

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590966

研究課題名(和文)免疫学的劇症肝炎モデルマウスにおける新たな細胞治療の基礎的検討

研究課題名(英文)Basic investigation for new cytotherapy in animal model for immune mediated fulminant hepatitis.

研究代表者

石上 雅敏(Ishigami, Masatoshi)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90378042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ConA投与における急性肝不全モデルマウスにおけるLASC(低血清培養脂肪由来幹細胞)群ではcontrol群に比較して投与8時間でのALT値の上昇を抑えた。肝内において、LASC投与群でIL-6, IL-10, IFN- γ のmRNA発現低下とTGF- β の発現上昇、またCD3, CD4, CD8, CD11b, CD11cの発現低下を認めた。ConAで刺激した脾細胞をLASCと共培養することにより、CD3の発現低下を認めたが、NK1.1, CD19の発現は変わらなかった。以上よりLASCは免疫調整作用による急性肝不全モデルにおける炎症抑制作用、特にT細胞系の調整作用があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of LASC (low serum cultured adipose cell derived stem cells) in animal model of liver injury. The results were as below; (1) In ConA-induced acute liver injury mice, LASC showed significant suppression of serum ALT elevation compared with control mice. (2) Intrahepatic mRNA expression of IL-6, IL-10, IFN- γ were downregulated and TGF- β was upregulated in LASC administrated mice compared with control mice. CD3, CD4, CD8, CD11b and CD11c mRNA expression were also downregulated. (3) In vitro culture with mouse splenocyte, coculture with LASC downregulate the expression of CD3 in splenocyte, however, expression of NK1.1 and CD19 did not change. These data suggested that LASC have immunomodulatory effect to suppress liver injury in the animal model for acute liver injury, especially through the immunomodulatory effect for T cells.

研究分野：肝臓病学

キーワード：脂肪由来幹細胞 急性肝不全モデル 炎症制御 肝再生

1. 研究開始当初の背景

急性肝不全治療は近年の内科的治療法、また肝移植医療の進歩により長足の進歩を遂げているものの、現在の内科的治療における急性型劇症肝炎で 50%、亜急性型で 20-30%の救命率という状況を鑑みると、特に肝移植を受けることができない多くの患者を救うことができず実臨床で数多くの歯痒い経験をしてきた。

この一番大きな要因としては、肝再生に対し根本的に介入する実臨床で使用できる治療法がないことにあると考えられる。肝再生については古くからその現象としてはよく知られているものの、そのメカニズムの研究については最近になりようやく盛んになってきている。

その一つのアプローチ方法としては ES 細胞や iPS 細胞等の多能性幹細胞による介入、または臓器作成があり、この分野も大きく進歩してきている。しかし、これらの幹細胞については手技の煩雑さ、また特に ES 細胞を用いる際の倫理的側面など、まだまだ解決すべきハードルは多い。

2. 研究の目的

実際にヒトの臨床応用を考える上でより簡便に実現可能なツールとして、我々は脂肪細胞由来の幹細胞に着目した。我々は通常より低い、血清濃度 2%として培養を行った低濃度血清培養脂肪由来幹細胞(LASC)を樹立、この細胞が従来の血清濃度で培養するよりも肝再生因子である HGF の産生が多いことに着目、肝再生に介入可能な方法ではないかと考えた。そこでその基礎的検討として、本研究では急性肝不全動物モデルである Concanavalin A(ConA)誘発肝障害モデルマウスを用いて検討を行った。

3. 研究の方法

本研究では以下のような検討を行った。

(1)LASC の特性確認

採取、培養された LASC の特性を確認するため、以下の検討を行った。

<1> LASC 表面マーカーの検討

Mesenchymal stem cell マーカーである、CD105, Ly6A-E (Sca-1), CD90 (Thy-1), CD117, また hematopoietic stem cell のマーカーである CD45、幹細胞の接着因子であり、の Mesenchymal stem cell マーカーともされる CD29, CD44 を Flow cytometry にて検討を行った。

