

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16976

研究課題名（和文）NASH治療を目的とした革新的BDDS製剤の創出

研究課題名（英文）Development of novel BDDS agents for the treatment of NASH

研究代表者

増田 篤高（Masuda, Atsutaka）

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：40647872

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）：血管内皮前駆細胞（EPC）や間葉系幹細胞（MSC）は障害肝に遊走し、生着することが知られている。本研究では、EPC、脂肪由来MSC（AdMSC）、骨髄由来MSC（BmMSC）のNASHモデルマウス肝臓への生着率の評価を行い、EPCが最も生着率が高いことを明らかにした。またNASHモデルマウスにおいて、EPC移植が肝線維化を抑制し、トランスアミナーゼ値の改善、肝細胞死の抑制、肝細胞の増殖亢進、酸化ストレスの抑制効果があることを明らかにし、さらにトランスクリプトーム解析により、EPC移植はNASH病態により病的に活性化された自然免疫を調整することで、抗炎症作用を示したことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管内皮前駆細胞（EPC）、間葉系幹細胞（MSC）が障害部位に遊走し、生着することは知られていたが、生着率を算出し、比較することはなされていなかった。本研究においてNASHモデルマウスの肝臓へEPCが高率に生着することが明らかとなり、EPCが低分子化合物や核酸製剤のベクターになり得る可能性が示唆された。またEPC単独であってもNASH肝臓に対し抗線維化作用、抗炎症作用、肝再生促進作用を持つことを明らかにし、さらに病的に活性化された自然免疫を調整する作用を有することが示唆された。これらの知見はこれまでにないBDDS製剤の開発に有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Endothelial progenitor cells (EPCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) are known to migrate and engraft in the injured liver. In this study, we evaluated the engraftment rates of EPCs, adipose-derived MSCs (AdMSCs), and bone marrow-derived MSCs (BmMSCs) in the liver of a NASH mouse model and found that EPCs had the highest engraftment rate. In NASH model mice, EPC transplantation suppressed liver fibrosis, improved transaminase levels, inhibited hepatocyte death, increased hepatocyte proliferation, and reduced oxidative stress. Furthermore, transcriptome analysis revealed that EPC transplantation exhibited anti-inflammatory effects by regulating innate immunity.

研究分野：細胞移植

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 血管内皮前駆細胞 肝硬変 肝再生 抗線維化 抗炎症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本には約 40 万人の肝硬変患者がいると推定されているが、その大多数を占める C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染は、直接作用型抗ウイルス剤の発売により制御可能となった。一方で、生活習慣の欧米化に伴い、肥満や糖尿病などの生活習慣に由来する非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) 中でも進行性線維化病態を示す非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) に伴う肝硬変の症例は今後増加することが予想されている。しかし現在においても、NASH に対する治療薬、特に肝線維化が進行した NASH 肝硬変を改善させる薬剤は存在しない。近年、さまざまな分野で、骨髄あるいは末梢血幹細胞、間葉系幹細胞 (mesenchymal stemcell; MSC) を用いた再生医療研究が臨床応用にまで進められている。本邦における NASH に対する再生治療については、脂肪由来の MSC を用いた臨床試験が行われている。

### 2. 研究の目的

これまで当研究室において、肝硬変に対する末梢血 CD34 陽性細胞を用いた肝再生治療に関する基礎的・臨床的研究を詳細に行ってきた (Nakamura T et al; Gastroenterology. 2007) (Nakamura T et al; J Gastroenterol Hepatol. 2014)。CD34 陽性細胞を含む血管内皮前駆細胞 (EPC) や MSC は障害部位に選択的に遊走するホーミング機能を持ち、一定期間組織に生着することが知られている。本研究の目的は NASH モデルマウスを用いて移植細胞をベクターとした bio-drug delivery system (BDDS) 製剤を創造することである。

### 3. 研究の方法

実験 : 移植細胞の肝生着率の算出

コリン欠乏メチオニン減量 60% 脂肪食 (CDAHFD60) を 16 週間給餌し、NASH モデルマウスを作製する。同種同系統の GFP-Tg マウスより CD34 陽性細胞、脂肪 MSC を採取・分離・培養し、また Cyagen 社より GFP 陽性骨髄 MSC を購入し、それぞれの細胞を  $1 \times 10^5$  cells/匹ずつ経脾的に細胞移植を行う。移植 48 時間後、マウスより肝臓を採取し、体積・密度測定キットを用いて肝体積 (V) 測定を行う。免疫染色にて面積 (S) あたりの GFP 陽性細胞数 (n) 組織切片の厚さ (L)、細胞長径 (D) を測定することで、以下の式を用いて肝臓全体の GFP 陽性細胞数を算出し、各移植細胞別に比較し、最も生着効率の高い細胞を決定する。

$$\text{数密度 } (\rho) = \frac{n}{S(L+D)}$$

$$\text{生着した GFP 陽性細胞数 } (N) = \rho V = \frac{nV}{S(L+D)} = \frac{n}{S} \times \frac{V}{L+D}$$

