

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08382

研究課題名(和文) 脂肪組織由来間葉系幹細胞を応用した非アルコール性脂肪肝炎への治療法と安全性

研究課題名(英文) Therapy of non-alcoholic steatohepatitis by adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and safety

研究代表者

高梨 正勝 (Takanashi, Masakatsu)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：80312007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織由来間葉系幹細胞は侵襲性が低く、生体内の幹細胞含有量が高い。間葉系幹細胞を用いた再生医療は、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の発症後の効果的な治療選択肢として、実用化の可能性が高いと期待されている。NASHモデルマウスを作製することにより、NASHの脂肪組織から間葉系幹細胞の樹立を試みた。NASHの動物モデルの作成についてはいくつかの報告があるが人間の病理学と同様の研究が依然として必要である。本研究ではIL-1受容体拮抗薬欠損マウスにストレプトゾトシンを投与し高脂肪食を長期間与えることでモデル動物の作製に成功した。これらの動物の脂肪組織から関与する幹細胞を確立することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASHモデル動物の作成とその動物由来の脂肪組織から間葉系幹細胞を樹立した。NASHの発症原因は様々な報告がある。NASHの発症機序や治療法の研究にはモデル動物は必要不可欠である。しかし、これまでに報告されているモデル動物では、未だ開発する必要がある。本研究ではこれまでに報告のない、IL-1 receptor antagonist欠損したマウスを使用した。このマウスはIL-1のシグナル伝達系が恒常的に刺激され、炎症が誘導された状態にあるマウスである。この系統によるモデルマウスの作出は、安定的に高頻度に誘導することが可能である。今後のNASHの発症の解明や治療モデルに応用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue are known to be less invasive to tissues and have higher stem cell content in tissues. Regenerating medicine using mesenchymal stem cells is expected to have a high potential for practical application as an effective therapeutic option after developing non-alcoholic steatohepatitis (NASH). We attempted to establish mesenchymal stem cells from adipose tissue of NASH by generating NASH model mice. Although there have been several reports on the creation of animal models of NASH, studies similar to those on human pathology are still needed. In this study, we succeeded in creating a model animal by administering streptozotocin to IL-1 receptor antagonist-deficient mice and feeding them a high-fat diet for a long period. We succeeded in establishing involved stem cells from the adipose tissue of these animals.

研究分野：実験病理学

キーワード：NASH 間葉系幹細胞 エクソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

NASH は肝硬変や肝がんへ高い割合で進行することが知られており、重篤な肝機能不全に対する治療が必要である。肝機能不全の改善に肝臓移植は有効な治療法であるが、ドナー不足や拒絶反応、治療費などの問題から普及は低い。これに代わる治療法として iPS 細胞を含む再生医療が注目されている。自己細胞や発がん性のリスクの無い成体幹細胞を応用した間葉系幹細胞 (MSC) を用いた治療が期待され、盛んに研究が行われている。MSC を採取する組織は骨髄、胎盤、脂肪組織などが報告されており、中でも侵襲性の低い脂肪組織由来間葉系幹細胞 (AMSC) が注目されている。AMSC は骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞など間葉系に属する細胞への分化能を有するが、内胚葉系の肝細胞にも分化することが報告され、重篤な肝機能不全の患者への応用が期待される。しかし、MSC を用いた再生医療には安全性に対し未解明の部分もあるため、未だ完全なる治療法には至っていない。NASH による肝機能不全状態のモデル動物に AMSC を投与した場合には肝細胞への再生が報告され、治療の主軸となり得ることが予測される。しかし、NASH の発症要因として肥満、動脈硬化、脂肪からの炎症性ファクターの産生などの様々な原因が報告されている。この様な報告から NASH 患者の脂肪組織中の MSC はこれらのリスクファクターに暴露され、この組織由来の AMSC は再生組織 (特に肝臓) に炎症などの病態の進行に何らかの影響を及ぼすか不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、NASH の進行病変である肝機能不全を改善する治療法として期待される再生医療の脂肪組織由来の MSC の安全性について調べることを目的とした。さらに、再生する肝臓組織に脂肪分解酵素を AMSC に導入することで再生肝臓が脂肪肝に成りにくい環境に改善することを目指した。NASH の発症原因や機構を解明するための研究は活発に行われており、これに伴い様々な因子によるモデル動物の作出が報告されている。これを応用して肝機能不全の改善に MSC を応用した研究は近年、数多く報告され注目されているが、正常個体由来の組織から樹立した細胞で行ったものであり、その安全性は不明である。本研究では、それぞれの発症原因による NASH モデル動物由来の組織から MSC を樹立し、正常個体由来の MSC との遺伝子発現を網羅的に解析することで肝機能に影響を与えるか解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

