

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17334

研究課題名(和文) うっ血性肝硬変に対する再生医療としての間葉系幹細胞移植療法

研究課題名(英文) Mesenchymal stem cell therapy for congestive cirrhosis

研究代表者

平井 健太 (Hirai, Kenta)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：50814224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、単心室症のフォンタン術後合併症であるうっ血性肝硬変に対する間葉系幹細胞移植の治療効果を検証した。

マウスの下大静脈を部分結紮してうっ血性肝硬変モデルを作成し、間葉系幹細胞の静脈内投与による治療効果判定を実施した。しかしプラセボ群と比較して単回移植群、複数回移植群いずれも肝臓線維化の程度や炎症・線維化マーカーに有意な変化を認めなかった。一方、上記過程でうっ血性肝硬変モデルマウスの肝臓内mRNA発現を偽手術群と比較したところ、うっ血性肝硬変モデルにおいて血漿タンパクHRGの発現が有意に低下していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うっ血性肝硬変は、フォンタン術後患者の長期合併症として回避できず、治療法は現時点で皆無である。本研究ではうっ血性肝硬変に対する再生医療として間葉系幹細胞の静脈投与を検討したが、有意な改善効果は得られなかった。一方、上記研究の過程で、うっ血性肝硬変モデルマウスの肝臓組織でHRGのmRNA発現が有意に低下していることを見出した。既存の肝線維化マーカーとしてはヒアルロン酸や型コラーゲン、P- -P、M2BPGiなどがあるが、フォンタン術後のうっ血性肝硬変に対する肝線維化の指標は確立されていない。今後の展望として、HRGが新規の肝線維化マーカーとして活用できるかについて検討していきたい。

研究成果の概要(英文)：This study evaluated therapeutic efficacies of mesenchymal stem cell injection for congestive cirrhosis, one of major complications of single ventricle congenital heart disease with Fontan circulation. Congestive cirrhosis mouse model was created by partial ligation of inferior vena cava, but intravenous administration of mesenchymal stem cells to the model failed to decrease hepatic fibrosis. Histidine-rich glycoprotein (HRG) mRNA expression level was significantly decreased in the congestive cirrhosis mouse model. HRG may be a novel biomarker for predicting progression of congestive cirrhosis.

研究分野：小児循環器

キーワード：細胞移植 肝硬変 うっ血 フォンタン HRG

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

単心室症は、循環に寄与する心室をひとつしか持たない重篤な複雑心奇形である。複数回の心臓手術を経てフォンタン手術に到達しても、肺への血液を送り出すポンプを持たないフォンタン循環は容易に破綻しやすく、その長期予後は不良である。当院では、単心室症患者に対して世界初の自己心臓内幹細胞移植法の第 1、2 相臨床研究を行い、心機能を改善することで、予後改善を目指してきた。

フォンタン術後患者の予後が徐々に改善してきた結果、長期合併症としてうっ血性肝硬変を高率にきたすことが明らかとなってきた。フォンタン術後患者は平均 18 年で 55%がうっ血性肝硬変をきたしており、肝臓にうっ血所見を認めない患者はわずか 7%であった。これは、ウイルス性肝硬変などと比較しても、はるかに若年で高率に肝硬変をきたしていると言える。そして、たとえ心機能が良好であっても、フォンタン循環は二心室循環と比較して肝臓に 2~3 倍の中心静脈圧が常にかかるため、長期合併症としてうっ血性肝硬変は回避できず、肝不全や肝細胞がんを発症すると、予後規定因子となる。それにもかかわらず、うっ血性肝硬変の治療法は現時点で皆無であり、肝細胞がんの早期発見・早期治療以外に対策がないのが現状である。

間葉系幹細胞(MSC)は、脂肪組織などから樹立され、骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞などへの多分化能をもつ幹細胞であるが、細胞から分泌される細胞外小胞体である exosome などによる paracrine effect の機序により、抗炎症、抗線維化、血管新生、抗アポトーシス作用などをもたらすとされており、再生医療の分野で有望視されている。肝臓領域においても肝細胞障害の抑制、抗炎症作用、星細胞の活性化抑制による抗線維化作用をもつと言われており、うっ血性肝硬変においても MSC 移植療法が有効である可能性があると考えた。

