量(4× 10^4 cells/well) もしくは 1/5 量(8× 10^4 cells/well) を播種し、10%FBS を添加した D-MEM で 24 時間培養した。PBS で洗浄後、無血清の D-MEM に交換した。LPS 100 ng/ml を添加し 24 時間後の上清を回収し、RAW264.7 細胞の mRNA を抽出した。Control は LPS で刺激しない群として設定した。mRNA は定量 RT-PCR にて、上清は ELISA 法にて検討した。

11-1-1　定量 RT-PCR

試薬及び材料

PBS	(Life Technologies)
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX	(Invitrogen)
QuantiTect Reverse Transcription Kit	(Qiagen)
RNase free water	(Millipore)
RNeasy Mini Kit	(Qiagen)

RNA の抽出は、RNeasy Mini Kit を用いて以下の方法で行った。培養液を吸引除去し、PBS で洗浄後、Buffer RLT 350 µl を添加し、ゴム製の cell scraper (Corning)で細胞ライセートを回収した。RNase free のシリンジに取り付けた 20G の注射針にライセートを 5 回通した。70% Ethanol 350 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。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。

逆転写の過程は QuantiTect Reverse Transcription Kit を用いて以下手法にて行った。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。Quantiscript Reverse Transcriptase 2 µl・Quantiscript RT Buffer 8 µl・RT Primer Mix 2 µl を加え、42°C で 2 分間インキュベートし、Quantiscript Reverse Transcriptase を不活性化するために 95°C で 3 分間インキュベートした。

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)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。primer は全て Qiagen 社より以下を購入して使用した。

β-actin	Mm_Actb_1_SG QuantiTect Primer Assay
TNF-α	Mm_Tnf_1_SG QuantiTect Primer Assay
MCP-1	Mm_Ccl2_1_SG QuantiTect Primer Assay

11-1-2　ELISA 法

試薬及び材料

Quantikine ELISA Kit Mouse TNF-α　(R&D Systems)

Quantikine ELISA Kit Mouse MCP-1　(R&D Systems)

細胞上清中の RAW264.7 細胞から産生された TNF-αと MCP-1 濃度を Quantikine ELISA Kit を使用し、以下手法にて測定した。

TNF-α

microplate の各 well に Assay Diluent RD1-63 50 µl と上清 50 µl を加え、1 分間タッピングにて混和し、plate cover をして室温下で 2 時間静置した。各 well あたり Wash Buffer 400 µl を用いて 5 回洗浄した。Mouse TNF-α Conjugate 100 µl を加え、plate cover をして室温下で 2 時間静置した。再び、Wash Buffer を用いて 5 回洗浄した。Substrate Solution 100 µl を加え、暗条件、室温下で 30 分間静置した。Stop Solution 100 µl を加えた後、450 nm における吸光度を GloMax®-Multi Detection System (Promega) を用いて測定した。

MCP-1

上清を Calibrator Diluent RD5-3 を用いて 5 倍に希釈して使用した。microplate の各 well に Assay Diluent RD1W 50 µl と希釈した上清 50 µl を加え、1 分間タッピングにて混和し、plate cover をして室温下で 2 時間静置した。各 well あたり Wash Buffer 400 µl を用いて 5 回洗浄した。Mouse MCP-1 Conjugate 100 µl を加え、plate cover をして室温下で 2 時間静置した。再び、Wash Buffer を用いて 5 回洗浄した。Substrate Solution 100 µl を加え、暗条件、室温下で 30 分間静置した。Stop Solution 100 µl を加えた後、450 nm における吸光度を GloMax®-Multi Detection System (Promega)を用いて測定した。

11-2　CM 添加での検討

細胞

RAW264.7 細胞 (American Type Tissue Collection)

試薬及び材料

D-MEM (Wako Pure Chemical Industries)

FBS (Life Technologies)

LPS (Sigma-Aldrich)

MEM-alpha (Life Technologies)

PBS (Life Technologies)

