

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17457

研究課題名（和文）歯髄幹細胞産生因子による腸肝臓器相関に着目した新規NASH治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel therapy for NASH focusing on the intestinal-liver organ correlation produced by factors from dental pulp stem cell

研究代表者

伊藤 隆徳（ITO, Takanori）

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：00827389

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）：ヒト乳歯歯髄幹細胞無血清培養上清（SHED-CM）には、炎症抑制や再生促進に関わる蛋白を含む多数の液性因子が含まれる。本研究では、SHED-CMをNASH肝線維化モデルマウスに投与することで、腸管上皮のtight junctionを保護し、腸管バリア機能を維持することを示した。更にin vitroでのSHED-CM処理は、Caco-2単細胞層モデルにおける腸管上皮の透過性の機能を維持することを示した。SHED-CMが、肝細胞保護作用や炎症性マクロファージ活性化抑制に加えて、腸肝相関を介してNASHモデルの線維化を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アジア、欧米諸国において肥満や2型糖尿病罹患頻度の増加とともにNAFLD/NASHが急速に増加している。しかし、NAFLD/NASHが強い炎症・線維化を来した場合、根本的な治療は現在存在しない。SHED-CMによる様々な動物モデルに対する抗炎症・組織再生効果は、これまでマクロファージの極性転換が主な作用点だと考えられてきたが、本研究においてNASHマウスモデルにおいてはそれに加えて腸肝相関を介して炎症・線維化を抑制することを明らかとなった。NAFLD/NASHの病態は複雑であるが、SHED-CMはNASHに対して多面的な治療効果を発揮するため、有望な治療薬となり得る可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Serum-free conditioned medium from stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth (SHED-CM) contains numerous humoral factors, including proteins involved in suppressing inflammation and promoting regeneration. This study showed that SHED-CM improved liver fibrosis in a mouse model of NASH by protecting the tight junction of the intestinal epithelium and maintaining the intestinal barrier function. Furthermore, in vitro, SHED-CM treatment was shown to maintain the permeability function of the intestinal epithelium in the Caco-2 single-cell layer model. In addition to its hepato-protective effects and inhibition of inflammatory macrophage activation, SHED-CM can suppress fibrosis in the NASH model via the gut-liver axis.

研究分野：消化器内科

キーワード：NASH SHED-CM ヒト乳歯歯髄幹細胞 腸肝相関 脂肪肝 マクロファージ

1、研究開始当初の背景

アジア、欧米諸国において肥満や2型糖尿病罹患頻度の増加とともにNAFLDが急速に増加している。日本におけるNAFLDの有病率に関するメタアナリシスおよびシステマティックレビューでは、一般人口における有病率は25.5%であり、1983年から2012年まで毎年0.64%ずつ増加し、2030年には39.3%に、2040年には44.8%に達すると予測されている。NAFLDの病態が進行した場合は肝硬変や肝癌を合併するが、現在NASHに対しては実臨床で使用可能な根本的治療は存在しない。NASHの発症機序としてはメタボリックシンドロームに伴う全身慢性炎症による”multiple parallel hit theory”が提唱されているものの、核となる仮説として、i) 脂肪蓄積による直接的な肝内炎症や、ii) 腸内細菌由来のエンドトキシンが門脈を通じて肝内へ流入することによる肝内マクロファージ(クッパー細胞)の刺激による肝星細胞の活性化が挙げられる。申請者の研究グループは、これまでにヒト乳歯髄幹細胞無血清培養上清 (SHED-CM) を四塩化炭素(CCl₄)による肝線維化マウスモデルに静脈投与することで、炎症や線維化が改善することを報告した。更にこれまでにSHED-CMは肝内環境を炎症性M1型マクロファージから抗炎症・抗線維化・再生M2型マクロファージへ形質転換することにより病態改善効果を発揮することを見出してきた。

