

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07903

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の急性肝障害下の産生物質、エクソソームに着目した抗炎症療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel anti-inflammatory therapy using mesenchymal stem cells

研究代表者

土屋 淳紀 (Tsuchiya, Atsunori)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：70464005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は抗Fas抗体、四塩化炭素、四塩化炭素+リポポリサッカライド、アセトアミノフェン、D-Galactosamine等様々な急性肝障害モデルを検討した。中でも最も安定したモデルが四塩化炭素による急性肝障害モデルであった。次に間葉系幹細胞やエクソソームの投与の効果の検証を肝障害開始後、肝障害と同時期、肝障害を起こす前に投与の3通りの方法で検証を行った。その結果、肝障害を起こす前に投与で、肝酵素の低下が有意にみられ、このことから投与時期が急性肝障害軽減には極めて大切な結果と考えている。しかし、一般臨床では急性肝障害の前に投与することは困難で、より慢性に近い方が効果を得やすい可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、慢性肝障害である肝硬変に対して、間葉系幹細胞やマクロファージなど様々な細胞治療や細胞を用いないセルフリー治療が日本、そして世界で開発されてきている一方、急性肝障害に対して、これらの細胞が、効果があるのかの検証はまだ十分とは言えない。急性肝障害に関しては、ステロイドをはじめとした治療があるものの、間葉系幹細胞治療の効果を検証すること、そして効果があるのであればその原因物質や機序を明らかにすることは有意義で有り、本研究を行うこととした。

研究成果の概要(英文)：We tried to develop mouse acute liver injury model using anti-Fas antibody, carbon tetrachloride (CCl4), CCl4 + lipopolysaccharide, acetaminophen and D-Galactosamine, and found that CCl4 induced acute liver injury model was most stable model for our analysis. Using this model, we tried to inject mesenchymal stem cells (MSCs) or their exosomes by three different ways around the time of acute liver damage; 1) pre-injection, 2) simultaneous injection, 3) post-injection. Our analysis showed that pre-injection of MSCs was most effective for acute liver injury. However, in clinical setting, pre-treatment of MSCs is very difficult, thus we concluded that MSC therapy is more appropriate for chronic liver injury model than acute liver injury model.

研究分野：肝臓

キーワード：急性肝障害 間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性肝障害はウイルス、薬物、自己免疫などを原因とする急激な肝細胞障害を伴い、時に急性肝不全に至る。急性肝不全には原因に対する治療を行いながら血漿交換をはじめとする肝補助療法など集学的な治療を行うが、時に肝移植が究極な治療法となるため新たな治療法の開発が求められている。一方間葉系幹細胞(MSC)は骨髄ばかりでなく脂肪組織、臍帯組織など医療廃棄物からも得られる細胞で、培養条件や環境条件で機能が多彩に変化し、肝硬変モデルマウスでは肝細胞障害軽減作用をもつ。実際我々は肝硬変モデルマウスにおいて MSC が容量依存的にマウスの肝逸脱酵素である ALT を低減させる機能があること、そしてそれは MSC の持つ多機能性、特に抗炎症効果、抗アポトーシス効果、抗酸化効果などが関係していると考えている。また、MSC は低抗原性であり、ヒトでは適切な細胞量であれば他家細胞を用いても副作用なく投与でき、マウスなどの実験動物を用いてもヒト MSC は効果を及ぼすことを我々は確認している (Takeuchi S, Tsuchiya A et al. NPJ Regen Med. 2021 Mar 30;6(1):19. doi: 10.1038/s41536-021-00132-4)。最近我々はヒト臨床においてロート製薬とのヒト他家脂肪由来 MSC を用いた非代償性肝硬変に対する有効性と安全性を見る Phase I/II study をスタートさせている。しかし、現状において MSC が急性肝障害に効果を発揮するのかという点に関しては十分明らかにされていない。

2. 研究の目的

今回、我々は MSC が肝硬変モデルマウスにおいて容量依存的にマウスの肝逸脱酵素である ALT を低減させる機能を持つこと、そして将来的に on demand で投与できる他家 MSC の臨床展開をみすえ、

- (1) 治療効果が評価できる急性肝障害モデルの確立を行う。
 - (2) 急性肝障害での MSC の効果をもたらすかどうかを検討する。
 - (3) 効果をもたらす様であればメカニズムと効果的な細胞、物質の同定を試みる。
- 以上の順で検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 急性肝障害モデルの作成に関して

