

# X線照射を用いたマウス慢性GVHD 全身性強皮症モデルにおける ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の 薬効評価検討

---

**株式会社 L S I M 安全科学研究所**  
熊本研究所 薬理研究部

細井 紫絹, 涌生 ゆみ, 樋川 奈穂美,  
守住 孝輔, 片山 誠一, 西 勝英

# COI開示

## X線照射を用いたマウス慢性GVHD 全身性強皮症モデルにおける ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の 薬効評価検討

株式会社LSIM安全科学研究所

熊本研究所 薬理研究部  
細井 紫絹

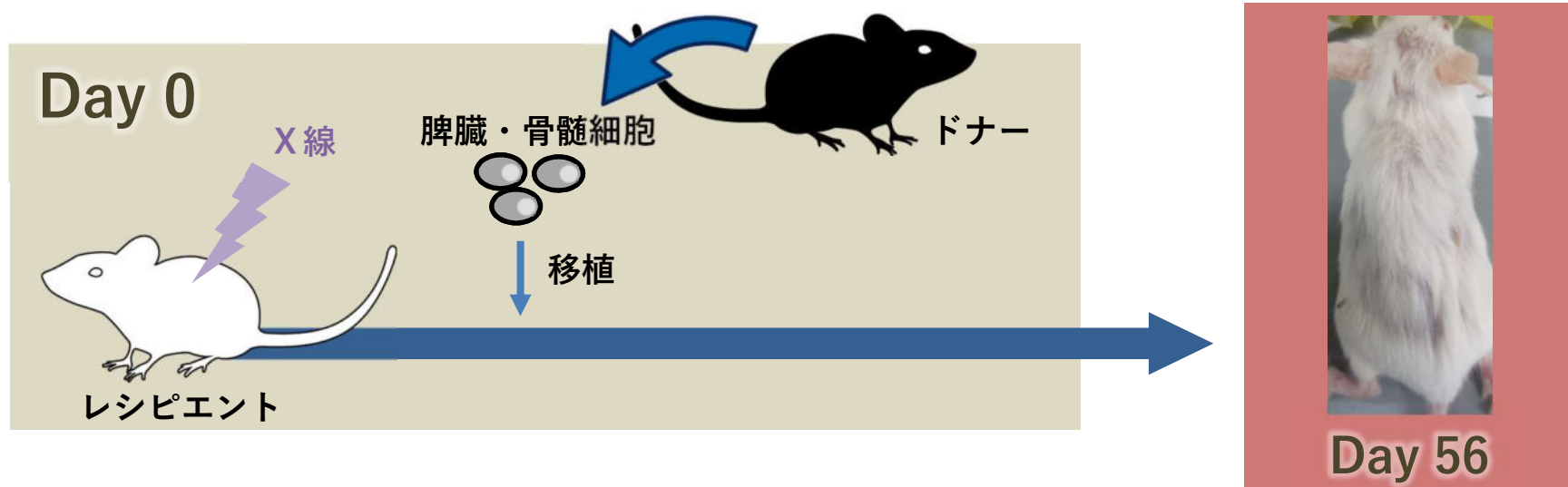
筆頭演者は、過去1年間（1月～12月）において、  
本演題の発表に関して開示すべきCOIはありません。

# 目次

- 目的
- 実験1：モデル作製検討
  - 方法
  - 結果：病態スコア, 病理組織学的検査
- 実験2：hMSC投与による薬効評価検討
  - 方法
  - 結果：病態スコア, 皮膚厚, 病理組織学的検査
- まとめ／考察

# 目的

移植片対宿主病 (graft-versus-host disease:GVHD) は、同種異系間移植に伴う合併症の一つであり、移植片が宿主を攻撃することで生じる症状の総称である。全身性強皮症様症状は慢性GVHDの主要な症状であり、進行性の**皮膚硬化**を呈する。しかし、現在有用なin vivoの評価系がないため治療薬の開発が進んでいない。そこで我々は、X線照射を用いた慢性GVHD全身性強皮症モデルを作製し、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) の効果を検討することで再生医療分野におけるモデルの有用性を検討した。