NASH 発症原因由来のモデルマウスと単純性脂肪肝のマウスの作出を試みた。

8~12 週令 C57BL/6J オスマウスに高脂肪含有食を給餌し、期間ごとに肝臓を採取して NASH 発症状況を病理組織学、逸脱酵素などの生化学的解析を行った。さらにストレプトゾトシン (STZ) による膵β細胞の機能低下による高血糖の誘導によるモデルマウスの作成を試みた。生後 2 日目のマウスの皮下に 200 μg の STZ を投与した。離乳後に高脂肪含有飼料を給餌し、対象群としてノーマル飼料を給餌した群と比較した。

また、IL-1α receptor antagonist (IL-1αR<sup>-/-</sup>) 欠損マウス生後 2 日目の皮下に STZ 投与し、離乳後に高脂肪含有飼料又は、通常飼料を最長 6 ヶ月間給餌した。

これらのモデルマウスから脂肪組織由来間葉系幹細胞 (AMSC) を樹立するために、マウスの腹部脂肪組織を摘出し、collagenase P で消化し細胞を分離精製後、20%FCS-DMEM 培地で培養

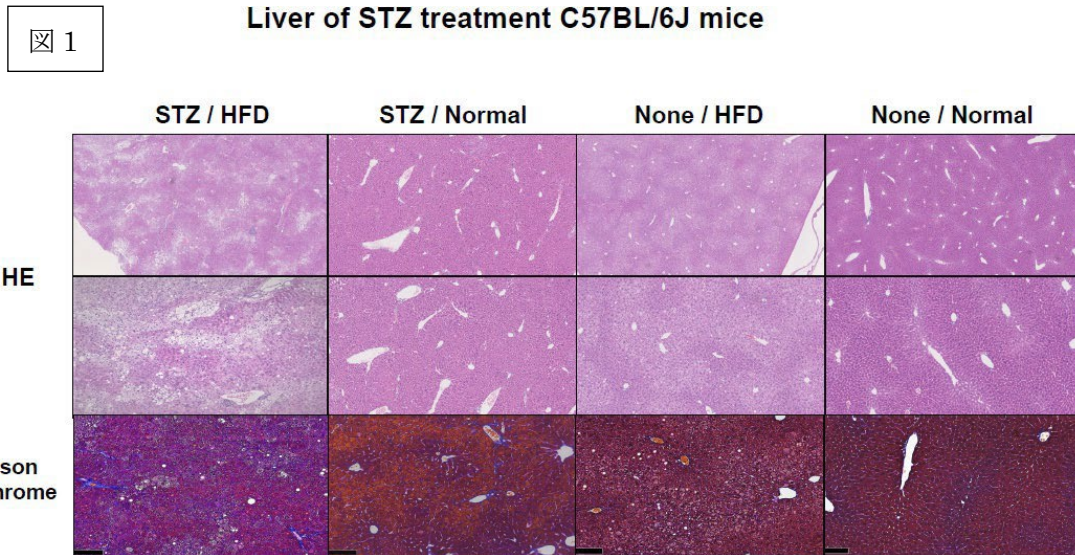
した。これらの AMSC の培養上清からエクソソームの精製を試みた。AMSC 由来のエクソソームが肝臓に及ぼす影響を評価するために擬似的な系を設定するために、マウス肝臓由来のオルガノイド培養を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) NASH モデル動物の作出

##### ① C57BL/6J マウスでの検討

C57BL/6J マウスに高脂肪含有飼料の給餌及び、STZ 投与後に高脂肪含有飼料又は、通常飼料を給餌し 6 か月後の肝臓の組織を評価した (図 1)。STZ 投与後に高脂肪含有飼料を給餌した群において肝細胞のバルーン化が見られ、一部の間質で弱い線維化が見られるが NASH 様の組織形態は認められなかった。さらに、高脂肪含有飼料を給餌した群では肝細胞の脂肪の蓄積が、STZ を投与したのみの群では無処置群と比較して差が見られなかった。以上の結果から、NASH モデル動物を作出するために、何らかの因子を加えることが必要であると考えられる。