6-well plate に RAW264.7 細胞 8×10^5 cells/well の細胞濃度で播種し、10%FBS を添加した D-MEM で 24 時間培養した。上清を吸引除去し PBS で洗浄した。Control 群と LPS 刺激群は無血清の MEM-alpha に、CM 添加群は上記にて作製した CM に培地を入れ替えた。続いて LPS 100 ng/ml を添加し 24 時間後に RAW264.7 細胞の mRNA を抽出した。mRNA は定量的 RT-PCR 法にて検討した。

11-2-1　定量的 RT-PCR

試薬及び材料

PBS (Life Technologies)

Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen)

QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen)

RNase free water (Millipore)

RNeasy Mini Kit (Qiagen)

工程は「実験材料と方法 11-1-1.参照」

12. 蛍光免疫染色(NF-κB)

細胞

RAW264.7 細胞 (American Type Tissue Collection)

試薬及び材料

D-MEM (Wako Pure Chemical Industries)

FBS (Life Technologies)

LPS (Sigma-Aldrich)

PBS (Life Technologies)
type I collagen-coated 8-chamber slide (BD)
0.2% Triton X-100 (MP Biomedicals)
4% paraformaldehyde (Wako Pure Chemical Industries)
抗体
Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen)
anti-NF-κB polyclonal antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)
DAPI (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)

RAW264.7 細胞を type I collagen-coated 8-chamber slide に 1×10^4 cells/chamber で播種し、10%FBS を添加した D-MEM で 24 時間培養した。上清を吸引除去し、PBS で洗浄した。CM(実験材料と方法 10.参照)で 3 時間 pre-incubation し、LPS 20 ng/ml で 60 分間刺激した。上清除去後、4% paraformaldehyde を添加し、4°C で 60 分間静置した。PBS で洗浄後 0.2% Triton X-100 を加え 15 分間静置することで Permeabilization を行った。PBS で洗浄後、chamber 内に anti-NF-κB polyclonal antibody を添加し、4°C で 60 分間静置した。PBS で洗浄し、Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-rabbit IgG を加え、室温で 60 分間染色した。続いて DAPI を加え 30 分間染色した。蛍光顕微鏡(BZ-9000, Keyence, Osaka, Japan)を用いて観察を行った。

各試薬は以下希釈濃度で使用した。
Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2000)
anti-NF-κB polyclonal antibody (1:100)
DAPI (1:2000)

13. Western Blot Analysis (IκB のリン酸化)

細胞
HEK293 (RIKEN BRC through the National Bio-Resource Project of the MEXT, Japan)
HEK293/hTLR4A-MD2-CD14 (Invivogen, San Diego, CA, USA)
緩衝液の組成
TBST (TBS with 0.05% Tween 20, Wako Pure Chemical Industries)
試薬及び材料
D-MEM (Wako Pure Chemical Industries)

FBS (Life Technologies)
Immobilon Western horse radish peroxidase substrate detection reagents (Millipore)
Immobilon-PVDF membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)
LPS (Sigma-Aldrich)
mouse recombinant TNF-α (R&D Systems)
PBS (Life Technologies)
SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
TBS (Wako Pure Chemical Industries)
1×SDS sample buffer (Wako Pure Chemical Industries)
2-mercaptoethanol (Wako Pure Chemical Industries)
5% dried nonfat milk (Wako Pure Chemical Industries)
1 次抗体
β-actin (13E5) (Cell Signaling Technology)
IκB (Cell Signaling Technology)
phospho-IκB (5A5) (Cell Signaling Technology)
2 次抗体
peroxidase-labeled rabbit or mouse antibodies
(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA)