<2> LASC が産生する液性因子、およびサイトカイン mRNA の検討

本モデルにおける炎症に関わる液性因子として VEGF, HGF, PGE2 を ELISA にて、また、IL-1 α , IL-6, TNF- α , IFN- (Proinflammatory cytokine) CXCL12 (Chemokine), IDO1, iNOS (炎症メディエーター), IL-10, TGF- β (抑制性サイトカイン) の肝内発現を mRNA の real-time PCR を用いて検討を行った。

(2) 急性肝不全モデルマウスにおける LASC の肝障害抑制効果

10週齢雄 C57BL/6 マウスに 15mg/kg の Con A を投与し、急性肝障害モデルを作成。ConA 投与 30 分後に PBS にて調整した 1×10^6 の LASC 投与群と PBS のみを投与した control 群を作成、以下の検討を行った。

<1> 肝障害の検討

ConA 投与後 8 時間(LASC 投与後 7.5 時間)、および 24 時間(LASC 投与

後 23.5 時間)における肝障害の程度を血清 ALT 値を測定することで両群の比較検討を行った。

<2>in vivo における肝内浸潤細胞、サイトカイン、ケモカインの発現

ConA 投与後 24 時間でマウスを屠殺、肝内の IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , CXCL12, iNOS, IDO1, CD3 γ , CD4, CD8, CD11b, CD11c mRNA 発現を両群間で比較検討した。

(3) LASC の免疫調整効果 - 脾細胞との混合培養による検討

C57BL/6 マウスから採取した脾細胞を PHA, ConA, LPS で刺激、LASC との濃度比を 10:1,20:1,40:1,80:1,および LASC 投与なし群とし、その増殖抑制効果を培養 48 時間後の BrdU 取り込みの測定にて、また、培養 72 時間後の脾細胞由来単核球(LMC)を回収し、その CD3, CD19, NK1.1 の発現について検討を行った。

(4) 統計学的検討

統計学的有意性については Dunnet's test、および one way ANOVA test にて評価した。 $P < 0.05$ を統計学的有意差と判定した。

4. 研究成果

(1) LASC の特性

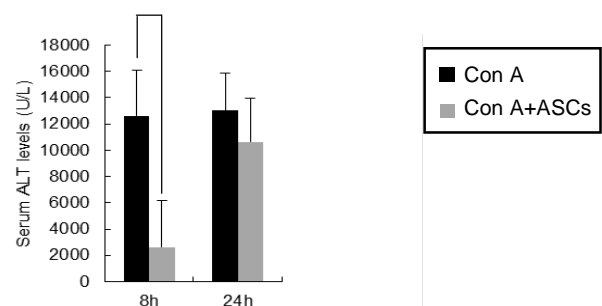
表面マーカーでは、CD29, CD44, CD90, CD105 および Sca-1 の発現が見られ、CD45, CD73, CD117 の発現は認められなかった。また培養上清中には VEGF, HGF, PGE2 の産生が認められ、また、IL-1 α , TNF- α , CXCL12, IDO1, iNOS の炎症性サイトカイン、ケモカインの発

現のみならず、注目すべき点として IL-10, TGF- β などの抑制性サイトカインの発現が認められた。これらにより、LASC には免疫調整作用の特性があることが示唆された。

(2) 急性肝不全モデルマウスによる肝障害への LASC の効果

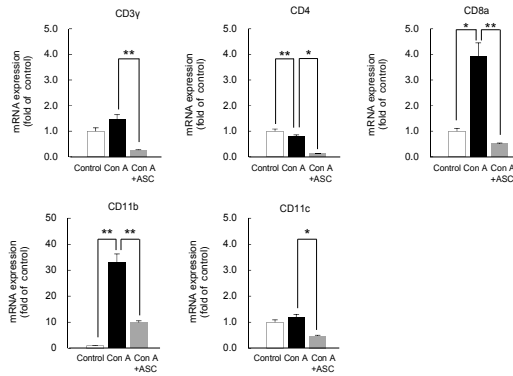
ConA 投与における急性肝不全モデルマウスにおいて、LASC 投与により投与 8 時間後の肝障害が control 群と比較して有意に低下した(LASC 群: 2633 ± 578 U/L vs control 群: 12617 ± 3431 U/L, $P < 0.05$, 図 1)。この差は投与 24 時間では少なくなったが、やや LASC 群の方が低かった(LASC 投与群: 10617 ± 4684 U/L vs control 群: 13017 ± 3563 U/L, $P = \text{NS}$, 図 1)。