### 2. 研究の目的

うっ血性肝硬変に対する MSC 移植の治療効果を検証し、その機序として exosome の関与を明らかにすることを本研究の目的とする。これまでにうっ血性肝硬変に対して MSC 移植を施行した報告はなく、独自性のある研究である。本研究の結果は、フォンタン術後患者の予後改善に大きく寄与する可能性がある。また MSC 移植の効果機序として exosome の関与を明らかにすることで、将来的に細胞よりも投与リスクが少ないと考えられる exosome 自体を治療薬として用いる、cell-free therapy の可能性についても検証を行う。

### 3. 研究の方法

うっ血性肝硬変モデルは、下大静脈を部分結紮することで作成する。C57BL/6 マウスに対して、イソフルラン吸入にて麻酔後、剣状突起下から右肋弓下に沿って 2cm の切開を行う。肝上の下大静脈を同定し、0.4mm の steel wire を下大静脈上に留置し、6.0 silk にて下大静脈を wire とともに結紮する。その後 wire を緩徐に抜去し、閉腹する。

#### (1) うっ血性肝硬変に対する MSC 移植の効果検証

(a)単回移植群、(b)複数回移植群、(c)Placebo 群の 3 群(各群 n=10)を作成する。(a)群は 4 週間後に  $1.0 \times 10^6$  個の MSC、5、6 週間後は生理食塩水、(b)群は 4、5、6 週間後に  $1.0 \times 10^6$  個の MSC、(c)群はモデル作成 4、5、6 週間後に生理食塩水をそれぞれ尾静脈投与する。モデル作成から 8 週間後にマウスを解剖、肝臓組織を摘出し、肝体重比でうっ血の程度を比較する。その後、各群の肝臓組織を用いてタンパク抽出、tRNA 抽出と cDNA に逆転写、ホルマリン固定を行う。採

血、血清分離も行い、各群で炎症・線維化マーカーの比較も行う。

(2)MSCの治療効果機序として exosome の検証

(e)MSC(DMSO)群、(f)MSC(GW4869)群、(g)MSC(GW4869)+exosome 群(各群 n=10)の3群を作成する。GW4869は exosome 分泌抑制効果があることが示されており、MSC 培養中に 20  $\mu$ M の GW4869 を 12 時間反応させた上で移植に用いる。(e)群に関しては、GW4869 の溶媒である DMSO のみを MSC に 12 時間反応させた細胞を移植に用いる。(e)群はモデル作成 4、5、6 週間後に DMSO 前処置した  $1.0 \times 10^6$  個の MSC、(f)群は 4、5、6 週間後に GW4869 で前処置した  $1.0 \times 10^6$  個の MSC、(g)群は 4、5、6 週間後に GW4869 で前処置した  $1.0 \times 10^6$  個の MSC と同数の MSC 上清から抽出した exosome を同時に尾静脈投与する。モデル 8 週間後にマウスを解剖、肝臓組織を摘出し、(1)と同様に炎症・線維化マーカーを比較して、exosome inhibitor である GW4869 により MSC の治療効果が抑制されるか、また exosome 同時投与をすると治療効果を認めるようになるかにつき検証を行う。

#### 4. 研究成果

マウスの腹壁から採取した脂肪組織をコラゲナーゼ処理することで、細胞移植に必要な MSC を培養することに成功した。次にマウスの下大静脈を部分結紮することで、うっ血性肝硬変モデルを作成し、中心静脈周囲の線維化を伴う肝硬変の所見が得られることを確認した。当初はマウス肝臓のうっ血の程度、病理組織上の肝硬変の程度に個体差が大きく、下大静脈を部分結紮する際に使用する steel wire 径の調整などを行うことで、手技の安定を図った。徐々に個体間のうっ血肝の程度の差が少なくなったため、MSC 移植による治療効果判定を実施した。しかし、Placebo 群と比較して単回移植群、複数回移植群いずれも中心静脈周囲の線維化の程度や炎症・線維化マーカーに有意な変化を認めなかった。この原因として、静脈投与ではターゲットとなる肝臓組織への細胞集積量が少なく、paracrine factors が肝臓組織に十分に作用せず抗炎症や組織修復効果が得られなかった可能性が考えられた。