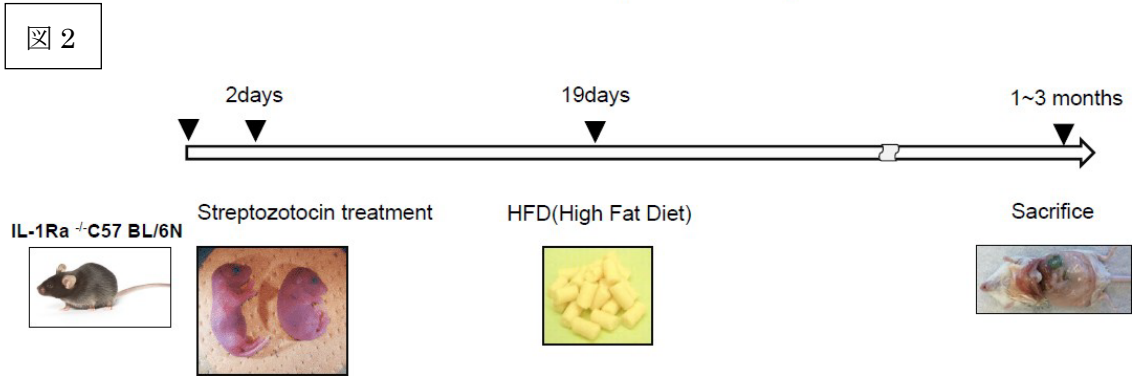


##### ② IL-1alpha receptor antagonist 欠損マウス (IL-1aR<sup>-/-</sup>) での NASH モデル作成検討

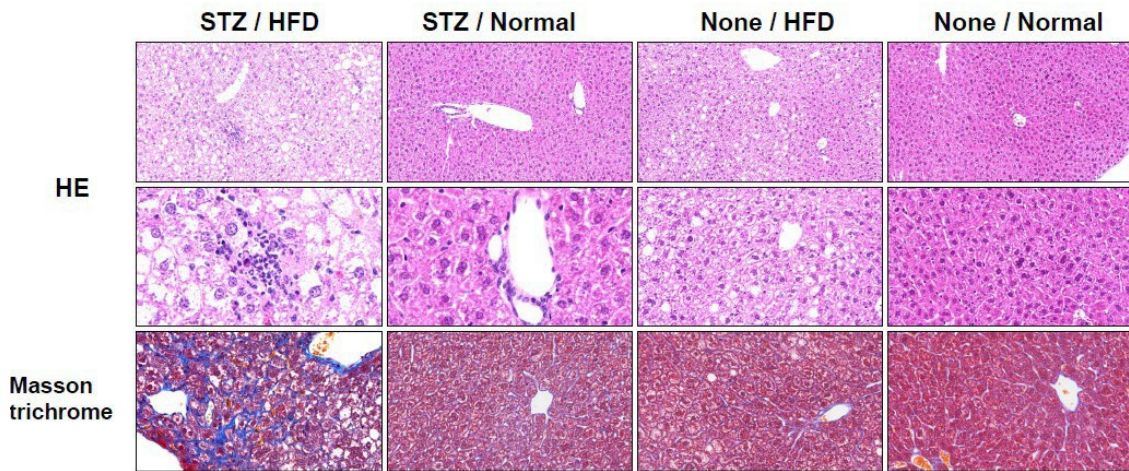
マウスは IL-1 の下流のシグナルが活性化しており、一部の組織において炎症反応が見られることが報告されている。この C57BL/6NIL-1Ra<sup>-/-</sup> マウスの 2 日目の新生児に STZ を投与し、離乳後に高脂肪含有飼料又は、通常飼料を給餌し 6 か月後の肝臓の組織を評価した (図 2、3)。IL-1Ra<sup>-/-</sup> に高脂肪含有飼料を給餌した群での肝臓の組織はバルーン化した肝細胞が多く見られ、血管周辺には白血球の浸潤が認められる。さらに間質には強い繊維化も観察された

(図 3)。一方、STD 無処置の高脂肪含有飼料給餌群では肝細胞のバルーン化は見られたが、白血球の浸潤や間質組織の線維化は認められなかった。血清生化学的な解析結果は血糖値、GOT、CPT の逸脱酵素や、中性脂肪は 1Ra<sup>-/-</sup> に高脂肪含有飼料を給餌した群で他の群と比較して高い値を示した (図 4)。

