

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20863

研究課題名（和文）メタボリックシンドロームに対する乳歯歯髄幹細胞培養上清を用いた新規治療の開発

研究課題名（英文）Development of a Novel Treatment for Metabolic Syndrome Using Conditioned medium from stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth (SHED-CM)

研究代表者

武藤 久哲 (Muto, Hisanori)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80909127

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：乳歯歯髄幹細胞(SHED)の無血清培養上清(SHED-CM)には多くの幹細胞由来因子が含まれており、さまざまな疾患モデルに対する有用性が報告されている。今回の検討で、SHED-CMがin vitroにおいてHepG2のミトコンドリア機能を活性化させること、NASHマウスモデルの肝臓の大滴性脂肪を減少させることが明らかになった。以上よりSHED-CMは、酸化を促進することで脂肪分解を促進し、NASHの改善に寄与する可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASH/NAFLDは近年世界的に問題になるとともに、比較的肥満が少ないとされる本邦においても、今後もますますNAFLDの有病率が上昇していくことが予測されている。しかしながら現在のところ有効な薬物治療は限られている。今回の検討により、SHED-CMにこれまで報告されてきた抗炎症作用に加えて、ミトコンドリア機能の活性化を介する作用が確認された。SHED-CMは複雑な病態を有するNASHにおいて、その多面的な作用から有望な治療戦略になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Conditioned medium from stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth (SHED-CM) contains many stem cell-derived factors, and its usefulness in various disease models has been reported. In this study, we found that SHED-CM activated HepG2 mitochondrial function in vitro and reduced steatosis in the liver of a NASH mouse model. These results suggest that SHED-CM may contribute to the amelioration of NASH by promoting lipolysis through enhancing -oxidation.

研究分野：消化器内科

キーワード：NASH NAFLD 乳歯歯髄幹細胞 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの肝表現型である非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)/非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は肝硬変・肝癌に進展するだけでなく、心血管イベントによる死亡率の増加をもたらす世界的な社会問題となっている。過剰な脂肪蓄積によって生じる全身のインスリン抵抗性は各種臓器由来の液性因子を介して、全身の臓器障害の進展に関わっている。肝臓は全身の脂質代謝や糖代謝を調節することで人体の恒常性を維持する中心的機能を担っているため、肝臓における慢性炎症と全身のインスリン抵抗性とは相互に強く関連している。研究代表者らはこれまでにヒト乳歯髄幹細胞培養上清(SHED-CM)が NASH マウスモデルにおいて肝臓における抗炎症作用や腸管バリア保護効果を含む多面的な作用を介して、肝線維化進展を抑制するとともに全身の代謝を改善させることを見出してきた。本研究は SHED-CM が肝臓を中心とした臓器相関を介して全身のインスリン抵抗性を改善する治療薬となり得るかどうかの基礎的検討を行った。

2. 研究の目的

ヒト乳歯髄幹細胞(SHED)は優れた増殖能と多分化能を有する幹細胞である。その無血清培養上清(SHED-CM)には抗炎症や再生関連蛋白を含む70種類を超える多数の液性因子が含まれている。研究代表者らは Western Diet 食及び四塩化炭素を用いた NASH マウスモデルに対して、SHED-CM の静脈投与を行うことで血中遊離脂肪酸の低下と肝炎抑制効果をもたらすことを報告するとともに、腸管バリア保護効果を示すことも見出した。これらの結果は SHED-CM が全身のインスリン抵抗性に対して膵細胞保護効果、肝炎抑制効果、腸管バリア保護効果といった多方面から病態を改善させる可能性があることを示唆している。さらに、NASH の進展やインスリン抵抗性には肝臓における脂肪酸のベータ酸化(ミトコンドリア呼吸)の変化が関与していることが報告されている。SHED-CM による再生促進作用や抗炎症効果についてはこれまでも検討されてきたが、肝臓におけるミトコンドリア呼吸をはじめとした代謝に対する影響については明らかではない。本研究では SHED-CM の肝臓における脂質代謝、ミトコンドリア機能に対する作用を明らかにすることで、さらなる研究推進に繋がる飛躍を目指した。