HEK293 および TLR4 を安定発現した HEK293 を使用し、各々同様の検討を行った。

HEK293 を 12-well plate に 1×10^5 cells/well で散布し、10%FBS を添加した D-MEM で 24 時間培養後、上清を吸引除去し PBS で洗浄した。CM(実験材料と方法 10.参照)で 3 時間 pre-incubation し、10 ng/ml mouse recombinant TNF-α を加えて 60 分間静置した。冷却した TBS(-)で洗浄し、2% 2-mercaptoethanol を含む 1×SDS sample buffer を加え、細胞融解させた。サンプルを 16,000g で 2 分間遠心し、上清を 95°C で 5 分間熱した。SDS-PAGE (30 A、60 分間)にて展開し、PVDF に転写させた (180 mA、60 分間)。続いて 5% dried nonfat milk を含む TBST 中で振盪し室温で 30 分間インキュベートした。1 次抗体を加えた後、1×TBST で 5 分間 3 回洗浄した。2 次抗体として peroxidase-labeled rabbit or mouse antibodies を TBST 中で 30 分間反応させた。Immobilon Western horse radish peroxidase substrate detection reagents を用いて検出した。

HEK293/hTLR4A-MD2-CD14 を用いた場合は、mouse recombinant TNF-α ではなく、10 ng/ml LPS で 60 分間刺激した。他工程は上記と同様とした。

上記抗体は以下希釈濃度で使用した。

β-actin (1:5,000)

IκB (1:2,000)
phospho-IκB　(1:2,000)
peroxidase-labeled rabbit or mouse antibodies (1:10,000)

14. Transient Transfection および Reporter Gene Assay

細胞

HEK293	(RIKEN BRC)
HEK293/hTLR4A-MD2-CD14	(Invivogen)

試薬及び材料

D-MEM	(Wako Pure Chemical Industries)
Dual Luciferase® Reporter Assay System	(Promega)
FBS	(Life Technologies)
Lipofectamine® LTX	(Invitrogen)
luciferase plasmid DNA with 10 ng of Renilla pGL4.75[hRluc/CMV] vector	(Promega)
luciferase reporter gene luc2P	(pGL4.32[luc2P/NF-κBRE/Hygro], Promega)
Opti-MEM®	(Life Technologies)

HEK293 と TLR4 安定発現した HEK293 を使用し、各々同様の検討を行った。

HEK293 を 24-well plates に 5×10^4 cells/well で播種し 10%FBS を添加した D-MEM で 37°C で 24 時間培養した。Internal control としての Renilla pGL4.75 vector 10 ng と luciferase reporter gene luc2P を組み込んだ NF-κB response element を含む plasmid DNA 200 ng を、Lipofectamine® LTX を用いてトランスフェクトさせた*。培地を CM(実験材料と方法 10.参照)に交換し、mouse recombinant TNF-α 10 ng/ml を加え、6 時間静置した。Reporter gene assay は Dual Luciferase® Reporter Assay System (Promega)を用いて検討した。PBS で各 well を洗浄後、Passive Lysis Buffer 100 μl/well を加え室温下で 15 分間静置した。Lysate 10 μl・Luciferase Assay Buffer II 50 μl・Stop & Glo® Buffer 50 μl を microplate 中の well に混和し、発光強度を GloMax®-Multi Detection System (Promega)を用いて測定した。

HEK293/hTLR4A-MD2-CD14 を用いた場合は、mouse recombinant TNF-α ではなく、10 ng/ml LPS を加えて 6 時間静置した。他工程は上記と同様とした。

＊　以下薬剤を全て混和し、室温下で 5 分間インキュベートし、50 μl/well を各 well に加え 37°C で 24 時間インキュベートすることでトランスフェクションさせた。

pGL4.32-luc	1 ml
pGL4.32-NF-κB	2 ml
ELipofectamine LTX	1 ml
Plus Reagent	0.5 ml
Opti-MEM	45.5 ml
Total	50 ml

15. 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、Tukey test によりそれぞれの群間の差を検定した。体重と DAI 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　ヒト AMSC の多分化能の証明

羊膜から分離した細胞の多分化能を評価するために、脂肪細胞・骨細胞への分化誘導を行った。

脂肪分化誘導を行った AMSC は細胞膜内に小円形の脂肪滴が多数出現した。この胞体は Oil Red O 染色にて赤色に染色されたため、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 AMSC では、細胞の周囲に細胞外基質の分泌や石灰沈着を認め、Alizarin Red S 染色にて橙色に染色されたため、骨細胞へ分化誘導されたことが確認された。

