

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08386

研究課題名（和文）抗線維化作用増強exosomeを用いた継続型低侵襲肝臓再生療法の開発

研究課題名（英文）Development of continuous non-invasive liver regeneration therapy using antifibrotic effect-enhanced extracellular vesicles.

研究代表者

松本 俊彦（Matsumoto, Toshihiko）

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70634723

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）：本研究では、間葉系幹細胞(MSC)由来細胞外小胞(EVs)にCollagenやElastinを標的とするmiR-5682を導入した抗線維化作用増強EVsの作製を目的とした。miR-5682はヒト肝星細胞(HSC)とマウスHSCのCollagen I, 発現を共通して低下させた。miR-5682導入MSCでは増殖抑制が起こったため、ヒト単球細胞株(THP-1)を代用した。miR-5682導入THP-1由来EVsはヒトHSCのCollagen I, 発現を低下させ、肝線維化モデルマウスの肝線維化面積を減少させた。以上よりmiR-5682高発現EVsは肝線維化治療に有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数の臨床研究で肝硬変に対するMSCの有効性が報告されたが、EVsの有効性は動物実験の報告に留まる。EVsの性能強化のため、siRNAやmicroRNA導入が試みられているが、EV中の核酸や蛋白の作用との競合が問題となる。しかし、miR-5682は治療標的そのものであるCollagenやElastinを直接標的とするため、EV中の核酸や蛋白と競合せずに作用を発揮できる。つまり、EVsをベースとした治療法の開発においてmiR-5682は最良の組み合わせであり、学術的にも独創性を持つ。また、作用機序の単純性・直接性から、肝硬変以外の線維化疾患の新規治療法として波及効果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to generate anti-fibrotic effect-enhanced EVs by introducing miR-5682, which targets collagen and elastin, into mesenchymal stem cell (MSC)-derived extracellular vesicles (EVs). MiR-5682 commonly down-regulated collagen I and III expression in human hepatic stellate cells (HSCs) and mouse HSCs. As proliferation inhibition occurred with miR-5682-transfected MSCs, a human monocyte cell line (THP-1) was substituted. MiR-5682-transfected THP-1-derived EVs decreased collagen I and III expression in human HSCs and reduced liver fibrotic area in a mouse model of liver fibrosis. These results suggest that miR-5682 highly expressing EVs may be useful in the treatment of liver fibrosis.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝硬変 間葉系幹細胞 肝星細胞 細胞外小胞 microRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は「自己骨髄間葉系幹細胞(MSC)を用いた肝臓再生療法」を開発してきた。臨床研究において非代償性肝硬変患者に対しMSCの末梢静脈投与を行ったが、肝機能改善効果は2~3ヶ月間に留まり、これは投与されたMSCが1~2週間で体内から消失することに起因すると考えられた。そこで、本治療を頻回投与可能な継続型の抗線維化療法へと発展させる必要があると考えた。

肝線維化は、肝星細胞による線維産生とマクロファージ(Mφ)による線維溶解のバランス破綻の結果である。そのため、肝星細胞の線維産生が十分に抑制された状況下で、Mφによる線維溶解作用を最大限に発揮させることが抗線維化治療となる。一方で、肝星細胞の活性化には複数のシグナルが相補的に関与するため、単一シグナルの制御で肝星細胞の活性化を抑制することは難しい。そこで、線維形成過程の最下流である線維性コラーゲンと弾性線維の産生を直接かつ網羅的に抑制できないかと考えた。microRNAは標的となるmRNAとのペアリングが不完全なため、多種のmRNAと結合可能であり、mRNAの分解促進や翻訳阻害に働く。このmicroRNAの特徴を肝星細胞の線維産生抑制に利用するため、Data base解析によりmiR-5682を見出した。miR-5682は、Collagen type1 alpha1 (Col1a1), type1 alpha2 (Col1a2), type3 alpha1 (Col3a1), type4 alpha1 (Col4a1), type5 alpha1 (Col5a1), type5 alpha2 (Col5a2), Elastin (Eln), Heat Shock Protein 47 (Serpinh1) を標的遺伝子に含み、線維と特異的分子シャペロンを網羅的に抑制する可能性がある。また、MSC由来細胞外小胞(EVs)は肝に効率的に集積するため、Drug delivery system (DDS)として有用であり、頻回投与も可能である。さらに、我々はMSC由来EVs中にMφの線維溶解酵素(MMP)発現を促進するmicroRNA; miR-6769b-5pが存在することを既に報告している。

