

令和 2 年 4 月 28 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15825

研究課題名(和文)急性肝不全に対する組織修復幹細胞(Muse細胞)の細胞治療に向けた理論基盤構築

研究課題名(英文) Establishment of a theoretical framework of cell therapy for acute liver failure using endogenous reparative pluripotent stem cells (Muse cells)

研究代表者

鈴木 悠地 (Suzuki, Yuji)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：00779332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄や臓器の結合組織に存在するMuse細胞は、傷害組織に集積しその組織に応じた細胞に自発的に分化する能力を持つ。本研究では、急性肝障害患者におけるMuse細胞の動態解析を行うことで、ヒトの病的状態におけるMuse細胞の役割を明らかにすることを目的とした。急性肝障害患者では臨床経過中にMuse細胞とその遊走因子(スフィンゴシン-1-リン酸)が上昇することを明らかとした。また、末梢血に動員されたMuse細胞は障害肝に遊走し、生着・分化し得ることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療の細胞ソースとして注目されるMuse細胞が、病的状態で一過性に動員され、障害組織の修復を行なっていることを支持する結果が示された。また、我々の研究結果は、肝臓の組織修復やホメオスタシスに肝外由来の細胞が貢献している可能性を示す結果でもある。本知見は、急性肝障害におけるMuse細胞の動態解明と、肝疾患に対するMuse細胞の細胞治療の可能性を検証するための基礎的データとなる。

研究成果の概要(英文)：The multi-lineage differentiating stress-enduring (Muse) cells, reside in bone marrow and organ connective tissues, home to the site of damaged tissue followed by differentiating into tissue-compatible cells. The purpose of this study is to clarify the role of Muse cells in acute liver injury by analyzing the mobilization of Muse cells during the clinical course of acute liver injury patients. Increased numbers of Muse cells and increased level of a homing signal (Sphingosine-1-phosphate) for Muse cells were observed during the clinical course of acute liver injury. Additionally, isolated endogenous Muse cells from acute liver injury patients peripheral blood samples homed into damaged liver tissue, followed by differentiating into the tissue-compatible cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：Muse細胞 急性肝不全 再生医療 細胞治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性肝障害の多くは自己終息的な経過をとるが、意識障害を伴う昏睡型急性肝不全に進展すると内科的救命率が約 20%と極めて予後不良であり、その克服が臨床的な課題である。我々は、急性肝障害患者の肝性昏睡発現の予知式(劇症化予知式)を開発し、急性肝障害患者の専門施設への早期搬送システムを確立した。この搬送システムにより急性肝障害患者の早期治療が可能となり、急性肝障害患者の至適治療開始の規準を明らかとした。最近では、昏睡覚醒を目指した人工肝補助機器の開発し多施設共同医師主導治験を完遂した。本機器を用いて、肝性脳症からの覚醒率を 90%程度達成することが可能となったが、肝機能の回復は生じない。つまり、内科治療に抵抗性の急性肝不全に対する治療は、現在のところ肝移植のみが唯一の根治的治療となる。急性肝不全に対する内科救命率向上のため、残る課題は有効な肝再生促進治療法の確立である。我々は、腫瘍性を持たない生体由来多能性幹細胞として知られる Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) 細胞に着目した。 Muse 細胞は経静脈投与により傷害組織に集積し、その組織に応じた細胞に自発的に分化することで組織を修復する。先行研究では、我々が開発したヒト肝臓切除後の再生を忠実に再現した損傷部分肝切除モデルを用い、骨髄間葉系幹細胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)のうち、 Muse 細胞分画のみが肝組織を構成する各種細胞に分化することを示した。以上の結果から、 BM-MSCs の分画に含まれる Muse 細胞が肝再生に関わる肝外細胞として有力な候補であると考へた。 Muse 細胞は脳梗塞患者や急性心筋梗塞患者の末梢血中にも動員されることが報告され、組織傷害にともなって末梢血に動員されることが臨床データから示唆されていた。 Muse 細胞は様々な疾患で動員され、生体の危機において多能性を駆使した組織修復を担っている可能性がある。しかしながら、これまでのところ、急性肝不全患者における Muse 細胞の動態や病的状態で動員された Muse 細胞が組織修復に果たす役割やメカニズムは明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、ヒト急性肝不全における Muse 細胞の動態および肝再生・肝機能維持に果たす役割を解明し、急性肝不全に対する Muse 細胞移植治療に向けた理論基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