2、研究の目的

本研究ではこれらの成果を発展させ、SHED-CMによる抗炎症・抗線維化効果がNASHに伴う肝線維化動物モデルでも応用可能か、肝臓のみならず腸管環境まで影響を与えうるか、またNASH肝硬変の有望な治療薬となり得るかどうかの基礎的検討を行った。

3、研究の方法

(1) NASH肝線維化モデルにおけるSHED-CM投与の病態改善効果・メカニズムの解析

NASHマウスモデルは、Western Dietおよび高濃度糖水の経口投与と少量のCCl₄腹腔内投与を併用して作成した。このモデルは12週でヒトNASHと類似した肝の脂肪化と線維化をきたす。10週目から12週目まで、SHED-CM(0.5 mL)またはコントロールとして無血清DMEM(0.5 mL)を週に1回尾静注した。肝組織の病理学的評価やトランスアミナーゼ、中性脂肪・血糖・遊離脂肪酸などの採血評価を行い、肝病理組織における脂肪量・線維化面積はBZ-9000解析ソフトを用いて比較検討した。

(2) 腸管透過性亢進と腸内細菌叢の変化を含めたメカニズム解析

SHED-CM投与による肝内遺伝子発現の変化について、qPCRを用いて解析をした。更に蛍光標識デキストラン(FITC-dextran)により腸管上皮の透過を評価する*in vivo*アッセイを行った後に屠殺し、回腸、盲腸内容物、および血清サンプルを収集し、組織学的、血清学的、および遺伝子発現分析を行った。

(3) *in vitro*における腸管上皮細胞に対するSHED-CM投与の影響

腸管上皮の*in vitro*モデルであるCaco-2 単細胞層をIFN- γ およびTNF- α で傷害し、その後SHED-CMあるいはDMEMを添加し24時間培養、FITC-dextranの透過性を評価するとともに、免疫染色および遺伝子発現解析を行った。

4、研究成果

① NASHマウスモデルに対するSHED-CM投与は、末梢血中のアラニンアミノトランスフェラーゼおよびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼレベルの上昇を抑制した。さらに、TGおよび遊離脂肪酸レベルは、DMEM群よりもSHED-CM群で有意に低かった。肝組織のSirius Red染色による肝線維化領域は、DMEM群

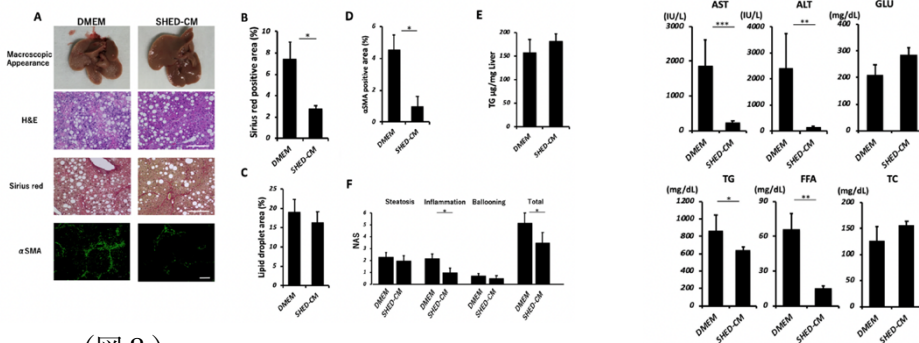
($7.43 \pm 1.57\%$) よりもSHED-CM群 ($2.75 \pm 0.31\%$) で有意に低いことが明らかとなった。NAS scoreは、DMEM群(5.14 ± 0.99)よりもSHED-CM群 (3.50 ± 0.63) で有意に低かったが、肝組織中の脂肪滴の量、TG蓄積は両群で有意差を認めなかった(図1)。肝組織におけるqPCR分析では、SHED-CM投与によりI型コラーゲン (*Colla1* および $\alpha 2$) および α -Smaの発現を有意に抑制することが示された。さらに*Ccl-2*、*Tnf- α* 、および*Tgf- β* 発現もSHED-CM投与によって抑制された(図2)。

