

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15945

研究課題名(和文) 改変型エクソソームを利用した新規肝硬変治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy for liver cirrhosis using modified type of exosome

研究代表者

板場 則子 (ITABA, Noriko)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70457167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)に独自開発の薬剤IC-2を添加し作製する肝疾患治療用細胞シートの肝線維化抑制因子を同定し、肝線維化を誘引する活性化肝星細胞を標的とするエクソソームを作製することで、新規肝硬変治療法開発を目指す研究となる。本研究では、IC-2処理MSCの培養上清より調整するエクソソームよりもセクレトームが、肝星細胞活性化を強く抑制することを明らかにした。セクレトームには、肝星細胞活性化抑制作用を示すチオレドキシン、Dkk-1の他、線維融解作用を示す各種MMPsが含まれており、IC-2処理MSCのセクレトームが、簡便かつセルフリーの新規肝硬変治療法と展開可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝硬変は国内の年間死亡者数が約17,000例に達しながら、いまだ有効な治療薬が存在しない。研究者らが開発した、温度応答性培養皿上で間葉系幹細胞(MSCs)に低分子化合物IC-2を添加し作製する「肝疾患治療用細胞シート」は、肝硬変の新規治療法となると期待されるが、外科手術を伴うため侵襲性が高く、すべての患者への適応は困難であると想定される。本研究ではIC-2をMSCsに添加することで、肝線維化抑制に有効な因子を増強したセクレトームが得られることを示した。本研究の成果は、簡便かつセルフリー、外科手術も不要な肝硬変患者の新規治療法として将来的に応用可能であり、学術的、社会的に意義深い研究である。

研究成果の概要(英文)：This research is aimed to develop a novel therapy for liver cirrhosis by identifying hepatic fibrosis-reducing factors of therapeutic cell sheets for liver disease derived from mesenchymal stem cells (MSCs) engineered with original compound, IC-2, and by constructing exosomes targeted to activated hepatic stellate cells.

In this study, it was clarified that IC-2-treated MSCs-derived secretome suppressed activation of hepatic stellate cells potently compared to those exosomes. The secretome included thioredoxin, Dkk-1, which were effective to inhibit hepatic stellate cells activation, and various MMPs which acted fibrinolysis. These data demonstrate that utilizing IC-2-treated MSCs-derived secretome may serve as the development of a simple and novel therapy for liver cirrhosis in cell-free system.

研究分野：再生医学

キーワード：間葉系幹細胞 肝線維化 セクレトーム エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非代償性肝硬変に対する根本的な治療薬は存在せず、生体肝移植が有効な治療法となるが、ドナー不足の問題から iPS 細胞など幹細胞を使用した再生医療が期待されている。国内外では主に間葉系幹細胞 (MSC) を中心に、肝硬変に対する組織幹細胞を用いた細胞移植療法の臨床研究が進められ、MELD (Model for End-Stage Liver Disease) score の改善などが報告されている (Shiota G, Itaba N, Hepatol Res 47:127-41, 2016)。細胞移植療法では血管を介した移植処置がとられるため、塞栓の問題から一度に移植できる細胞数が限られ、疾患によっては繰り返しの細胞移植が必要となるケースも生じる。これら移植細胞数の制限、塞栓の問題をも回避可能な移植技術として、細胞シート移植が近年注目されている。

研究者は温度応答性培養皿による細胞シート作製技術に加え、細胞ソースとして間葉系幹細胞、肝細胞分化誘導剤として低分子化合物を利用する安全性に優れた肝疾患治療用細胞シートを開発し (特許第 6008297 号 他) 同シートの肝臓表面への移植が、四塩化炭素誘発性の急性肝障害を抑制し、肝再生を促進することを明らかにした (Sci Rep 5:16169, 2015)。

また、新規薬剤 IC-2 を開発し (Regen Ther 2:32-41, 2015) IC-2 誘導肝疾患治療用細胞シートが強力な急性肝障害抑制効果だけでなく、四塩化炭素誘発性慢性肝障害モデルマウスにおいて肝線維化抑制効果を示すことを見出した。