Muse 細胞は、傷害組織から出されるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) に対する受容体 (S1P receptor 2) を発現している。そのため、循環血液中にある Muse 細胞は傷害部位に遊走することが可能である。予備検討として、2011 年から 2016 年までに集積されたヒト急性肝不全保存血漿を用いて S1P を液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS/MS) により定量した。その後、末梢血 Muse 細胞の定量化および S1P 濃度の測定を前向き観察研究として実施した。急性肝不全患者の入院 0 日目、3 日目、5 日目、7 日目、30 日目の末梢血 Muse 細胞数を測定した。血漿 S1P 濃度は、各症例について末梢血 Muse 細胞の上昇が確認された時点およびそれ以前の保存血漿を用いて測定した。経過中に肝移植となった症例に関しては、移植後 1 日目、3 日目、5 日目、7 日目、30 日目の末梢血 Muse 細胞数の測定を行った。 Muse 細胞数の定量化は、末梢血中の単核球分画を分離し、 Muse 細胞マーカーである抗 SSEA-3 抗体を用いてフローサイトメトリーにより定量化した。また、 Muse 細胞の上昇が確認された一部の症例について、 SSEA-3 を指標として Muse 細胞をソーティングした。ソーティング細胞を損傷肝切除モデルの脾臓に異種移植して、肝臓への遊走・生着・分化能について検証した。

4. 研究成果

2011 年から 2016 年までに集積されたヒト急性肝不全保存血漿を用いて S1P を LC/MS/MS 法

により定量した結果、死亡群と比較し生存群で有意に血中の S1P 濃度が上昇していた。急性肝障害患者 20 例について Muse 細胞数を継続的に測定した結果、解析を行った 20 例中 16 例(80%)で経過中に Muse 細胞数が一過性に上昇した(図 1)。また、Muse 細胞の遊走因子である S1P 濃度も上昇していることを確認した(図 2)。さらに、Muse 細胞の上昇が確認できた患者の末梢血から Muse 細胞をソーティングし、肝障害モデルマウスの脾臓に Muse 細胞を異種移植した結果、障害肝臓への Muse 細胞の遊走と生着が確認できた。この結果は、病的状態で動員された Muse 細胞が障害肝組織に遊走・生着する能力を持つことを示すとともに、肝臓の再生機構に肝外由来の細胞が関与していることを示唆している。

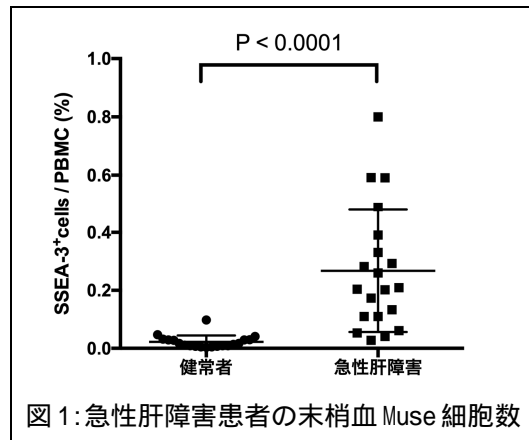


図 1:急性肝障害患者の末梢血 Muse 細胞数

この結果は、病的状態で動員された Muse 細胞が障害肝組織に遊走・生着する能力を持つことを示すとともに、肝臓の再生機構に肝外由来の細胞が関与していることを示唆している。

その他、付随研究の成果として以下の研究成果が得られた。血友病 A 患者に肝移植が行われると、血友病の表現型が治癒すると報告されていた。血友病 A は血液凝固因子のうち第 Ⅲ 因子の欠損ないしは活性低下による血液凝固異常症である。第 Ⅲ 因子の主たる産生細胞は肝臓の類洞内皮細胞である。そのため、肝移植後に血友病 A の遺伝的背景を持たないグラフト肝臓から第 Ⅲ 因子が産生されることが、血友病 A の表現型が治癒する機序と考えられている。我々は、肝移植後の凝固因子活性を詳細に観察した。その結果、継続的に第 Ⅲ 因子の活性は血友病 A 再燃のレベルまで低下し、肝移植後に血友病 A が再燃する可能性があることを世界で初めて報告した。経過中、血中に第 Ⅲ 因子の inhibitor は存在していなかった。この結果は、血友病 A で欠損している第 Ⅲ 因子の産生細胞である類洞内皮細胞が、肝移植後の長期的な経過で、第 Ⅲ 因子を産生することのできないレシピエント由来の細胞に置き換わっている

