

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08331

研究課題名(和文) 肝疾患治療用細胞シートの液性因子に着目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 focusing on humoral factors of cell sheets for liver disease treatment

研究代表者

板場 則子 (ITABA, Noriko)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：70457167

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)：本研究は、間葉系幹細胞(MSC)に独自開発の薬剤IC-2を使用し線維化抑制効果を増強した肝疾患治療用細胞シートの液性因子中の線維化抑制因子を同定することで、新たな肝硬変治療法開発を目指す研究となる。本シートのセクレトームを、限外濾過法、ゲル濾過クロマトグラフィー法による2段階のサイズ分画を実施後、LC-MS/MSショットガンプロテオミクス解析を実施することで、線維化抑制因子の候補となるタンパクの絞り込みに成功した。この手法は、腎線維症の*in vitro*評価系にも応用可能であることが明らかとなり、本研究により、肝硬変だけでなく腎線維症の治療法開発へと繋げる重要な知見を得ることができた。

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に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。本研究ではこの問題点を打破すべく、肝疾患治療用細胞シートのセクレトームに着目し、肝線維化のみならず腎線維化抑制因子の抽出を進めることができた。本研究成果は、アンメットメディカルニースとなる肝硬変や腎線維症の新たな治療法開発へと繋がる学術的、社会的に意義深い研究である。

研究成果の概要(英文)：This research aims to identify fibrosis-suppressing factors in the humoral factors of a cell sheet for liver disease treatment, which utilizes mesenchymal stem cells (MSCs) and an independently developed drug, IC-2, to enhance the fibrosis-suppressing effect. The goal of this research is to develop a new treatment for liver cirrhosis. The secretome of this sheet underwent a two-step size fractionation process using ultrafiltration and gel filtration chromatography, followed by LC-MS/MS shotgun proteomics analysis to identify candidates for fibrosis-inhibiting factors. We succeeded in narrowing down the proteins. It has become evident that this method can be applied to an *in vitro* evaluation system for renal fibrosis. Thus, this research has provided crucial knowledge that will not only contribute to the development of treatments for liver cirrhosis but also for renal fibrosis.

研究分野：再生医療

キーワード：間葉系幹細胞 セクレトーム 肝線維化 腎線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非代償性肝硬変に対する承認薬は存在せず、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 細胞や組織幹細胞を利用する再生医療が注目されている。その細胞源としては、再生促進作用や抗炎症作用、免疫調節作用など再生医療の細胞源としての利点を多く有する間葉系幹細胞(MSC)が重要視され、MSC を用いた肝硬変に対する細胞移植療法の臨床研究が国内外で進められている。MSC の移植により、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. 2017.)。

研究者らは再生医療による非代償性肝硬変の新規治療法の確立を目指し低分子化合物のスクリーニングを実施し、MSC を肝障害抑制効果の高い肝細胞化間葉系幹細胞へと誘導可能な新規薬剤 IC-2 を見出した(Itaba N., et al. Regen Ther. 2015)。また、本薬剤と温度応答性培養皿による細胞シート作製技術を組み合わせることで、肝疾患治療用細胞シート(特許 6008297 号他、関連特許 8 件、関連特許出願 16 件)を開発した。本シートの肝臓表面への移植は、四塩化炭素誘発性の急性肝障害を抑制し、肝再生を促進する他(Itaba N., et al. Sci Rep. 2015, Itaba N., et al., Regen Ther 2018) 四塩化炭素誘発性慢性肝障害モデルマウスにて肝線維化を抑制することを見出している(Itaba N., et al. Sci Rep. 2019)。興味深いことに、この線維化抑制効果は細胞シートを移植した別の肝葉においても、移植肝葉と同様の線維化抑制効果が認められる。また、肝疾患治療用細胞シートの濃縮培養上清からなるセクレトームは、肝線維化進展の主たる要因となる肝星細胞の活性化を抑制する事から、肝疾患治療用細胞シートの液性因子中に線維化抑制因子が含まれると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、研究者らが独自に開発した薬剤 IC-2 により肝線維化抑制効果を増強した肝疾患治療用細胞シートの線維化抑制因子に着目し、細胞シート移植による外科的侵襲性の高い治療ではなく、肝線維化抑制薬としての展開を目指して、肝疾患治療用細胞シートが産生する線維化抑制因子を同定し、新たな肝硬変治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肝疾患治療用細胞シート由来セクレトームの *in vitro* での抗線維化作用の検証