# 目次

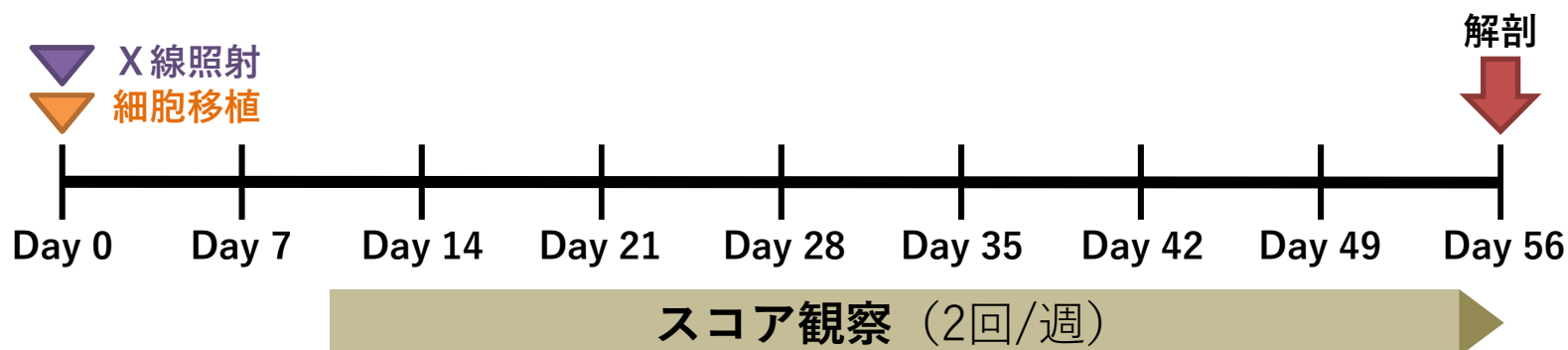
- 目的
- 実験1：モデル作製検討
  - 方法
  - 結果：病態スコア, 病理組織学的検査
- 実験2：hMSC投与による薬効評価検討
  - 方法
  - 結果：病態スコア, 皮膚厚, 病理組織学的検査
- まとめ／考察

# 方法

## 動物

- レシピエント：BALB/c, ♂, 10週齢
- ドナー：B10.D2, ♀, 10週齢

## 実験スケジュール



## 群構成

	試験群	細胞量 (cells/匹)	X線照射量	例数
1	正常	—	—	3
2	病態モデル	Sp: $1 \times 10^6$ , BM: $5 \times 10^5$	7 Gy	5

Sp: 脾臓細胞, BM: 骨髄細胞

# 方法

## 》X線照射

- 7Gy, 全身照射
- MX-160 Labo (メディエックステック株式会社) 使用

## 》細胞移植

X線照射から約6時間後に、脾臓細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/匹) 及び骨髄細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/匹) を尾静脈内投与により移植

## 》評価項目

- **病態スコア**：背部の脱毛及びその他部位の皮膚症状をスコア化し、Day 10から2回/週の頻度で観察
  - 背部脱毛：右表参照
  - その他皮膚症状：口吻周囲，眼周囲，耳，尾，四肢のいずれかに脱毛を含む皮膚病変が認められた場合，部位ごとにスコアを0.3加算.
- **病理組織学的検査**：HE染色による定性検査
  - Day 56 (細胞移植後8W)

最高：4.5  
(背部脱毛：3, その他皮膚：1.5)

スコア	クライテリア
0	被毛異常なし
0.5	薄毛範囲 $< 1 \text{ cm}^2$
1	薄毛範囲 $> 1 \text{ cm}^2$
1.5	脱毛範囲 $< 1 \text{ cm}^2$
2	脱毛範囲 $1 \text{ cm}^2 \sim 2 \text{ cm}^2$
2.5	脱毛範囲 $2 \text{ cm}^2 \sim 3 \text{ cm}^2$
3	脱毛範囲 $> 3 \text{ cm}^2$