その他、肝疾患治療用細胞シートの皮下移植が急性肝障害を抑制することを *in vivo* で確認していたことから、細胞シート由来の細胞外分泌因子が肝障害の抑制に寄与していると推察された。

2. 研究の目的

本研究では、肝疾患治療用細胞シートの肝線維化抑制機序に細胞外分泌因子が重要であると考え、細胞間の情報伝達因子として近年注目されている細胞外分泌小胞、エクソソームに着目した。エクソソームは生体内の様々な細胞から分泌される 30~150nm の膜小胞で、mRNA、miRNA、たんぱく質などを内包し、目的の細胞へと運ばれ取り込まれることで、細胞間や組織間のシグナル伝達に関与する (Front Pharmacol. 3:231, 2016)。

研究者は、肝疾患治療用細胞シート由来のエクソソームの網羅的解析を通して、抗線維化作用を有する因子を同定し、エクソソームを利用した新たな肝硬変治療法の開発を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

肝疾患治療用細胞シートの作製同様に、間葉系幹細胞 (MSC) に所属教室独自に開発した低分子薬 IC-2 を添加後、培養上清よりエクソソームならびに濃縮培養上清からなるセクレトームをそれぞれ調整し、*in vitro* にて肝線維化の惹起・増悪に重要な活性化肝星細胞に添加し、その活性化抑制効果を検討した。

肝疾患治療用細胞シートの線維化抑制効果にエクソソームが重要であるかを明らかにするため、エクソソーム分泌阻害剤 GW4869 添加条件下でセクレトームを回収し、同セクレトームの肝星細胞活性化抑制効果を検討した。予想に反し、GW4869 併用 IC-2 処理 MSC 由来セクレトーム

は、GW4869 非併用 IC-2 処理 MSC 由来セクレトームと同様に肝星細胞の活性化を抑制したことから、肝疾患治療用細胞シートの線維化抑制機序としてセクレトームが重要であることが示唆されたため、研究計画を修正し、IC-2 処理 MSC より産生される液性因子の解析を LC-MS/MS 分析、ウェスタンブロットティングにより実施した。

4. 研究成果

肝疾患治療用細胞シートと同様のプロトコールにて培養する IC-2 処理 MSC より培養上清を濃縮し、セクレトームを調整後、TGF- β にて活性化を誘導した肝星細胞 LX-2 細胞に添加した。IC-2 処理 MSC セクレトームは、コントロールセクレトームや薬剤未処理の MSC セクレトーム、DMSO 処理 MSC セクレトームと比較し、強力に肝星細胞活性化を抑制した (図 1)。

セクレトーム中にはエクソソームが含まれることから、IC-2 処理 MSC の培養上清よりエクソソームを抽出し、セクレトーム同様に肝星細胞活性化抑制効果を検討した。セクレトームと異なり、IC-2 処理 MSC エクソソームの肝星細胞活性化抑制効果は、mRNA レベルでは認められず、タンパク発現でのみ認められた (図 2)。したがって、セクレトームによる肝星細胞活性化抑制とエクソソームによる肝星細胞活性化抑制は、それぞれ独立、もしくは協調して作用している可能性が示唆されたため、肝疾患治療用細胞シートの肝線維化抑制効果、

肝星細胞活性化抑制効果にエクソソームが関与しているか、エクソソーム分泌阻害剤 GW4869 を使用し検討を行った。IC-2 処理 MSC のセクレトーム回収時に GW4869 を併用し、同セクレトームの肝星細胞活性化抑制効果を検討した。GW4869 併用 IC-2 処理 MSC セクレトームは、IC-2 処理 MSC セクレトームと同様に肝星細胞の活性化を抑制した (図 3)。

この結果は、肝疾患治療用細胞シートの肝線維化抑制効果にエクソソームの関与を否定することにはならないが、エクソソーム以外の細胞外分泌因子が、肝星細胞活性化抑制に重要であると推察された。そこで研究計画を修正し、セクレトーム中の肝星細胞活性化抑制因子、肝線維化抑制因子の解析を進めることとした。

