

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08996

研究課題名(和文)急性肝不全モデル動物における歯髄由来幹細胞の効果-肝臓における炎症と再生の相関

研究課題名(英文)Effect of Stem Cells derived from Human Exfoliated Deciduous Teeth in animal model of acute liver failure-correlation between inflammation and regeneration in liver

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：急性肝不全はその治癒には自力での肝再生が必要であるが、現在まだ臨床で使用可能な肝再生を誘導する薬剤が存在しない。

そこで我々は、乳歯歯髄由来幹細胞の培養上清(SHED-CM)の効果急性肝不全モデルラットにおいて検討、他の幹細胞と比較して高い効果を示した。また、歯髄幹細胞培養上清内に多く含まれる液性因子として、単球-マクロファージの遊走因子であるMCP-1とマクロファージを炎症惹起型から炎症抑制型への変換を行う因子である分泌型Siglec-9を見出し、この2つの液性因子のみでも炎症抑制、肝再生促進効果があることを見出した。これらの2因子は新たな急性肝不全治療薬として期待できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In acute liver failure, liver regeneration is essential to be cured, however, there are no effective drugs to use for the intervention to the liver regeneration in clinical practice.

We investigated the culture medium of stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth (SHED-CM) in animal model of acute liver failure, and showed higher efficacy compared with other stem cells. And as the abundant humoral factors in SHED-CM, we found MCP-1, which is well-known chemoattractant of monocytes-macrophages, and secreted domain of Siglec-9, which is the key factors for transition of pro- to antiinflammatory phase of macrophages, and we also found high efficacy of these two factors for improving survival of animals, suppression of the inflammation, and promotion of the hepatocyte regeneration.

These two factors might become hopeful tools for the newly development of the drugs for acute liver failure.

研究分野：肝臓病学

キーワード：急性肝不全 歯髄由来幹細胞 MCP-1 sSiglec-9 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

劇症肝炎を始めとした急性肝不全においては、近年の全身管理方法の大きな進歩により、治療効果が大きく改善されてきた。ただその反面、炎症による大量の肝細胞壊死から患者の回復に導くためには肝臓の自力での再生が不可欠である。現在の所、臨床で使用できる肝再生を促す有効な薬剤は存在せず、最終的には「自力での回復」にまかせるしかない部分もあり、回復が得られない多くの患者を救命できなかったという歯痒い経験をしてきた。

一方で肝再生の研究については、特に多能性幹細胞である ES 細胞、iPS 細胞の確立などにより近年盛んに研究されている。肝臓を構成する細胞要素の再生に寄与する細胞としては左図のようなものが可能性として考えられている。(1)成熟肝細胞の分裂、(2)骨髄由来幹細胞の肝細胞への transdifferentiation、(3)Oval cell(肝前駆細胞)の肝細胞、胆管細胞への分化、(4)多能性幹細胞の肝細胞、胆管細胞、類洞内皮細胞への分化、(5)胎児由来肝細胞の肝細胞、胆管細胞への分化などがそれに当たるが(Karp SJ. *Am J Transplant*, 2009)、これらの機序がこれらの機序が肝障害時の再生変化にどのように、またどの程度関与しているかは生体内では十分わかっていない。

炎症形成、および終息の過程において動く自然免疫系における一つの重要なメカニズムとして、マクロファージの M1/M2/Regulatory サブセットのバランスが挙げられる。

炎症初期においては抗原提示細胞であるマクロファージ、樹状細胞から産生された IL-12 の働きにより T 細胞、NK 細胞の活性化による IFN- γ の産生による M1 への偏向により炎症を形成する。

炎症により損傷された細胞は、IL-25、IL-33、TSLP などの Alarmin と呼ばれる炎症抑制因子

が放出され、M2/Regulatory マクロファージへの偏向が始まり、M2 による炎症終息、線維形成、その後の Regulatory Macrophage による線維形成抑制へとつながっていく(Murray PJ, Wynn TA. *Nat Rev Immunol* 2011)。

我々はヒト乳歯歯髄より新たな幹細胞 (SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth) を新たに樹立した。この幹細胞は、培養上清の投与を行うことで細胞投与をしなくとも著明な効果を示すことを(1)脊髄損傷(Sakai K, et al. *J Clin Invest*, 2012, Yamamoto A, et al. *Neurosci Res*, 2014)、骨形成(Ando Y, et al. *Bone*, 2014)モデル動物にてすでに報告してきた。

