

令和元年5月29日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19897

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞を用いた転写因子制御による肝虚血再灌流障害の新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Integrated treatment strategy for liver I/RI with transcriptional regulation by mesenchymal stem cell

研究代表者

高須 千絵 (TAKASU, Chie)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・講師

研究者番号：70582823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：術後肝不全を引き起こすI/RIの予防法として、ADSCs投与によるNrf2の活性化による肝保護作用について検討した。ADSCsによるNrf2を介した肝虚血再灌流傷害の細胞保護効果は認められなかったが、臍島細胞において移植時のI/RIをNrf2の核内移行を促進させることで細胞保護効果を有する可能性が示唆された。また肝切除後組織を用いたメタボローム解析によって、切除後肝内において抗酸化作用を持つValineとTryptophan上昇が関与す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

本研究ではADSCs投与によるNrf2の活性化による肝虚血再灌流傷害時の肝細胞保護作用について検討した。残念ながら、ADSCsによるNrf2を介した肝細胞保護効果は認められなかったが、Nrf2を介した虚血再灌流傷害時の細胞保護効果に関しては臍島移植modelを用いて示すことができた。また肝虚血再灌流傷害時の臨床検体を用いた検討では、抗酸化作用を持ちNrf2経路に関与する代謝物であるValineとTryptophanが肝切除後にupregulateされていることを解明し、肝I/RIの病態解明の一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish the integrated treatment strategy for liver I/RI with Nrf2 activation by adipose-derived stem cells (ADSCs).

We investigated the protective effect of ADRC for liver I/RI through Nrf2 activation, but not be proved. On the other hand, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, may protect islets viability and function through Nrf2 expression. EGCG group significantly prolonged cell viability after 24hr culture. Nrf2 nuclear translocation was significantly increased in EGCG group compared to control group after 24hr culture. Regarding the clinical setting, we investigated the changes of liver metabolites in hepatectomy (Hx) with I/RI. The principal component analysis revealed remarkably different component profiles between Pre and Post Hx. Valine and Tryptophan significantly increased after Hx.

研究分野：医歯薬学、外科系臨床医学、外科学一般

キーワード：MSC ADSC I/RI Nrf2

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝移植は末期肝不全に対する究極の治療であり、術後肝不全を引き起こす重大な原因の一つである肝虚血再灌流障害(I/RI)の治療・予防法の開発にはこれまで多くの基礎研究がなされてきたが、その複雑な病態から未だ肝虚血再灌流における包括的治療法は確立されていない。一方、自己複製能および多分化能をもつ幹細胞を用いた再生医療の研究が進行し、特に体性幹細胞に属する間葉系幹細胞: MSC (mesenchymal stem cell) が臨床導入されつつある。MSC は骨髄、脂肪組織や臍帯血などに存在し、自己細胞を利用すれば iPS 細胞や ES 細胞のように倫理面・発癌の問題や免疫拒絶がなく生着もよいという利点を持つ。現在、MSC は虚血性疾患では血管新生・心筋細胞分化、Crohn 病の上皮形成、脊髄損傷の神経細胞分化に加え、MSC 自体に炎症や免疫反応を押さえる作用があることが報告されている (Eur J Immunol. 2006)。MSC は炎症部位において TNF- α の低下や制御性 T 細胞発現などの免疫寛容を誘導し、多分化能 (再生効果) を示す (J Cell Mol Med. 2009)。

2. 研究の目的

我々は、肝 I/RI の治療・予防に関する研究を報告してきた。また、酸化ストレスのホルミシスを制御する Nrf2 転写活性誘導剤である Dimethyl Fumarate (DMF) を用い、Nrf2 を活性化することで、I/RI に対し抗酸化物質を誘導することでストレス耐性を発揮し、好中球活性や炎症を抑制、eNOS 発現回復による NO 制御により細胞保護効果を発揮することを確認した。Nrf2 は HSP の一種である HO-1 を誘導することが報告されていることから、I/RI において Nrf2 活性化による Antioxidant や HSPs の発現誘導は、ROS への耐性による細胞保護効果や DAMPs などによる炎症 cascade の抑止効果が期待され、包括的治療の target として期待できる (図 1)。これまで骨髄由来 MSC は HGF による抗アポトーシス作用を増強するとともに、Nrf2 の target である抗酸化物質の SOD や prdx1 を増強し抗酸化作用を発揮することで肝繊維化を抑制したことが報告されており (PLoS One. 2011)、ADSCs についても抗酸化作用や Nrf2 との関係性が期待される。以上から本研究では、ADSCs 投与により I/RI 時の Nrf2 の活性化増強による肝保護作用について明らかにする。