1.2　細胞表面抗原の解析

MSC の基準が国際細胞治療学会より提唱されており[39]、それに従い Flow cytometer を用いて AMSC の細胞表面抗原を解析した。AMSC は MSC の陽性マーカーである CD44、CD73、CD90、CD105 を発現していた。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。

1.3　AMSC 投与後の腸炎ラットの体重・DAI の推移と大腸径の測定

ラットを以下 3 群に分けて、AMSC 投与後の体重・DAI の推移と腸管径の測定を行った。体重と DAI は毎日評価し、腸管径の測定はラットを屠殺後に行った。

① コントロール群

② 8%DSS 誘発腸炎ラット群

③ 8%DSS 誘発腸炎ラット・AMSC 投与群

DSS 誘発腸炎群においては、Day3 より徐々に体重の減少を認めたが、ヒト AMSC 投与群では体重減少の程度は低く抑えられ、Day4・5 においては DSS 誘発腸炎群と比較し有意差が認められた。

DAI は DSS 誘発腸炎群では、経過とともに上昇し、重症な腸炎の発症が確認された。AMSC 投与群では Day5 で上昇傾向を認めるが、Day4・5 では DSS 誘発腸炎群と比較し、有意に DAI が低く抑えられていた。

腸管径は、DSS 誘発腸炎群では炎症による著明な腸管の短縮を認めたが、AMSC 投与群では腸管の短縮は有意に抑制されていた。

1.4　ラット直腸における inflammatory mediator の mRNA 発現量

DSS 誘発腸炎群では TNF-α、IL-1β、CXCL1、CXCL2 といった inflammatory mediator の発現が有意に上昇していた。

AMSC 投与群では DSS 誘発腸炎群と比較して、TNF-α、IL-1β、MIF の発現が有意に抑制されていた。また有意差は認めなかったものの、CXCL1、CXCL2、IFN-γ は発現量が低下傾向を示した。

IL-6、MCP-1 に関しては各群間で明らかな差は認められなかった。

1.5　DSS 誘発腸炎ラット腸管の病理学的評価

HE 染色においては、DSS 誘発腸炎群では、腺窩の消失、粘膜下層での出血、多数の炎症細胞浸潤を認めた。AMSC 投与群と比較して、非常に高度な炎症を認めた。Histological score では、AMSC 投与群では DSS 誘発腸炎群と比較して有意に低下していた。

免疫染色では抗 CD68 モノクローナル抗体、抗 CD163 モノクローナル抗体、抗 myeroperoxidase 抗体、抗 CD3 モノクローナル抗体を用いて検討した。CD68 陽性 M1 monocyte/macrophages、CD163 陽性 M2 monocyte/macrophages、MPO 陽性 neutrophils、CD3 陽性 T lymphocytes の組織への浸潤細胞数を測定したところ、AMSC 投与群では DSS 誘発腸炎群と比較して、CD68 陽性 M1 monocyte/macrophage と CD163 陽性 M2 monocyte/macrophage の細胞数は有意に低下していた。有意差は認めないものの MPO 陽性 neutrophils の細胞数は低くなる傾向であったが、CD3 陽性 T lymphocyte の細胞数は両群において大きな差は認められなかった。

1.6　AMSC 投与後のラット血清 MCP-1 測定

DSS 誘発腸炎群における血清 MCP-1 濃度は著明に上昇していた。AMSC 投与群では DSS 誘発腸炎群と比較して、有意に血清 MCP-1 濃度が低下していた。

1.7　活性化 macrophage に対する、AMSC 共培養または Conditioned medium による培養による抗炎症効果の検討

動物実験において、AMSC 投与は macrophage の腸管への浸潤を有意に抑制したことから、活性化 RAW264.7 細胞に対する AMSC との共培養もしくは CM の添加による抗炎症効果を検討した。

LPS 添加群では、TNF-α と MCP-1 の遺伝子発現と産生が著明に上昇していた。AMSC 共培養・CM 添加群においては、LPS 添加群と比較して、TNF-α と MCP-1 の遺伝子発現は有意に低下していた。AMSC 共培養群では TNF-α 産生の有意な低下を認めた。有意差は認めなかったが、AMSC 共培養群では MCP-1 産生は低下傾向であった。

