

Biochemical & Pharmacotherapy
131(2020)110789

ヒト臍帯血由来の幹細胞培養上清液の皮膚免疫への効果

Effects of conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in the skin immune response

Highlights

USC-CM は、Th2 細胞と B 細胞の調節を通じて皮膚の免疫応答に影響を与えます。

USC-CM は、アトピー患者の皮膚水分含有量が増加し、TEWL（経皮水分蒸散量）が減少したことをヒトで確認しました。

私たちの調査結果は、USC-CM が化粧品や医薬品としてのアトピー性皮膚炎治療効果を潜在的に持っている可能性があることを示唆しています。

USC-CM は、フューチャーセルジャパン(株)が製造販売するベビーステム、セルコードの原料である Kang Stem Bio Tech 社製の臍帯血由来培養上清液です。

Original article



Effects of conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in the skin immune response

Yoon-Jin Kim ^{a,1}, Hee-Jin Ahn ^{e,1}, Seung-Hee Lee ^b, Mi-Hye Lee ^c, Kyung-Sun Kang ^{d,e,*}

^a *Derma Science R&D Center, Primoris International CO., LTD., #1504, A Bldg., 60 Haahn-ro, Gwangmyeong-si, Gyeonggi-do, 14332, Republic of Korea*

^b *Stem Cells and Regenerative Bioengineering Institute, Kangstem Biotech Co., Ltd., 2nd Floor, Biotechnology Center, #81 Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, 08826, Republic of Korea*

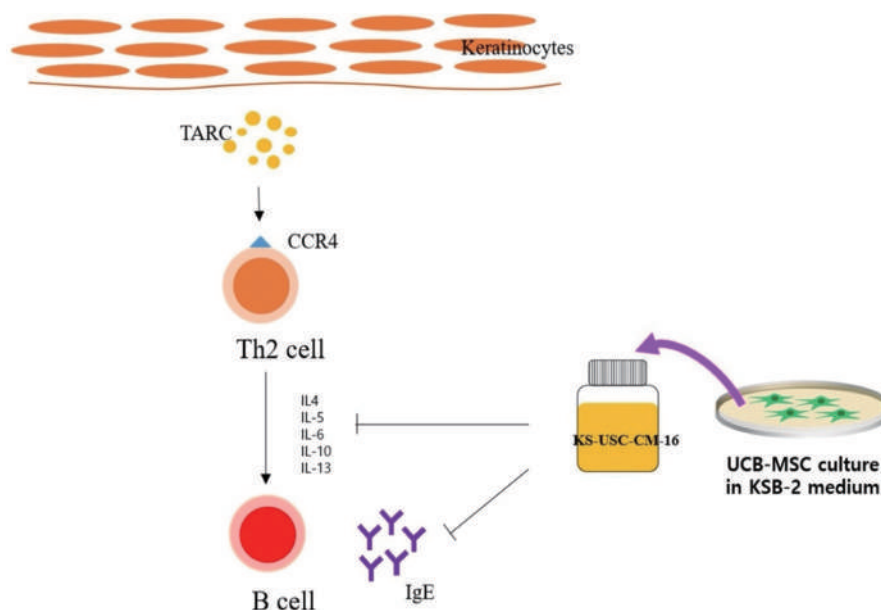
^c *GMP Center, Kangstem Biotech Co., Ltd., 6nd Floor, A Bldg., 60 Haahn-ro, Gwangmyeong-si, Gyeonggi-do, 14332, Republic of Korea*

^d *Adult Stem Cell Research Center, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, 08826, Republic of Korea*

^e *Cytherapy R&D Center, PRIMORIS CO., LTD., #1504, A Bldg., 60 Haahn-ro, Gwangmyeong-si, Gyeonggi-do, 14332, Republic of Korea*

Abstract (抄録)

アトピー性皮膚炎 (AD) は、アレルギー性の 2 型炎症因子が重要な役割を果たす炎症性皮膚疾患です。本研究では、現在使用されている AD 治療の限界を克服できる副作用のリスクが低い効果的な治療法として、ヒト臍帯血細胞順化培養液 (USC-CM) の抗炎症効果を調査しました。USC-CM は抗炎症効果と関連する様々な成長因子とサイトカインを持っていることを発見しました。RT-PCR および ELISA 分析は、USC-CM が TNF- α /IFN- γ 刺激 HaCaT 細胞において 2 型サイトカインおよびケモカイン胸腺および活性化調節ケモカイン (TARC)、TNF- α および IL-6 のレベルを阻害することを示しました。さらに、USC-CM は Th2 細胞の IL-4 および IL-13 レベルを阻害しました。したがって、我々の研究の結果は、USC-CM が B 細胞株を活性化することによる免疫グロブリン (IgE) 分泌の阻害に関連する TNF- α /IFN- γ 刺激 HaCaT 細胞において抗炎症効果を有することを示した。私たちの *in vivo* の結果は、USC-CM を軽度の AD 患者の病変に 4 週間適用すると、Corneometer のレベルを上げ、経表皮水分喪失 (TEWL) の値を下げることで、皮膚バリアが強化されることを示しました。結論として、結果は、USC-CM が化粧品および医薬品としての AD の治療効果を有する可能性があることを示唆しています。



1. はじめに

アトピー性皮膚炎 (AD) は、免疫学的異常によって引き起こされるそう痒症および皮膚湿疹を特徴とする慢性炎症性皮膚疾患です [1,2]。AD は、T リンパ球の活性化、サイトカイン系の異常、細胞性免疫の低下、免疫グロブリン E (IgE) の増加などの免疫学的異常、生理学的要因、皮膚の生化学的欠陥などのいくつかの要因によって引き起こされます [3-5]。IgE は血液中に存在する免疫タンパク質であり、アレルギー性炎症の機能は、IgE および IgE を介した肥満細胞と好酸球の活性化が AD に寄与することを示唆しています [6]。

近年、AD や様々なアレルギー性疾患が増加しており、AD の様々な治療法が考案されています。しかし、現在治療薬として使用されている免疫抑制剤やステロイドには、長期使用時の皮膚の菲薄化やたるみにより、既存量を超えて使用した場合にのみ現れるさまざまな副作用があります。これらの制限を克服するために、副作用のリスクが低い効果的な予防戦略 / 治療法を開発する緊急の必要性があります。

リンパ節では、T 細胞が増殖して分化すると IFN- γ が分泌され、抗原を含む樹状細胞と T 細胞の相互作用により CD4 + T 細胞が Th1 細胞に分化します。続いて、IL-4、IL-5、IL-13 を Th2 細胞に分泌し、IL-17 と IL-22 を Th17 細胞に分泌します。樹状細胞は、サイトカインや共プロモーターの発現を通じて、これらの T 細胞の分化に重要な役割を果たします。樹状細胞は、サイトカインや共プロモーター分子の発現を通じて、これらの T 細胞の分化に重要な役割を果たします。さらに、AD のケラチノサイトは多数のケモカインを発現して、樹状細胞、T 細胞、その他の白血球の皮膚への流入を誘発し、CCL27、CCL17 / TARC、CCL22 / MDC などの炎症を増加させます [7]。このケモカインは、CCR4 を介して Th2 細胞の遊走と炎症部位への浸潤を誘発し、Th2 免疫応答を引き起こすことが知られています [8-10]。ケモカイン (TSLP、RANTES、CTACK、LARC、MDC、TARC) 産生の増加、Th1 細胞に対し Th2 細胞数の増加、サイトカイン (IL-10、IL-4、IL-5、TNF- α など) の増加、IgE 産生の増加は AD の免疫学的症状として報告されています。皮膚の免疫応答に関与するケラチノサイト、Th2 細胞、B 細胞、および炎症細胞を標的とすることは、AD の新しい治療戦略を構成する可能性があります。

一般的に、AD の臨床的特徴には、皮膚バリアの破壊により重度のかゆみや炎症が含まれます [11]。AD の臨床的特徴を調査するために、皮膚の保湿と皮膚バリア保護能力は、AD 皮膚の表皮バリア損傷の正確なマーカーとして経表皮水分喪失 (TEWL) と Corneometer を使用して評価できます [12,13]。

幹細胞治療は、体内の自己治癒能力を備えた細胞に高度なバイオテクノロジーを使用して、人間の不治の病を治療する新しいタイプの治療法です。これは、既存の外科的または薬物療法の限界を克服する薬です。このため、間葉系幹細胞 (MSC) への関心が最近高まっており、MSC とその馴化培地が広く研究されています [14]。MSC は、さまざまな組織に由来する多能性細胞です。特に臍帯血 (UCB) 由来の MSC は、他の MSC に比べて最も若い幹細胞であり、幹細胞の中で最も優れた特性と再生能力を持っています [15-17]。最近の研究では、ヒト臍帯血由来間葉系幹細胞 (UCB-MSC) が炎症性阻害剤の分泌を介して免疫抑制効果を示すことが示され、AD の有望な治療アプローチとして注目されています。[18、19]。ただし、MSCs 馴化培地の抗炎症効果は比較的不明です。

したがって、この研究の目的は、ヒト臍帯血由来間葉系幹細胞 (USC-CM) の馴化培地が、ケラチノサイト、Th2 細胞、B 細胞、炎症細胞、およびヒトのアトピー性皮膚に及ぼす影響を調べる事です。

2. 実験方法

2.1. USC-CM の培養

UCB-MSC の隔離、培養および特性化は先に述べたとおりに行われました [20]。UCB 検体は FORMIZ WOMEN's Hospital(ソウル、韓国) で提供されました。この実験過程は 2018 年 8 月 09 日韓国機関審査委員会 (IRB No.219255-201305-BR-001) により承認されました。UCB-MSC では、10% の FBS とともに (FBS、Gibco) KSB-3 を加えて、37°C、5% の CO₂ 条件で 6 継代まで増殖しました。UCB-MSC(2x10⁵cells/ flask) は、T-25 フラスコに播種し、FBS10% で KSB-3 において 48 時間培養されました。PBS で 2 回洗浄した培養培地は、表皮成長因子 (EGF) (10ng/mL) と基本繊維増長因子 (bFGF) (10ng/mL) を含む DMEM (Gibco) に変更され、その後の培養期間は 96 時間でした。USC-CM を収集し、1500rpm で 5 分間遠心分離した後、最終的に 0.22 μ m フィルターを使用して滅菌処理しました。

2.2 ヒトタンパク質抗体アレイ

ヒトタンパク質は、Human Antibody Array1000 (#AAH-BLM-1000-4、RayBiotech) を使用して、製造元の指示に従って分析しました。メンブレンは検出バッファーを使用して展開され、濃度計を使用し分析しました。検出後、Image J ソフトウェア (NIH 国立衛生研究所) を使用して、フィルムをスキャンした画像を処理して処理しました。シグナル強度は、比較のために内部のポジティブコントロールに対して正規化されました。