我々は、抗 Fas 抗体、四塩化炭素、四塩化炭素 + リポポリサッカライド、アセトアミノフェン、D-Galactosamine 等を用いて様々な急性肝障害モデルを検討した。肝障害後に様々なポイントで AST、ALT、Alb(アルブミン)、T-Bil(ビリルビン)の測定を行い、治療効果が得られているかを検討した。

(2) 急性肝障害モデルでの MSC の効果の検証

(1) にて選択した肝障害モデルにおいて、MSC の投与による治療効果の検証を行った。急性肝障害を起こす前、起こすと同時、起こした後にヒト MSC を 1×10^6 cells/mouse の投与を行った。治療後の血清 AST、ALT、Alb、T-Bil の測定を行い、治療効果の検討を行った。

(3) 効果メカニズムの検証

効果メカニズムの検証として、MSC のエクソソームの投与、そしてエクソソームのプロテオミクス、miRNA 解析を行った。

4. 研究成果

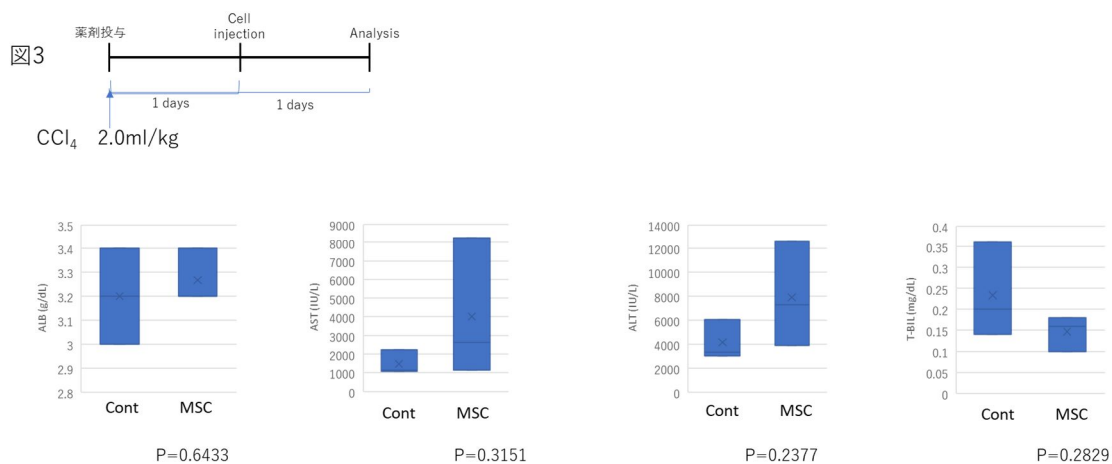
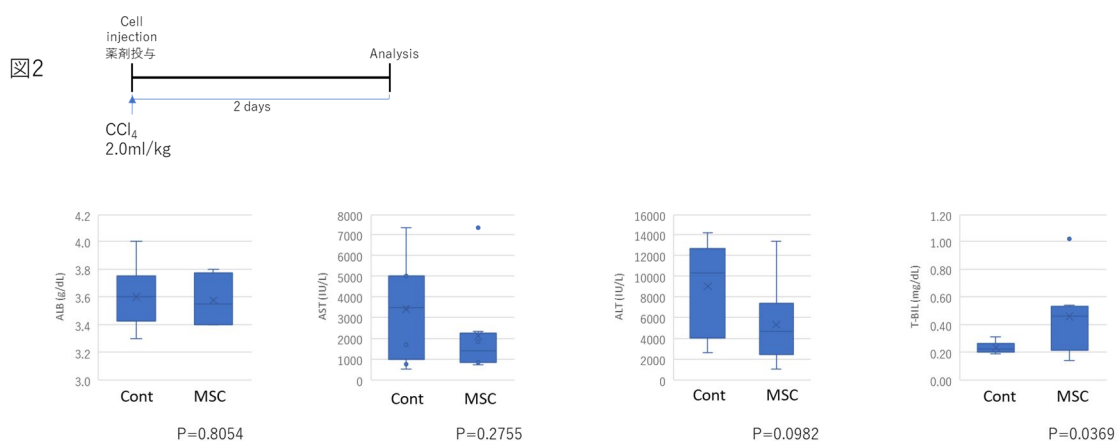
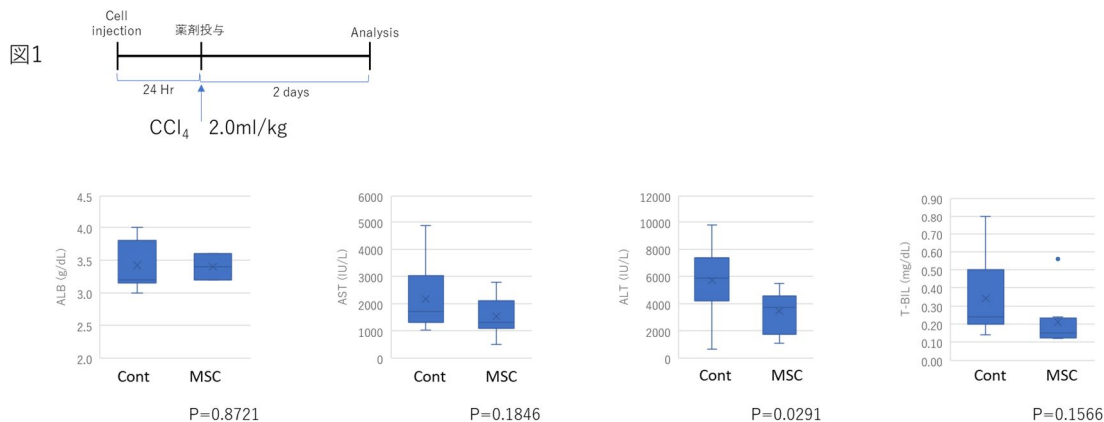
(1) 四塩化炭素急性肝障害モデルが最も安定した肝障害モデルであった。