図 1. IC-2処理MSCセクレトームの肝星細胞活性化抑制効果

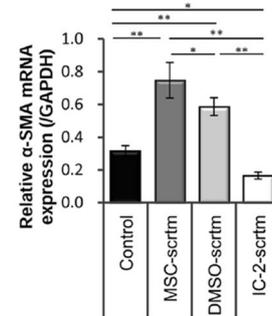


図 2. IC-2処理MSCエクソソームによる肝星細胞活性化抑制効果

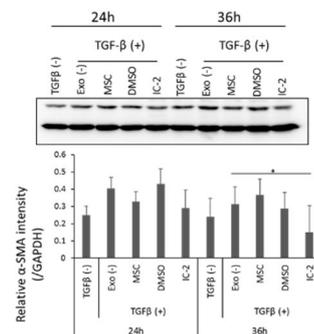
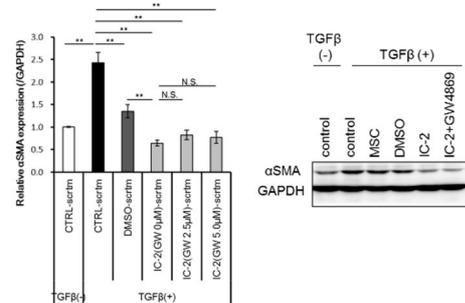
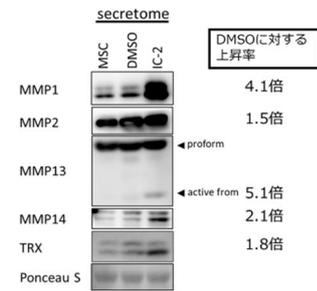


図 3. GW4869併用IC-2処理MSCセクレトームの肝星細胞活性化への影響の評価



すでに肝星細胞活性化抑制効果が報告されている MFGE8, thioredoxin に着目したところ、IC-2 によりセクレトーム中の MEGE8 量に変動は認めなかったが、thioredoxin の産生が IC-2 により MSC の上清中で上昇しており、IC-2 処理 MSC セクレトームの肝星細胞活性化抑制効果に thioredoxin が作用している可能性が示唆された。また、thioredoxin の他、セクレトーム中には線維融解に作用するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の中で、MMP-1、MMP-2、MMP-13、MMP-14 が上昇していることを認めた(図4)。これまでに、肝疾患治療用細胞シートの線維化抑制効果は、細胞シートを移植した肝葉とは別の肝葉でも認めており、IC-2 処理 MSC セクレトームの解析で見出された、MMP 群や thioredoxin が *in vivo* での肝疾患治療用細胞シートの肝線維化抑制に作用している可能性が示唆された。

図4. IC-2処理MSCセクレトーム中の抗線維化因子の解析



より包括的に IC-2 処理 MSC セクレトームの肝星細胞活性化抑制因子、肝線維化抑制因子を明らかにするため、質量分析により IC-2 処理 MSC セクレトーム中の内包因子の網羅的解析を実施した。計 1653 個のタンパク質がセクレトーム中に含まれていることが明らかとなったが、これらのタンパク質群の中から効率的に肝星細胞活性化抑制因子、肝線維化抑制因子を抽出するため、セクレトーム回収時の限外ろ過フィルター種を変更することで、肝星細胞活性化抑制因子が含まれる分画の特定を試みた。その結果、約 10kDa から約 30kDa の分画に強力な肝星細胞活性化抑制因子、約 30kDa から約 50kDa の分画、約 100kDa 以上の分画に肝星細胞活性化抑制因子が含まれることを明らかにした。50kDa 以下の分画では、既に肝線維化抑制効果が報告されている Dkk-1 を含む 94 因子が IC-2 により増加し、121 因子が IC-2 により低下することを見出している。