1.8　NF-κB シグナル伝達経路を介した AMSC の抗炎症作用機序の解明

HEK293 細胞と TLR4 の安定発現した HEK293 細胞を用いて、TNF-α や LPS によって活性化された NF-κB シグナルに対する抑制効果を検討した。抑制効果の作用点として「NF-κB の転写活性」、「NF-κB 核移行」、「IκB のリン酸化」に注目した。

TNF-α による NF-κB の転写活性は、AMSC 共培養群、CM 添加群では有意に抑制されていた。LPS による NF-κB の転写活性は、AMSC 共培養群では抑制されなかったが、CM 添加群では有意に抑制された。

LPS 刺激による NF-κB の核移行は、CM 添加群において有意に抑制された。

TNF-α、LPS によって誘導された IκB のリン酸化は、CM 添加によっても抑制されなかった。

考察

本研究では、AMSC の重症腸炎ラットに対する治療効果について検討し、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、DAI 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 AMSC の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-κB の核移行を抑制した。

骨髄由来もしくは脂肪組織由来 MSC の DSS 腸炎動物モデルに対する治療効果が、数多く報告されている [43-47]。これらの実験プロトコールは、DSS の濃度や投与期間、MSC 投与数、また評価項目や評価期間に各々違いがあるものの、MSC 投与の効果が示された。腸炎動物モデルに対する AMSC の有効性に関しての報告は未だないものの、*in vitro* において、AMSC は骨髄由来 MSC と比較し、ナイーブ T 細胞から T helper 17 細胞への分化誘導を強く抑制することを示し、AMSC の抗炎症効果について報告している [15]。また、T リンパ球数は抗体の刺激で著明に増加するが、AMSC や骨髄由来 MSC と共培養することによって、その増加が有意に抑制されたことが示されている [48]。

本研究ではまず、AMSC のもつ分化能や発現する表面マーカーにおいて、骨髄由来と脂肪組織由来 MSC と非常に似た特徴を持っていることを示し [2]、他の組織由来の MSC と同様に AMSC が MSC の基準を満たすことを確認した [18]。

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ていることを確認した。8%の高濃度 DSS の投与を 5 日間を超えて続けた場合、死亡するラットが認められることから、病理学的評価は Day5 に施行することとした。AMSC を投与することで、体重低下の抑制、DAI の低下、腸管の短縮が抑制され、また病理スコアが改善された。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 T 細胞ではなく、マクロファージの浸潤が AMSC の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-α、IL-1β、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。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 [49,50]、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唆された。実際様々な文献においても、マクロファージに対する抗炎症効果が報告されている。脂肪組織由来 MSC は IL-10 といった因子の産生を通して、マクロファージを炎症制御性の phenotype (M2)へと変化させ、そのマクロファージがさらに T 細胞やマクロファージに抑制性に作用することが報告された [51]。 また MSC は自身が産生する

PGE2やCOX-2により誘導された抗炎症性M2マクロファージの働きによって創傷治癒過程を促進させることが報告されている[2]。PGE2は骨髄由来MSCにおける検討で注目される免疫調整因子であるが[52]、AMSCをヒトCD4+T細胞と共培養させた時、絨毛膜由来MSCと比較して、多量のPGE2を産生することが共著者の研究グループより報告されている[48]。

既報では、M2マクロファージが、IL-10産生、栄養因子の分泌、アポトーシス細胞のクリアランスの促進によって、炎症の消退や組織修復を促進させることが明らかとなっている[53]。また、MSCが炎症性M1マクロファージをM2マクロファージへと変化させることで、抗炎症効果を発揮することが報告されている[28]。今回の検討では、CD68とCD163に対する免疫染色を行ったが、AMSC投与は、M1マクロファージとM2マクロファージの浸潤を抑制することが示され、M1マクロファージからM2マクロファージへのphenotype変化は確認されなかった。