上記効果の主たるメカニズムとして、肝内の Macrophage である Kupffer 細胞の M1 優位から M2/Regulatory 優位への Phenotype 変化が示されている。

炎症の強力な抑制は臓器再生には重要なステップであると考えられる。本研究では新たに確立された歯髄幹細胞培養上清 (SHED-CM) を肝臓における最も強力な炎症環境である急性肝不全モデルラットで検討してみることを計画した。

2. 研究の目的

上記のような背景から、未だ明らかでない詳細な肝再生メカニズムの機序の検討と、また臨床で使用可能な薬剤のない急性肝不全における新たな治療法の可能性を見出すため、本研究では、以下の3点につき検討することを目的とした。

- (1) 急性肝不全モデルラットにおける SHED-CM の効果、およびそのメカニズムの検討
- (2) SHED-CM 内に多く含まれる液性因子の同定
- (3) 同定された液性因子が急性肝不全モデルラットにおいて炎症-再生関連にどのように関わるかのメカニズムの検討

3. 研究の方法

(1) 急性肝不全モデルラットにおける

SHED-CM の効果、およびそのメカニズムの検討

急性肝不全モデルとして D-galactosamine (D-gal) をラットに対し腹腔内投与を行い、D-gal 投与後 24 時間の時点で、SHED-CM、骨髄由来幹細胞培養上清 (BMSC-CM)、線維芽細胞上清 (Fibro-CM)、および control として DMEM のみを投与した群を設定、D-gal 投与後 7 日までの生存率、投与後投与後 48 時間における血清 ALT 値、およびまだ全てのラットが生存していると考えられる D-gal 投与後 36 時間 (上清投与後 12 時間) における各種炎症、再生に関する遺伝子発現 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、iNOS、TGF- β 、CD206、Arginase1、IL-10、VEGF、SCF、IGF-1、TWEAK、HGF、FGF7、Wnt3a)、免疫組織学的検討としては TUNEL 陽性細胞/DAPI 陽性細胞比の検討と、肝組織中のマクロファージ機能解析として、CD11b、iNOS、IL-10 の染色と炎症抑制性 (M2) マクロファージマーカーである CD206 の染色を行った。

(2) SHED-CM 内に多く含まれる液性因子の同定

SHED-CM は後述する通り、他の幹細胞より強い効果を示すことが明らかとなったが、それらの効果に寄与する液性因子を抽出するために Cytokine Antibody Array (RayBio Human Cytokine Antibody Array G Series 4000) を用いて検討、274 種類のヒトにおけるサイトカイン発現について、SHED-CM、骨髄由来幹細胞上清、DMEM で比較した。

(3) 同定された液性因子が急性肝不全モデルラットにおいて炎症-再生相関にどのように関わるかのメカニズムの検討

上記 (2) の検討からマクロファージ遊走因子である MCP-1 とマクロファージを炎症惹起型から炎症抑制型に形質転換する液性因子と

考えられる分泌型 Siglec-9 (sSiglec-9) を抽出した。

この 2 液性因子の急性肝不全モデルにおける効果を検証するため、D-gal 誘発急性肝不全モデルラットに対し、まず SHED-CM、および上記 2 液性因子を SHED-CM から抗体で除去した dSHED-CM、DMEM 間投与群で D-gal 投与後 7 日までの生存率、投与後投与後 48 時間における血清 ALT 値 D-gal 投与後 D-gal 投与後 36 時間 (上清投与後 12 時間) における各種炎症に関する遺伝子発現 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、iNOS、TGF- β 、CD206、Arginase1、IL-10) を比較検討した。次いで、これら上記 2 液性因子の協調的効果を検証するため、MCP-1/sSiglec-9 投与群を MCP-1、sSiglec-9 単独投与群 (control として PBS 投与群) と D-gal 投与 7 日目までの生存率の比較検討を行った。また MCP-1/sSiglec-9 投与群では PBS 投与群と血清 ALT 値の推移、また免疫組織学的検討として壊死炎症の程度の検討として TUNEL 陽性細胞と DAPI 陽性細胞の共染色と、肝細胞再生の程度の検討として、Ki-67 とアルブミンの共染色を行った。