以上より、MφのMMP発現促進因子を含むMSC由来EVsに、miR-5682の肝星細胞に対する線維産生抑制効果を追加した抗線維化作用増強EVsの開発を着想した。

2. 研究の目的

- (1) miR-5682 を導入したヒト及びマウス肝星細胞の網羅的遺伝子発現解析により、miR-5682 の肝星細胞に対する線維産生抑制効果を確認し、肝線維化モデルマウスを用いて *in vivo* で miR-5682 の抗線維化作用を検証することが妥当であるかを検証すること。
- (2) lentivirus vector を用いて miR-5682 導入 MSC の作製し、MSC 由来 EVs 中の miR-5682 発現を評価すること。
- (3) miR-5682 導入 MSC 由来 EVs を肝星細胞に添加し、肝星細胞に対する線維産生抑制効果を評価することで、MSC 由来 EVs の肝星細胞に対する DDS としての有用性を確認すること。
- (4) 肝線維化モデルマウスに miR-5682 導入 MSC 由来 EVs を投与することで、生体内において MSC 由来 EVs が DDS として作用し、miR-5682 の抗線維化作用を発現するかを評価し、新規抗線維化療法としての Proof of concept を取得すること。

3. 研究の方法

- (1) miR-5682 導入ヒト・マウス肝星細胞における網羅的遺伝子発現解析

ヒト肝星細胞(HHStc)またはマウス肝星細胞(mHSC)に lipofection 法により hsa-miR-5682

mimic を導入し、SAGE 法により網羅的遺伝子発現解析を行い、HHSteC と mHSC における hsa-miR-5682 導入後の遺伝子発現変化の共通点と相違点を検討した。さらに Western blotting により Collagen 及び Elastin 蛋白の発現を評価した。

(2) lentivirus vector を用いた miR-5682 導入 MSC の作製と EV 中の miR-5682 発現の評価

EVs に取り込まれる small RNA に特異的な RNA 配列、hsa-miR-5682、蛍光蛋白 GFP を組み込んだ lentivirus vector を作出し、ヒト MSC 細胞株に hsa-miR-5682 を導入した。続いて、miR-5682 導入 MSC と非導入 MSC の EVs を回収し、EV 中の miR-5682 発現を qPCR で評価した。

* MSC 細胞株での不具合により、ヒト単球細胞株(THP-1)を用いて同様の検討を行った。

(3) miR-5682 導入 THP-1 由来 EVs のヒト肝星細胞に対する線維産生抑制作用の評価

miR-5682 導入 THP-1 の培養上清から回収した EVs をヒト肝星細胞の培養液に添加し、肝星細胞に対する線維産生抑制作用を qPCR で評価した。

(4) 肝線維化モデルマウスでの miR-5682 導入 THP-1 由来 EVs の抗線維化効果の評価

Gubra Amylin NASH (GAN)食の給餌と四塩化炭素 (CCl₄)の腹腔内投与を併用した肝線維化モデルマウスを作出し、control 群、miR-5682 非導入 EVs 投与群、miR-5682 導入 EVs 投与群の 3 群に分け、EVs の複数回投与を行った。肝組織を用いて Sirius red 染色により肝線維化面積を測定し、線維化抑制効果を評価した。

4 . 研究成果

(1) miR-5682 導入 HHSteC ・ mHSC における網羅的遺伝子発現解析

SAGE 解析の結果、hsa-miR-5682 mimic 導入群と Negative control microRNA (NC-miR)導入群との比較では、hsa-miR-5682 mimic 導入群において HHSteC と mHSC で共通して Col1a1, Col3a1, Col4a1, Col5a2, Serpinh1 の発現が有意に低下した(表 1)。次に、Western blotting により Collagen 及び Elastin 蛋白の発現を評価し、hsa-miR-5682 mimic 導入群において HHSteC では Collagen I, Collagen III, Elastin、mHSC では Collagen I, Collagen III の有意な発現低下を確認した(図 1)。hsa-miR-5682 mimic を導入した HHSteC と mHSC に共通して Collagen の発現低下が確認され、肝線維化モデルマウスを用いて hsa-miR-5682 の抗線維化作用を評価することは可能であると判断した。

