

令和元年6月13日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09338

研究課題名(和文)肝幹細胞由来の細胞外小胞を用いた新たな急性肝不全治療の研究

研究課題名(英文) Novel treatment for acute liver failure by hepatic stem cells derived EV

研究代表者

芳賀 弘明 (Haga, Hiroaki)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：70466613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外小胞(EV)を用いた治療の検討報告は乏しい。我々は肝幹細胞由来EV(HSC-EV)および間葉系幹細胞由来EV(MSC-EV)を用いた急性肝不全治療の効果について検討した。D-galactosamine + TNF- α を腹腔内投与した急性肝不全マウスモデルにMSC-EV、HSC-EV、PBS(コントロール)を尾静脈投与したところ、MSC-EVおよびHSC-EVともに肝酵素の改善を認め、さらに肝組織学的検討では肝壊死およびアポトーシスが改善されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性肝不全の中でも重症な病態である劇症肝炎は、死亡率がきわめて高く、70～80パーセントの人が死亡するとされている。このような肝不全に対して肝臓移植が標準的治療法として認識されている一方で、同時に深刻なドナー不足の問題があり、新たな治療法が求められている。我々の研究で肝幹細胞由来EVおよび間葉系幹細胞由来EVが急性肝不全マウスモデルの肝障害を改善させたことは、急性肝不全の新たな治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Treatment with the extracellular vesicles (EV) have rarely been reported. We examined the effect of treatment using hepatic stem cell-derived EV (HSC-EV) and mesenchymal stem cell-derived EV (MSC-EV) in acute liver failure. Administration of MSC-EV and HSC-EV to an acute liver failure mouse model improved liver enzymes, and in liver histological examination, improved liver necrosis and apoptosis.

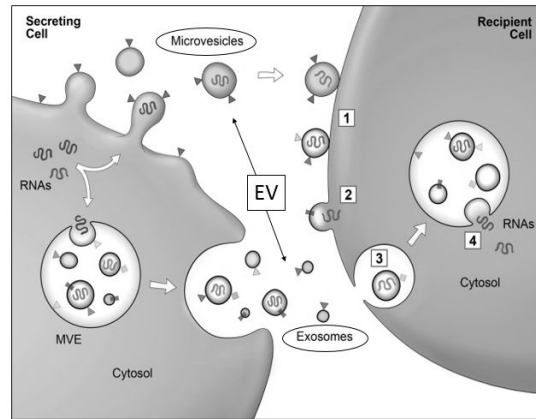
研究分野：肝臓病学

キーワード：急性肝不全 細胞外小胞 肝幹細胞 間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Extracellular vesicles(以下 EV)には Exosomes や Microvesicles も含まれ、様々な正常細胞や癌細胞および幹細胞から放出されている。EV 中には protein, mRNA, non-coding RNA (micro RNA, long noncoding RNA など), DNA, mitochondrial DNA が含まれており、それらを放出し、受け取ることによって細胞間の情報伝達を行っていると考えられている (J Cell Biol. 2013;200:379)。近年では、EV 中の micro RNA(miRNA)または lncRNA を用いた癌診断の研究が数多く行なわれている。しかし、EV を用いた治療法 (EV therapy) の研究は、まだ、ほとんど行われていない。一方、急性肝不全の中でも重症な病態である劇症肝炎は、死亡率がきわめて高く、70~80 パーセントの人が死亡するとされている。このような肝不全に対して肝臓移植が標準的治療法として認識されている一方で、同時に深刻なドナー不足の問題がある。しかし、こうしたドナー不足は、今後解消される見込みはきわめて低く、肝再生医療の開発が必要である。これまで、劇症肝炎動物モデルに造血幹細胞、間葉系幹細胞または肝幹細胞移植の有用性が報告されているが、移植された幹細胞がどのようなメカニズムで肝再生に寄与しているかは、不明な点が多く、現在、2つのメカニズムが考えられている。移植された細胞が肝細胞へ分化すること、移植された細胞から分泌される液性因子が肝臓修復に寄与することであり、近年ではこの機序の重要性が数多く報告されている。申請者も骨髄由来間葉系幹細胞からの液性因子が肝幹細胞を肝細胞に分化誘導することを報告している。しかし、これまでの研究は、増殖因子やサイトカインなどの Protein level での研究が中心であり、先述した幹細胞から分泌される EV についての研究されはあまり行われていない。



2. 研究の目的

本研究の目的は急性肝不全マウスモデルにおける肝幹細胞および間葉系幹細胞由来の EV の有用性を検討することである。

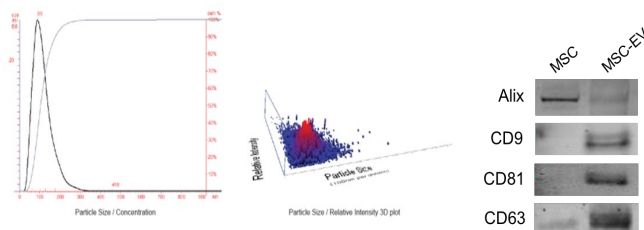
3. 研究の方法

肝幹細胞および間葉系幹細胞のそれぞれの培養液から Ultracentrifugation 法にて Extracellular Vesicles (EV) の採取を行った。それらの EV において Exosome マーカーの発現を Western blot 法で検討した。さらに、D-galactosamine + TNF- α を腹腔内投与した急性肝不全マウスモデルに間葉系幹細胞由来 EV (MSC-EV)、肝幹細胞由来 EV (HSC-EV)、PBS (コントロール) を尾静脈投与を行い、血液生化学的検討にて肝酵素の変化を、肝組織にて肝壊死やアポトーシスの変化を検討した。