*In vitro*の検討では、AMSCとの共培養、CM添加はRAW264.7細胞におけるTNF-αやMCP-1の発現を有意に抑制することが示された。既報ではLPSで活性化されたRAW264.7細胞から産生される炎症性サイトカインは、ヒト胎盤由来MSCとの共培養によって有意に発現が抑制され[54]、そのヒト胎盤由来MSCの抗炎症効果の機序としてmyeloid differentiation primary response gene 88-dependent pathwayを介したPGE2の産生が関与している可能性が報告されている。今回の検討では、CMがNF-κB転写活性を抑制したこと、そしてTNF-αまたはLPSによるIκBのリン酸化が抑制されなかったことから、CMはNF-κB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。今後更なるメカニズムの解明、検討が求められる。

最近、炎症性腸疾患患者に対してヒトMSCを用いた細胞治療に関わる研究が盛んに行われている。自己骨髄由来MSC投与は、重症な治療抵抗性のクローン病患者に対しては安全であり、臨床応用可能な治療法であると報告された[36]。また、痔瘻を伴うクローン病の治療として、自己骨髄由来MSCの局所投与は安全性が高く、奏功することが報告された[55]。さらに、健常者から得られた骨髄由来MSCや、正常出産の過程で得られる臍帯血由来MSCを用いた同種MSC投与の検討では、重篤な偶発症は認められず、治療抵抗性のクローン病や潰瘍性大腸炎患者の臨床症状を改善することが報告された[37]。このように炎症性腸疾患患者に対するヒトMSCを用いた細胞治療の有効性を検証する臨床試験が、現在世界各国で行われている。

AMSC投与に関しては、消化管疾患以外の他疾患に対する動物モデルでの報告が散見される。AMSCの静脈投与が、マウスモデルでのブレオマイシンによる肺の炎症や線維化を抑制することが報告された[56]。また四塩化炭素による肝線維症マウスモデルにおいて、AMSCの投与が線維化を抑制する可能性が示唆された[57]。さらに最近では、ヒトに対する臨床試験が行われ、ステロイド抵抗性の急性移植片対宿主病(GVHD)に

対する卵膜由来 MSC を用いた細胞治療が、first-in-human study として行われた。卵膜由来 MSC の静脈投与は安全性が高く、治療を受けた治療抵抗性急性 GVHD 患者の overall response は、骨髄由来 MSC を用いた治療のそれと大きな差は認められなかったことが示された[58]。ヒトに対する卵膜由来 MSC 投与の高い安全性と治療効果が初めて示されたことで、AMSC 投与の IBD 患者への臨床応用が期待されるところである。

MSC を用いた細胞治療は、骨髄由来そして脂肪組織由来 MSC を用いた検討が現在先行して行われている。しかしながら MSC を獲得する過程として、骨髄や脂肪組織の採取が必須であり、それは身体的侵襲を伴う。また、組織内に含まれる MSC の量が少ないため多くの組織を採取する、もしくは長期の培養期間を要することが考えられる。一方、卵膜は通常医療廃棄物として処分されてしまうことから、侵襲を伴うことなく獲得することができ倫理的ハードルの軽減に繋がること、胎児由来の細胞であるためより若い細胞を使用することが出来ること、一つの卵膜から非常にたくさんの MSC を獲得することが出来ることから患者へ投与するまでの期間の短縮が見込まれることなど、利点が多い。MSC を用いた細胞治療の発展に大きく寄与することが期待され、重症腸炎に対する治療的戦略の一つとなりえると考えられる。

総括

本研究において、以下の知見が得られた。

1. ヒト AMSC の投与は、DSS により誘発された腸炎ラットモデルにおいて、体重低下の抑制、DAI の低下、腸管の短縮抑制に寄与する。

2. ヒト AMSC の投与は、DSS により誘発された腸炎ラットモデルにおいて、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する。

