

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 五十嵐 俊三
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 905 号
学位授与の日付 令和2年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Effects of Human Adipose Tissue-Derived and Umbilical Cord Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Dextran Sulfate Sodium-Induced Mouse Model (DSS マウスモデルにおけるヒト脂肪組織由来、ヒト臍帯組織由来間葉系幹細胞の効果)

論文審査委員 主査 教授 若井 俊文
副査 教授 平島 正則
副査 教授 木下 義晶

博士論文の要旨

【背景および目的】潰瘍性大腸炎、クローン病に代表される炎症性腸疾患の病因は不明である。免疫調整薬や抗 TNF α 製剤等の分子標的薬が治療成績を飛躍的に向上させたが、再燃を繰り返す、外科手術を要する等で QOL 低下を来してしまうことも少なくない。新たな治療薬、治療アプローチの開発が求められており、申請者は間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells : MSCs) に注目した。MSCs は多系統への分化能、抗炎症能、免疫調節能等多数の効果が報告されている。また余剰組織、医療廃棄物である脂肪組織、臍帯組織から抽出でき、比較的容易に培養増殖可能なことから優れた医療資源として期待されている。本研究では大腸炎モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発腸炎マウスに対して、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (Human adipose tissue-derived MSCs : AD-MSCs) 、ヒト臍帯組織由来間葉系幹細胞 (Human umbilical cord tissue-derived MSCs : UC-MSCs) を投与し、それぞれの有効性、差異について検証した。さらに MSCs の効果発現には細胞の生着は不要との既報があり、MSCs 培養上清投与で細胞投与時と同様の効果が得られるかを検証した。【方法】C57Bl/6(雄、10-12 週令)に DSS を 1 週間経口投与し腸炎を惹起させた。DSS 投与開始後 3 日目(早期投与群)または 7 日目(後期投与群)に AD-MSCs または UC-MSCs を 1×10^6 cells 尾静注し、DSS 投与開始後 21 日目に屠殺した。臨床学的、組織学的、サイトカイン測定で評価した。MSCs 培養上清は投与開始後 3、4 日目に尾静注し、DSS 投与開始後 21 日目に屠殺、同様に評価した。作用機序を検証するため MSCs 投与翌日の腸管を摘出し、次世代シーケンシング (Next-Generation Sequencing : NGS) によって腸管で生じる初期の変化を網羅的に解析した。さらに in vitro で AD-MSCs、UC-MSCs を用いて正常マウス血清または DSS 腸炎マウス血清添加群、血清非添加群を設定し、それらと共培養した MSCs を (Cap analysis of gene expression : CAGE) で性状の変化を解析した。また AD-MSCs、UC-MSCs 尾静注によるマウス腸内細菌への影響を検証した。【結果】早期投与群では AD-MSCs、UC-MSCs の両方で腸炎症状、組織学的炎症所見の軽快が示された。大腸組織を検体とした RT-PCR では、炎症性サイトカインである *Il-6*、