2.3. 細胞増殖アッセイ

ヒト皮膚ケラチノサイト細胞株 (HaCaT 細胞) は、ATCC から (米国) から入手しました。HaCaT 細胞 (1.5 \times 10⁵ cells/well) を 24 ウェルプレートに播種し、10%FBS を含む DMEM / F12 (Gibco) で 24 時間培養しました。細胞をプレートに付着させた後、USC-CM をいくつかの濃度 (1、10、50、および 100%) で処理し、TNF- α (10ng / mL) および IFN- γ の有無にかかわらず刺激しました。 γ (10ng/mL)。24 時間後、Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo、USA) を使用して細胞生存率を測定しました。CCK-8 溶液をウェルに加え、細胞をさらに 2 時間インキュベートしました。次に、マイクロプレートリーダー (Tecan、Switzerland) を使用して 45nm で吸光度を測定しました。

2.4. mRNA の分離と cDNA 合成、定量 RT-PCR

6 ウェルプレートの HaCaT 細胞 (3.5 \times 10⁵cells/well) をさまざまな濃度 (50 および 100%) の USC-CM で 1 時間前処理し、さらに TNF- α /IFN- γ (各 10ng/mL) で 6 時間刺激しました。細胞を回収し、RNA ミニキット (Invitrogen) を使用して全細胞 RNA を抽出した後、cDNA 合成キット (Bioneer) を使用して逆転写を行いました。cDNA と SYBR のグリーン PCR マスターミックス (Applied Biosystems) と各プライマーを使用した定量的 PCR を行いました。各遺伝子発現レベルは、ハウスキープニングコントロールとして RPL13A を使用して正規化されました。プライマー配列は表 1

2.5. 酵素免疫測定法 (ELISA)

6well plate の HaCaT 細胞 (3.5 \times 10⁵cells/well) をさまざまな濃度 (50 および 100%) の USC-CM で 1 時間前処理し、TNF- α /IFN- γ で 24 時間刺激しました (各 10ng/mL)。上清を回収し、12,000g で 5 分間遠心分離しました。ケモカイン TARC、TNF- α 、および IL-6 のレベルは、ELISA キット (R&D systems、米国) によって製造元のプロトコルに従って測定されました。

2.6. 末梢血単核細胞 (PBMC) の培養

PBMC (ATCC) は、10%FBS を添加した RPMI 1640 培地 (Gibco) で 37° C, 5% CO₂ で培養しました。細胞 (1×10⁶cells / 24well) は USC-CM 存在下で抗 IFN- γ (1 ug / mL)、IL-2 (5 ng / mL)、IL-4 (10ng / mL)、CD3+CD28 抗体 (T リンパ球活性化) で 4 日間刺激しました。上清を回収し、製造元のプロトコルに従って IL-4 および IL-13 ELISA (R&D systems) で測定しました。

2.7. U266B1 細胞からの IgE 分泌の測定

ヒト U266B1 細胞 (ATCC) は、10%FBS を添加した RPMI1640 培地で 37° C および 5%CO₂ で培養しました。細胞 (1×10⁶ cells/ 24well) を、USC-CM の存在下でリポ多糖 (LPS) (1×ug / mL)、IL-4 (5 ng / mL) で 3 日間刺激しました。上清を回収し、サンドイッチ ELISA (Abcam, USA) による IgE アッセイを行いました。

2.8. ヒトの in vivo 試験

ヒトの in vivo 試験は、CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY CLINICAL TRIAL CENTER (Gwangju, Korea)

において実施されました。この作業は、2017 年 11 月 15 日に CHONNAM 大学病院研究所審査委員会によって承認されました (IRB, CNUH-2017-293)。28 人の男性と女性を対象に行い、テスト前に各被験者に説明を行いました。Corneometer と TEWL の評価は、製品の塗布前、塗布後 2 週間と 4 週間後に実施しました。皮膚の測定は、CorneometerCM 825 を使用して測定されました。(CK エレクトロニクス)。皮膚の TEWL は、テワメーター (Tewameter TM300、ドイツ) を使用して測定しました。

2.9. 統計解析

全てのデータは平均 \pm 標準偏差 (SD) として表しました。

グループ間の統計的に有意な差は、GraphPadPrism5 ソフトウェアを使用した t 検定によって評価されました。P 値 <0.05 は有意であると見なされました。* P <0.05、** P <0.01、*** P 0.001 として図に示されています。

Table 1
Primers used in research.

Gene	Species	Primer
TARC	Human	F 5'-actgctccagggatgccatcgTTTT -3'
		R 5'-acaaggggatgggatctcctcactg-3'
TNF- α	Human	F 5'-ctatctgggaggggtctcc-3'
		R 5'-ggttgaggggtgtctgaagga-3'
IL-1 β	Human	F 5'-cagccaatcttcattgctca-3'
		R 5'-gcatcttctcagcttgcc-3'
IL-6	Human	F 5'-aaagaggcactggcagaaaa-3'
		R 5'-caggggtggttattgcatct-3'
RPL13A	Human	F 5'-gcacgaccttgaggcagcc -3'
		R 5'-catcgtggctaaacaggtactg-3'

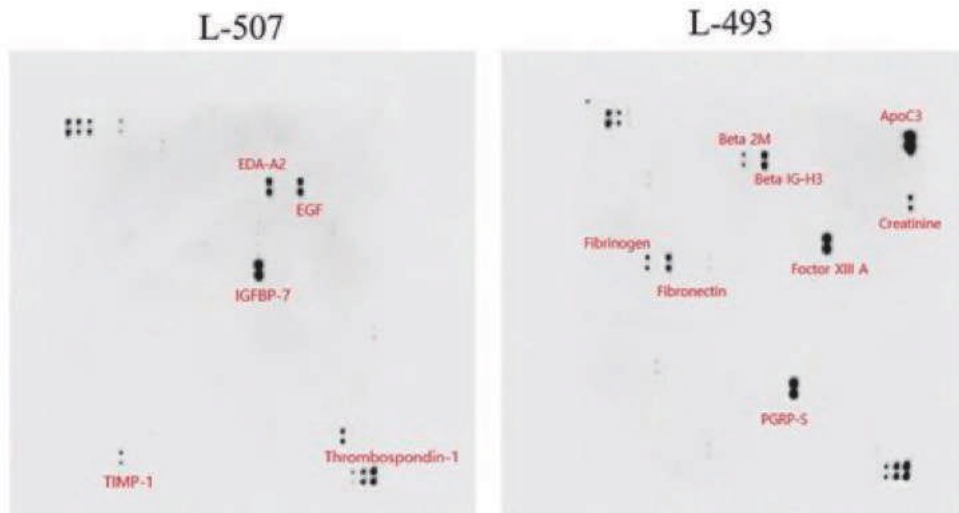


図1.USC-CMのヒト抗体アレイ分析。アレイLシリーズ（1000protein）に対するUSC-CMの反応性を示す画像例。

3. 結果

3.1. USC-CMは多様な成長因子やサイトカインを含有する。

USC-CMの成長因子とサイトカインを決定するために、ヒト抗体アレイ1000を使用して、USC-CMのさまざまなサイトカインを分析しました。メンブレンには、1000種類の成長因子および受容体に対する抗体が標識されています。L-507メンブレンは9つのポジティブコントロールと7つのネガティブコントロールを示し、L-493メンブレンは9つのポジティブコントロールと8つのネガティブコントロールを示しました（図1）。ヒト成長因子抗体アレイの結果、USC-CMはEGF、TIMP-1、IGFBP-7、トロンボスポンジン-1、フィブリノーゲン、フィブロネクチンのような高濃度の成長因子や抗炎症性のサイトカインを含有していることが明らかとなりました。全体として、これらの結果は、USC-CMにはさまざまな成長因子があり、サイトカインは抗炎症作用に関連していることを示しています。

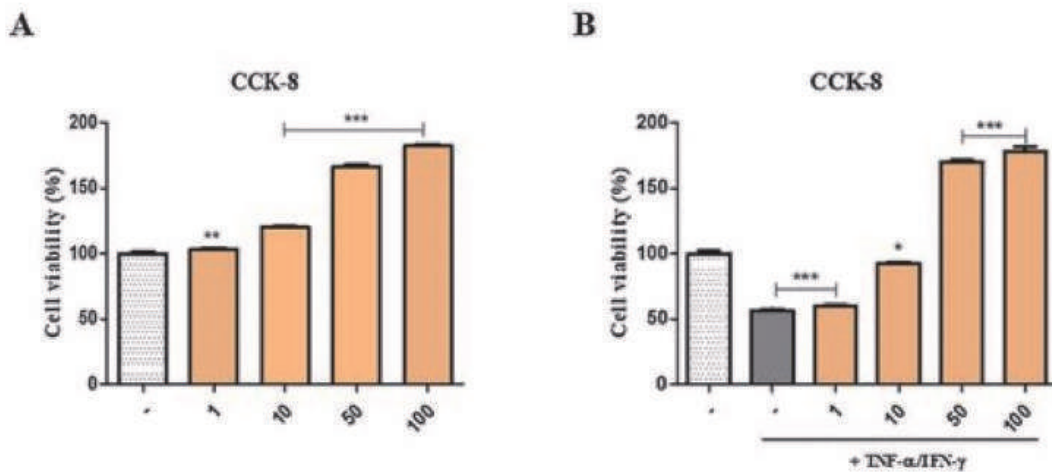


図2.HaCaT細胞に対するUSC-CMの細胞毒性効果。細胞生存率は、CCK-8アッセイを使用して決定されました。各細胞を24ウェルプレートに播種し、さまざまな濃度のUSC-CMで24時間処理しました。(A)一般的な状態タイプのHaCaT細胞に対するUSC-CMの細胞毒性効果。(B)TNF- α /IFN- γ で刺激されたHaCaT細胞に対するUSC-CMの細胞毒性効果。

3.2. HaCaT 細胞における USC-CM の細胞毒性

HaCaT 細胞に対する USC-CM の細胞毒性を測定するために、CCK-8 アッセイを使用して細胞の生存率を調べました。各条件付きタイプは、異なる濃度の USC-CM (1、10、50、および 100%) とともに 24 時間培養しました。炎症誘発型では、各 TNF- α および IFN- γ 10ng/mL を 1 時間処理しました。一般的な状態のタイプでは、USC-CM は、対照群と比較して、すべての濃度で用量依存的に細胞生存率を低下させることなく細胞増殖を促進することにより、有意な細胞毒性効果を示しませんでした (図 2A)。TNF- α /IFN- γ 刺激炎症誘発型では、細胞生存率は 50% に低下しましたが、USC-CM で用量依存的に処理した場合、対照と比較して細胞生存率が上昇することが調査されました。したがって、最も細胞増殖促進効果があるのは USC-CM の最適濃度を 50% および 100% と決定しました。

3.3. TNF- α /IFN- γ で刺激された HaCaT 細胞における mRNA の発現への影響。

ヒトケラチノサイトにおける USC-CM の抗炎症活性を評価するために、TNF- α /IFN- γ 刺激により産生される HaCaT 細胞における炎症誘発性ケモカインを測定しました。qRT-PCR により、TARC、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の mRNA 発現を分析しました。qRT-PCR では、TNF- α /IFN- γ を 6 時間処理後 TARC、TNF- α 、IL-1 β 、および IL-6 の mRNA 発現レベルを有意に増加させることを示しました。USC-CM の全ての濃度群において、TARC、TNF- α 、および IL-6 は、陽性コントロールと比較して有意に阻害されました。IL-1 β の場合、USC-CM の 50% では抑制効果がありませんでしたが、100% の濃度では効果が確認されました。以上のことから USC-CM 処理により TNF- α /IFN- γ 誘発性の過剰発現炎症性サイトカインの TARC、TNF- α 、IL-1 β および IL-6 mRNA の発現レベルが阻害される事が示されました (図 3)。