3. 研究の方法

(1) NASH マウスモデルに対する SHED-CM 投与の肝脂肪に対する効果と遺伝子発現解析
12週間 Western Diet と高濃度糖水を摂取させ、少量の CCL4 を週一回腹腔内投与して作成した NASH マウスモデルに対して、SHED-CM またはコントロールとして DMEM を投与し、肝組織の組織学的検討及び遺伝子発現解析を行った。

(2) *in vitro* における SHED-CM の肝臓代謝への影響の検討
肝臓の代替モデルとして一般的に使用されているヒト肝臓由来細胞株である HepG2 細胞を用いて SHED-CM の存在下における肝臓のミトコンドリア機能を、Seahorse XF24e Flux analyzer を用いて検討した。

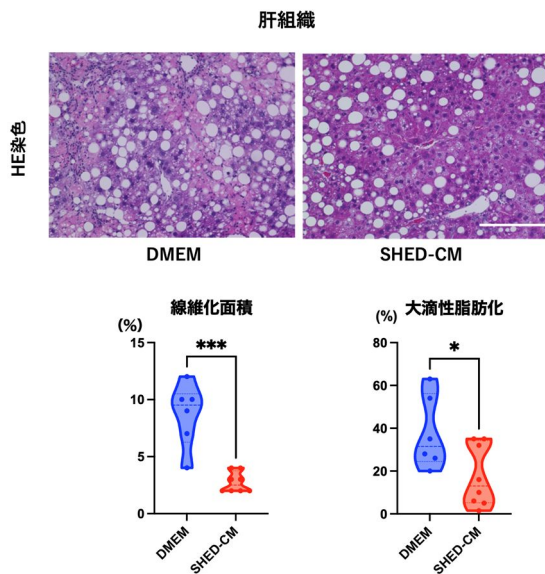
4. 研究成果

NASH マウスモデルにおいて、SHED-CM を投与することで肝臓組織の線維化面積と大滴性脂肪沈着が有意に改善した(図1)。肝臓より、RNA-seq により網羅的な遺伝子解析を行うと、653 の遺伝子が SHED-CM によって有意に発現上昇を認めた。脂肪酸の酸化に関連する多くの遺伝子において、SHED-CM 群では発現上昇を認め、階層クラスタリングを用いると、SHED-CM 群と DMEM 群で2分された。ミトコンドリア内膜に関連する多くの遺伝子でも SHED-CM 群で発現上昇を認めた。脂質の酸化に関与する PPAR や CPT1 に関して、qPCR で検討を行うと、いずれも SHED-CM で発現上昇を認めた(図2)。すなわち、NASH マウスモデルにおいて、SHED-CM 投与は肝臓の脂肪沈着を改善するとともに、酸化をはじめとした脂質代謝関連の遺伝子発現およびミトコンドリア内膜を構成する遺伝子発現を上昇させた。

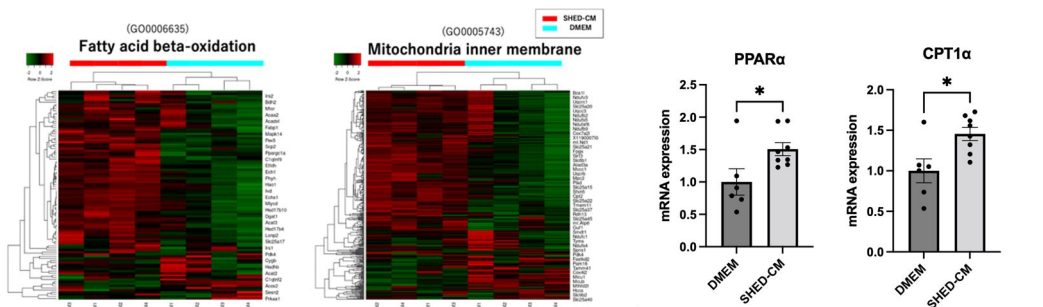
SHED-CM あるいは DMEM 存在下で培養した HepG2 のミトコンドリア機能を seahorse XF24e Flux analyzer を用いてミトストレステストのプロトコルで評価した。SHED-CM 存在下で培養した HepG2 において基礎呼吸、最大呼吸に加えて ATP 産生が増加し、基礎呼吸に対する ATP 産生とのカップリング効率も SHED-CM で有意に上昇した(図3)。すなわち SHED-CM は HepG2 の電子伝達