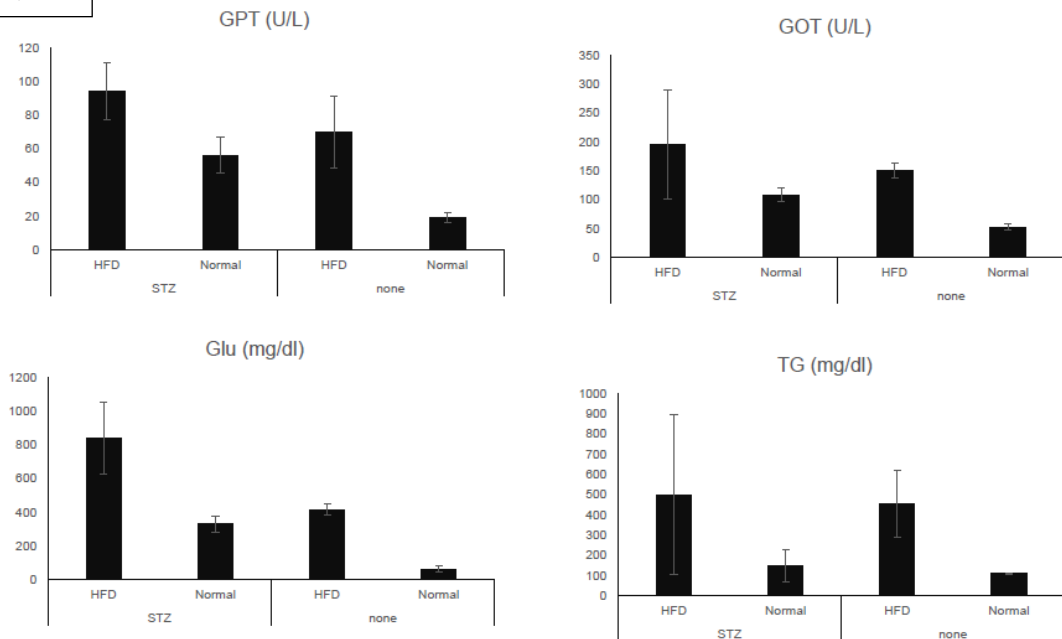
IL-1Ra<sup>-/-</sup>C57 BL/6N mice were treatment with Streptozotocin and High Fat Diet.



3 Liver of STZ treatment IL-1Ra<sup>-/-</sup>/C57BL/6N mice



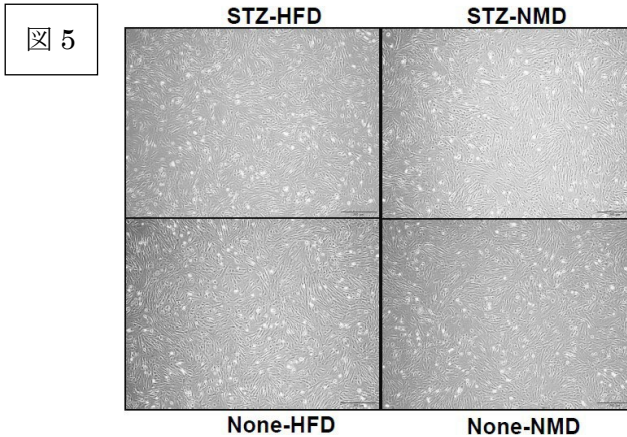
4 Serum in STZ treatment of IL1-Ra<sup>-/-</sup> C57BL/6N mice



(2) NASH モデル動物由来脂肪組織からの MSC の樹立

NASH モデル動物としての C57BL/6N<sup>IL-1ra<sup>-/-</sup></sup>マウスの脂肪組織を摘出し、酵素での消化後に培養して MSC の樹立を試みた (図 5)。各群のマウス由来の脂肪組織から樹立した MSC には形態上の差は認められなかった。

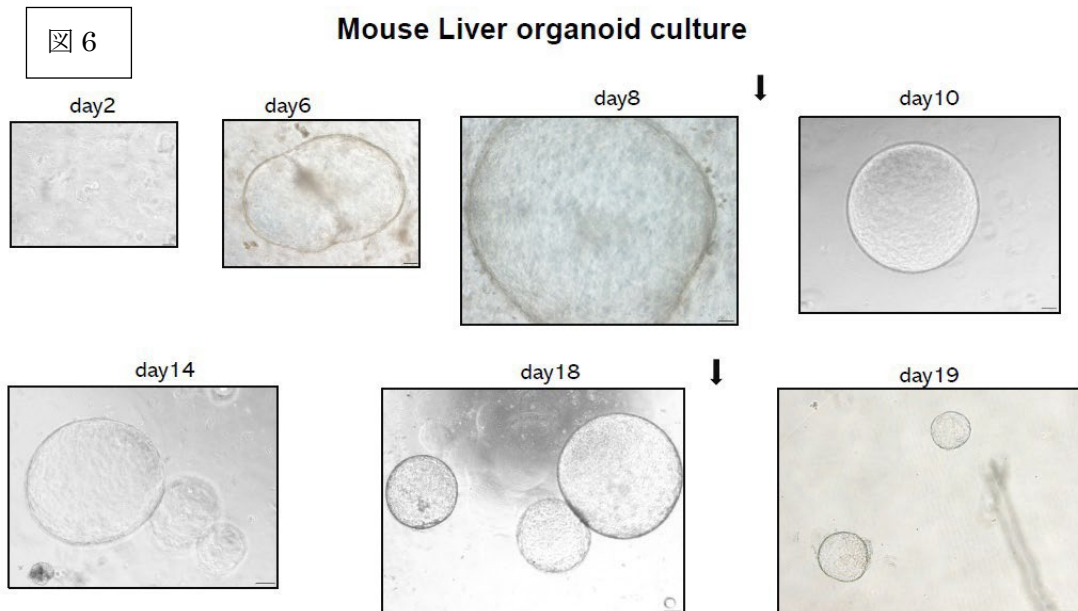
**AMSCs derived from adipose tissue in C57BL/6N IL-1ra<sup>-/-</sup>**