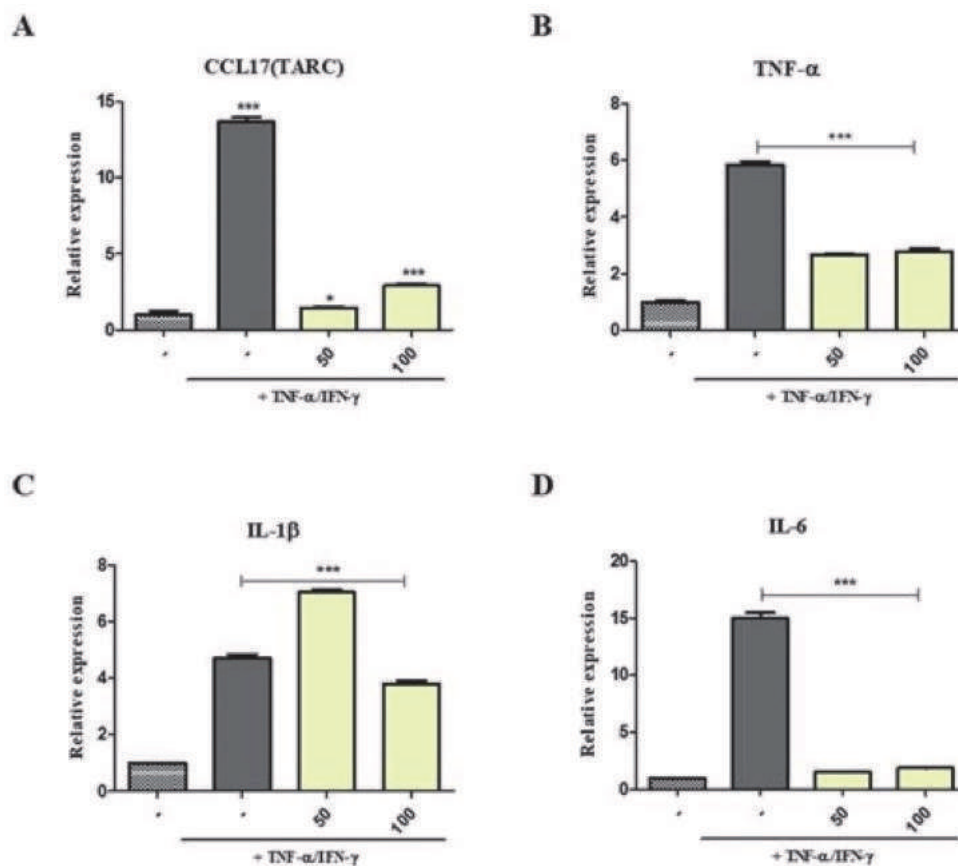


図 3. TNF- α /IFN- γ で刺激された HaCaT 細胞におけるサイトカインおよびケモカインの発現に対する USC-CM の阻害効果。(A) TARC (B) TNF- α (C) IL-1 β (D) IL-6 mRNA の発現は、qRT-PCR を使用して決定されました。

3.4. USC-CM が TNF- α /IFN- γ によって誘発される HaCaT 細胞のケモカイン産生に及ぼす影響

HaCaT 細胞における USC-CM の抗炎症活性を定量的に調べるために、我々は、ELISA によって HaCaT 細胞における IL-1 β を除く TARC、TNF- α および IL-6 タンパク質レベルに対する USC-CM の効果を分析しました。TNF- α /IFN- γ を 24 時間処理すると、上清中のケモカイン TARC、TNF- α 、IL-6 のレベルが大幅に上昇しました。TARC タンパク質レベルは、USC-CM での治療により、すべての濃度で用量依存的に有意に阻害されました。TNF- α および IL-6 の場合、タンパク質レベルは USC-CM50% での処理によって大幅に抑制されました。しかし、USC-CM100% では TNF- α と IL-6 のタンパク質レベルに阻害効果を及ぼしませんでした (図 4)。したがって、これらの結果は、USC-CM が HaCaT 細胞に対して抗炎症作用を有し、AD 様炎症下での 2 型サイトカインおよびケモカイン産生を阻害する可能性があることを示唆しました。

3.5. PBMC からの Th2 サイトカインの産生に対する USC-CM の効果

Th2 細胞の特性を検証するために、PBMC (末梢血単核球) から Th2 細胞を誘導しました。Th2 細胞からの Th2 サイトカインの産生に対する USC-CM の影響を調査しました。これは、Th2 細胞の対照群とは対照的に、USC-CM で処理した後の抗炎症性サイトカインの ELISA 分析の結果です。抗 IFN- γ 、IL-2、IL-4 および CD3/28 で 4 日間処理すると、上清中の IL-4 および IL-13 のレベルは大幅に増加しました。その結果、USC-CM50% および 100% での処理により、陽性対照と比較して IL-4 および IL-13 タンパク質レベルは抑制されました。さらに、USC-CM は、IL-4 および IL-13 の活性を 100% の濃度でそれぞれ約 72% および 63% 強く阻害しました (図 5)。このデータは、USC-CM の Th2 サイトカインの阻害効果が Th2 細胞に直接作用することを示しています。

3.6. U266B1 細胞における IgE の産生に対する USC-CM の阻害活性

U266B1 細胞による IgE 産生に対する USC-CM の効果をテストしました。分泌された IgE レベルを測定するために、USC-CM または RPMI-1640 培地の存在下で、U266B1 細胞を LPS (10ug/mL) および IL-4 (5ng/mL) で 3 日間刺激しました。さらに、培養上清中の IgE 産生のレベルを ELISA によって測定した。次に、図 6 に示すように、LPS/IL4 による刺激は、U266B1 の IgE レベルを増加させました。その結果、USC-CM 治療は、陽性対照と比較して IgE 産生を有意に減少させました。これらの結果は、USC-CM が B 細胞株で活性化されることにより IgE 分泌を阻害できることを示した。

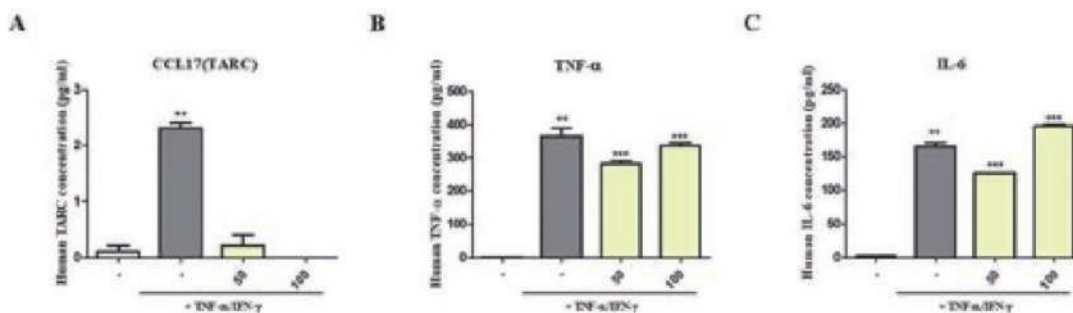


図 4. HaCaT 細胞における TNF- α /IFN- γ 誘導性のサイトカインおよびケモカインの産生に対する USC-CM の阻害効果。(A) TARC、(B) TNF- α 、および (C) IL-6 の産生は、TNF- α /IFN- γ で刺激された HaCaT 細胞の培養上清で測定されました。

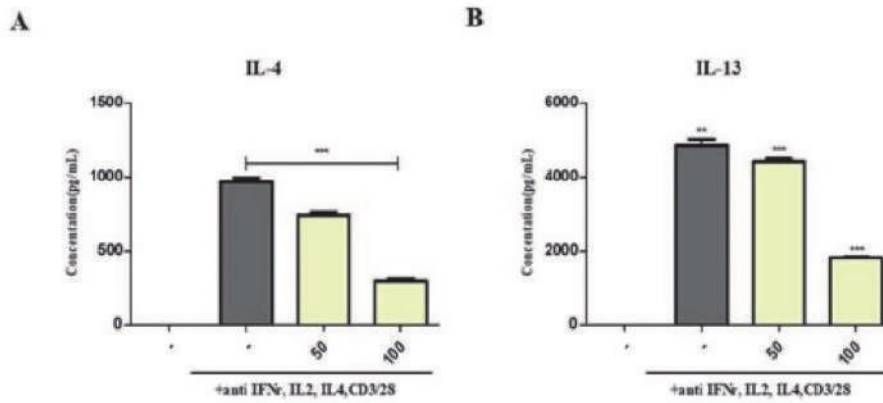


図 5. Th2 細胞における Th2 サイトカイン産生に対する USC-CM の阻害効果。(A) IL-4、および (B) IL-13 の産生は、抗 CD3/28 刺激 PBMC の培養上清で測定されました。

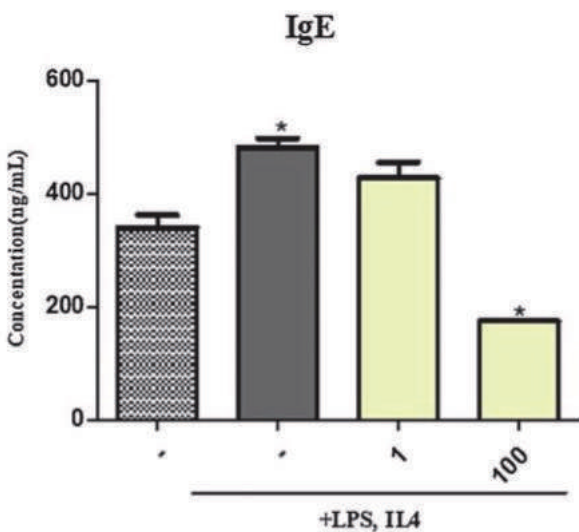


図 6.B 細胞株における IgE 産生に対する USC-CM の阻害効果

Table 2
Demographic information of subjects.

Variable	Treatment group (n = 28)
Age (average \pm standard deviation)	24.68 \pm 4.32
Gender (M:F)	15:13

Table 3
Value changes of lesion and non-lesion in Corneometer and TEWL after product application.

Content	Visit	N	Summary	Treatment group	
				Lesion	Non-lesion
Corneometer (a.u.)	Visit 2	28	Difference ¹	11.68 \pm 7.82 **	15.48 \pm 6.53**
	Visit 3	28	Difference ¹	15.67 \pm 8.22 **	14.49 \pm 7.93**
	28	Difference ²	3.99 \pm 5.69**	0.99 \pm 6.31	
TEWL (g/m ² /hr)	Visit 2	28	Difference ¹	-10.06 \pm 12.80**	-0.53 \pm 4.69
	28	Difference ¹	-15.09 \pm 13.42**	-3.08 \pm 3.67**	
	28	Difference ²	-5.03 \pm 11.73*	-2.56 \pm 4.16**	

a.u.: arbitrary unit; Visit 1: week 0; Visit 2: week 2; Visit 3: week 4.