# 結果：病態スコア

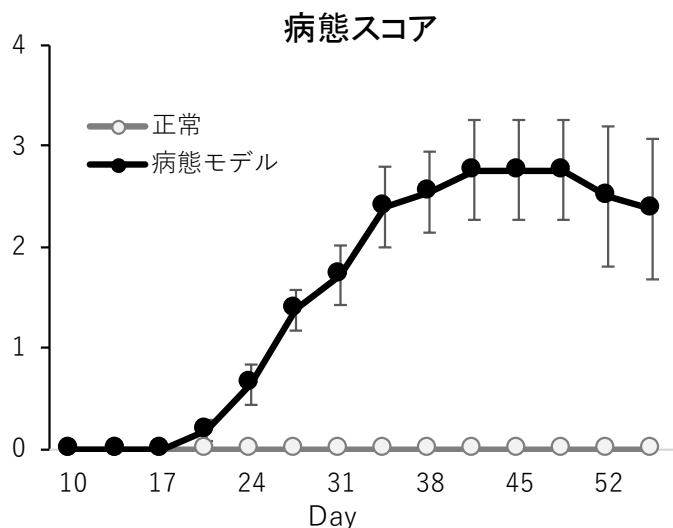


Fig 1 病態スコア

Mean ± SEM, n=5

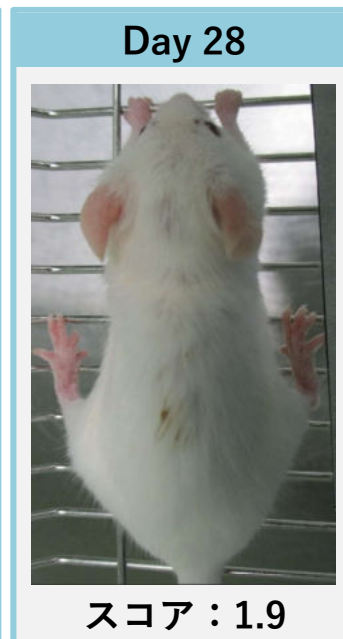
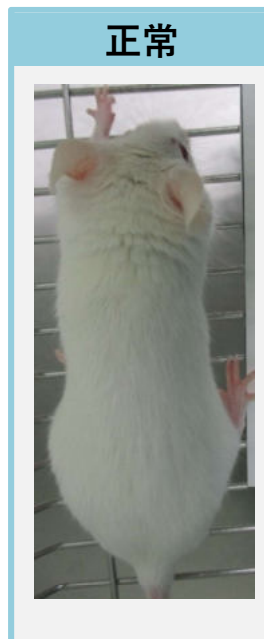