また、これらの作用における M1 \rightarrow M2 への形質転換の役割を示すため、MCP-1/sSiglec9 投与下で M2 マクロファージの阻害剤である m-Clodrosome と control である m-Encapsome の投与を行い、D-gal 投与後 36 時間における血清 ALT 値、肝組織、および炎症に関する遺伝子発現 (TNF- α 、IL-6、iNOS、Ym-1、CD206、IL-10) の比較検討を行った。

4. 研究成果

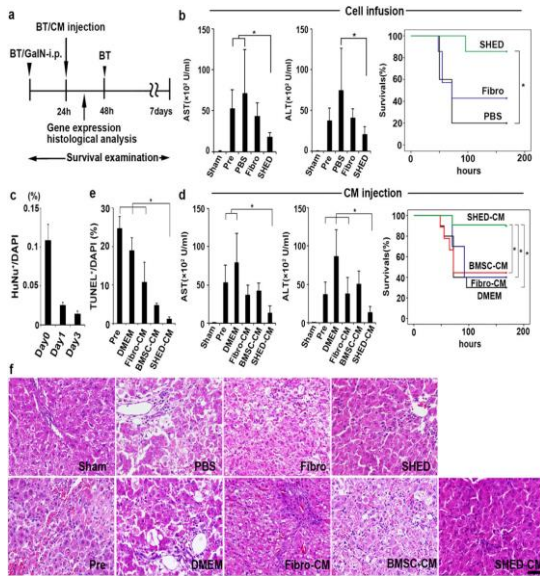
(1) 急性肝不全モデルラットにおける

SHED-CM の効果、およびそのメカニズムの検討

D-gal 投与後 7 日目までの生存率では SHED-CM 投与群が、BMSC-CM、Fibro-CM、DMEM 投与群に比較して有意に生存率が高く、投与後 48 時間における血清 ALT 値は SHED-CM 群

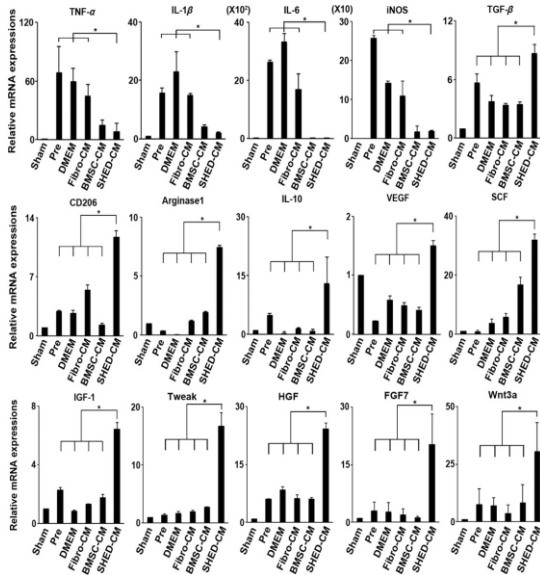
で DMEM 群や Fibro-CM 群で低く、またこれは TUNEL 陽性細胞による apoptosis の検討でも同様の結果であった (Figure 1)。

(Figure 1)



D-gal 投与後 36 時間 (上清投与後 12 時間) における遺伝子発現においては炎症性マーカー (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、iNOS) が SHED-CM 群で DMEM、Fibro-CM 群に比べて低下、それに対し炎症抑制性マーカー (TGF- β 、CD206、Arginase1、IL-10)、再生に関わるマーカー (VEGF、SCF、IGF-1、TWEAK、HGF、FGF7、Wnt3a) は、DMEM 群、Fibro-CM 群、BMSC-CM 群のいずれよりも高い発現を示し、SHED-CM は炎症抑制、肝再生に極めて高い特性があることが示唆された (Figure 2)。

(Figure 2)