Tnf α 、*Il-17 α* が有意に低下した。これらの結果は MSCs の由来間で差はみられず、効果は同等であった。しかし後期投与群ではいずれの MSCs でも炎症軽減効果が確認できなかった。MSCs 培養上清では AD-MSCs、UC-MSCs 由来のいずれも腸炎症状が軽減し、RT-PCR では *Tnf α* が有意に低下した。しかし炎症軽減効果は細胞投与時に比し軽度であった。NGS による解析では、Control 群に対し $P < 0.05$ の変化を示した遺伝子群のうち発現比が 0.5 倍以下または 2 倍以上変動した mRNA を抽出した。AD-MSC 投与群では 451 個、UC-MSC 投与群では 893 個が該当し、共通項目は 74 個であった。両者の共通性は高くないように思われた。B 細胞マーカーである Cd19、ヘルパー T 細胞マーカーである Ccr6 発現低下等が確認され、一覧は Gene Expression Omnibus : GEO に登録した。(accession No. GSE136397) Pathway 解析では TNF- α /nuclear factor (NF)- κ B、T cell receptor、epidermal growth factor receptor 1 (EGFR1) signaling pathways 等が抽出され、投与早期から腸管での炎症、上皮細胞の修復に関与していることが示唆された。CAGE による解析では、血清添加で 4 倍以上に発現増加または 0.25 倍以下に発現減少した遺伝子を抽出し、結果は GEO に登録した。(accession No. GSE137173) AD-MSCs、UC-MSCs を用いて正常マウス血清、DSS 腸炎マウス血清添加群のいずれにおいても発現増加がみられた遺伝子は *C10orf54*、*CA9*、*CLGN*、*CXCL5*、*DHRS3*、*FHOD3*、*KRT7*、*RARRES1*、*RRAD*、*STC1*、*TNFRSF11B*、*TERMI* であった。それぞれ炎症との関連性が報告されており、炎症軽減効果に何らかの影響を及ぼしたものと考えられる。MSCs 投与後の腸内細菌への影響は、炎症性腸疾患症例で減少することが多いとされている Bacteroidetes、Firmicutes の割合がいずれの MSCs 投与群でも維持されている傾向がみられた。【考察】本研究では AD-MSCs、UC-MSCs のいずれでも同様の腸管炎症軽減効果が示された。ただし後期投与群で同効果が示されなかったように効果発現には適切な投与タイミングがあると思われた。さらに MSCs 培養上清による炎症軽減効果は細胞投与時に比し軽度ながら確認することができ、MSCs の効果は細胞自体の直接的な要素のみではないと推察した。MSCs の効果発現機序検証のため NGS、CAGE で解析したが投与早期の段階で炎症に関わる遺伝子、pathway に影響を及ぼしていることが明らかとなった。炎症性腸疾患において MSCs を用いた様々な臨床研究が行われているが、本研究では MSCs が腸管炎症を軽減するといった知見を支持した。今後の MSC 治療の一助となることを期待する。

審査結果の要旨

本研究では大腸炎モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発腸炎マウスに対して、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (Human adipose tissue-derived MSCs : AD-MSCs)、ヒト臍帯組織由来間葉系幹細胞 (Human umbilical cord tissue-derived MSCs : UC-MSCs) を投与し、それぞれの有効性、差異について検証した。さらに MSCs 培養上清投与で細胞投与時と同様の効果が得られるかを検証した。C57Bl/6(雄、10-12 週令)に DSS を 1 週間経口投与し腸炎を惹起させた。DSS 投与開始後 3 日目(早期投与群)または 7 日目(後期投与群)に AD-MSCs または UC-MSCs を 1×10^6 cells 尾静注し、DSS 投与開始後 21 日目に屠殺した。臨床学的、組織学的、サイトカイン測定で評価した。MSCs 培養上清は投与開始後 3、4 日目に尾静注し、DSS 投与開始後 21 日目に屠殺、同様に評価した。作用機序を検証するため MSCs 投与翌日の腸管を摘出し、次世代シーケンシング(Next-Generation Sequencing : NGS)によって腸管で生じる初期の変化を網羅的に解析した。さらに *in vitro* で AD-MSCs、UC-MSCs を用いて正常マウス血清または DSS 腸炎マウス血清添加群、血清非添加群を設定し、それらと共培養した MSCs を (Cap analysis of gene expression : CAGE) で性状の変化を解析した。早期投与群では AD-MSCs、UC-MSCs の両方で腸炎症状、組織学的炎症所見の軽快が示された。大腸組織を検体とした RT-PCR では、炎症性サイトカインである *Il-6*、*Tnf α* 、*Il-17 α* が有意に低下した。後期投与群ではいずれの MSCs でも炎症軽減効果が確認できなかった。MSCs 培養上清では AD-MSCs、UC-MSCs 由来のいずれも腸炎症状が軽減し、RT-PCR では *Tnf α* が有意に低下した。NGS による解析では、AD-MSC 投

与群では 451 個、UC-MSC 投与群では 893 個が該当し、共通項目は 74 個であった。CAGE による解析では、血清添加で 4 倍以上に発現増加または 0.25 倍以下に発現減少した遺伝子を抽出し、AD-MSCs、UC-MSCs を用いて正常マウス血清、DSS 腸炎マウス血清添加群のいずれにおいても発現増加がみられた遺伝子は C10orf54、CA9、CLGN、CXCL5、DHRS3、FHOD3、KRT7、RARRES1、RRAD、STC1、TNFRSF11B、TERM1 であった。本研究では AD-MSCs、UC-MSCs のいずれでも同様の腸管炎症軽減効果があることを明らかにし、本研究成果を Bioresearch 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。