セクレトーム中のタンパクが抗線維化作用を示すかを明らかにするため、熱変性処理を行ったセクレトームの抗線維化作用を *in vitro* にて検証した。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、培養上清を限外ろ過フィルターにより濃縮することでセクレトームを調整し、熱変性処理(-/+セクレトームを *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。

(2) 肝星細胞活性化抑制作用を示すセクレトームの分画と該当分画のショットガンプロテオミクス解析

1 段階目に限外ろ過フィルターによるサイズ分画、2 段階目にゲルろ過クロマトグラフィーによるサイズ分画を実施することで、肝星細胞活性化抑制作用を示す因子が含まれるセクレトーム分画を明らかにし(図 1)、該当分画に含まれるタンパクの網羅的解析を LC-MS/MS ショットガン解析により実施した。

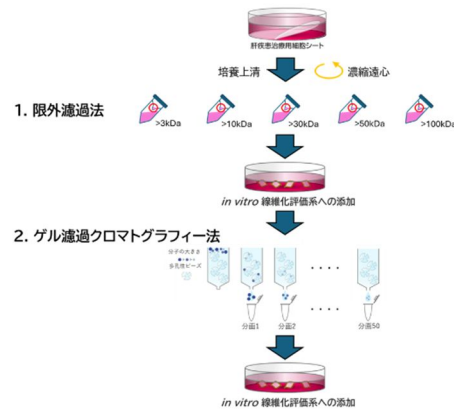


図1. 肝星細胞活性化抑制作用を示すセクレトームの分画

(3) 線維化抑制候補因子の抽出 (*in silico*)

既実施となる LC-MS/MS の Tandem Mass Tag (TMT)解析より得ている IC-2 添加によりセクレトーム中で発現が変動するタンパクの解析結果と、前述のショットガン解析結果を統合することで、線維化抑制候補因子の抽出を行った。

(4) 候補因子の validation と機能解析

in silico 解析により抽出した候補因子の validation を qPCR, Western blotting (WB) により実施し、候補因子のリコンビナントタンパク添加による機能解析を実施した。

4. 研究成果

セクレトーム中の抗線維化因子として、タンパクに着目する方針で問題ないかを検証するため、熱変性処理を行ったセクレトームの肝星細胞活性化抑制効果を検証した。熱変性未処理のセクレトームでは肝星細胞活性化抑制効果が認められる一方、熱変性処理(+)セクレトームではこの肝星細胞活性化抑制効果が消失した(図 2)。肝疾患治療用細胞シートにエクソソーム分泌阻害剤 GW4869

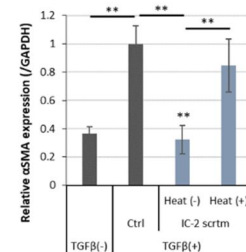


図2. セクレトーム中のタンパクによる肝星細胞活性化抑制効果

を併用して回収したセクレトームでは、肝星細胞活性化抑制効果が維持されるとのデータを得ていることから、セクレトーム中のタンパクに線維化抑制候補因子が含まれると推察された。

既実施となる LC-MS/MS の Tandem Mass Tag (TMT)解析では、IC-2 によりセクレトーム中で産生が変動するタンパクが 215 因子含まれていた事から、線維化抑制因子の同定には実験レベルでの絞り込みが必要と考えられた。そこで、候補因子を絞り込むため *in vitro*にて肝星細胞活

性化抑制作用を示すセクレトームのサイズ分画を限外濾過法とゲルろ過クロマトグラフィーによる2段階の分画により実施した(図 3)。限外濾過法では、3kDa 以上、50kDa 以下のセクレ