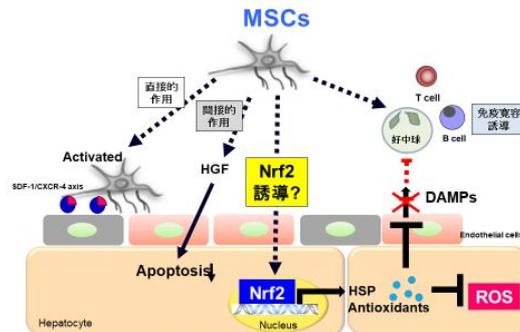


図1: MSCsによる肝I/RI治療戦略

3. 研究の方法

(1) in vitro - ADSCs による肝細胞保護効果と Nrf2 pathway 関連解明

正常肝細胞株(RLC-27)とADSCsを細胞接触のない状態で Transwell で共培養し、I/RI vitro model (Transplantation, 2017)を用い、肝細胞の Cell Viability とともに、confocal microscopy による活性化 Nrf2 (nuclear translocation)の確認を行う。

【Protocol】

Hepatocyte cell を 6-well dishe にて 10×10^5 cells/well で培養し、ADSC 2×10^5 cells/well PBS (control)を添加し、vitro I/RI 装置にて、chamber に seal し 5% CO₂, 21% O₂, balanced with N₂ (95% humidity)にて 2-3 分(total 100L)で充填した後に 1. Normoxic 群: clamp を open した状態で 90 分 2. Hypoxic 群: 低酸素ガス(5% CO₂, 95% N₂ 0.1-0.13 Mpa)で 4 分 (100L)で充填した状態で 90 分 seal し、その後両群ともに port を 24 時間 open し、各検討を行う。

【Parameters】

1. IF: nuclear translocation of Nrf2
2. Cell viability

(2) Nrf2-Keap1 制御系を介した膵島保護作用に関する検討

我々はこれまでにラット肝切除後モデルにおいて Epigallocatechin-3 Gallate (EGCG)による I/RI に対する細胞保護効果を効果している (J Gastroenterol. 2014)。1)の結果を受け、Nrf2 の細胞保護効果の確認として、膵島分離精製時の I/RI に対し、EGCG を用いた pre-conditioning を行うことで Nrf2-Keap1 制御系を介した膵島細胞内酸化ストレス制御について基礎的に検討した。

Collagenase 法で分離した C57BL/6 マウス膵島を islet culture medium 群 (control 群), islet culture medium + EGCG $100 \mu\text{M}$ 群 (EGCG 群)の 2 群に分け、経時的 (0, 6, 24 時間後)な膵島細胞の viability, 低・高グルコース応答性試験 (3mM, 20mM グルコース液)によるインスリン分泌能, Nrf2 発現について PI 染色、ELISA 法、蛍光免疫染色にて検討した。

(3) 肝虚血再灌流における代謝物解析

続いて実臨床における肝虚血再灌流傷害が実臨床においてどのような代謝に関与するかを検討することとし、ヒト肝切除症例において、切除前後の肝組織を用いてメタボローム解析を行った。初回肝切除症例、術前化学療法なし、胆道再建・リンパ節郭清なし、ICGR $15 < 15\%$ 、計

23 症例（肝細胞癌 n=19、肝内胆管癌 n=1、転移性肝癌 n=1、良性肝腫瘍 n=2）を対象とし、肝切除前、切除直後の非癌部肝組織を採取し、CE-TOFMS によるメタボロミクス解析を実施した。