¹ Difference from Visit 1.

² Difference from Visit 2.

* P < 0.05.

** P < 0.01 (Paired t-test results within each group).

3.7. USC-CM 含有化粧品には、人間のコルネオメーター測定値を改善し、TEWEL 値を減少させる効果がありました。

in vivo テストのために選ばれた 28 人の患者に USC-CM を含むクリームベースの化粧品を、IRB 承認後、患者の病変と非病変に 1 日 2 回 4 週間塗布しました。表 2 は、この in vivo テストに参加する被験者の情報を示しています。Corneometer および TEWEL レベルは、病変および非病変に 4 週間治療を適用する前と比較して、有意な効果を示しました (表 3)。治療後 4 週間の病変および非病変の Corneometer のレベルは、治療前と比較して、それぞれ 15.67 a.u. および 14.49 a.u. と大幅に増加しました。TEWEL のレベルも、治療後にそれぞれ 15.09 a.u. および 3.08 a.u. 減少しました。全体として、すべてのデータは、USC-CM に含まれる化粧品が角質層の皮膚を改善し、病変と非病変の両方の皮膚バリアを強化することを示しました。

4. 考察

アトピー性皮膚炎 (AD) は、遺伝的素因と環境要因の複雑な相互作用によって引き起こされることが知られています。蓄積されたエビデンスは、幹細胞がアレルギー性疾患およびパラクライン効果を介した免疫調節能力に対して多くの潜在的な有益な効果を持っていることが報告されています [21-23]。

例えば、Kim らによると、ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞は、MIP-2、miR-122a-SOCS1、および Th1 / Th2 応答の発現を調節することによってアトピー性皮膚炎を軽減することを報告しました [24]。特に、これまでに報告されたエビデンスでは、UCB-MSC が AD を改善する効果を持っていることを報告しています。Park らは、ヒト臍帯血由来の間葉系幹細胞が分泌する TGF- β は、TNF- α と IgE の分泌を阻害することでアトピー性皮膚炎を改善すると報告されています [25]。Lee らは、疾患特異的にプライミングされたヒト成体幹細胞は、マウスの実験的アトピー性皮膚炎を効果的に改善すると報告しました [26]。Kim らはまた、臨床試験を通じて中等度から重度の AD 患者の治療としての UCB-MSC の有効性を実証しました。[27]。さらに、Liu らはヒト臍帯間葉系幹細胞馴化培地は、in vivo および in vitro で腎線維症に抗炎症作用があると報告されています [28]。したがって、この研究は、AD 治療としての USC-CM の抗炎症能力を示しています。

最初の結果は、USC-CM が EGF、TIMP-1、IGFBP-7、トロンボスポンジン -1、フィブリノーゲン、フィブロネクチンなどの成長因子やサイトカインを多く含んでいることを示唆しました [29-31]。以前の研究では、EGF は AD などの皮膚疾患の炎症細胞の数を減らすことが示され、EGF の抗炎症効果は AD 治療として使用されてきました [32]。さらに、いくつかの研究では、フィブロネクチンの抗炎症能力が慢性全身性炎症性疾患の治療に適用できることが報告されています [33,34]。

ケラチノサイトは角質層の形成に不可欠な細胞であり、皮膚の免疫応答の標的および主要な誘導因子として機能し、さまざまな刺激によって T 細胞を活性化し、さまざまなサイトカインを分泌することによって炎症に関与することが報告されています [35]。したがって、本研究では、TNF- α /IFN- γ によって誘導される HaCaT 細胞に対する USC-CM の抗炎症の可能性を調査することを目的とした。その結果、さまざまな濃度の USC-CM 処理が、TNF- α /IFN- γ で刺激された HaCaT 細胞に対する細胞毒性なしに増殖が誘導されました。USC-CM は、TNF- α /IFN- γ で刺激された HaCaT 細胞において、TARC、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 などの Th2 関連ケモカインの mRNA を阻害することを示しました。興味深いことに、特に USC-CM は、Th2 炎症反応において、主要な炎症誘発性サイトカインである TARC タンパク質のレベルを有意に阻害しました。さまざまな炎症性因子の中で、Th2 関連ケモカインは炎症性細胞を動員します。したがって、Th2 関連ケモカインの阻害は、AD などの慢性皮膚疾患に抗炎症作用を及ぼす可能性があります。TARC は、CCR4 に影響を与える Th2 型ケモカインであり、アレルギー性炎症が発生した場所に細胞を移動させる一種のケモカインです。TARC は、皮膚の炎症反応において初期の役割を果たすため、治療標的として機能する可能性があります。IL-4 は AD の急性期に増加し、IFN- γ の分泌を阻害し、B リンパ球を刺激して IgE を分泌します。図 1 と図 2 に示すように、4 および 5、USC-CM は、炎症性グループと比較して、IL-4 および IL-13、ならびに AD 様疾患マーカー IgE を有意に減少させました。これらの結果は、USC-CM が PBMC で産生されるサイトカイン IL-4 および IL-13 を調節し、B 細胞の IgE 低下を誘導することにより、皮膚病変の慢性炎症反応に関与していることを一貫して示しています。

過去に天然植物成分の抗炎症作用に関する研究が行われてきましたが、動物細胞由来物質の研究は不完全です [36,37]。この研究は、臍帯血幹細胞が炎症を軽減する効果を実証しました。

続いて、in vivo の結果は、USC-CM がヒトの皮膚の AD などの慢性皮膚炎の臨床的特徴を改善することを示唆しました。USC-CM と化粧品ベースの混合物を局所的に処理したにもかかわらず、皮膚の水分に関連する代表的な指標である Corneometer のレベルが上昇し、皮膚バリア保護能力の指標である水分喪失のレベルが大幅に低下しました。

今後は USC-CM に含まれる多数の成長因子とサイトカインの定量分析が必要です。さらに、AD の TARC / CCR4 シグナル伝達経路における USC-CM の調節をサポートする正確なメカニズムは、さらなる実験的検証を必要とします。将来の研究では、AD の治療の理論的根拠を持つ免疫調節メカニズムと病因の遺伝子を見つけることが非常に重要です。

結論として、この研究は、USC-CM の有効な因子が、AD などの慢性皮膚炎の主な原因である TARC の産生を抑制し、サイトカインを調節し、PBMC の IgE を抑制することによって Th2 免疫応答を抑制することを示しました。また、AD の臨床的特徴がヒトの皮膚で改善されていることを示しました (図 1)。私たちの調査結果は、USC-CM を化粧品として、または AD のような皮膚病変の治療ツールの薬として使用することについての新しい洞察を示唆しています。

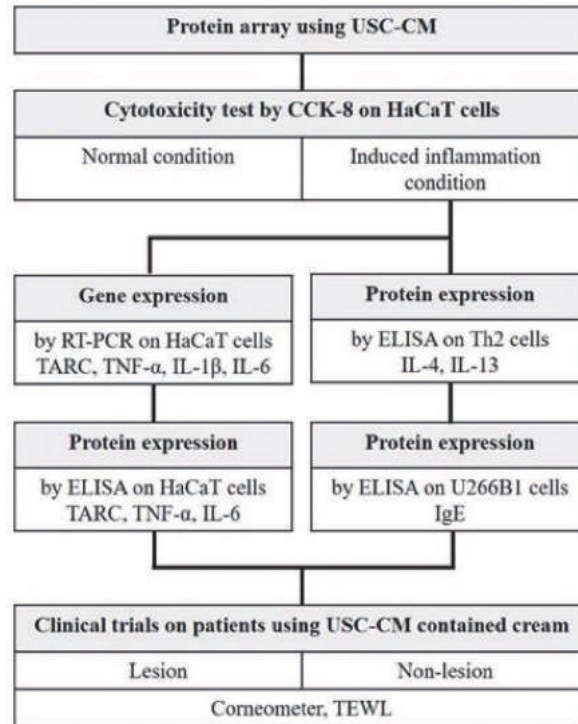
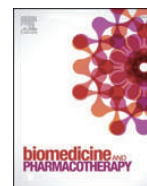


Chart 1. The research methodology.



Original article

Effects of conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in the skin immune response

Yoon-Jin Kim^{a,1}, Hee-Jin Ahn^{e,1}, Seung-Hee Lee^b, Mi-Hye Lee^c, Kyung-Sun Kang^{d,e,*}^a Derma Science R&D Center, Primoris International CO., LTD., #1504, A Bldg., 60 Haahn-ro, Gwangmyeong-si Gyeonggi-do 4332, Republic of Korea^b Stem Cells and Regenerative Bioengineering Institute, Kangstem Biotech Co., Ltd., 2nd Floor, Biotechnology Center, #81 Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, 08826, Republic of Korea^c GMP Center, Kangstem Biotech Co., Ltd., 6nd Floor, A Bldg., 60 Haahn-ro, Gwangmyeong-si Gyeonggi-do 4332, Republic of Korea^d Adult Stem Cell Research Center, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, 08826, Republic of Korea^e Cytotherapy R&D Center, PRIMORIS CO., LTD., #1504, A Bldg., 60 Haahn-ro, Gwangmyeong-si Gyeonggi-do 4332, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Keywords:

Conditioned media from UCB-MSCs

USC-CM

Anti-inflammatory

Atopic dermatitis

TARC

Type 2 allergic inflammation

ABSTRACT

Atopic dermatitis (AD) is an inflammatory skin disease in which type 2 allergic inflammation plays a critical role. In this study, the anti-inflammatory effect of conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (USC-CM) was investigated in order to apply it as an effective treatment with a low risk of side effects that can overcome the limitations of AD treatment which is currently in use. We found that USC-CM has various growth factors and cytokines associated with anti-inflammatory effect. RT-PCR and ELISA analysis showed that USC-CM inhibited the levels of type 2 cytokine and chemokine Thymus and activation-regulated chemokine (TARC), TNF- α and IL-6 in TNF- α /IFN- γ stimulated HaCaT cells. In addition, USC-CM inhibited IL-4 and IL-13 levels in Th2 cells. Therefore, the results of our study demonstrated that USC-CM has anti-inflammatory effect in TNF- α /IFN- γ stimulated HaCaT cells which associated with the inhibition of the immunoglobulin (IgE) secretion by activating B cell line. Our *In vivo* results showed that when the USC-CM was applied to lesions of patients with the mild AD for 4 weeks, the skin barrier was strengthened by increasing the level of Corneometer and decreasing the value of transepidermal water loss (TEWL). In conclusion, the results suggest that USC-CM may have therapeutic effect for AD as cosmetics and drug materials.

1. Introduction

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease characterized by pruritus and skin enema caused by immunological abnormalities [1,2]. AD is caused by several factors such as activation of T lymphocytes, abnormalities of cytokine system, decrease of cell mediated immunity, immunologic abnormality such as increase of immunoglobulin E (IgE), physiological factors and skin biochemical defects [3–5]. IgE is an immunoprotein present in the blood, and the function in allergic inflammation suggests that IgE and IgE-mediated mast cells and eosinophil activation contribute to AD [6]. Recently, AD and various allergic diseases are increasing, and various treatments for AD have been

devised. However, immunosuppressants and steroids currently used as treatments have various side effects that appear only when used in excess of the existing amount due to thinning and sagging of the skin during long-term use. In order to overcome these limitations, there is an urgent need to develop effective prevention strategies/therapies with low risk of side effects.