我々は、既報の文献を元に急性肝障害モデルの作成を試みることにした。抗 Fas 抗体、四塩化炭素、四塩化炭素 + リポポリサッカライド、アセトアミノフェン、D-Galactosamine を用いたが、それぞれで、肝障害を評価した。一番問題だったところは、個々のばらつきと死亡率であった。この二つの問題点を解決するために投与量、タイミングなど様々な条件検討を行ったが、個体間のばらつきが少なく、安定した急性肝障害が作れるモデルは四塩化炭素(2.0ml/kg)での投与であった。また、解析タイミングは四塩化炭素投与後 2 - 3 日の間が最もばらつきが少なく、治療効果のタイミングを見るには最適と考えた。

(2) 肝障害前に MSC を投与した時に、最も治療効果が得られた。

次に四塩化炭素急性肝障害モデルを用いて、肝障害を起こす前、同時、後のいずれの時期に細胞を投与すると最も肝障害の軽減作用があるかの検討を行った。その結果最も効果が得られたのは、肝障害をおこす前に細胞投与を行っていた群で、AST、ALT 共に軽快傾向が見られ、ALT では有意差を持って低下傾向が見られた(図 1)。同時投与でも、AST 及び ALT に低下傾向は見られたが、有意差はなかった(図 2)。肝障害を起こした後に細胞を投与した群では、AST 及び ALT がむしろ高くなる傾向が見られた(図 3)。以上のことより投与するタイミングも非常に大切であることが考えられた。また、今回の経過は臨床に置き換えると、肝障害の前に MSC を打つのは不可