Fig 2  
動物写真



病態スコアは、Day 21から上昇し始め、Day 42でプラトーに達した。

5例中1例では実験期間を通して脱毛は認められなかった。

Day 45から一部の個体で被毛の再生等が認められたため、スコアが減少に転じた。

病態スコア以外で認められた症状は、下痢、耳の発赤、掻痒行動、易過敏性等であった。



## 結果：病理組織学的検査

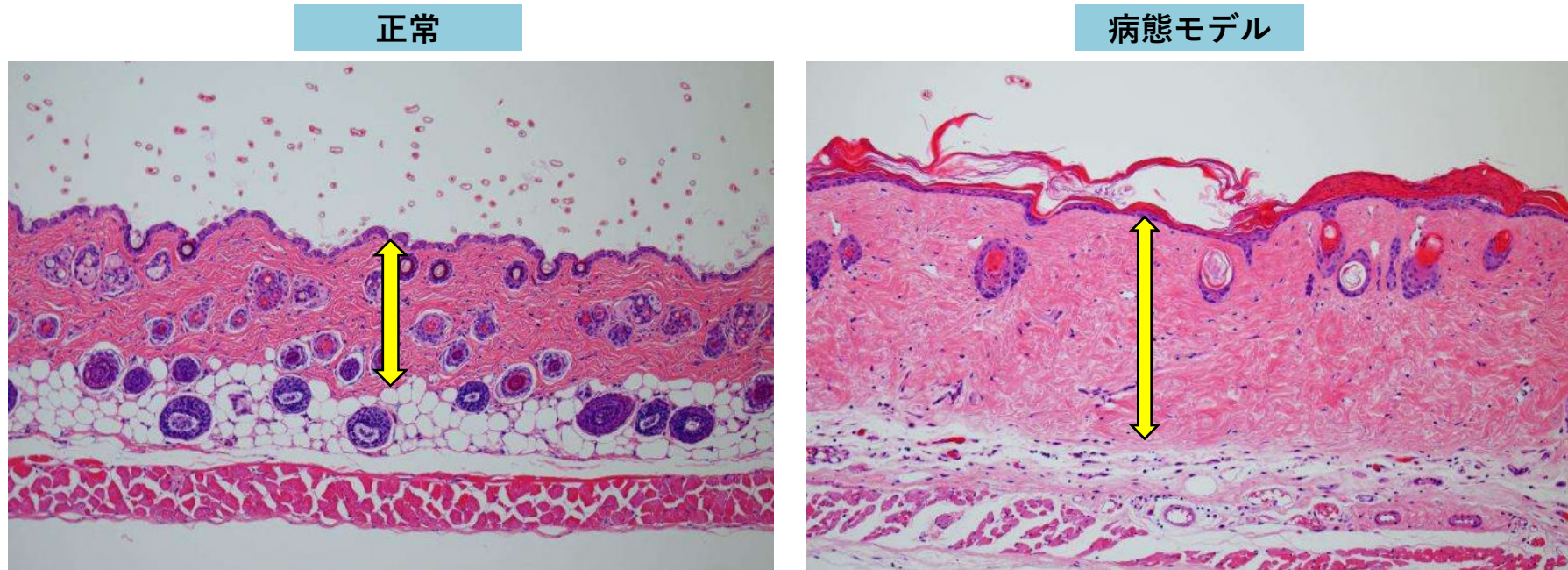


Fig 3 病理組織学的検査（皮膚の肥厚）

↔ : 皮膚厚

病理組織学的検査では、病態群全例で顕著な毛包の減少が認められた。さらに、5例中1例においてヒトの強皮症患者に特徴的な所見の一つである膠原線維の膨化、皮膚の肥厚が認められた。