3. AMSC との共培養、もしくは AMSC の培養上清はマクロファージの炎症反応を抑制する。

4. AMSC の培養上清は NF-κB の核移行を抑制する可能性がある。

本研究において、ヒト AMSC の動物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、様々な組織を移植細胞源とした MSC が使用されている。今回注目したヒト AMSC は、組織採取の際の侵襲性がない点、胎児由来のより若い MSC を一度に多量に獲得することが出来るという大きなアドバンテージを持つことから、羊膜は MSC を用いた細胞治療の新しい移植細胞源と考えられる。現在、治療抵抗性のクローン病患者に対する新規治療法の開発を目的として、first-in-human の臨床試験の準備をすすめている。

本研究では、NF-κB に注目し検討を行うことで、AMSC による NF-κB の核移行抑制が一因となっている可能性が示唆された。しかしながら、MSC による抗炎症効果のメカニズムに関する報告は散見されるものの、未だ解明には至っていない。現在、メカニズムの深い理解よりも、ヒトに対する治療が先行していることから、基礎医学として今後更なる検討が必要と考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、有益な御指導・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。

研究に対する心構えや信念、実験方法、データ解釈、論文作成など、様々な面において御指導・御援助頂きました北海道大学病院消化器内科　大西俊介講師には感謝の念に堪えません。厚く御礼申し上げます。

遠方でありますのに、直接札幌に足を運んで頂き、卵膜由来間葉系幹細胞のご提供、幹細胞の分離・培養における技術指導を賜りました、国立循環器病研究センター再生医療部室長　山原研一先生には、心より感謝いたします。

忙しい臨床業務の中、妊婦の方への同意の取得、帝王切開の施行など、卵膜検体の獲得にご尽力頂きました、社会医療法人母恋天使病院産婦人科科長　渡利道子先生にはありがたく御礼申し上げます。

実験の開始にあたり、実験方法のご指導、環境をご提供いただいた、北海道大学大学院薬学研究院臨床病態解析学研究室、武田宏司教授、中川宏治講師、大久保直登先生、東亮介先生には、深謝いたします。

研究生活の面でお力添えいただき、そして研究のための時間を筆者に提供下さいました北海道大学病院消化器内科　桂田武彦助教には深く感謝いたします。

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。

2015 年 3 月

大西　礼造

REFERENCES

1 Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).

2 Le Blanc, K. & Mougiakakos, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol* **12**, 383-396 (2012).

3 Le Blanc, K. & Ringden, O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol* **18**, 586-591 (2006).

4 Schaffler, A. & Buchler, C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem cells* **25**, 818-827 (2007).

5 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).

6 Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* **8**, 726-736 (2008).

7 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 engineering* **18**, 101-115 (2012).

8 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).

9 Stolzing, A. & Scutt, A. Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. *Aging cell* **5**, 213-224 (2006).

10 Miki, T. & Strom, S. C. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem cell reviews* **2**, 133-142 (2006).

11 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).

12 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 Dev Biol* **7**, 11 (2007).

13 Ishikane, S. *et al.* Allogeneic Injection of Fetal Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cells Induces Therapeutic Angiogenesis in a Rat Model of Hind Limb Ischemia. *Stem Cells* **26**, 2625-2633 (2008).

14 Ishikane, S. *et al.* Allogeneic administration of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells attenuates acute myocarditis in rats. *J Mol Cell*

Cardiol **49**, 753-761 (2010).

15 Ohshima, M. *et al.* Systemic transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppresses Th1 and Th17 T cell responses in experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* **53**, 420-428 (2012).

16 Tsuda, H. *et al.* Allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells contribute to renal repair in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* **299**, F1004-1013 (2010).

17 Tsuda, H. *et al.* Transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protect against ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. *Cell transplantation* **23**, 889-899 (2014).

18 Burisch, J. & Munkholm, P. Inflammatory bowel disease epidemiology. *Curr Opin Gastroenterol* **29**, 357-362 (2013).

19 Ng, S. C. *et al.* Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut* **62**, 630-649 (2013).

20 Baumgart, D. C. & Carding, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* **369**, 1627-1640 (2007).

21 桑原絵里加 & 朝倉敬子. 炎症性腸疾患の疫学. *胃と腸* **48**, 547-553 (2013).