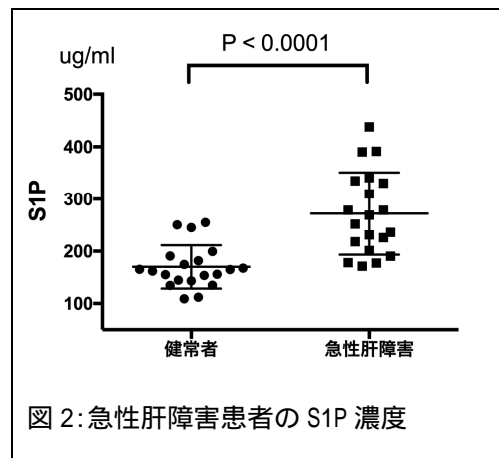


図 2:急性肝障害患者の S1P 濃度

可能性を示唆する結果である。肝臓のホメオスタシスに、Muse 細胞のような肝外由来の多分化能を持つ細胞が関与している可能性が臨床的データからも得られた。

また、アルコール多飲による重症アルコール性肝炎患者の解析でも、Muse 細胞の一過性的上昇が確認された。我々の解析は肝臓に急激に障害が及ぶ様々な病態で、Muse 細胞が動員されることを示唆する結果であった。

以上、ヒト急性肝障害では末梢血に Muse 細胞が誘導されることが明らかとなり、肝臓の組織修復やホメオスタシスに肝外由来の細胞が貢献している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Suzuki Yuji, Kakisaka Keisuke, Matsumoto Tomoko, Nogami Keiji, Katagiri Hirokatsu, Takahara Takeshi, Takikawa Yasuhiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Orthotopic liver transplantation for haemophilia A may not always lead to a phenotypic cure of haemophilia A: A case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Haemophilia	6. 最初と最後の頁 e420 ~ e422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hae.13604	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 Suzuki Yuji, Kakisaka Keisuke, Suzuki Akiko, Takahara Takeshi, Sasaki Tokio, Sato Takuro, Yonezawa Takehiro, Nitta Hiroyuki, Takikawa Yasuhiro	4. 巻 49
2. 論文標題 A Lille Model for Predicting the Response of Severe Alcoholic Hepatitis to Corticosteroid Treatment in Japanese Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 758-764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13334	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 Nishizuka Satoshi S., Suzuki Yuji, Katagiri Hirokatsu, Takikawa Yasuhiro	4. 巻 1103
2. 論文標題 Liver Regeneration Supported by Muse Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 219 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-4-431-56847-6_12	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 Sasaki Tokio, Suzuki Yuji, Kakisaka Keisuke, Wang Ting, Ishida Kazuyuki, Suzuki Akiko, Abe Hiroaki, Sugai Tamotsu, Takikawa Yasuhiro	4. 巻 9
2. 論文標題 IL 8 induces transdifferentiation of mature hepatocytes toward the cholangiocyte phenotype	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 2105 ~ 2116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12750	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yuji Suzuki, Keisuke Kakisaka, Takuro Sato, Hiroaki Abe, Tokio Sasaki, and Yasuhiro Takikawa
2. 発表標題 Technetium-99m-GSA Scintigraphy Performed within the First 3 d After Admission as an Early Predictor of Outcome in Severe Acute Liver Injury
3. 学会等名 The International Liver Congress 2019. Apr 2019. Vienna, Austria. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Suzuki, Keisuke Kakisaka, Akiko Suzuki, Yasuhiro Takikawa.
2. 発表標題 A Lille model for predicting the response of severe alcoholic hepatitis to corticosteroid treatment in Japanese patients.
3. 学会等名 Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2018. March 2018. New Delhi, India. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tokio Sasaki, Yuji Suzuki, Keisuke Kakisaka, Ting Wang, Yasuhiro Takikawa.
2. 発表標題 Interleukin-8 induces transdifferentiation of mature hepatocytes towards biliary epithelial cell phenotype.
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research 2018. June 2018. Melbourne, Australia. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木悠地、柿坂啓介、滝川康裕
2. 発表標題 Acute-on-Chronic Liver Failureの一成因であるアルコール性肝炎に対する治療プロトコールの統一化を行って
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会 2019年5月 東京
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木登希夫、鈴木悠地、柿坂啓介、王挺、滝川康裕
2. 発表標題 Interleukin-8は成熟肝細胞を胆管上皮細胞の表現型に誘導する
3. 学会等名 第45回日本急性肝不全研究会 2019年5月 東京
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
研究協力者	西塚 哲 (Nishizuka Satoshi)		
研究協力者	串田 良祐 (Kushida Yoshihiro)		