4. 研究成果

(1) in vitro - ADSCs による肝細胞保護効果と Nrf2 pathway 関連解明

in vitro I/RI model を用いて、I/RI を in vitro で再現し、ADSCs 投与による細胞保護効果の検討を行ったが、I/RI による cell viability の低下は ADSCs 投与により改善は認められなかった(図 2a)。

また低酸素条件を 3h に延長し同様の実験を行ったが、ADSCs 投与による cell viability の改善効果は認められなかった(図 2b)。

Nrf2 の活性化を IF を行い confocal microscopy にて核内移行の確認を行ったが、Normoxic 群、Hypoxia 群いずれにおいても ADSCs 添加による Nrf2 の活性化に差は認められなかった(図 3)。

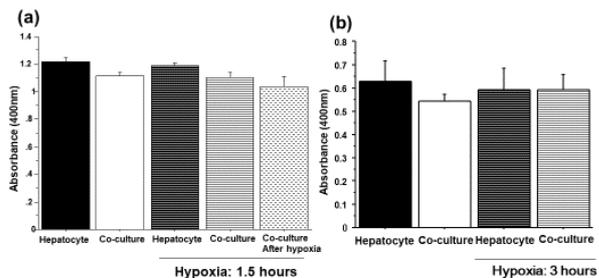


図2: Cell viability

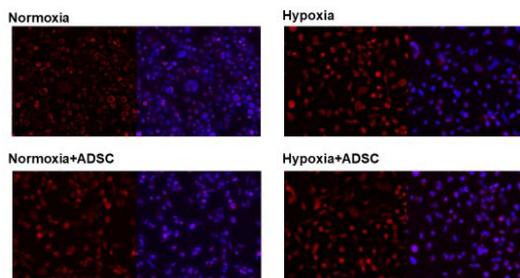


図3: Nrf2の核内移行

(2) Nrf2-Keap1 制御系を介した膵島保護作用に関する検討

cell viability については control 群、EGCG 群では 0, 6 時間では差を認めなかったが、培養後 24 時間では EGCG 群で良好な結果であった(control 群: EGCG 群=68.3%:78.0%, $p < 0.05$ 図 4)。

インスリン分泌については 24 時間培養後、低グルコース、高グルコース刺激いずれにおいても Control 群に比べて、EGCG 群で有意に培養液中のインスリン濃度は上昇していた(control 群:EGCG 群=0.6ng/dl:9.8ng/dl, 及び 0.6ng/dl:8.5ng/dl, $p < 0.05$)。

Nrf2 発現に関しては膵島細胞全体における発現面積は両群間で 0, 24 時間において差は認めなかったが、核染色との fusion では 24 時間後、核内移行した Nrf2 陽性細胞の割合が EGCG 群において有意に上昇していた(control 群:EGCG 群=14.9%:49.1%, $p < 0.05$ 図 5)。

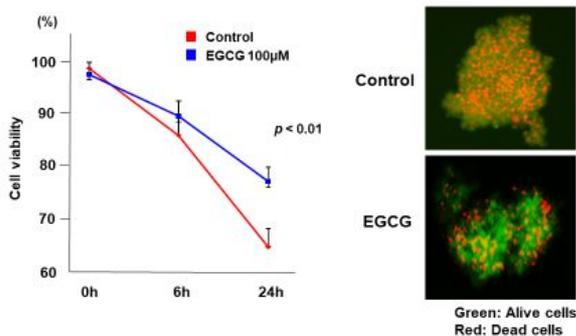


図4: Islet viability (PI staining)