表 1 miR-5682 導入 HHSteC, mHSC における線維化関連遺伝子の発現 (SAGE 解析)

Gene	Symbol	HHSteC		mHSC	
		miR5682/NC-miR	p-value	miR5682/NC-miR	p-value
Collagen type III alpha 1	COL3A1	0.35	<0.01	0.24	<0.01
Collagen type I alpha 1	COL1A1	0.44	<0.01	0.41	<0.01
Collagen type V alpha 2	COL5A2	0.49	<0.01	0.52	<0.01
Collagen type IV alpha 1	COL4A1	0.53	0.01	0.41	<0.01
Serpin family H member 1	SERPINH1	0.62	<0.00	0.56	<0.01

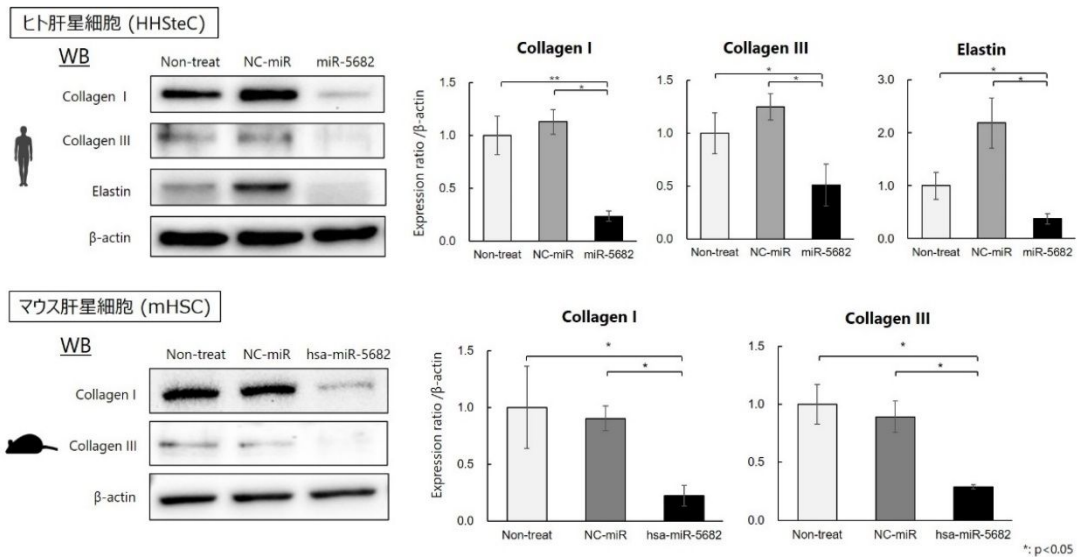


図 1 miR-5682 導入 HHStEC, mHSC における Collagen 及び Elastin 蛋白発現

(2) lentivirus vector を用いた miR-5682 導入 MSC の作製と EV 中の miR-5682 発現の評価

EV 中の small RNA の特異配列と hsa-miR-5682 を組み込んだ lentivirus vector を用いてヒト MSC 細胞株に遺伝子導入を行い、EV 中に miR-5682 を高発現する MSC を作成した。しかし、MSC 細胞株では miR-5682 または lentivirus による増殖抑制が強く、以降の実験に不都合であると判断し、同様の手法を用いて miR-5682 導入ヒト単球細胞株(THP-1)を作製した。THP-1 は HHStEC, MSC, 肝癌細胞株 HepG2 と比較し、細胞内に hsa-miR-5682 を高発現しており、hsa-miR-5682 導入の影響を受けにくいことが予想されたため、MSC に次ぐ細胞株として用いた。miR-5682 導入 THP-1 では増殖抑制はみられず、培養上清から多量の EVs の回収が可能であり、非導入 THP-1 と比較し、EV 内に約 207 倍の hsa-miR-5682 発現を確認した(図 2)。

