

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	川田 雄三
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 843 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Early injection of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell after inflammation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through the induction of M2 macrophages and regulatory T cells (炎症時のヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の早期投与は、M2 マクロファージおよび制御性 T 細胞の誘導を介することで、マウスのデキストラン硫酸ナトリウム誘導性大腸炎を改善させる。)
論文審査委員	主査 教授 若井 俊文 副査 准教授 高村 昌昭 副査 教授 寺井 崇二

博士論文の要旨

【背景および目的】炎症性腸疾患は、大腸に原因不明の慢性的な炎症をきたす難治性腸疾患である。未だ難治例が存在し、また現状の治療も副作用などの問題から長期投与できない薬剤もあり、新たな治療法の開発が期待されている。間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells : MSCs) は抗炎症作用を含め免疫調整作用を認め、炎症性腸疾患の治療においても注目を集めている。マウスの腸炎モデルにおいて、MSCs の投与で改善した報告は多数認められ、現在炎症性腸疾患の臨床研究も実施されている。ただ、MSCs 療法の適切な投与のタイミングと大腸炎に対する MSCs の治療効果およびメカニズムは完全に解明されていない。本研究ではデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) により腸炎を惹起したマウスに対して、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (Human adipose tissue-derived MSCs : hAdMSCs) を投与し、その有効性および投与のタイミングの検証、作用機序につき検討した。【方法】投与タイミングを検証するために、DSS を 1 週間経口投与させ腸炎を惹起させた C57Bl/6 (♂、8-10 週令) に対し、hAdMSCs を 1×10^6 cells を DSS 投与開始後 3 日目、7 日目または 11 日目に尾静注し、DSS 投与開始後 21 日目に屠殺を行い、臨床学的、組織学的、サイトカインを評価した。また投与経路の評価目的に DSS 投与開始後 3 日目に腹腔投与を行い、評価を行った。その作用機序を検討するためにマクロファージおよび T 細胞に着目し、hAdMSCs と 72 時間共培養を行い、それぞれに及ぼす効果を検証した。【結果】DSS 投与開始後 11 日目に hAdMSCs を投与した群では臨床学的、組織学的に改善は認められなかったが、DSS 投与開始後 3 日目または 7 日目に hAdMSCs を投与した群では臨床学的、組織学的に改善を認めた。とりわけ DSS 投与開始後 3 日目に hAdMSCs を投与した群ではより改善を認めた。また投与経路としては腹腔投与よりも静脈投与のほうがより効果的であった。DSS 投与開始後 3 日目に hAdMSCs を投与した群の大腸組織のサイトカインの評価を行ったところ、炎症性サイトカインである *Il-6*、*Il-17a*、*Tnfa* は低下し、成長因子である *Hgf*、*Vegf*、*Egf* は上昇していた。また抗炎症性マクロファージ (M2 マクロファージ) のマーカーである *Cd206* と、M2 マクロファージの分化に関与する *Pge2* の上昇を認めた。DSS 投与開始後 3 日目に hAdMSCs を投与した群の組織を免疫染色で T

細胞を評価したところ、粘膜下層に浸潤した T 細胞の数は著明に減少しており、また hAdMSCs を投与した群では制御性 T 細胞の割合が増えていた。マクロファージに関しては免疫染色では評価できなかったが、大腸組織のマクロファージをフローサイトメトリーで評価を行ったところ、M2 マクロファージの割合の増加を認めた。In vitro で評価するため、T 細胞活性化物質を投与したうえで T 細胞と hAdMSCs を共培養したところ、hAdMSCs は濃度依存性に T 細胞の増殖能を抑制することが分かった。また T 細胞の活性化マーカーである CD25、CD69 の発現の低下を認めた。マクロファージと hAdMSCs を共培養し、マクロファージの mRNA の評価を行ったところ、抗炎症性サイトカインである *Il-10*、*Tgfβ* の上昇を認め、M2 マクロファージのマーカーである *Cd206*、*Ym-1* の上昇、炎症性マクロファージ (M1 マクロファージ) のマーカーである *iNos*、*Tnfa* の低下を認めた。【考察】hAdMSCs は DSS 腸炎に対し、優れた治療効果を示した。投与経路としては腹腔投与より静脈投与が効果的であり、また炎症初期での投与がもっとも効果的であった。T 細胞の活性化や増殖能を抑制すること、制御性 T 細胞を増加させること、マクロファージを抗炎症性マクロファージに分化させることで hAdMSCs が腸炎を改善させると考えた。現在、炎症性腸疾患において様々な MSC の臨床研究が行われている。本研究が今後の炎症性腸疾患治療の MSC 治療の一助となることを期待する。

審査結果の要旨

デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)により腸炎を惹起したマウスに対して、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (Human adipose tissue-derived MSCs : hAdMSCs) を投与し、有効性、投与のタイミング、作用機序につき検討した。DSS を 1 週間経口投与させ腸炎を惹起させた C57Bl/6 (♂、8-10 週令) に対し、hAdMSCs を 1×10^6 cells を DSS 投与開始後 3 日目、7 日目または 11 日目に尾静注し、DSS 投与開始後 21 日目に屠殺を行い、臨床学的、組織学的、サイトカインを評価した。作用機序を検討するためにマクロファージおよび T 細胞に着目し、hAdMSCs と 72 時間共培養を行い、効果を検証した。DSS 投与開始後 11 日目に hAdMSCs を投与した群では臨床学的、組織学的に改善は認められなかったが、DSS 投与開始後 3 日目または 7 日目に hAdMSCs を投与した群では臨床学的、組織学的に改善を認めた。特に DSS 投与開始後 3 日目に hAdMSCs を投与した群ではより改善を認めた。3 日目に hAdMSCs を投与した群では、炎症性サイトカイン *Il-6*、*Il-17a*、*Tnfα* は低下し、成長因子 *Hgf*、*Vegf*、*Egf* は上昇していた。抗炎症性マクロファージのマーカーである *Cd206*、*Pge2* の上昇を認め、粘膜下層に浸潤した T 細胞の数は著明に減少し、制御性 T 細胞の割合が増えていた。T 細胞と hAdMSCs を共培養したところ、hAdMSCs は濃度依存性に T 細胞の増殖能を抑制し、T 細胞活性化マーカー CD25、CD69 の発現の低下を認めた。マクロファージと hAdMSCs を共培養し、抗炎症性サイトカイン *Il-10*、*Tgfβ* の上昇、M2 マクロファージのマーカー *Cd206*、*Ym-1* の上昇、炎症性マクロファージのマーカーである *iNos*、*Tnfα* の低下を認めた。

hAdMSCs は DSS 腸炎に対し、T 細胞の活性化や増殖能を抑制し、制御性 T 細胞を増加させ、抗炎症性マクロファージに分化させることで腸炎を改善させる可能性があり、本研究成果を *Cell Tissue Res* に誌上発表しており、学位論文として価値のある研究成果であると判断しました。