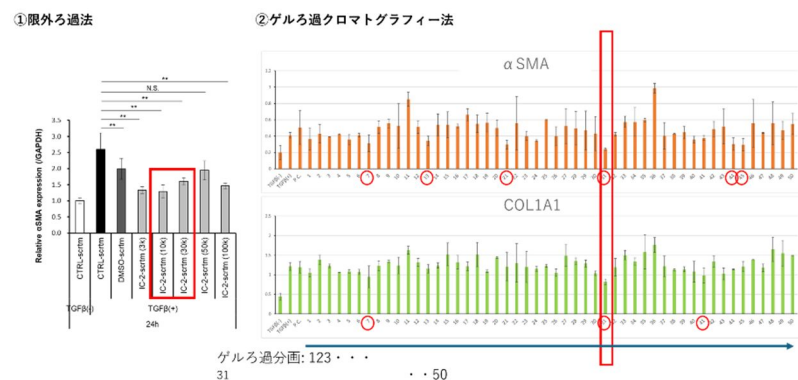


図3.肝星細胞活性化抑制作用を示すセクレトーム分画の抽出

トーム分画で肝星細胞活性化抑制効果が認められた。3kDa と 10kDa の限外ろ過フィルターにより回収したセクレトームでは、肝星細胞活性化抑制作用に差が認められなかったことから、10kDa 以上 50kDa 以下のセクレトームを回収し、2 段階目のゲルろ過クロマトグラフィーによるサイズ分画を実施した。ゲルろ過クロマトグラフィーで 50 分画に細分画した中では、No.31 の分画で α -smooth muscle actin (α -SMA) の発現低下を伴う肝星細胞活性化抑制効果とコラーゲンの発現低下を認めたため、当該分画を LC-MS/MS ショットガンプロテオミクス解析に供した。

既実施となる LC-MS/MS の Tandem Mass Tag (TMT) 解析により得ている IC-2 添加によりセクレトーム中で発現が変動するタンパクの情報と、前述のショットガン解析結果を統合し、IC-2 添加で MSC の培養上清中に産生が増加し、かつ分画セクレトームに含まれるタンパクの中から同定されたフラグメント数の多いタンパク上位 6 因子を抽出した。この中には、線維分解酵素となるマトリックスメタロプロテアーゼ-1(MMP-1)が含まれていた。この他の多くは、CCL2 や CXCL8 など線維の増生に關与する因子であった。

そこで、線維分解酵素となる MMP-1 の機能解析を活性化肝星細胞にて検討した。MMP-1 は、MSC への IC-2 添加により、mRNA 発現、タンパク発現、セクレトーム中への産生が亢進するが、リコンビナントの pro-MMP-1、active-MMP-1 の何れを添加しても *in vitro* での肝星細胞活性化抑制効果は認められなかった (図 4)。MMP-1 は I 型、III 型コラーゲンを基質とすることから、線維の分解に重要な酵素ではあるが、セクレトーム中の肝星細胞活性化抑制作用の本態ではないことが示唆された。肝線維化

抑制因子の同定には、候補因子を上位 6 因子から解析対象を広げる必要があり、今後の検討課題となる。

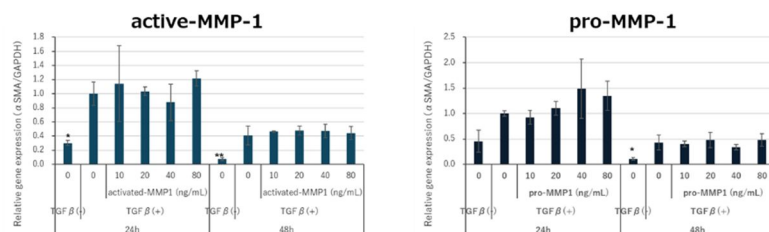


図 4. MMP-1 の肝星細胞活性化への影響の評価

本研究ではこれ以外に、肝疾患治療用細胞シートのセクレトームがヒト尿細管上皮細胞の上皮間葉転換(EMT)による腎線維症の *in vitro* 評価系、ラット腎線維芽細胞の活性化による腎線維症の *in vitro* 評価系において、SMA の発現抑制作用を示すことを認め、限外ろ過フィルターによるサイズ分画により、約 50 - 100kDa の分画中に線維芽細胞の活性化を抑制する因子が含まれることを見出している。本研究の推進により、肝線維化抑制因子のみならず、肝硬変同様に有効な治療薬のない腎線維症に対しても線維化抑制因子の同定へと繋がる貴重なデータが得られた。

<引用文献>

Shiota G, Itaba N. Progress in stem cell-based therapy for liver disease. *Hepatol Res.* 47: 127-141, 2017.

Itaba N, Sakabe T, Kanki K, Azumi J, Shimizu H, Kono Y, Matsumi Y, Abe K, Tonoi T, Oka H, Sakurai T, Saimoto H, Morimoto M, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Shiota G. Identification of the small molecule compound which induces hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Regen Ther.* 2:32-41, 2015

Itaba N, Kono Y, Watanabe K, Yokobata T, Oka H, Osaki M, Kakuta H, Morimoto M, Shiota G. Human mesenchymal stem cell-engineered hepatic cell sheets accelerate liver regeneration in mice. *Sci Rep.* 5: 16169, 2015