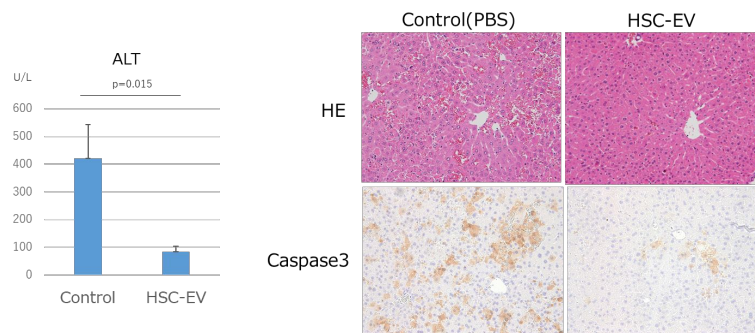
In vitro の検討では、MSC-EV 中の long-noncoding RNA (lnc RNA) や mRNA をプロファイリングし、肝障害に有効な因子の検討を行った。さらに、actinomycin D/TNF- α の肝細胞障害モデルにおいて、MSC-EV 投与での ROS や NF- κ B の変化を検討した。

4. 研究成果

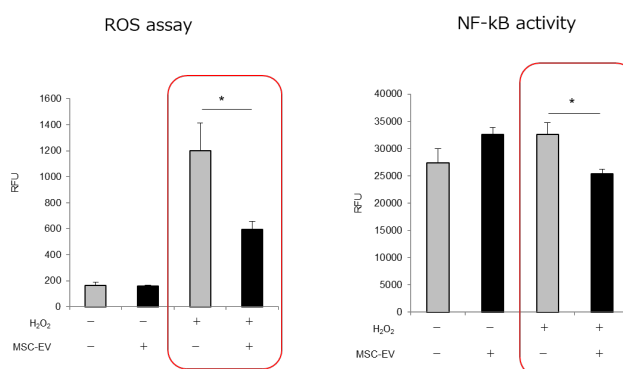
(1) 肝幹細胞および間葉系幹細胞の培養液から Ultracentrifugation 法にて採取した Extracellular Vesicles (EV) は、Exosome マーカーの発現を認め、Nanosight の検討では、exosome の粒子の大きさが含まれていることがわかった。



(2) D-galactosamine + TNF- α を腹腔内注射して作成した急性肝不全マウスモデルに肝幹細胞由来 EV (HSC-EV)、間葉系幹細胞由来 EV (MSC-EV) を尾静脈投与を行ったところ、PBS (コントロール) に比べ、MSC-EV および HSC-EV とも、肝酵素の改善を認め、肝組織においても肝壊死やアポトーシスの改善を示した。



(3) In vitro の actinomycin D/TNF の肝細胞障害モデルにおいて、MSC-EV 中の Y RNA-1 (lnc RNA) は肝細胞の viability の改善に寄与していた。また、MSC-EV 中には CXCL1 (mRNA) も多く含まれており、CXCL1 は肝細胞の増殖能を上昇させた。さらに、MSC-EV は、肝虚血状態で上昇した ROS と NF- κ B を低下させ、肝細胞の viability を保つ効果を示した。



5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

- 1) Haga H, Yan IK, Borelli D, Matsuda A, Parasramka M, Shukla N, Lee DD, Patel T. Extracellular vesicles from bone marrow derived mesenchymal stem cells protect against murine hepatic ischemia-reperfusion injury. *Liver Transplantation*. 2017;23(6):791-803 (査読有り)
- 2) Haga H, Yan IK, Takahashi K, Matsuda A, Patel T. Extracellular Vesicles from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Survival from Lethal Hepatic Failure in Mice. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(4):1262-1272 (査読有り)
- 3) Yan IK, Wang X, Asmann YW, Haga H, Patel T. Circulating Extracellular RNA Markers of Liver Regeneration. *PLoS One*. 2016 Jul 14;11(7): (査読有り)

〔学会発表〕(計2件)

- 1) 芳賀弘明, 上野義之: 間葉系幹細胞由来 Extracellular Vesicles は肝虚血再灌流マウスモデルの肝障害を軽減させる. 日本細胞外小胞学会, 広島; 2017年9月
- 2) 芳賀弘明, Patel Tushar, 上野義之: 間葉系幹細胞由来 Extra cell vesicles の肝虚血再灌流障害における肝死およびアポトーシスに対する有用性の検討 第52回日本肝臓学会総会, 千葉市; 2016年5月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：邵 力
ローマ字氏名：SHO Ri
所属研究機関名：山形大学
部局名：) 医学（系）研究科（研究院）
職名：助教
研究者番号（8桁）：80344787

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：水野 恵
ローマ字氏名 Mizuno Kei

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。