② 肝臓におけるLPSの受容体である*Tlr4*の発現は、DMEM群よりもSHED-CM群で有意に抑制されていた(図2)。SHED-CMによって血中LPS-binding protein濃度の低下も確認された。さらに、FITC-dextranを用いた腸管透過性評価によって、SHED-CM治療は腸管バリア機能を保護することが確認された。回腸におけるZO-1の発現はSHED-CM群で有意に増強しており、tight junctionを保護する作用が示唆された。一方で、次世代シーケンサーを用いた腸内細菌解析においては、SHED-CMによる変化は認めなかった(図3)。

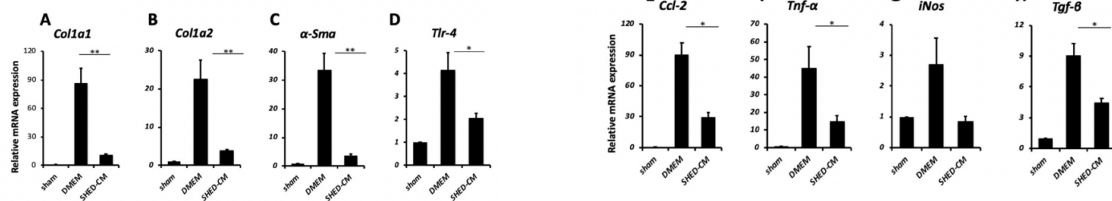
③ Caco-2単細胞層に対して、SHED-CM投与により遺伝子発現解析においては、SHED-CM処理によって*Zo-1*の有意な発現上昇を認め、免疫染色においてもSHED-CMでZO-1 陽性細胞の増加を認めた。つまりSHED-CMは腸管バリア機能を改善させる作用があることが示された(図4)。

本研究では、SHED-CMが腸管上皮のtight junctionを保護し、腸管バリア機能を維持することを示された。この結果、門脈のLPS濃度を反映する血清LPS binding protein濃度が低下し、肝臓での*Tlr-4*の発現が抑制されたと考えられる。SHED-CMによるLPS/TLR-4シグナル経路の抑制効果の一部は、腸管バリアの保護を介している可能性があると考えられた。実際、*in vitro*でのSHED-CM処理が、Caco-2単細胞層モデルにおける腸管上皮の透過性の機能を維持することを示した。SHED-CMが、肝細胞の保護作用や炎症性マクロファージの活性化の抑制に加えて、腸肝相関を介してマウスNASHモデルの線維化を抑制することを明らかにした(図5)。

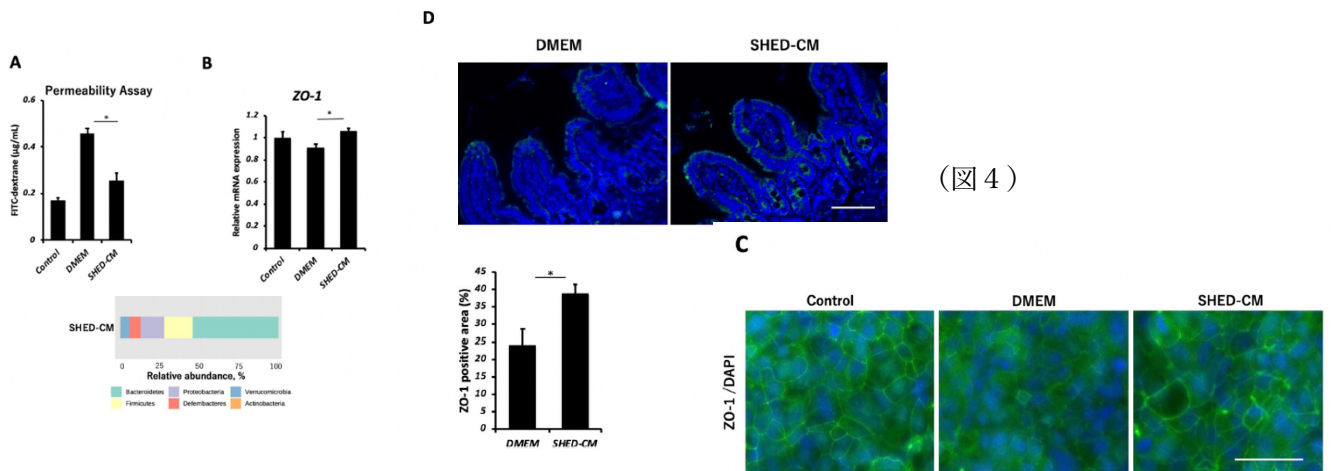
(图 1)