※膠原線維の膨化：膠原線維の束が融合し、境界が不明瞭になる所見

動物の外観変化に伴う病態スコアの上昇と、病理組織学的検査における各所見から、強皮症様症状の変化を捉えることができ、モデルの作製ができたと判断した。

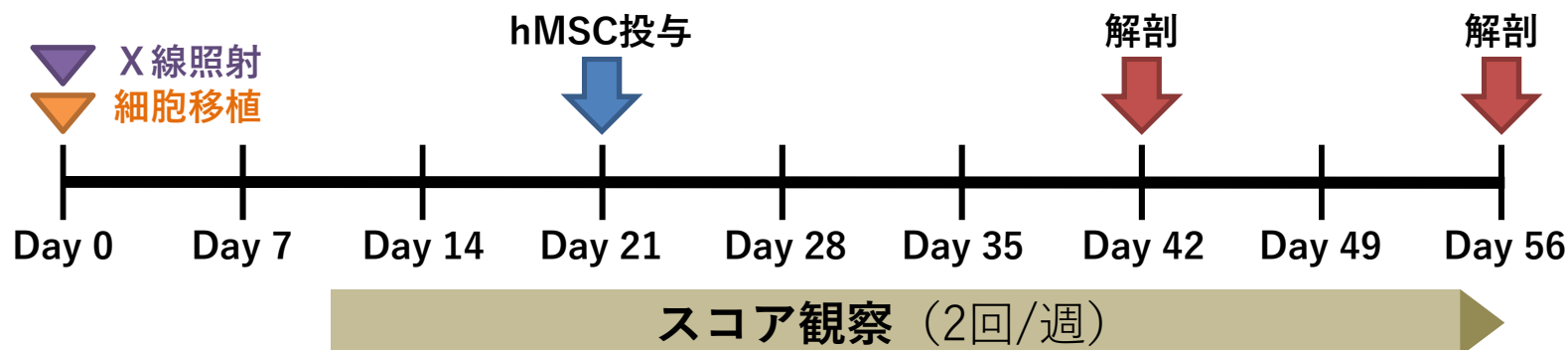
# 目次

- 目的
- 実験 1 : モデル作製検討
  - 方法
  - 結果 : 病態スコア, 病理組織学的検査
- 実験 2 : hMSC投与による薬効評価検討
  - 方法
  - 結果 : 病態スコア, 皮膚厚, 病理組織学的検査
- まとめ / 考察

# 方法

※動物・X線照射・細胞移植は、実験1と同条件

## 実験スケジュール



## 群構成

	試験群	移植細胞量 (cells/匹)	hMSC投与量 (cells/匹)	照射量	開始例数	採用例数
1	正常	—	—	—	5	5
2	Control-6W	Sp: $1 \times 10^6$ BM: $5 \times 10^5$	0	7 Gy	15	13
3	hMSC投与-6W		$1 \times 10^6$		15	12
4	Control-8W		0		15	10
5	hMSC投与-8W		$1 \times 10^6$		15	10

Sp: 脾臓細胞, BM: 骨髄細胞

# 方 法

## hMSC投与

- $1 \times 10^6$  cells/匹, Day 21に単回尾静脈内投与.

## 評価項目

- **病態スコア**：実験 1 と同様に, Day 10から2回/週の頻度で観察
- **皮膚厚**：病理組織標本にて測定
- **病理組織学的検査**：HE, MT染色による定性検査
  - 細胞移植後後6W 及び8W