In the lymph nodes, IFN- γ is secreted when T cells proliferate and differentiate, and CD4⁺ T cells differentiate into Th1 cells due to the interaction between antigen-containing dendritic cells and T cells. Consecutively, it secretes IL-4, IL-5, IL-13 into Th2 cells and IL-17 and IL-22 into Th17 cells. Dendritic cells play a critical role in the differentiation of these T cells through the expression of cytokines and co-promoter

Abbreviations: AD, atopic dermatitis; USC-CM, conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells; TARC, thymus and activation-regulated chemokine; IgE, immunoglobulin E; TEWL, transepidermal water loss; MSC, mesenchymal stem cells; UCB, umbilical cord blood; UCB-MSCs, human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells; FBS, fetal bovine serum; EGF, epidermal growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; TIMP-1, tissue inhibitors of metalloproteinases-1; IGFBP-7, insulin like growth factor binding protein-7.

* Corresponding author.

E-mail address: kangpub@snu.ac.kr (K.-S. Kang).¹ These authors equally contributed to this study.<https://doi.org/10.1016/j.biopharm.2020.110789>

Received 3 July 2020; Received in revised form 12 September 2020; Accepted 17 September 2020

Available online 23 October 2020

0753-3322/© 2020 The Author(s).

Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

molecules. Furthermore, the keratinocytes of AD express high numbers of chemokines to induce inflow of dendritic cells, T cells and other leukocytes into the skin to increase inflammation, including CCL27, CCL17/TARC and CCL22/MDC [7]. This chemokine is known to induce Th2 cell migration and infiltration into inflammatory sites via CCR4, leading to a Th2 immune response [8–10]. Increased chemokine (TSLP, RANTES, CTACK, LARC, MDC and TARC) production, increased number of Th2 cells compared to Th1 cells, increased cytokine (IL-10, IL-4, IL-5, TNF- α etc) production, and increased IgE production have been reported as immunological symptoms of AD. Targeting keratinocytes, Th2 cells, B cells, and inflammatory cells involved in the skin immune response might constitute a novel therapeutic strategy for AD.

In general, clinical features of AD include disruption of the skin barrier due to severe itching and inflammation [11]. To investigate the clinical characteristics of AD, skin moisturization and skin barrier protection ability can be evaluated by using transepidermal water loss (TEWL), and Corneometer as accurate markers of epidermal barrier damage in AD skin [12,13].

Stem cell therapy is a new type of therapy that treats incurable diseases of humans using advanced biotechnology on cells with self-healing capabilities in the body. It is a medicine that overcomes the limitations of existing surgical or drug therapy. For this reason, interest in mesenchymal stem cells (MSCs) has recently increased, and the MSCs and their conditioned media are being widely studied [14]. MSCs are multipotent cells derived from various tissues. Especially MSCs derived from umbilical cord blood (UCB) are the youngest stem cells compared to other MSCs and has the most outstanding characteristics and regeneration ability of stem cells [15–17]. Recent studies have shown that the human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (UCB-MSCs) have an immunosuppressive effect through the secretion of inflammatory inhibitors, and it is a promising therapeutic approach for AD [18,19]. However, the anti-inflammatory effect of MSCs conditioned media is relatively unclear.

Therefore, the aim of this study was investigating the effect of conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (USC-CM) on the keratinocyte, Th2 cells, B cells, inflammatory cells and AD human skin.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of USC-CM

Isolation, culture, and characterization of UCB-MSCs were performed as described previously [20]. UCB samples were obtained from the FORMIZ WOMEN's Hospital (Seoul, Korea). This work was approved by the Korea National Institutional Review Board on August 09, 2018 (IRB No.219255-201305-BR-001). UCB-MSCs were cultured and expanded up to passage 6 at 37°C and 5% CO₂ in KSB-3 (Irvine scientific, Santa Ana, CA, USA) with 10 % fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Grand Island, NY, USA). UCB-MSCs (2×10^5 cells/flask) were seeded in T-25 flask and cultured for 48 h in KSB-3 with 10 % FBS. After washing twice with PBS, the culture medium was changed to KSB-2 media; DMEM (Gibco) containing epidermal growth factor (EGF) (10 ng/mL) and basic fibroblast growth factor (bFGF) (10 ng/mL), followed by incubation period of 96 h. USC-CM were collected, centrifuged at 1500 rpm for 5 min, and finally filtered using a 0.22 μ m syringe filter.

2.2. Human growth factor antibody array

Human proteins were analyzed by using a Human Antibody Array 1000 (Cat. No. AAH-BLM-1000-4, RayBiotech, Norcross, GA, USA) according to the manufacturer's instructions. Membranes were developed using detection buffer and quantified using a densitometer. After developing, films were scanned and the images processed and quantified using Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Signal intensity was normalized to internal positive controls for

Table 1
Primers used in research.

Gene	Species	Primer
TARC	Human	F 5'-actgctccaggatgccatcgttttt8' R 5'-acaaggggatgggatctccctcactg-3
TNF- α	Human	F 5'-ctatctggggaggggtcttcc-3 R 5'-ggttgaggggtgctgaagga-3
IL-1 β	Human	F 5'-cagccaatcttcattgtca-3 R 5'-gcattctcctcagctgtcc-3
IL-6	Human	F 5'-aaagaggcactggcagaaaa-3 R 5'-caggggtgtattgcatct-3
RPL13A	Human	F 5'-gcacgaccttgaggcgagce3' R 5'-catcgtggctaacaggtactg-3

comparison.

2.3. Proliferation assay

The human skin keratinocyte cell line (HaCaT cells) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). HaCaT cells (1.5×10^5 cells/well) were seeded in 24-well plates and cultured for 24 h in DMEM/F12 (Gibco) with 10 % FBS. After attaching the cells to the plate, USC-CM was treated with several concentration (1, 10, 50, and 100 %), and stimulated with or without TNF- α (10 ng/mL) and IFN- γ (10 ng/mL). After 24 h, cell viability was measured by using a Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo, Gaithersburg, MD, USA). CCK-8 solutions were added to the well and the cells were more incubated for 2 h. Then, the absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader (Tecan, Mannedorf, Switzerland).

2.4. mRNA isolation, cDNA synthesis and quantitative RT-PCR

HaCaT cells (3.5×10^5 cells/well) in 6-well plates were pretreated with USC-CM at various concentration (50 and 100 %) for 1 h, and stimulated with TNF- α /IFN- γ (each 10 ng/mL) for 6 h. Cells were collected, and total cellular RNA was extracted with using an RNA mini kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA), followed by a reverse transcription using a cDNA synthesis kit (Bioneer, Daejeon, Korea). The cDNA was followed by quantitative PCR using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with each primer. Each gene expression level was normalized with RPL13A as a housekeeping control. The primer sequences were listed in Table 1.

2.5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

HaCaT cells (3.5×10^5 cells/well) in 6-well plates were pretreated with USC-CM at various concentration (50 and 100 %) for 1 h, and stimulated with TNF- α /IFN- γ (each 10 ng/mL) for 24 h. The supernatant was collected and centrifuged at 12,000 g for 5 min. The level of chemokines TARC, TNF- α and IL-6 were determined by an ELISA kits (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's protocol.

2.6. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) cultures

PBMC (ATCC) were cultured at 37°C and 5% CO₂ in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10 % FBS. The cells (1×10^6 cells/24-well) were stimulated with anti-IFN- γ (1 μ g/mL), IL-2 (5 ng/mL), IL-4 (10 ng/mL), and CD3 plus CD28 antibodies (T-lymphocyte activation) in the presence of USC-CM for 4 days. The supernatants were collected and measured with IL-4, and IL-13 ELISA (R&D systems) according to the manufacturer's protocol.

2.7. Measurement of IgE secretion from U266B1 cells

Human U266B1 cells (ATCC) were cultured at 37°C and 5% CO₂ in

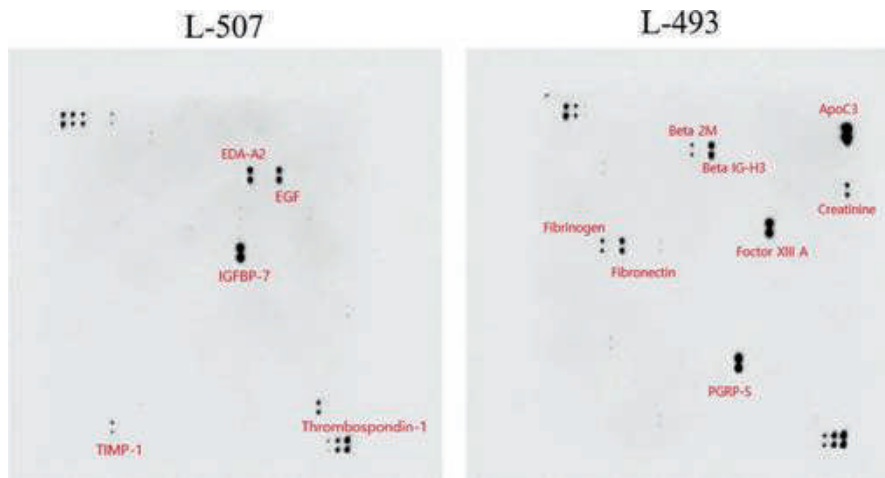


Fig. 1. Human antibody array analysis of USC-CM. Representative images from human antibody arrays demonstrating the reactivity of USC-CM to arrays L series (1,000 proteins).

RPMI 1640 medium supplemented with 10 % FBS. The cells (1×10^6 cells/24-well) were stimulated with lipopolysaccharides (LPS) (10 ug/mL), IL-4 (5 ng/mL) in the presence of USC-CM for 3 days. The supernatants were harvested for IgE assay by Sandwich ELISA (Abcam, Cambridge, MA, USA).

2.8. In vivo humantest

In vivo tests on human were performed by CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY CLINICAL TRIAL CENTER (Gwangju, Korea). This work was approved by the Chonnam National University Hospital Institutional Review Board on November 15, 2017 (IRB, CNUH-2017-293). Twenty eight males and females were tested and each subject was informed with directions before application. Evaluation of Corneometer, and TEWL was performed before application of the product, 2 and 4 weeks after application. Skin Corneometer were measured using Corneometer CM825; CK Electronic). Skin TEWL was measured using Tewameter (Tewameter TM300; CK electronic GmbH, Cologne, Germany).

2.9. Statistical analysis

All the data were shown as meaning \pm standard deviation (SD). The

statistically significant differences between groups were assessed by t-test using GraphPad Prism 5 software. P values < 0.05 were considered significant. *P < 0.05, **P < 0.01, ****P < 0.0001. The values are shown in the figures.

3. Results

3.1. USC-CM contained various growth factors and cytokines

In order to determine growth factors and cytokines in USC-CM, we analyzed 1000 different cytokines in USC-CM using the human antibody array 1000. The membrane was printed with antibodies for 1000 growth factors and receptors. The L-507 membrane showed nine positive and seven negative controls, and the L-493 membrane showed nine positive and eight negative controls (Fig. 1). Results from quantification of the human growth factor antibody array showed that USC-CM contained high concentrations of growth factors and cytokines associated with anti-inflammatory such as EGF, tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1), insulin like growth factor binding protein-7 (IGFBP-7), Thrombospondin-1, Fibrinogen and Fibronectin. Overall, our results demonstrated that USC-CM has various growth factors and cytokines are associated with anti-inflammatory effects.