系における ATP 産生を増加させることが示された。脂肪酸は、ミトコンドリア内の 酸化によって肝臓で異化され、結果として還元生成物 (NADH および FADH₂) がミトコンドリアの電子伝達系に供給される。NASH において、酸化によって生じた還元生成物を電子伝達系で処理しきれずに生じる活性酸素種 (ROS) が病態の進展に関わっていることが報告されており、ミトコンドリア機能を強化することが、NASH 治療のアプローチの一つとして注目されている。SHED-CM は、酸化を促進するとともに電子伝達系での ATP 産生を増加させることで、ROS を増加させることなく脂肪分解を促進し、NASH の改善に寄与する可能性がある (図 4)。SHED-CM に含まれる有効因子の同定や詳細なメカニズムについてはさらなる検討が必要である。SHED-CM は、NASH における複雑な病態に対して多面的に作用することで有望な治療戦略となり得る。

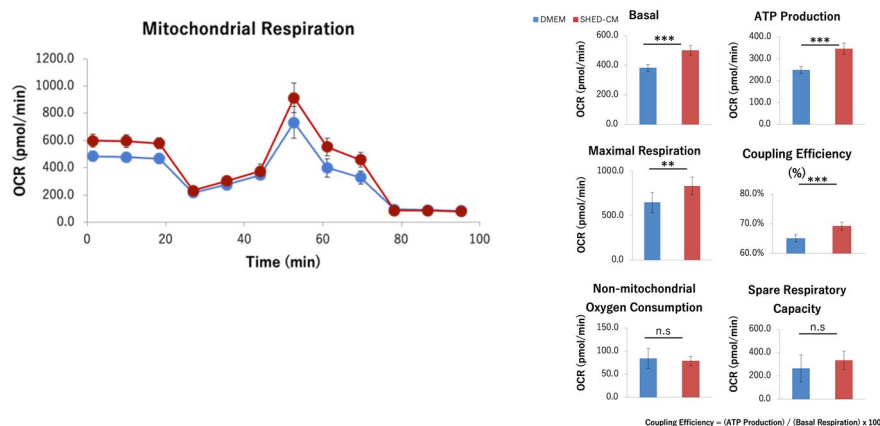
(図 1)



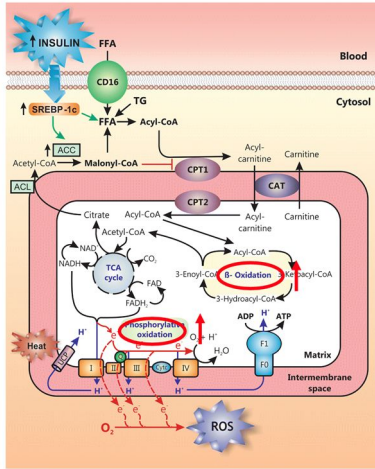
(図 2)



(図 3)



(4)



Cellular and Molecular Life Sciences 2018 76:1, (2018), 99-128, 76(1) (改変)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Muto Hisanori, Honda Takashi, Tanaka Taku, Yokoyama Shinya, Yamamoto Kenta, Ito Takanori, Imai Norihiro, Ishizu Yoji, Maeda Keiko, Ishikawa Tetsuya, Adachi Shungo, Sato Chikara, Tsuji Noriko M., Ishigami Masatoshi, Fujishiro Mitsuhiro, Kawashima Hiroki	4. 巻 15
2. 論文標題 Proteomic Analysis Reveals Changes in Tight Junctions in the Small Intestinal Epithelium of Mice Fed a High-Fat Diet	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1473 ~ 1473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu15061473	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4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 AASLD2021 (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 日本肝臓学会総会
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 乳歯歯髄幹細胞培養上清を用いたNASH/NAFLD治療の可能性
3. 学会等名 第44回日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武藤 久哲、本多 隆、水野 史崇、松田 宣賢、犬飼 庸介、山本 崇文、水野 和幸、横山 晋也、田中 卓、山本 健太、伊藤 隆徳、今井 則博、石津 洋二、石川 哲也、石上 雅敏、川嶋 啓揮
2. 発表標題 Deep proteomicsを用いた高脂肪食摂取マウスにおける腸管透過性亢進メカニズムの検討
3. 学会等名 第109回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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