# 結果：病態スコア・皮膚厚

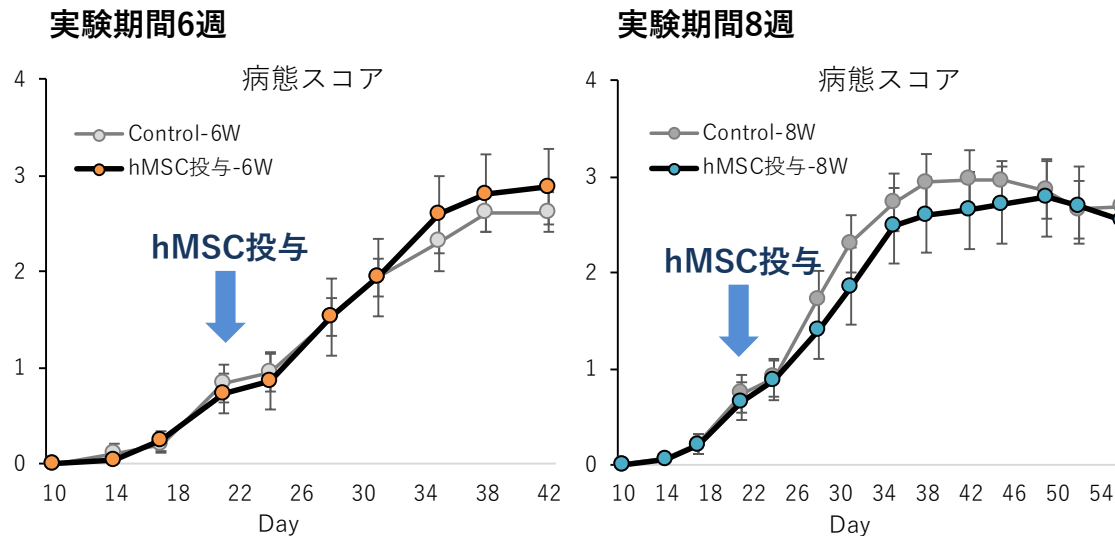


Fig 4 病態スコア

Mean ± SEM, n=10-13  
 正常群は実験期間を通してスコア0であった。

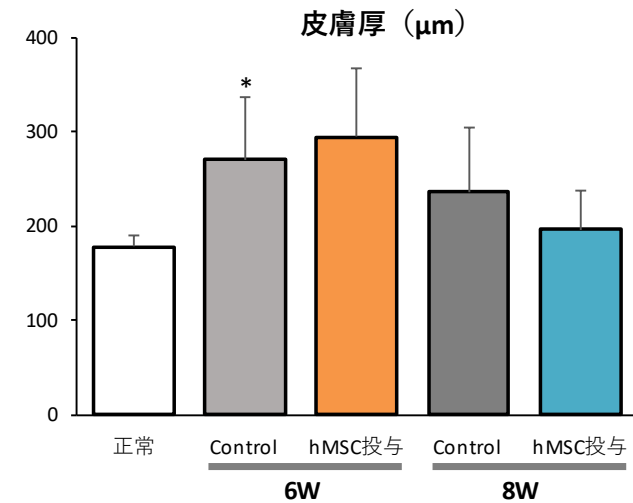


Fig 5 皮膚厚

Mean ± SEM, n=10-13  
 \* P < 0.05, 正常群と比べて有意差あり  
 (Studentのt検定)

**病態スコア**は、正常群と比較してモデル全群でDay 17から上昇が認められた。脱毛が認められない個体が、実験期間を通して各群10~20%の割合で発生した。各Control群と比較して各hMSC投与群は、顕著なスコア減少は認められなかった。