これらの培養上清からエクソソームを単離し、細胞、収量、形態を測定したが、それぞれに大きな差は認められなかった。

(3) マウスの肝臓由来のオルガノイドの樹立

C57BL/6N マウス、オスの肝臓から酵素処理をし、細胞の 3D 培養を行い、肝臓オルガノイドを樹立した。これらの細胞は継代可能である (図 6)。



以上の系を試料とし、MSC から単離したエクソソームを上記で作成した肝臓オルガノイドを用いて肝臓に及ぼす影響を測定する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Asakage M, Usui Y, Nezu N, Shimizu H, Tsubota K, Yamakawa N, Takanashi M, Kuroda M, Goto H.	4. 巻 61(11)
2. 論文標題 Comprehensive miRNA Analysis Using Serum From Patients With Noninfectious Uveitis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci.	6. 最初と最後の頁 4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.61.11.4.	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 Nezu N, Usui Y, Asakage M, Shimizu H, Tsubota K, Narimatsu A, Umazume K, Yamakawa N, Ohno SI, Takanashi M, Kuroda M, Goto H.	4. 巻 9(8)
2. 論文標題 Share Distinctive Tissue and Serum MicroRNA Profile of IgG4-Related Ophthalmic Disease and MALT Lymphoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 2530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm9082530.	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 Minezaki T, Usui Y, Asakage M, Takanashi M, Shimizu H, Nezu N, Narimatsu A, Tsubota K, Umazume K, Yamakawa N, Kuroda M, Goto H.	4. 巻 9(6)
2. 論文標題 High-Throughput MicroRNA Profiling of Vitreoretinal Lymphoma: Vitreous and Serum MicroRNA Profiles Distinct from Uveitis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 1844
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm9061844.	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 Tsujiyama K, Takanashi M, Sudo K, Ishikawa A, Mineo S, Ueda S, Kumagai K, Kuroda M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Extracellular microvesicles that originated adipose tissue derived mesenchymal stem cells have the potential ability to improve rheumatoid arthritis on mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regen Ther.	6. 最初と最後の頁 305-311
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2020.08.004.	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 Umehara R, Kurata A, Takanashi M, Hashimoto H, Fujita K, Nagao T, Kuroda M.	4. 巻 38
2. 論文標題 Fascin as a Useful Marker for Identifying Neural Components in Immature Teratomas of Human Ovary and Those Derived From Murine Embryonic Stem Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Gynecol Pathol	6. 最初と最後の頁 377-385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PGP.0000000000000528.4065tennchann	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 Ueda S, Takanashi M, Sudo K, Kanekura K, Kuroda M	4. 巻 -
2. 論文標題 miR-27a ameliorates chemoresistance of breast cancer cells by disruption of reactive oxygen species homeostasis and impairment of autophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lab Invest.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-020-0409-4	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2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 高梨正勝 須藤カツ子 石川章夫 黒田雅彦
2. 発表標題 DC由来のexosomeによるT細胞の活性化機構について
3. 学会等名 日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takanashi M, Ueda S, Sudo K, Kuroda M
2. 発表標題 Dendritic cell derived-exosomes activate immune systems by transferring exosome involved factors to T cell.
3. 学会等名 ANNUAL MEETING ISEV 2019 (国際学会)
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	村上 善基  (Murakami Yoashiki)  (00397556)	東京医科大学・医学部・兼任教授   (32645)	
研究分担者	上田 しのぶ  (Ueda Shinobu)  (00521874)	東京医科大学・医学部・助手   (32645)	
研究分担者	須藤 カツ子  (Sudo Katsuko)  (50126091)	東京医科大学・医学部・兼任講師   (32645)	
研究分担者	梅澤 明弘  (Umezawa hiroaki)  (70213486)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・再生医療センター・再生医療センター長   (82612)	

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
---------	---------