Itaba N, Kono Y, Watanabe K, Yokobata T, Oka H, Osaki M, Kakuta H, Morimoto M, Shiota G. Hepatic cell sheets engineered from human mesenchymal stem cells with a single small molecule compound IC-2 ameliorate acute liver injury in mice. *Regen Ther* 9: 45-57, 2018

Itaba N, Kono Y, Watanabe K, Yokobata T, Oka H, Osaki M, Kakuta H, Morimoto M, Shiota G. Reversal of established liver fibrosis by IC-2-engineered mesenchymal stem cell sheets. *Sci Rep.* 9: 6841, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 2件）

1. 著者名 Hoi S, Tsuchiya H, Itaba N, Suzuki K, Oka H, Morimoto M, Takata T, Isomoto H, and Shiota G.	4. 巻 47
2. 論文標題 WNT/ β -catenin Signal Inhibitor IC-2-derived Small-Molecule Compounds Suppress TGF- β 1-induced Fibrogenic Response of Renal Epithelial Cells by Inhibiting SMAD2/3 Signalling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Exp Pharmacol Physiol	6. 最初と最後の頁 940-946
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1440-1681.13270.	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 Fukushima K, Itaba N, Kono Y, Okazaki S, Enokida S, Kuranobu N, Murakami J, Enokida M, Nagashima H, Kanzaki S, Namba N, Shiota G.	4. 巻 18
2. 論文標題 Secreted matrix metalloproteinase-14 is a predictor for antifibrotic effect of IC-2-engineered mesenchymal stem cell sheets on liver fibrosis in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regen Ther	6. 最初と最後の頁 292-301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2021.08.004.	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 板場則子、汐田剛史	4. 巻 36
2. 論文標題 幹細胞生物学と細胞シート工学の技術を融合した新しい形の肝再生療法	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨牀消化器内科	6. 最初と最後の頁 1700-1706
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 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 汐田剛史、板場則子	4. 巻 7
2. 論文標題 肝再生研究の動向と再生医療への展開	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 消化器・肝臓内科	6. 最初と最後の頁 522-529
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 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 汐田剛史、板場則子	4. 巻 37
2. 論文標題 肝硬変治療細胞シートの開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO INDUSTRY	6. 最初と最後の頁 62-69
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 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 汐田剛史、板場則子	4. 巻 35
2. 論文標題 間葉系幹細胞を用いた肝移植に代わる治療法開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 29-33
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 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 -

〔学会発表〕 計10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、福嶋健志、汐田剛史
2. 発表標題 肝疾患治療用細胞シートの肝線維化抑制効果に関わる有効性予測因子の検討
3. 学会等名 第29回肝細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板場則子、福嶋健志、汐田剛史
2. 発表標題 非代償性肝硬変の治療への肝疾患治療用細胞シートの開発
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板場則子、汐田剛史
2. 発表標題 肝線維化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22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 板場則子、汐田剛史
2. 発表標題 肝細胞化間葉系幹細胞シートによる肝硬変の再生医療
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 板場則子、坂部智彦、汐田剛史
2. 発表標題 間葉系幹細胞の分化誘導システムより見出した肝疾患創薬
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

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の肝再生促進効果
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 板場則子、汐田剛史
2. 発表標題 四塩化炭素誘発性慢性肝障害モデルおよびNASH モデルでのWnt / -catenin 経路阻害剤IC-2の肝線維化抑制効果の評価
3. 学会等名 第27回肝細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 板場則子、汐田剛史
2. 発表標題 Wnt/ -catenin経路阻害剤IC-2による肝線維化の抑制
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 汐田剛史、板場則子
2. 発表標題 POTENT AND LONG-ACTING STEM CELL-BASED THERAPY FOR LIVER CIRRHOSIS
3. 学会等名 ISSCR/JSRM 2021 Tokyo International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 板場則子、福嶋健志、汐田剛史
2. 発表標題 間葉系幹細胞とWnt/ -catenin経路阻害剤IC-2による肝疾患治療用細胞シートの有効性評価と将来への展望
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計6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、EP18851336.0	出願年 2020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、CN201880054224.7	出願年 2020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、US16/641,874	出願年 2020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2020-523067	出願年 2020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、EP19815672.1	出願年 2020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、US16/972,285	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	汐田 剛史 (SHIOTA Goshi) (70263457)	鳥取大学・医学部・特任教授 (15101)	
研究協力者	鈴木 響介 (SUZUKI Kyosuke)	鳥取大学・医学部・大学院生 (15101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	石賀 早織 (ISHIGA Saori)	鳥取大学・医学部・大学院生 (15101)	

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