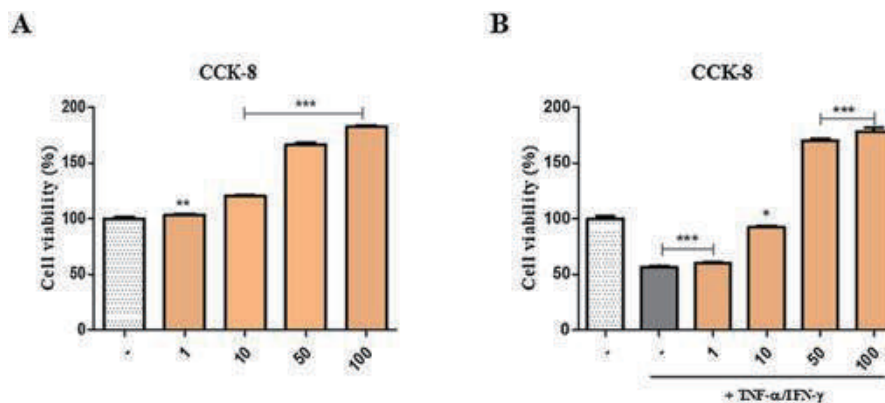


Fig. 2. Cytotoxic effect of USC-CM on HaCaT cells. Cell viability was determined by using a CCK-8 assay. Each of cells were seeded into 24-well plates and treated with various concentrations of USC-CM for 24 h. (A) Cytotoxic effect of USC-CM on HaCaT cells in the general condition type. (B) Cytotoxic effect of USC-CM on TNF- α /IFN- γ stimulated HaCaT cells.

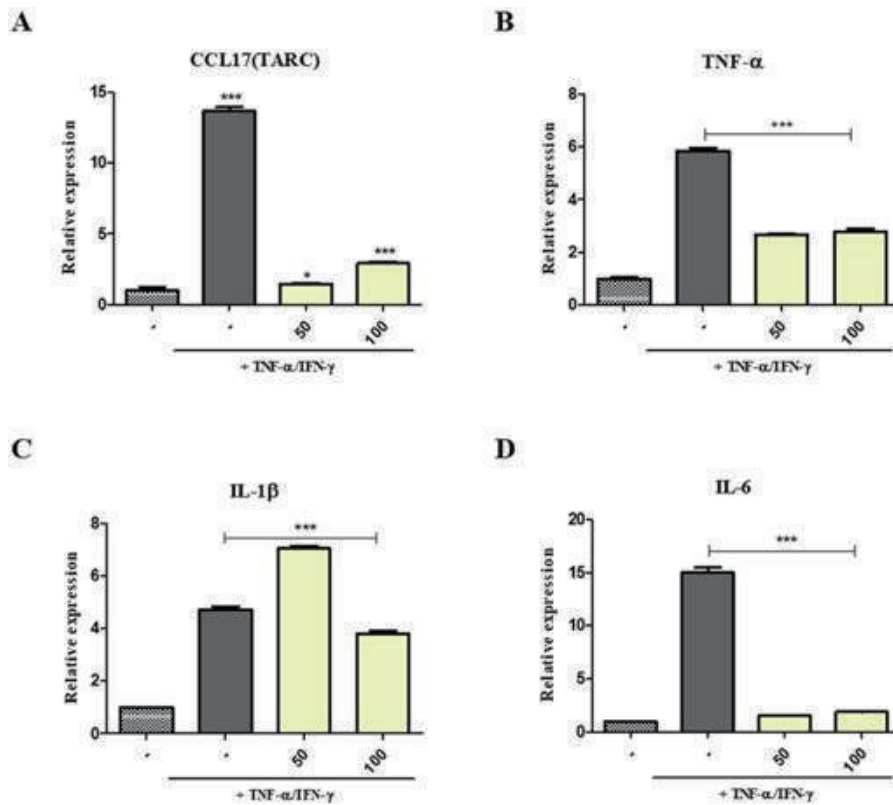


Fig. 3. Inhibitory effects of USC-CM on cytokine and chemokine expression in TNF- α /IFN- γ stimulated HaCaT cells. The expression of (A) TARC, (B) TNF- α (C) IL-1 β and (D) IL-6 mRNA was determined by using a qRT-PCR.

3.2. Cytotoxicity of USC-CM in HaCaT cells

In order to determine the cytotoxicity of USC-CM on HaCaT cells, we examined a cell viability using CCK-8 assay. Each conditional type was incubated with different concentrations of USC-CM (1, 10, 50 and 100 %) for 24 h. In the inflammation-induced type, each TNF- α and IFN- γ 10 ng/mL were pretreated for 1 h. In the general condition type, USC-CM had no significant cytotoxic effects by promoting cell growth without reducing cell viability in a dose-dependent manner at all concentrations compared with control group (Fig. 2A). In the TNF- α /IFN- γ stimulated inflammation-inducing type, the cell viability decreased to 50 %, but it was investigated that the cell viability increased when treated with USC-CM in a dose-dependent manner compared to the control group. Therefore, we determined the optimal concentrations of USC-CM to 50 and 100 %, which has the most significant cell growth promoting effect

(Fig. 2B).

3.3. Effects of USC-CM on mRNA expression in TNF- α /IFN- γ stimulated in HaCaT cells

To evaluate the anti-inflammatory activity of USC-CM in human keratinocytes, we measured the TNF- α /IFN- γ stimulated production of pro-inflammatory chemokines in HaCaT cells. We analyzed mRNA expression of TARC, TNF- α , IL-1 β and IL-6 using a qRT-PCR system. qRT-PCR analysis indicated that TNF- α /IFN- γ treatment for 6 h significantly increased mRNA expression levels of TARC, TNF- α , IL-1 β and IL-6. In all concentration groups treated with USC-CM, TARC, TNF- α and IL-6 were significantly inhibited compared to positive control. In the case of IL-1 β 50 % of USC-CM had no inhibitory effect, but it has at 100 % concentration. Consecutively, we demonstrated USC-CM treatment inhibits the

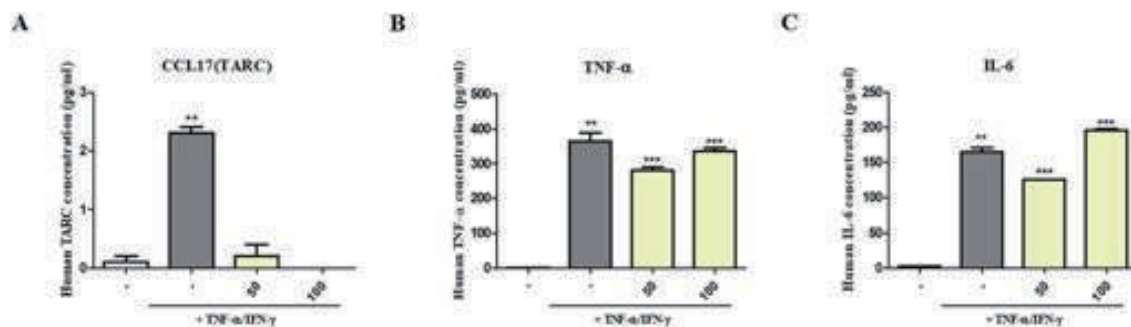


Fig. 4. Inhibitory effects of USC-CM on the TNF- α /IFN- γ induced production of cytokines and chemokines in HaCaT cells. The production of (A) TARC, (B) TNF- α and (C) IL-6 was measured in the culture supernatant of TNF- α /IFN- γ stimulated HaCaT cells.

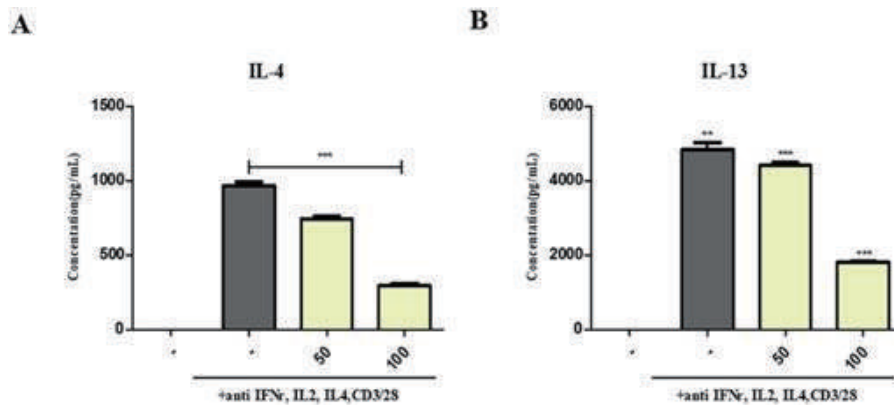


Fig. 5. Inhibitory effects of USC-CM on Th2 cytokines production in Th2 cells. The production of (A) IL-4, and (B) IL-13 was measured in the culture supernatant of anti-CD3/28 stimulated PBMC.

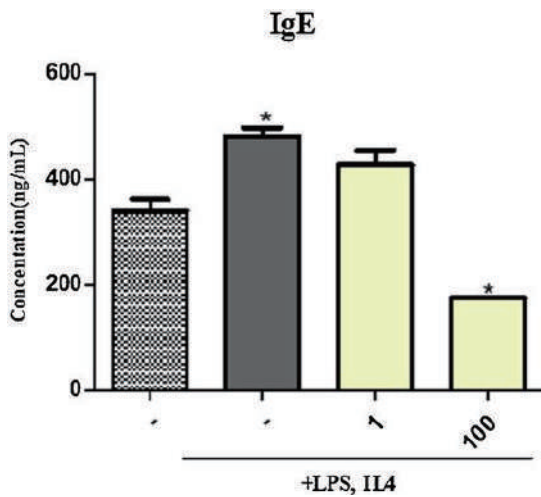


Fig. 6. Inhibitory effects of USC-CM on IgE production in B cell line.

TNF- α /IFN- γ induced overexpressed inflammatory cytokines TARC, TNF- α IL-1 β and IL-6 mRNA expression levels (Fig. 3).

3.4. Effects of USC-CM on TNF- α /IFN- γ induced production of chemokine in HaCaT cells

To quantitatively examine the anti-inflammatory activity of USC-CM in HaCaT cells, we analyzed the effect of USC-CM on TARC, TNF- α and IL-6 protein levels excluding IL-1 β in HaCaT cells by ELISA. TNF- α /IFN- γ treatment for 24 h significantly increased the levels of chemokines TARC, TNF- α and IL-6 in the supernatant. TARC protein levels were significantly inhibited in a dose-dependent at all concentrations by treatment with USC-CM. In the case of TNF- α and IL-6, protein levels were significantly inhibited by treatment with USC-CM 50%. However, USC-CM 100% had no inhibitory effect on the protein level of TNF- α and IL-6 (Fig. 4). Thus, these results suggested that USC-CM may have the anti-inflammatory effects on HaCaT cells to inhibit type 2 cytokine and chemokine production under AD-like inflammation.