一方、上記研究の過程で、うっ血性肝硬変モデルマウスの肝臓組織内の mRNA 発現を偽手術群と比較したところ、うっ血性肝硬変モデルにおいて Col1a1、Tgfb1、Acta2、Pdgfra といった既知の線維化マーカーの上昇とともに、血漿タンパク HRG の mRNA 発現が有意に低下していることを見出した(図 1)。臨床応用されている既存の肝線維化マーカーとしては、ヒアルロン酸や Ⅲ型コラーゲン、P-ⅢP、M2BPGi などがあるが、フォンタン術後のうっ血性肝硬変に対する肝線維化の指標は確立されていない。今後の展望として、HRG がフォンタン術後うっ血性肝硬変に対する新規の肝線維化マーカーとして活用できるかについて検討していきたい。

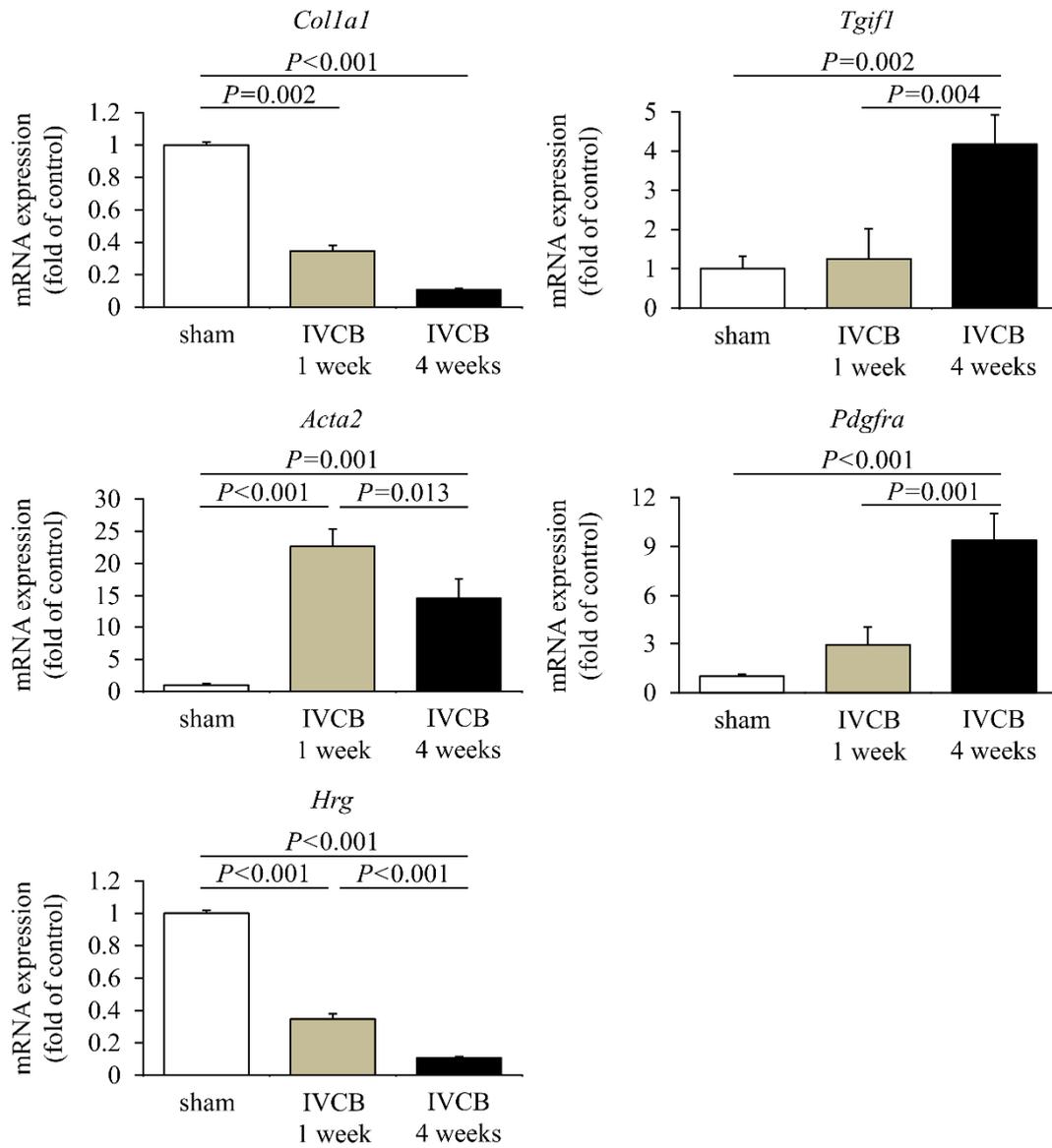


図1 うっ血性肝硬変モデルマウスの肝臓組織におけるmRNA発現解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Hirai K, Ousaka D, Fukushima Y, Kondo M, Eitoku T, Shigemitsu Y, Hara M, Baba K, Iwasaki T, Kasahara S, Ohtsuki S, Oh H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Cardiosphere-derived exosomal microRNAs for myocardial repair in pediatric dilated cardiomyopathy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scitranslmed.abb3336	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Hirai K, Baba K, Goto T, Ousaka D, Kondo M, Eitoku T, Kotani Y, Kasahara S, Ohtsuki S, Tsukahara H.	4. 巻 42
2. 論文標題 Outcomes of right ventricular outflow tract reconstruction in children: Retrospective comparison between Bovine jugular vein and expanded Polytetrafluoroethylene conduits.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Cardiology	6. 最初と最後の頁 100-108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00246-020-02458-0	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 平井健太, 王英正	4. 巻 62
2. 論文標題 Stem Cellを用いた治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 小児科	6. 最初と最後の頁 612-619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Imai Y, Baba K, Otsuki S, Kondo M, Eitoku T, Shigemitsu Y, Fukushima Y, Hirai K, Iwasaki T, Kanazawa T, Kotani Y, Kasahara S	4. 巻 43