(3) miR-5682 導入 THP-1 由来 EVs の HHStEC に対する線維産生抑制作用の評価

miR-5682 導入 THP-1 の培養上清より回収した EVs を HHStEC の培地に添加し、48 時間後に HHStEC における Collagen, Elastin, Fibronectin (FN)の遺伝子発現を評価した。miR-5682 導入 THP-1 由来 EVs を添加した HHStEC では、非添加 HHStEC と比較して、細胞内に約 28 倍の hsa-miR-5682 を発現し、hsa-miR-5682 の標的遺伝子である Col1a1, Col3a1, ELN 発現は用量依存性に低下し、標的遺伝子ではない FN の発現に変化はなかった (図 2)。

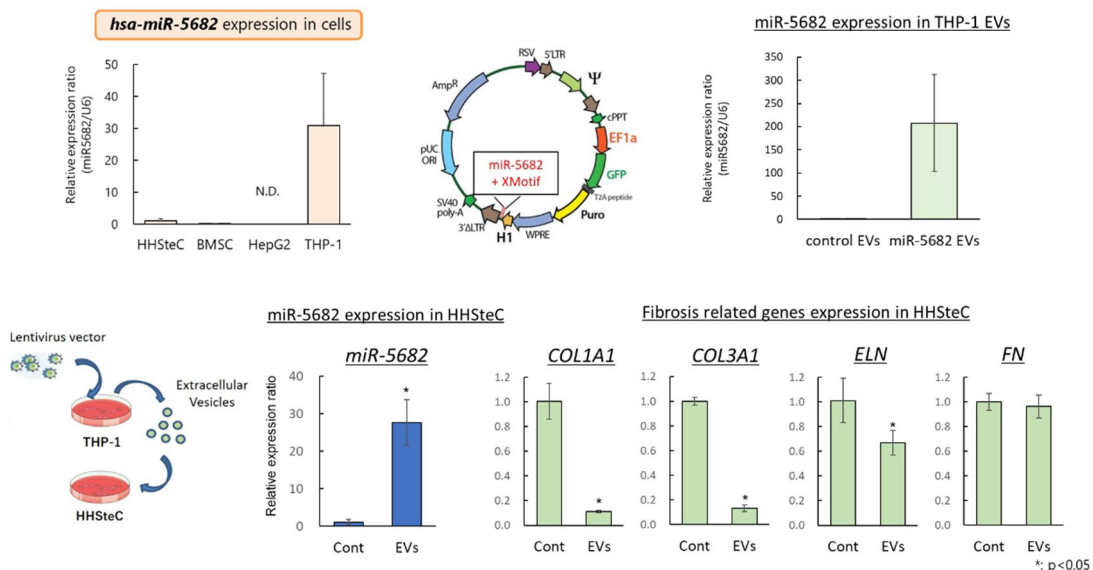


図 2 THP-1, THP-1 EV, HHStEC における miR-5682 発現

(4) 肝線維化モデルマウスでの miR-5682 導入 THP-1 由来 EVs の抗線維化効果の評価

GAN 食を 4 週給餌した後に CCl₄ 腹腔内投与の併用を開始し、併用 8 週後に control 群、miR-5682 非導入 EVs 投与群、miR-5682 導入 EVs 投与群の 3 群に分けた。以降、EVs 投与群には週 1 回計 8 回の EVs 投与を行い、モデル作成開始から 20 週目に肝線維化モデルマウスより肝を採取した。Sirius red 染色により肝線維化面積を評価すると control 群、miR-5682 非導入 EVs 投与群と比較し、miR-5682 導入 EVs 投与群で線維化面積の減少を認めた (図 3)。