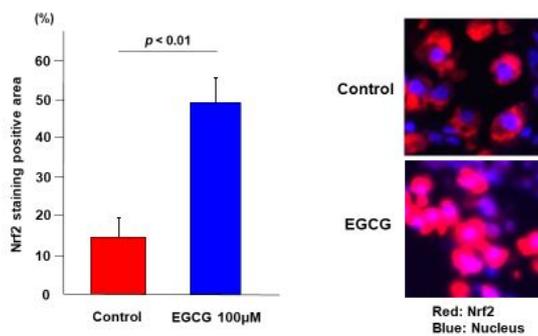


図5: Nrf2 活性化の確認

(3) 肝虚血再灌流における代謝物解析と肝再生因子の解明

切除前後の肝組織代謝物は階層クラスター解析 (Hierarchical Clustering) により系統が分かれ、主成分分析 (principal component analysis) より、明らかに異なるプロファイルを示した(図 6)。切除後肝組織では、主要アミノ酸のうち、Valine と Tryptophan が切除前と比較して有意に上昇していた(図 7)。さらに、肝細胞増殖に關与する Nicotinamide、臓器保護作用を示す GABA も有意に上昇していた。さらに、切除後肝において、切除容積を区域切除以上 (n=15)・未滿 (n=8) で群別化した際に、区域切除以上 (切除肝容積が多い)群において、Valine は有意に上昇していた。これらの傾向は虚血時間別では有意差を認めなかった。

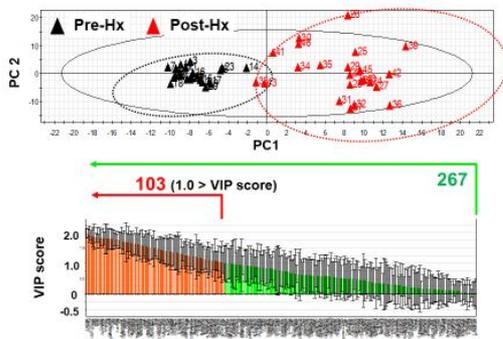


図6:肝切除前後の主成分分析

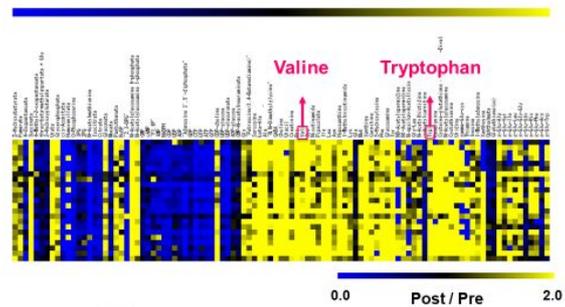


図7:Hierarchical clustering

以上の検討結果から、ADSCs による肝細胞における肝虚血再灌流傷害の細胞保護効果は認められず、Nrf2 の有意な活性化は認められなかった。一方で、膵島細胞において移植前の pre-conditioning が Nrf2 の細胞内発現、核内移行を促進させることで細胞保護効果を有する可能性が示唆された。また肝虚血再灌流傷害の実臨床における検討としては、肝切除後組織を用いたメタボローム解析によって、切除後肝内で抗酸化作用を持つ Valine と Tryptophan 上昇が確認でき、肝再生に関与する可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

1. Wada Y, Takata A, Ikemoto T, Morine Y, Imura S, Iwahashi S, Saito Y, Shimada M.
The protective effect of epigallocatechin 3-gallate on mouse pancreatic islets via the Nrf2 pathway. *Surg Today*. 2019 Feb 7. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30730004. 査読有 . doi: 10.1007/s00595-019-1761-0.
2. Ikemoto T, Feng R, Shimada M, Saito Y, Iwahashi S, Morine Y, Imura S.
A new established 2-step acceleration protocol with HDAC inhibitor for generating insulin-producing cells from adipose derived mesenchymal stem cells. *Pancreas*. 2018;47(4):477-481. 査読有 . doi: 10.1097/MPA.0000000000001017.
3. Saito Y, Morine Y, Iwahashi S, Ikemoto T, Imura S, Yamanaka-Okumura H, Hirayama A, Soga T, Tomita M, Shimada M.
Changes of liver metabolites following hepatectomy with ischemia reperfusion towards liver regeneration. *Ann Gastroenterol Surg*. 2018 30;2(3):204-211. 査読有 .doi: 10.1002/ags3.12058.
4. Ikemoto T, Feng R, Shimada M, Saito Y, Iwahashi S, Morine Y, Imura S. A New 2-Step Acceleration Protocol Using a Histone Deacetylase Inhibitor to Generate Insulin-Producing Cells From Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Pancreas*. 2018;47(4):477-481. 査読有 . doi: 10.1097/MPA.0000000000001017.