本研究により、単一の薬剤 IC-2 を MSC に添加するだけの簡便な操作で、そのセクレトーム中で肝線維化抑制に有効な種々の MMP 群、ならびに thioredoxin や Dkk-1 と言った肝星細胞活性化抑制因子を効率的に増強することが可能であることを明らかにした。したがって、当初予定していたエクソソームの利用よりも、IC-2 処理 MSC のセクレトームを利用することで、セルフリーとなる新規肝硬変治療法の開発へと繋げることが可能であることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Itaba N, Noda I, Oka H, Kono Y, Okinaka K, Yokobata T, Okazaki S, Morimoto M, and Shiota G.	4. 巻 24
2. 論文標題 Hepatic cell sheets engineered from human mesenchymal stem cells with a single small molecule compound IC-2 ameliorate acute liver injury in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Regen Ther	6. 最初と最後の頁 45-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2018.07.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Itaba N, Kono Y, Watanabe K, Yokobata T, Oka H, Osaki M, Kakuta H, Morimoto M, and Shiota G.	4. 巻 9
2. 論文標題 Reversal of established liver fibrosis by IC-2-engineered mesenchymal stem cell sheets	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 6841
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 板場則子、汐田剛史
2. 発表標題 肝疾患治療用細胞シートによる新規の肝線維化治療法の開発
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 板場則子、河野洋平、汐田剛史
2. 発表標題 肝硬変への臨床応用を目指した間葉系幹細胞分化シートのサイエンス：作用機序の解析
3. 学会等名 第25回肝細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noriko Itaba, Goshi Shiota
2. 発表標題 Development of anti-fibrotic cell sheets engineered from mesenchymal stem cells for liver fibrosis
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress - 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 板場則子、汐田剛史
2. 発表標題 間葉系幹細胞由来肝細胞化シート移植の治療効果
3. 学会等名 第15回酸化ストレスと肝研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 板場則子、河野洋平、汐田剛史
2. 発表標題 肝硬変治療を目指した肝疾患治療用細胞シートの開発
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 板場則子、河野洋平、汐田剛史
2. 発表標題 非代償性肝硬変への肝疾患治療用細胞シートによる肝線維化抑制治療
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriko Itaba, Yohei Kono, Goshi Shiota
2. 発表標題 IC-2-engineered mesenchymal stem cell sheets therapy for liver fibrosis.
3. 学会等名 JSH International Liver Conference 2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計5件

産業財産権の名称 線維化抑制作用を有する細胞シート	発明者 汐田剛史、板場則子、河野洋平	権利者 鳥取大学、カノンキュア株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-539482	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 線維化抑制組成物、これを生産する細胞、およびこの細胞からなる細胞シート	発明者 汐田剛史、板場則子、河野洋平	権利者 鳥取大学、カノンキュア株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/021603	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 線維化抑制作用を有する細胞シート	発明者 汐田剛史、板場則子、河野洋平	権利者 鳥取大学、カノンキュア株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/031357	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 線維化抑制作用を有する細胞シート	発明者 汐田剛史、板場則子、河野洋平	権利者 鳥取大学、カノンキュア株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、TW107129167	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 線維化抑制組成物、これを生産する細胞、およびこの細胞からなる細胞シート	発明者 汐田剛史、板場則子、河野洋平	権利者 鳥取大学、カノンキュア株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-110587	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 ヒト間葉系幹細胞を肝細胞へ分化誘導する新規化合物の合成と解析	発明者 汐田剛史、星川淑子、松本則子、森本稔、他4名	権利者 鳥取大学、東京女子医科大学、カノンキュア株
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6391067号	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

ホームページ等

2017年7月27日 肝細胞研究会 研究交流「肝疾患治療用細胞シートの開発」(<http://hepato.umin.jp/kouryu/kouryu44.html>)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	汐田 剛史 (SHIOTA Goshi)	鳥取大学・医学部・教授 (15101)	
研究協力者	川崎 誉之 (KAWASAKI Takayuki)	鳥取大学・医学部・大学院生 (15101)	
研究協力者	吉田 久輝 (YOSHIDA Hisateru)	鳥取大学・医学部・大学院生 (15101)	
研究協力者	岡崎 静麻 (OKAZAKI Shizuma)	鳥取大学・医学部・大学院生 (15101)	
研究協力者	野田 郁也 (NODA Ikuya)	鳥取大学・医学部・大学院生 (15101)	