能で、MSC は今回のモデルケースよりもより慢性に近い物の方が効果を得やすい可能性が考えられた。また、エクソソーム投与においても細胞投与と同様の傾向が見られた。



(3) エクソソームのプロテオーム解析や miRNA 解析の結果が得られた。

今回は、当初は肝障害の後に MSC を投与しても効果が得られると考えていたが、実際はそうではなかった。我々は、ただ、エクソソームにおいても同様の傾向が見られたことから、エクソソームのプロテオーム解析及び、miRNA 解析を行った。タンパクは 2000 以上が同定でき、miRNA に関しては 200 を越える miRNA のデータを集積する事ができた。現在、効果改善に関わる機序や特定のタンパク miRNA の解析を行っているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kojima Yuichi, Tsuchiya Atsunori, Ogawa Masahiro, Nojiri Shunsuke, Takeuchi Suguru, Watanabe Takayuki, Nakajima Kenji, Hara Yukio, Yamashita Junji, Kikuta Junichi, Takamura Masaaki, Ishii Masaru, Terai Shuji	4. 巻 11
2. 論文標題 Mesenchymal stem cells cultured under hypoxic conditions had a greater therapeutic effect on mice with liver cirrhosis compared to those cultured under normal oxygen conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 269 ~ 281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.08.005	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchiya Atsunori, Takeuchi Suguru, Watanabe Takayuki, Yoshida Tomoaki, Nojiri Shunsuke, Ogawa Masahiro, Terai Shuji	4. 巻 39
2. 論文標題 Mesenchymal stem cell therapies for liver cirrhosis: MSCs as “conducting cells” for improvement of liver fibrosis and regeneration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-019-0107-z	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima Nao, Hashimoto Satoru, Sato Hiroki, Takahashi Kazuya, Nagoya Takuro, Kamimura Kenya, Tsuchiya Atsunori, Yokoyama Junji, Sato Yuichi, Wakatsuki Hanako, Miyata Masayuki, Akashi Yusuke, Tanaka Ryusuke, Matsuda Ken, Tabata Yasuhiko, Terai Shuji	4. 巻 11
2. 論文標題 Efficacy of gelatin hydrogels incorporating triamcinolone acetonide for prevention of fibrosis in a mouse model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 41 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.04.001	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchiya Atsunori, Lu Wei-Yu	4. 巻 25
2. 論文標題 Liver stem cells: Plasticity of the liver epithelium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1037 ~ 1049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3748/wjg.v25.i9.1037	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawata Yuzo, Tsuchiya Atsunori, Seino Satoshi, Watanabe Yusuke, Kojima Yuichi, Ikarashi Shunzo, Tominaga Kentaro, Yokoyama Junji, Yamagiwa Satoshi, Terai Shuji	4. 巻 376
2. 論文標題 Early injection of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell after inflammation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through the induction of M2 macrophages and regulatory T cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 257 ~ 271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-018-02981-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Yusuke, Tsuchiya Atsunori, Seino Satoshi, Kawata Yuzo, Kojima Yuichi, Ikarashi Shunzo, Starkey Lewis Philip J., Lu Wei-Yu, Kikuta Junichi, Kawai Hirokazu, Yamagiwa Satoshi, Forbes Stuart J., Ishii Masaru, Terai Shuji	4. 巻 8
2. 論文標題 Mesenchymal Stem Cells and Induced Bone Marrow-Derived Macrophages Synergistically Improve Liver Fibrosis in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 STEM CELLS Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 271 ~ 284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/sctm.18-0105	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawata Yuzo, Tsuchiya Atsunori, Seino Satoshi, Watanabe Yusuke, Kojima Yuichi, Ikarashi Shunzo, Tominaga Kentaro, Yokoyama Junji, Yamagiwa Satoshi, Terai Shuji	4. 巻 376
2. 論文標題 Early injection of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell after inflammation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through the induction of M2 macrophages and regulatory T cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 257 ~ 271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-018-02981-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Yusuke, Tsuchiya Atsunori, Seino Satoshi, Kawata Yuzo, Kojima Yuichi, Ikarashi Shunzo, Starkey Lewis Philip J., Lu Wei-Yu, Kikuta Junichi, Kawai Hirokazu, Yamagiwa Satoshi, Forbes Stuart J., Ishii Masaru, Terai Shuji	4. 巻 8
2. 論文標題 Mesenchymal Stem Cells and Induced Bone Marrow-Derived Macrophages Synergistically Improve Liver Fibrosis in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 STEM CELLS Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 271 ~ 284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/sctm.18-0105	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土屋淳紀、高村昌昭、寺井崇二
2. 発表標題 消化器疾患での間葉系幹細胞を用いた治療法開発
3. 学会等名 JDDW2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺井崇二、土屋淳紀、竹内卓
2. 発表標題 間葉系幹細胞を指揮細胞として用いた肝硬変に対する再生医療の治療戦略
3. 学会等名 JDDW2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土屋淳紀、竹内卓、寺井崇二
2. 発表標題 肝硬変に対する間葉系幹細胞由来のエクソソーム療法の開発に向けて
3. 学会等名 日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土屋淳紀、小川雅裕、野尻俊介、渡邊貴之、竹内卓、小島雄一、川田雄三、寺井崇二
2. 発表標題 消化器疾患での間葉系幹細胞を用いた再生医療の治療戦略
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 分担 者	寺井 崇二 (Shuji Terai) (00332809)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------