[学会発表](計11件)

1. 第18回日本再生医療学会総会 2019年 神戸
和田佑馬, 池本哲也, 居村暁, 岩橋衆一, 齋藤裕, 山田眞一郎, 太田昇吾, 岩橋祥子, 島田光生
脂肪由来幹細胞からのインスリン産生細胞分化誘導に関する研究
2. 第54回日本移植学会総会 2018年 東京
和田佑馬, 池本哲也, 森根裕二, 岩橋衆一, 齋藤裕, 山田眞一郎, 居村暁, 島田光生
Nrf2 経路による EGCG の膵島保護効果
3. 第54回日本移植学会総会 2018年 東京
池本哲也, 島田光生, 居村暁, 森根裕二, 岩橋衆一, 齋藤裕, 和田佑馬, 太田昇吾
臨床応用を目指した間葉系幹細胞から創生されるインスリン産生細胞による糖尿病の治療法確立に関する研究
4. 第53回日本移植学会総会 2018年 旭川
池本哲也, 島田光生, 居村暁, 森根裕二, 岩橋衆一, 齋藤裕, 寺奥大貴
膵島移植に対するブレイクスルーとしての Adipose tissue derived stem cells からの効果的 Insulin-producing cells 創生
5. 第53回日本移植学会総会 2018年 旭川
寺奥大貴, 池本哲也, 森根裕二, 岩橋衆一, 齋藤裕, 和田佑馬, 太田昇吾, 居村暁, 島田光生
Nrf2-Keap1 制御系を介した Epigallocatechin-3-gallate(EGCG)による膵島保護作用に関する検討
6. 第72回日本消化器外科学会総会 2018年 金沢

- 高田厚史, 池本哲也, 岩橋衆一, 齋藤裕, 森根裕二, 居村暁, 島田光生
Epigallocatechin-3-gallate(EGCG)による Nrf2-Keap1 制御系を介した膵島保護作用に関する検討
7. 第 118 回日本外科学会定期学術集会 2018 年 東京
第 5 回「臨床研究助成」及び「若手外科医のための臨床研究助成」
齋藤裕, 池本哲也, 岩橋衆一, 寺奥大貴, 居村暁, 森根裕二, 島田光生
Epigallocatechin gallate(EGCG)による脂肪由来間葉系幹細胞 (ADSC) から Insulin producing cell(IPC)への効率的な分化誘導に関する研究
 8. 第 44 回 日本膵・膵島移植研究会 2018 年 京都
池本哲也, 島田光生, 岩橋衆一, 良元俊昭, 吉川雅登, 齋藤裕, 森根裕二, 居村暁
ADSC による Insulin-producing cell(IPCs)作成における効果的新規分化誘導方法に関する検討
 9. 第 44 回 日本膵・膵島移植研究会 2018 年 京都
高田厚史, 池本哲也, 岩橋衆一, 森根裕二, 齋藤裕, 居村暁, 島田光生
Epigallocatechin-3-gallate(EGCG)による Nrf2-Keap1 制御系を介した膵島保護作用に関する検討
 10. 第 16 回日本再生医療学会総会 2018 年仙台
池本哲也, 島田光生, 岩橋衆一, 齋藤裕, 良元俊昭
ADSC による Insulin-producing cell(IPCs)作成における効果的新規分化誘導方法に関する検討
 11. 第 117 回日本外科学会定期学術集会 2017 年 横浜
齋藤裕, 奥村仙示, 森根裕二, 平山明由, 梶浦大資, 多々納浩, 良元俊昭, 高田厚史, 吉川雅登, 岩橋衆一, 池本哲也, 居村暁, 島田光生
Epigallocatechin gallate(EGCG)による脂肪由来間葉系幹細胞 (ADSC) から Insulin producing cell(IPC)への効率的な分化誘導に関する研究

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者

研究協力者氏名：森根 裕二

ローマ字氏名：(MORINE, Yuji)

研究協力者氏名：齋藤 裕

ローマ字氏名：(SAITO, Yu)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。