(図 1) ConA 投与急性肝不全モデルにおける LASC 投与群と非投与群での炎症の程度の比較(血清 ALT 値)



肝内の mRNA 発現を見ると、炎症性サイトカインである IL-6, IFN- γ , TNF- α の発現低下、および抑制性サイトカインである TGF- β の上昇が認められた。浸潤細胞の表面マーカーを検討すると、CD3 γ , CD4, CD8 α , CD11b, CD11c の発現が LASC 投与群で control 群と比較して有意に低下していた(図 2)。これらのデータから、LASC は特に T 細胞系を中心とした免疫応答を調節することで急性肝不全モデルでの炎症を軽減する可能性が示唆された。

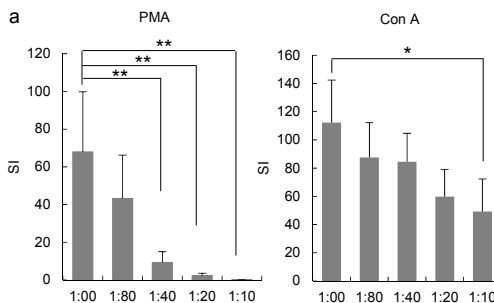
(図 2) ConA 投与急性肝不全モデルマウスにおける LASC 投与群と非投与群における肝内浸潤細胞の比較



(3) in vitro における単核球への LASC の直接効果の検証

実際に免疫担当細胞への LASC の直接効果を検証するため、C57BL/6 マウス脾細胞から単核球成分(LMC)を採取、mitogen で刺激後、LASC の濃度を変えることで検討を行った。LASC は PHA, ConA で刺激した脾細胞由来 LMC の増殖を抑えることが BrdU 取り込み測定にて明らかになった(図 3)。この増殖抑制効果は LASC の培養上清を加えるだけでは control 群と比較して差を認めなかった。

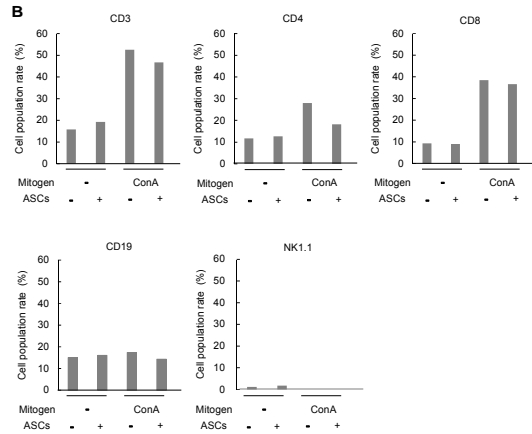
(図 3) LASC の混合培養による mitogen 刺激脾細胞の増殖抑制効果



混合培養 72 時間後の LMC 成分を採取し、表面マーカーの検討を行うと、CD3 発現が LASC 投与群で低下していたが、CD19, NK1.1 の発現は変化が認められ

なかった(図 4)。

(図 4) mitogen 刺激脾細胞の LASC 投与による表現マーカーの変化



以上の結果から LASC はその放出する液性因子ではなく、直接の細胞 - 細胞間の作用により、主に T 細胞系の免疫応答を調節することで炎症抑制効果を示すことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

吉住寧真、加納由貴、加納綾乃、中川伸吾、山田達也、湯川博、石川哲也 マウス急性肝障害モデルにおける脂肪組織由来幹細胞(ASC)の炎症制御効果について 第 13 回日本再生医療学会総会 京都 2014.3.4.-3.6. 国立京都国際会館(京都府京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石上 雅敏 (ISHIGAMI Masatoshi)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90378042

(2) 研究分担者

後藤 秀実 (GOTO Hidemi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10215501

石川 哲也 (ISHIKAWA Tetsuya)
名古屋大学・医学部・教授
研究者番号：10288508

丸山 彰一 (MARUYAMA Shoichi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：10362253