3.5. Effect of USC-CM on the production of Th2 cytokines from PBMC

To verify the characteristics of Th2 cells, we induced Th2 cells from PBMC. We investigated the effect of USC-CM on the production of Th2 cytokines from Th2 cells. This is the result of ELISA analysis for anti-

Table 2 Demographic information of subjects.

Variable	Treatment group (n = 28)
Age (average \pm standard deviation)	24.68 \pm 4.32
Gender (M:F)	15:13

Table 3 Value changes of lesion and non-lesion in Corneometer and TEWL after product application.

Content	Visit	N	Summary	Treatment group	
				Lesion	Non-lesion
Corneometer (a.u.)	Visit 2	28	Difference ¹	11.68 \pm 7.82	15.48 \pm 6.53**
	Visit 3	28	Difference ¹	15.67 \pm 8.22	14.49 \pm 7.93**
	Visit 2	28	Difference ²	3.99 \pm 5.69**	0.99 \pm 6.31
TEWL (g/m ² /hr)	Visit 2	28	Difference ¹	-10.06 \pm 12.80**	-0.53 \pm 4.69
	Visit 3	28	Difference ¹	-15.09 \pm 13.42**	-3.08 \pm 3.67**
	Visit 2	28	Difference ²	-5.03 \pm 11.73*	-2.56 \pm 4.16**

a.u.: arbitrary unit; Visit 1: week 0; Visit 2: week 2; Visit 3: week 4.

¹ Difference from Visit 1.

² Difference from Visit 2.

* P < 0.05.

** P < 0.01 (Paired t-test results within each group).

inflammatory cytokines after treatment with USC-CM in contrast with the control group in Th2 cells. Anti IFN- γ IL-2, IL-4 and CD3/28 were treated for 4 days, and the levels of IL-4 and IL-13 in the supernatant were significantly increased. As a result, the IL-4 and IL-13 protein levels were suppressed by treatment with USC-CM as 50 and 100% compared to positive control. In addition, USC-CM strongly inhibited the activity of IL-4 and IL-13 by approximately 72% and 63% respectively at the concentration of 100% (Fig. 5). This data demonstrated that the Th2 cytokine inhibitory effect of USC-CM directly in Th2 cells.

3.6. Inhibitory activity of USC-CM on the production of IgE in U266B1 cells

We tested the effect of USC-CM on IgE production by U266B1 cells. To measure the secreted IgE level, U266B1 cells were stimulated with LPS (10 μ g/mL) and IL-4 (5 ng/mL) in the presence of USC-CM or RPMI-1640 medium as a control for 3 days. In addition, the levels of IgE

production in the culture supernatant were measured by ELISA. Then, as shown in Fig. 6 stimulation with LPS/IL4 increased IgE levels in U266B1. As a result, USC-CM treatment significantly reduced IgE production compared to positive control. These results indicated that USC-CM can inhibit the IgE secretion by activated in the B cell line.

3.7. USC-CM contained cosmetics increasing Corneometer value and decreasing TEWL value in human

28 patients were selected for in vivo test. USC-CM containing cream bases were applied twice a day for 4 weeks to patients' lesion and non-lesion after IRB approval. Table 2 shows demographic information of 28 subjects who passed screening test to participate this in vivo test. The Corneometer and TEWL levels showed a significant effect compared with before applied the treatment in the lesion and non-lesion for 4 weeks (Table 3). The level of Corneometer of lesion and non-lesion at 4 weeks after the treatment was significantly increased by 15.67 a.u and 14.49 a.u, respectively, when compared to that of before treatment. The level of TEWL was also decreased after the treatment by 15.09 a.u and 3.08 a.u, respectively. Overall, all data demonstrated that USC-CM contained cosmetics improved the skin stratum corneum and strengthened the skin barrier for both lesion and non-lesion.

4. Discussion

AD is known to be caused by a complex interaction of genetic predisposition and environmental factors. Accumulating evidence has reported that stem cells have many potential beneficial effects on allergic diseases and immunomodulatory ability through paracrine effects [21–23]. For instance, Kim et al. reported that human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells attenuate atopic dermatitis by regulating the expression of MIP-2, miR-122a-SOCS1 axis, and Th1/Th2 responses [24]. In particular, accumulating evidence has reported that UCB-MSC has efficacy which improve AD. Park et al. reported that TGF- β secrete by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells ameliorates atopic dermatitis by inhibiting secretion of TNF- α and IgE [25]. Lee et al. reported that disease-specific primed human adult stem cells effectively ameliorate experimental atopic dermatitis in mice [26]. Kim et al. also demonstrated the effectiveness of UCB-MSC as a treatment for moderate to severe AD patients through clinical trial. [27]. Furthermore, Liu et al. reported that human umbilical cord mesenchymal stem cell conditioned medium has anti-inflammatory effects on renal fibrosis in vivo and in vitro [28]. Accordingly, this study has showed the USC-CM's anti-inflammatory ability as an AD treatment.

The first result suggested that USC-CM contains the highest amount of growth factors and cytokines such as EGF, TIMP-1, IGFBP-7, Thrombospondin-1, Fibrinogen and Fibronectin, which well known to be important for anti-inflammatory effect [29–31]. In a previous study, EGF was shown to reduce the number of inflammatory cells in skin diseases such as AD, and the anti-inflammatory effects of EGF have been used as an AD treatment [32]. Moreover, several studies reported that the anti-inflammation ability of fibronectin can be applied for chronic systemic inflammatory diseases' treatment [33,34].

Keratinocytes are essential cells for the formation of the stratum corneum and act as targets and the primary inducer of immune responses in the skin, which have been reported to be involved in inflammation by activating T cells by various stimulation and secrete various cytokines [35]. Thus, this study aimed to investigate the anti-inflammatory potential of USC-CM to TNF- α /IFN- γ -induced HaCaT cells. As a result, the treatment with various concentrations of USC-CM proliferation was induced without cytotoxicity on TNF- α /IFN- γ stimulated HaCaT cells. We observed that USC-CM inhibits mRNA of Th2-related chemokines such as TARC, TNF- α IL-1 β and IL-6 in TNF- α /IFN- γ stimulated HaCaT cells. Intriguingly, especially USC-CM significantly inhibited the level of TARC protein, a key pro-inflammatory cytokine, in Th2 inflammatory response. Among the

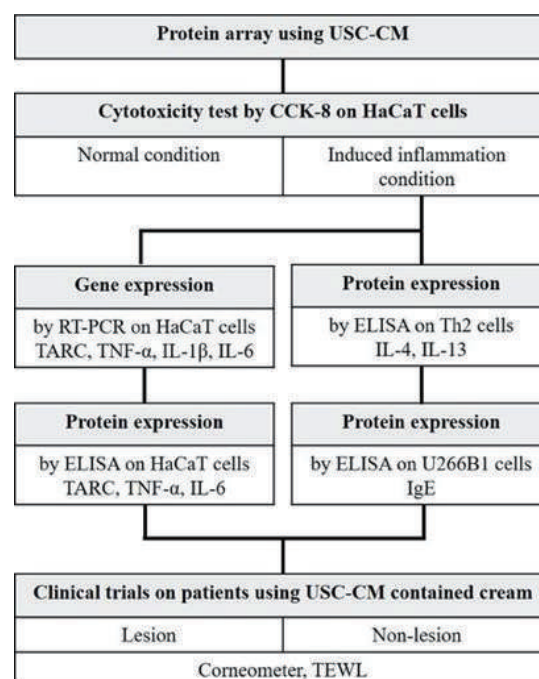


Chart 1. The research methodology.

various inflammatory factors, Th2-related chemokines recruit inflammatory cells. Therefore, inhibition of Th2 related chemokines may have anti-inflammatory effects on chronic skin diseases such as AD. TARC is a Th2-type chemokine that effects on CCR4 and a kind of chemokine that migrations cells to the place where allergic inflammation occurred. TARC may works as a therapeutic target, because it plays an early role in the skin inflammatory response. IL-4 increases during the acute phase of AD, which inhibits the secretion of IFN- γ and stimulates B lymphocytes to secrete IgE. As shown in Figs. 4 and 5, USC-CM significantly reduced IL-4 and IL-13 as well as AD-like disease marker IgE compared to the inflammatory group. These results consistently demonstrated that USC-CM is involved in the chronic inflammatory response of skin lesions by regulating the cytokines IL-4 and IL-13 produced in PBMC, inducing IgE reduction in B cells.

Research has been conducted on the anti-inflammatory effects of natural plant ingredients in the past, but research on animal cell-derived substances has been incomplete [36,37]. This study has demonstrated the effect of mitigating inflammation of substances dispensed with cord blood stem cells.

Subsequently, the in vivo result suggested that USC-CM improve clinical features in chronic dermatitis such as AD in human skin. Even though USC-CM and cosmetic base mixture are treated topically, the level of Corneometer, a representative indicator related to skin moisture was increased, and the level of TEWL, an indicator of skin barrier protection ability was significantly decreased.

There are still limitations in this study that are not clear. Quantitative analysis of numerous growth factors and cytokines contained in USC-CM is required. In addition, the accurate mechanisms which supporting regulation of USC-CM in the TARC/CCR4 signaling pathway in AD requires further experimental validation. In the future research, it is very important to find out the immune regulation mechanism and the genes for etiology that have a rationale for the treatment of AD.

In conclusion, this study showed the effective factors of USC-CM suppresses Th2 immune response by suppressing the production of TARC, a major cause of chronic dermatitis such as AD, suppresses cytokine regulation, and IgE in PBMC. In addition, it showed that clinical features of AD have improved in human skin (Chart 1). Our findings

suggest new insights into the use of USC-CM as cosmetics or as drugs to therapeutic tool for AD-like skin lesions.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the Technology development Program (S2559061) funded by the Ministry of SMEs and Startups (MSS, Korea).