**皮膚厚**は、正常群と比較して各Control群で高値を示した。Control-6W群と比較して、hMSC投与-6W群は同程度であったが、hMSC投与-8W群はControl-8W群と比較して低値を示した。

## 結果：病理組織学的検査

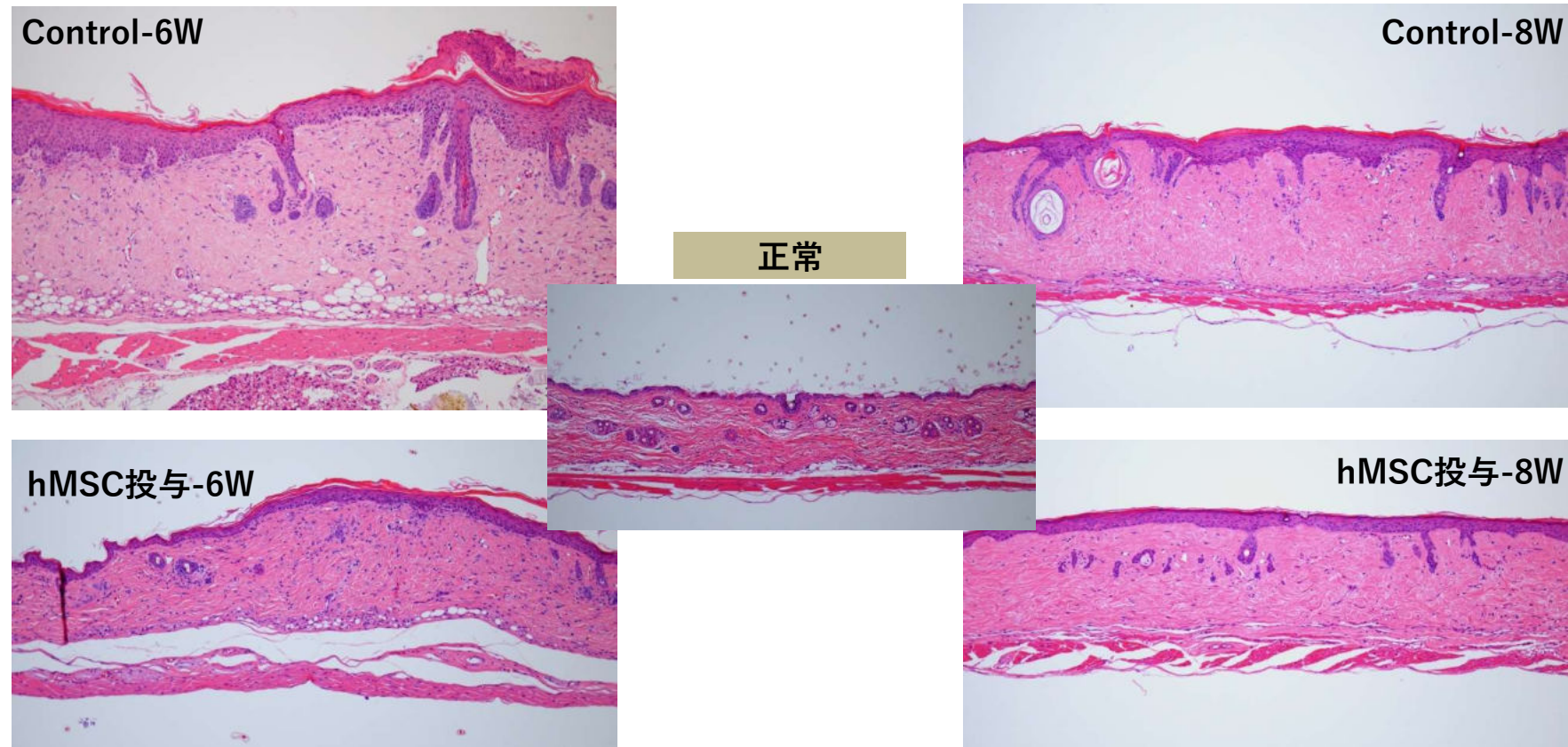


Fig 6 病理組織学的検査

病理組織学的検査では、正常群以外の全群にて皮膚の肥厚が散見された。  
また、膠原線維の膨化はほとんどの例で認められた。  
炎症細胞の浸潤も認められ、実験期間6週群は実験期間8週群より強い浸潤であった。  
膠原線維の膨化及び炎症細胞浸潤は、Control群とhMSC投与群の間に差は認められなかった。

# 目次

- 目的
- 実験 1 : モデル作製検討
  - 方法
  - 結果 : 病態スコア, 病理組織学的検査
- 実験 2 : hMSC投与による薬効評価検討
  - 方法
  - 結果 : 病態スコア, 皮膚厚, 病理組織学的検査
- まとめ / 考察

## まとめ

---

- 実験1では、病態スコアの上昇が認められ (Fig 1), 病理組織学的検査から5例中1例で皮膚肥厚や膠原線維の膨化, 全例で毛包減少など強皮症様症状の変化を捉えることができた (Fig 3) .
- 実験2の各Control群の病態スコアの推移ならびに病理組織学的検査は, 実験1と同程度の変化を示したことにより, モデルの再現性を確認できた (Fig 4, 6) .
- 実験2では, 実験1の結果より皮膚厚の測定を実施したところ, 顕著な肥厚を捉えることができた. また, hMSC投与-6W群の皮膚厚はControl-6W群と比較して同程度であったが, hMSC投与-8W群の皮膚厚はControl-8W群と比較して低値を示した (Fig 5) .



## 考察

---

以上の結果から、本モデルは細胞移植後8週まで、強皮症様症状の変化を捉えることができた。

本試験条件下では、hMSCの単回投与による明らかな改善作用は認められなかったが、皮膚厚で改善傾向を示した。

本モデルは、動物の個体差が大きく影響し、ロットにより発症の時期や程度に差が出ることが分かっている。そのため更なる改良が必要だが、ヒトの臨床所見を反映しており、慢性GVHD全身性强皮症モデルとして、有用だと判断した。

また、皮膚だけでなく臓器障害も認められることから、強皮症のみならず慢性GVHD評価での有用性も示唆された。