(图 2)

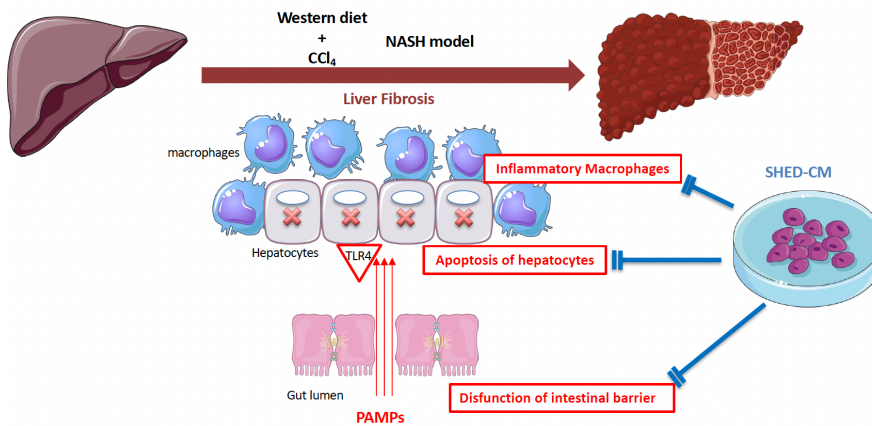


(图 3)



(图 4)

(图 5)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hisanori Muto, Takanori Ito, Taku Tanaka, Shinya Yokoyama, Kenta Yamamoto, Norihiro Imai, Yoji Ishizu, Keiko Maeda, Takashi Honda, Tetsuya Ishikawa, Asuka Kato, Taichi Ohshiro, Fumiya Kano, Akihito Yamamoto, Kiyoshi Sakai, Hideharu Hibi, Masatoshi Ishigami, Mitsuhiro Fujishiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Conditioned medium from stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth ameliorates NASH via the Gut-Liver axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-021-98254-8.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hisanori Muto, Takanori Ito, Masatoshi Ishigami
2. 発表標題 Conditioned medium from stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth ameliorates NASH via the Gut-Liver axis
3. 学会等名 AASLD（アメリカ肝臓学会）2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武藤久哲、伊藤隆徳、石上雅敏
2. 発表標題 NASH線維化マウスモデルに対する歯髄幹細胞無血清培養上清の病態改善効果作用の検討
3. 学会等名 肝臓学会総会 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武藤久哲 伊藤隆徳 石上雅敏 藤城光弘
2. 発表標題 マウスNASHモデルに対する歯髄幹細胞無血清培養上清の抗線維化作用の検討
3. 学会等名 第41回日本炎症再生医学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 伊藤 隆徳、武藤 久哲、田中 卓、中村 正直、本多 隆、石上 雅敏、藤城 光弘	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本メディカルセンター	5. 総ページ数 7
3. 書名 臨牀消化器内科 36巻13号 特集 肝不全・肝硬変に対する再生療法 最先端の今 開発中の肝再生医療 乳歯歯髄由来幹細胞の培養上清 (SHED-CM) を用いた肝再生療法の可能性	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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