References

- [1] S.B. Elmariah, E.A. Lerner, The missing link between itch and inflammation in atopic dermatitis, *Cell* 155 (2) (2013) 267–269, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.038>.
- [2] L. Schneider, S. Tilles, P. Lio, M. Boguniewicz, L. Beck, J. LeBovidge, N. Novak, D. Bernstein, J. Blessing-Moore, D. Khan, D. Lang, R. Nicklas, J. Oppenheimer, J. Portnoy, C. Randolph, D. Schuller, S. Spector, S. Tilles, D. Wallace, Atopic dermatitis: a practice parameter update 2012, *J. Allergy Clin. Immunol.* 131 (2) (2013) 295–299, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.12.672>, e1–27.
- [3] L. Sharma, Diagnostic clinical features of atopic dermatitis, *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 67 (1) (2001) 25–27.
- [4] D.Y. Leung, M. Boguniewicz, M.D. Howell, I. Nomura, Q.A. Hamid, New insights into atopic dermatitis, *J. Clin. Invest.* 113 (5) (2004) 651–657, <https://doi.org/10.1172/jci21060>.
- [5] F.S. Larsen, J. Hanifin, Epidemiology of atopic dermatitis, *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 22 (1) (2002) 1–24, [https://doi.org/10.1016/S0889-8561\(03\)00066-3](https://doi.org/10.1016/S0889-8561(03)00066-3).
- [6] F.T. Liu, H. Goodarzi, H.Y. Chen, IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 41 (3) (2011) 298–310, <https://doi.org/10.1007/s12016-011-8252-4>.
- [7] T. Kakinuma, K. Nakamura, M. Wakugawa, H. Mitsui, Y. Tada, H. Saeki, H. Torii, A. Asahina, N. Onai, K. Matsushima, Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity, *J. Allergy Clin. Immunol.* 107 (3) (2001) 535–541, <https://doi.org/10.1067/mai.2001.113237>.
- [8] A. Pivarski, B. Homey, Chemokine networks in atopic dermatitis: traffic signals of disease, *Curr. Allergy Asthma Rep.* 5 (4) (2005) 284–290, <https://doi.org/10.1007/s11882-005-0068-y>.
- [9] C.T.H. Nguyen, N. Kambe, I. Ueda-Hayakawa, I. Kishimoto, N.T.M. Ly, K. Mizuno, H. Okamoto, TARC expression in the circulation and cutaneous granulomas correlates with disease severity and indicates Th2-mediated progression in patients with sarcoidosis, *Allergol. Int.* 67 (4) (2018) 487–495, <https://doi.org/10.1016/j.allit.2018.02.011>.
- [10] A. Hakuta, Y. Yamaguchi, T. Okawa, S. Yamamoto, Y. Sakai, M. Aihara, Anti-inflammatory effect of collagen tripeptide in atopic dermatitis, *J. Dermatol. Sci.* 88 (3) (2017) 357–364, <https://doi.org/10.1016/j.jidmsci.2017.09.002>.
- [11] D.Y. Leung, T. Bieber, Atopic dermatitis, *Lancet (London, England)* 361 (9352) (2003) 151–160, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12193-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12193-9).
- [12] E.A. Holm, H.C. Wulf, L. Thomassen, G.B. Jemec, Instrumental assessment of atopic eczema: validation of transepidermal water loss, stratum corneum hydration, erythema, scaling, and edema, *J. Am. Acad. Dermatol.* 55 (5) (2006) 772–780, <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2006.03.036>.
- [13] F.A. Addor, R. Takaoka, E.A. Rivitti, V. Aoki, Atopic dermatitis: correlation between non-damaged skin barrier function and disease activity, *Int. J. Dermatol.* 51 (6) (2012) 672–676, <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05176.x>.
- [14] R.G. Felix, A.L.C. Bovolato, O.S. Cotrim, P.D.S. Leao, S.S. Batah, M.A. Golim, A. P. Velosa, W. Teodoro, V. Martins, F.F. Cruz, E. Deffune, A.T. Fabro, V.L. Capelozzi, Adipose-derived stem cells and adipose-derived stem cell-conditioned medium modulate in situ imbalance between collagen I- and collagen V-mediated IL-17 immune response recovering bleomycin collagen pulmonary fibrosis, *Histol. Histopathol.* (2019), 18152, <https://doi.org/10.14670/hh-18-152>.
- [15] H.J. Jin, Y.K. Bae, M. Kim, S.J. Kwon, H.B. Jeon, S.J. Choi, S.W. Kim, Y.S. Yang, W. Oh, J.W. Chang, Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (9) (2013) 17986–18001, <https://doi.org/10.3390/ijms140917986>.
- [16] S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, K. Bieback, Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue, *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24 (5) (2006) 1294–1301, <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>.
- [17] D.C. Ding, Y.H. Chang, W.C. Shyu, S.Z. Lin, Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy, *Cell Transplant.* 24 (3) (2015) 339–347, <https://doi.org/10.3727/096368915x686841>.
- [18] H.S. Kim, J.W. Yun, T.H. Shin, S.H. Lee, B.C. Lee, K.R. Yu, Y. Seo, S. Lee, T. W. Kang, S.W. Choi, K.W. Seo, K.S. Kang, Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell-derived PGE2 and TGF-beta1 alleviate atopic dermatitis by reducing mast cell degranulation, *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 33 (4) (2015) 1254–1266, <https://doi.org/10.1002/stem.1913>.
- [19] J.Y. Song, H.J. Kang, H.M. Ju, A. Park, H. Park, J.S. Hong, C.J. Kim, J.Y. Shim, J. Yu, J. Choi, Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell extracts ameliorate atopic dermatitis in mice by reducing the T cell responses, *Sci. Rep.* 9 (1) (2019) 6623, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42964-7>.
- [20] Y. Seo, S.R. Yang, M.K. Jee, E.K. Joo, K.H. Roh, M.S. Seo, T.H. Han, S.Y. Lee, P. D. Ryu, J.W. Jung, K.W. Seo, S.K. Kang, K.S. Kang, Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells protect against neuronal cell death and ameliorate motor deficits in Niemann Pick type C1 mice, *Cell Transplant.* 20 (7) (2011) 1033–1047, <https://doi.org/10.3727/096368910x545086>.
- [21] Y.Q. Sun, M.X. Deng, J. He, Q.X. Zeng, W. Wen, D.S. Wong, H.F. Tse, G. Xu, Q. Lian, J. Shi, Q.L. Fu, Human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation in mice, *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 30 (12) (2012) 2692–2699, <https://doi.org/10.1002/stem.1241>.
- [22] E. Zappia, S. Casazza, E. Pedemonte, F. Benvenuto, I. Bonanni, E. Gerdoni, D. Giunti, A. Ceravolo, F. Cazzanti, F. Frassoni, G. Mancardi, A. Uccelli, Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy, *Blood* 106 (5) (2005) 1755–1761, <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1496>.
- [23] K. Le Blanc, I. Rasmusson, B. Sundberg, C. Gotherstrom, M. Hassan, M. Uzunel, O. Ringden, Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells, *Lancet (London, England)* 363 (9419) (2004) 1439–1441, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)1604-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)1604-7).
- [24] M. Kim, S.H. Lee, Y. Kim, Y. Kwon, Y. Park, H.K. Lee, H. Jung, D. Jeoung, Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells attenuate atopic dermatitis by regulating the expression of MIP-2, miR-122a-SOCS1 axis, and Th1/Th2 responses, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 1175, <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.011175>.
- [25] H.H. Park, S. Lee, Y. Yu, S.M. Yoo, S.Y. Baek, N. Jung, K.W. Seo, K.S. Kang, TGF-beta secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells ameliorates atopic dermatitis by inhibiting secretion of TNF-alpha and IgE, *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 38 (7) (2020) 904–916, <https://doi.org/10.1002/stem.3183>.
- [26] B.C. Lee, J.J. Kim, J.Y. Lee, I. Kang, N. Shin, S.E. Lee, S.W. Choi, J.Y. Cho, H.S. Kim, K.S. Kang, Disease-specific primed human adult stem cells effectively ameliorate experimental atopic dermatitis in mice, *Theranostics* 9 (12) (2019) 3608–3621, <https://doi.org/10.7150/thno.32945>.
- [27] H.S. Kim, J.H. Lee, K.H. Roh, H.J. Jun, K.S. Kang, T.Y. Kim, Clinical trial of human umbilical cord blood-derived stem cells for the treatment of moderate-to-severe atopic dermatitis: phase I/IIa studies, *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 35 (1) (2017) 248–255, <https://doi.org/10.1002/stem.2401>.
- [28] B. Liu, F. Ding, D. Hu, Y. Zhou, C. Long, L. Shen, Y. Zhang, D. Zhang, G. Wei, Human umbilical cord mesenchymal stem cell conditioned medium attenuates renal fibrosis by reducing inflammation and epithelial-to-mesenchymal transition via the TLR4/NF-kappaB signaling pathway in vivo and in vitro, *Stem Cell Res. Ther.* 9 (1) (2018) 7, <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0760-6>.
- [29] M.M. Lee, B.J. Yoon, K. Osiewicz, M. Preston, B. Bundy, A.M. van Heeckeren, Z. Werb, P.D. Soloway, Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 regulates resistance to infection, *Infect. Immun.* 73 (1) (2005) 661–665, <https://doi.org/10.1128/iai.73.1.661-665.2005>.
- [30] S. Wang, J. Liu, D.L. Wu, X. Pang, J. Zhao, X. Zhang, Pro-inflammatory effect of fibrogen on vascular smooth muscle cells by regulating the expression of PPARalpha, PPARgamma and MMP-9, *Biomed. Rep.* 3 (4) (2015) 513–518, <https://doi.org/10.3892/br.2015.459>.
- [31] W.A. Price, B.M. Moats-Staats, A.D. Stiles, Pro- and anti-inflammatory cytokines regulate insulin-like growth factor binding protein production by fetal rat lung fibroblasts, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26 (3) (2002) 283–289, <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.26.3.4601>.
- [32] Y.J. Kim, M.J. Choi, D.H. Bak, B.C. Lee, E.J. Ko, G.R. Ahn, S.W. Ahn, M.J. Kim, J. Na, B.J. Kim, Topical administration of EGF suppresses immune response and protects skin barrier in DNCB-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice, *Sci. Rep.* 8 (1) (2018) 11895, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30404-x>.
- [33] V.J. Stecher, J.E. Kaplan, K. Connolly, Z. Mielens, J.K. Saels, Fibronectin in acute and chronic inflammation, *Arthritis Rheum.* 29 (3) (1986) 394–399, <https://doi.org/10.1002/art.1780290313>.
- [34] D. Yanez, M. Izquierdo, F. Ruiz-Perez, J.P. Nataro, J.A. Giron, R.M. Vidal, M. J. Farfan, The role of fibronectin in the adherence and inflammatory response induced by enteroaggregative Escherichia coli on epithelial cells, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6 (2016) 166, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00166>.
- [35] S. Li, P. Kang, W. Zhang, Z. Jian, Q. Zhang, X. Yi, S. Guo, W. Guo, Q. Shi, B. Li, Y. He, P. Song, L. Liu, K. Li, G. Wang, T. Gao, C. Li, Activated NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome in keratinocytes promotes cutaneous T-cell response in patients with vitiligo, *J. Allergy Clin. Immunol.* 145 (2) (2020) 632–645, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.10.036>.
- [36] K. Lae, S. Su, N. Win, N. Than, H. Ngwe, Isolation of Lasiodiplodan and evaluation of some biological activities of the stem barks of Phyllanthus Albizzioides (Kurz) Hookf., *Sci. Med. J.* 1 (4) (2019) 199–216, <https://doi.org/10.28991/SciMedJ-2019-0104-5>.
- [37] A. Salim, Y. Chin, D. Kinghorn, Drug discovery from plants, *Bioactive Mol. Med. Plants* (2008) 1–24, https://doi.org/10.1007/978-3-540-74603-4_1.

お問合せ先

バースバンク 株式会社【販売総代理店】
〒107-0062 東京都港区南青山 3 丁目 8-40 青山センタービル 2F
TEL : 03-5324-2580

フューチャーセルジャパン 株式会社【原料メーカー】
〒107-0062 東京都港区南青山 3 丁目 8-40 青山センタービル 2F
TEL : 03-5324-2294

複写や複製、コピーの譲渡、または無断で他社製品の販売ツール等に用いることは固くお断りしております。