2. 論文標題 Stepwise Treatment for Heterotaxy Syndrome and Functional Single Ventricle Complicated by Infra-Cardiac Total Anomalous Pulmonary Venous Connection with Ductus Venosus Stent Placement and Subsequent Occlusion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric Cardiology	6. 最初と最後の頁 756-763
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00246-021-02782-z	査読の有無 有
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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hirai K
2. 発表標題 Exosomes Mediate Myocardial Regeneration of Cardiac Progenitor Cells in a Swine Model of Dilated Cardiomyopathy
3. 学会等名 European Society of Cardiology Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平井健太
2. 発表標題 右室流出路再建術におけるContegraとYamagishi conduitの遠隔成績比較
3. 学会等名 第55回日本小児循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirai K
2. 発表標題 Cardiosphere-derived exosomal microRNAs for cardiac repair in pediatric dilated cardiomyopathy: preclinical and safety lead-in phase 1 clinical studies.
3. 学会等名 European Society of Cardiology Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平井健太
2. 発表標題 Update of Regenerative Therapy for Pediatric Heart Failure
3. 学会等名 第56回日本小児循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平井健太
2. 発表標題 Cardiosphere-derived exosomal microRNAs for cardiac repair in pediatric dilated cardiomyopathy: preclinical and safety lead-in phase 1 clinical studies.
3. 学会等名 第85 回日本循環器学会学術集会
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

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