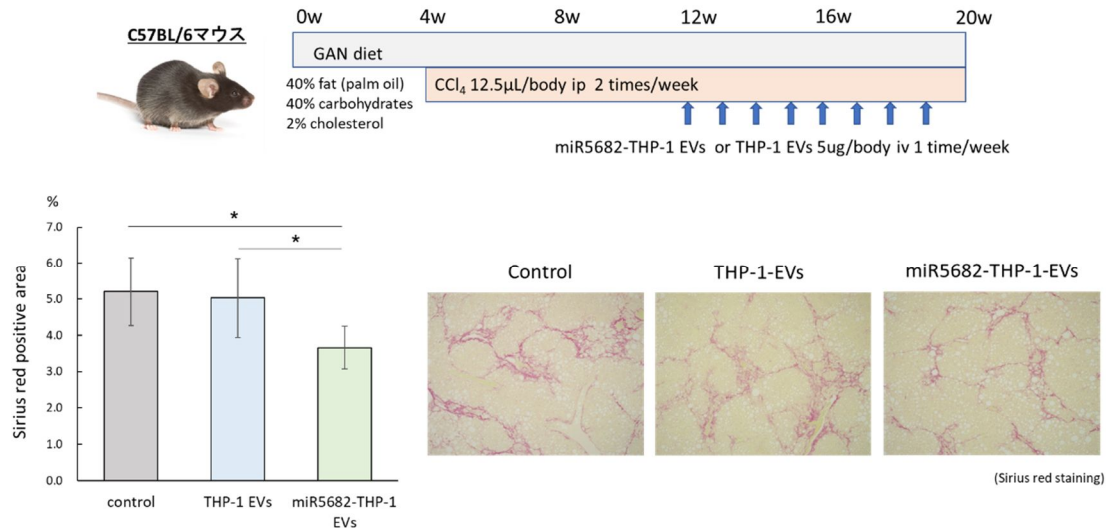


図 3 肝線維化モデルマウスにおける miR-5682 導入 THP-1 由来 EVs の肝線維化抑制効果

考察と今後の展望

EVs 産生細胞を MSC 細胞株から THP-1 に変更したことで、EVs の回収量が増加し、*in vitro* 及び *in vivo* での肝線維化抑制効果も確認できたが、一方で、MSC 由来 EVs が持つ Mφ に対する MMP 発現促進作用が失われた可能性がある。そこで、今後は MSC または MSC 由来 EVs と miR-5682 導入 THP-1 由来 EVs の併用について検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本 俊彦、石川 剛、高見 太郎
2. 発表標題 医師主導治験「自己完結型肝硬変再生療法」と抗線維化エクソソームを用いた補助療法の開発
3. 学会等名 第109回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本 俊彦、石川 剛、高見 太郎
2. 発表標題 自己完結型肝硬変再生療法と 抗線維化エクソソーム補助療法の開発
3. 学会等名 第59回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原 和牙, 松本 俊彦, 藤澤 浩一, 山本 直樹, 高見 太郎
2. 発表標題 培養自己骨髄間葉系幹細胞投与療法に対するexosomeを用いた補助療法の開発
3. 学会等名 第21回再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原 和牙, 松本 俊彦, 山本 直樹, 高見 太郎
2. 発表標題 培養自己骨髄間葉系幹細胞投与療法に対するexosomeを用いた補助療法の開発
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 松本 俊彦、高見 太郎、坂井田 功
2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞の細胞外小胞を介した肝臓再生機序の解明と効果増強に向けた検討
3. 学会等名 第107回 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本 俊彦、高見 太郎、坂井田 功
2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞肝動脈投与による「自己完結型肝硬変再生療法」の開発と併用療法に向けた作用機序の解明
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本 俊彦、山崎 隆弘、高見 太郎
2. 発表標題 肝非実質細胞の細胞間相互作用に関連する抗線維化核酸治療薬の開発に向けた検討
3. 学会等名 第44回日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原 和冴、松本 俊彦、藤澤 浩一、山本 直樹、高見 太郎
2. 発表標題 培養自己骨髄間葉系幹細胞投与療法に対するmicroRNAを用いた補助療法の開発
3. 学会等名 第35回肝類洞壁細胞研究会
4. 発表年 2021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	藤澤 浩一 (Fujisawa Koichi) (00448284)	産業医科大学・産業生態科学研究所・教授 (37116)	
研究分担者	高見 太郎 (Takami Taro) (60511251)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	
研究分担者	山本 直樹 (Yamamoto Naoki) (90448283)	山口大学・教育・学生支援機構・教授 (15501)	

	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	原 和冴 (Hara Kazusa)		

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