22 Daniel, K. P. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **347**, 417-429 (2002).

23 Baumgart, D. C. & Carding, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *The Lancet* **369**, 1627-1640 (2007).

24 Mowat, C. *et al.* Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* **60**, 571-607 (2011).

25 Hu, D. *et al.* Exclusive enteral nutritional therapy can relieve inflammatory bowel stricture in Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* **48**, 790-795 (2014).

26 Gupta, K. *et al.* A novel enteral nutrition protocol for the treatment of pediatric Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis* **19**, 1374-1378 (2013).

27 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).

28 Hanauer, S. B. *et al.* Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* **359**, 1541-1549 (2002).

29 Rutgeerts, P. *et al.* Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* **353**, 2462-2476 (2005).

30 Rutgeerts, P., Van Assche, G. & Vermeire, S. Optimizing anti-TNF treatment in

inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **126**, 1593-1610 (2004).

31 Ford, A. C. *et al.* Efficacy of biological therapies in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* **106**, 644-659 (2011).

32 Nielsen, O. H., Seidelin, J. B., Munck, L. K. & Rogler, G. Use of biological molecules in the treatment of inflammatory bowel disease. *J Intern Med* **270**, 15-28 (2011).

33 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).

34 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).

35 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).

36 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).

37 Liang, J. *et al.* Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in seven patients with refractory inflammatory bowel disease. *Gut* **61**, 468-469 (2012).

38 Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S. & Sedergran, D. J. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* **69**, 238-249 (1993).

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 Williams, K. L. *et al.* Enhanced survival and mucosal repair after dextran sodium sulfate–induced colitis in transgenic mice that overexpress growth hormone. *Gastroenterology* **120**, 925-937 (2001).

41 Sartor, R. B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **3**, 390-407 (2006).

42 Singh, K. *et al.* The apolipoprotein E-mimetic peptide COG112 inhibits NF-kappaB signaling, proinflammatory cytokine expression, and disease activity in murine models of colitis. *J Biol Chem* **286**, 3839-3850 (2011).

43 Tanaka, F. *et al.* Exogenous administration of mesenchymal stem cells ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis via anti-inflammatory action

in damaged tissue in rats. *Life Sci* **83**, 771-779 (2008).

44 Gonzalez, M. A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Buscher, D. & Delgado, M. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* **136**, 978-989 (2009).

45 Gonzalez-Rey, E. *et al.* Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* **58**, 929-939 (2009).

46 He, X. W., He, X. S., Lian, L., Wu, X. J. & Lan, P. Systemic infusion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of experimental colitis in mice. *Dig Dis Sci* **57**, 3136-3144 (2012).

47 Duijvestein, M. *et al.* Pretreatment with interferon-gamma enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem cells* **29**, 1549-1558 (2011).

48 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).

49 de Jong, Y. P. *et al.* Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat Immunol* **2**, 1061-1066 (2001).

50 Rollins, B. J. Chemokines. *Blood* **90**, 909-928 (1997).

51 Anderson, P. *et al.* Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. *Gut* **62**, 1131-1141 (2013).

52 Aggarwal, S. & Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815-182 (2005).

53 Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958-969 (2008).

54 Chen, C. P., Tsai, P. S. & Huang, C. J. Antiinflammation effect of human placental multipotent mesenchymal stromal cells is mediated by prostaglandin E2 via a myeloid differentiation primary response gene 88-dependent pathway. *Anesthesiology* **117**, 568-579 (2012).

55 Ciccocioppo, R. *et al.* Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut* **60**, 788-798 (2011).

56 Moodley, Y. *et al.* Anti-inflammatory effects of adult stem cells in sustained lung injury: a comparative study. *PLoS One* **8**, e69299 (2013).

57 Zhang, D., Jiang, M. & Miao, D. Transplanted human amniotic

membrane-derived mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in mouse. *PLoS One* **6**, e16789 (2011).

58 Ringdén, O. *et al.* Fetal membrane cells for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Stem Cells* **31**, 592-601 (2013).