(2) SHED-CM 内に多く含まれる液性因子の同定

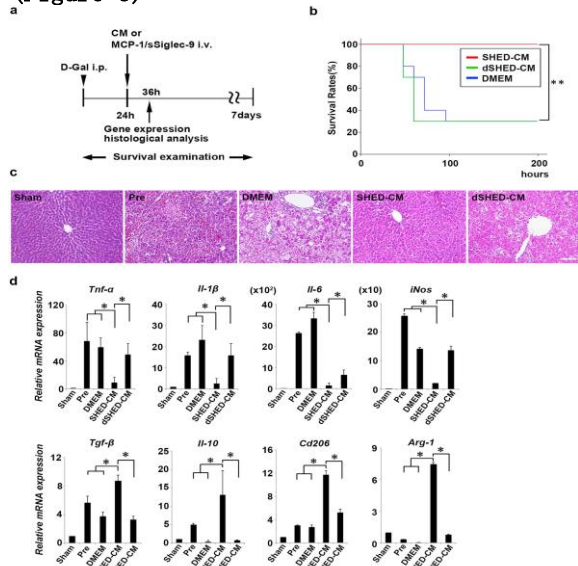
次に SHED-CM に他の幹細胞培養上清と比較して豊富に含まれる因子を、BMSC-CM と比較検討を行い、マクロファージ極性を規定する因子として MCP-1、IL-6、sSiglec-9 の 3 種類を同定した。

これら 3 種類の液性因子の中で、M2 のマーカーである CD206 の発現、および炎症抑制性サイトカインである IL-10 の発現は MCP-1、sSiglec-9 の抗体除去により低下したが、IL-6 の除去では低下せず、この 2 つの液性因子が M1→M2 への形質転換に重要であることが示された。

(3) 同定された液性因子が急性肝不全モデルラットにおいて炎症-再生相関にどのように関わるかのメカニズムの検討

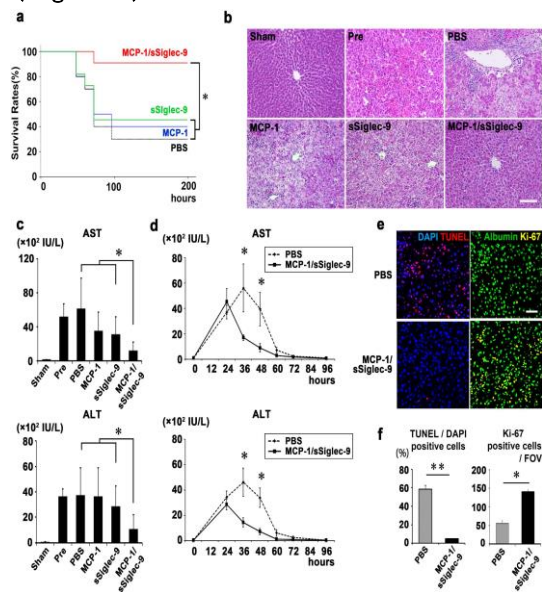
上記で同定された液性因子の効果を検討するため、まずは上記 2 因子を抗体で除去した培養上清 (dSHED-CM) の効果を SHED-CM、DMEM のみの投与群と比較検討、dSHED-CM 群ではラットの生存率が control 群と同様に有意に低下、また SHED-CM の炎症性マーカー (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、iNOS) 発現の抑制効果、および抗炎症性マーカー (TGF- β 、CD206、Arginase1、IL-10) 発現の増強効果が有意にキャンセルされることが示された (Figure 3)。

(Figure 3)



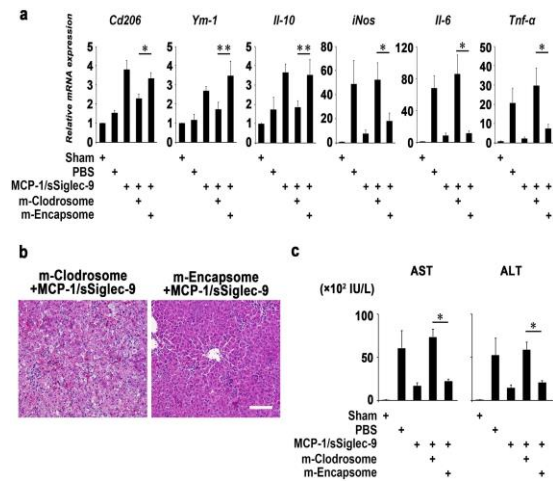
次に 2 液性因子の直接効果を示すため、MCP-1/sSiglec-9 投与群と MCP-1, sSiglec-9、および PBS 投与群と比較、MCP-1/sSiglec-9 の同時投与群で D-gal 投与後の生存率が有意に改善、また D-gal 投与後 48 時間における毛清 ALT 値の有意な低下と、TUNEL 陽性細胞の減少、KI-67 陽性細胞の増加が認められ、これらは各因子の単独投与での効果は認められなかった (Figure 4)。

(Figure 4)



また、マクロファージの炎症性→抗炎症性への形質転換メカニズムがこれらの効果に及ぼす影響を検討するため、M2 (抗炎症性) マクロファージ機能の阻害剤である m-Clodrosome の投与を行った所、control である m-Encapsome 投与群と比較して、2 液性因子の血清 ALT 低下、炎症性マーカー発現低下、炎症抑制性マーカー発現上昇等の効果が有意にキャンセルされることが明らかとなった (Figure 5)。

(Figure 5)



上記の結果から、SHED-CM、MCP-1/sSiglec-9 投与はマクロファージ極性を転換することにより炎症抑制、肝再生促進に寄与することが示された。

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 3 件)

1. Matsushita Y, Ishigami M, Matsubara K, Kondo M, Wakayama H, Goto H, Ueda M, Yamamoto A. Multifaceted therapeutic benefits of factors derived from stem cells from human exfoliated deciduous teeth for acute liver failure in rats. *J Tissue Eng Regen Med* 2017; 11: 1888-1896、査読有
2. Ito T, Ishigami M, Matsushita Y, Hirata M, Matsubara K, Ishikawa T, Hibi H, Ueda M, Hirooka Y, Goto H, Yamamoto A. Secreted Ectodomain of SIGLEC-9 and MCP-1 Synergistically Improve Acute Liver Failure in Rats by Altering Macrophage Polarity. *Sci Rep.* 2017 ;7:44043、査読有
3. Hirata M, Ishigami M, Matsushita Y, Ito T, Hattori H, Hibi H, Goto H, Ueda M, Yamamoto A. Multifaceted Therapeutic Benefits of Factors Derived From Dental

Pulp Stem Cells for Mouse Liver Fibrosis.
Stem Cells Transl Med 2016 Jun 8. pii:
sctm.2015-0353、査読有

〔学会発表〕（計 4 件）

1. 伊藤 隆徳、田中 卓、山本 健太、安藤 祐資、安田 諭、野村 彩、加藤 幸一郎、石津 洋二、葛谷 貞二、本多 隆、林 和彦、石上 雅敏、廣岡 芳樹、石川 哲也、後藤 秀実 歯髄幹細胞無血清培養上清による難治性肝疾患での有用性の検討 急性・慢性肝炎動物モデルにおける効果発現メカニズムの違いに着目して 第 53 回日本肝臓学会総会、広島、2017
2. Ito T, Yamamoto A, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Ishikawa T, Ishigami M, Hirooka Y, Goto H. Secreted ectodomain of sialic acid-binding Ig-like lectin-9 and monocyte chemoattractant protein-1 identified from dental pulp stem cells synergistically resolve acute liver failure in rats by altering macrophage polarity. AASLD, 2016, Boston
3. 伊藤 隆徳、山本 朗仁、山本 健太、安藤 祐資、安田 諭、野村 彩、加藤 幸一郎、新家 卓郎、石津 洋二、葛谷 貞二、本多 隆、林 和彦、石上 雅敏、廣岡 芳樹、石川 哲也、日比 英晴、後藤 秀実 新規 M2 マクロファージ誘導因子を用いた難治性肝疾患治療法の開発 第 20 回日本肝臓学会大会、神戸、2016
4. 伊藤 隆徳、松下 嘉泰、安田 諭、川口 彩、加藤 幸一郎、新家 卓郎、今井 則博、阿知波 宏一、石津 洋二、葛谷 貞二、本多 隆、林 和彦、石上 雅敏、廣岡 芳樹、石川 哲也、山本 朗仁、後藤 秀実 M2 マクロファージ誘導因子を用いた肝細胞保護効果の検討 第 41 回日本肝臓学会西部会、名古屋、2015

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 1 件）

名称：炎症性疾患の予防又は治療用組成物
発明者：山本 朗仁、上田 実、後藤 秀実、石上 雅敏、松下 嘉泰、長谷川 好規、橋本 直純、若山 博隆
権利者：国立大学法人名古屋大学
種類：再公表特許(A1)
番号：W0/0
取得年月日：2017年2月2日
国内外の別：国際

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

山本 朗仁 (YAMAMOTO Akihito)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・教授
研究者番号：50244083

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

伊藤 隆徳 (ITO Takanori)
名古屋大学・大学院医学系研究科・大学院生