実験 : NASH モデルマウスにおける CD34 陽性細胞移植の効果とその作用機序の解明

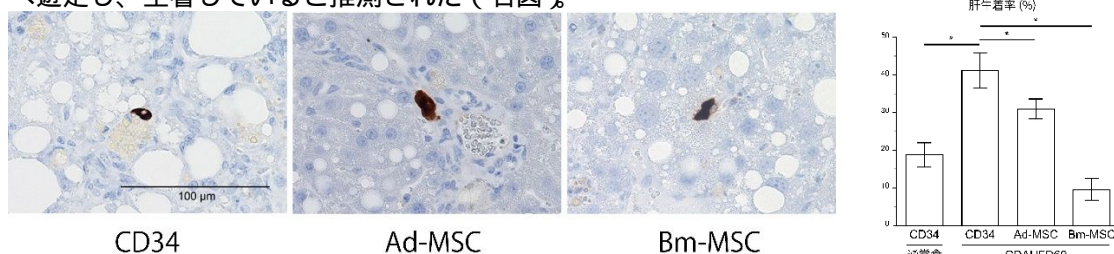
実験の結果、CD34 陽性細胞がもっとも肝臓に生着していた。CD34 陽性細胞を用いた BDDS 製剤を開発するため、CD34 陽性細胞の NASH モデルマウスにおける効果および作用機序の解明を試みた。

NASH マウスは CDAHFD60 を給餌させ、12 週間給餌群を軽度線維化群、20 週間給餌群を高度線維化群とし、各々に 1 回 (CD34s) もしくは 2 回 (CD34d) の培養 CD34+ 陽性細胞移植を行い、細胞移植を行わなかった群 (Vehicle) と肝組織像、生化学検査を比較した。さらに高度線維化群において、通常食を給餌したマウス (NCD) Vehicle 群と CD34d 群で RNA-seq 解析を行った。

### 4. 研究成果

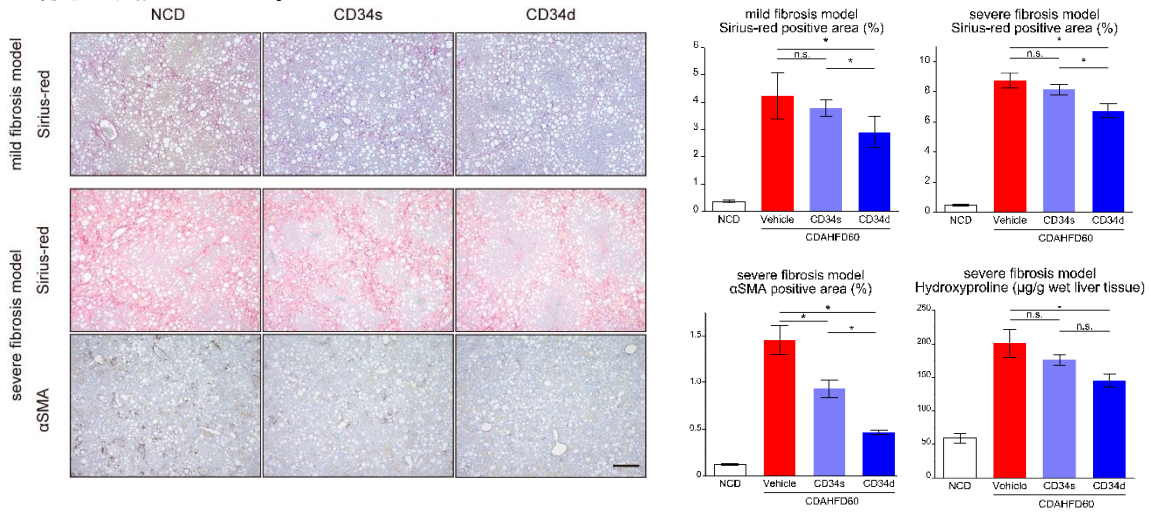
実験

CD34 陽性細胞、脂肪由来 MSC (Ad-MSC)、骨髄由来 MSC (Bm-MSC) において、NASH モデルマウス肝臓への生着率を算出した。その結果、3 つの移植細胞はそれぞれ肝臓に生着していることが観察された (左図)。さらに、CD34 陽性細胞の生着率が Ad-MSC、Bm-MSC に比べ優位に高く、また通常食を給餌したマウスに移植した場合と比べても生着率が増加しており、肝障害に伴い肝臓へ遊走し、生着していると推測された (右図)。

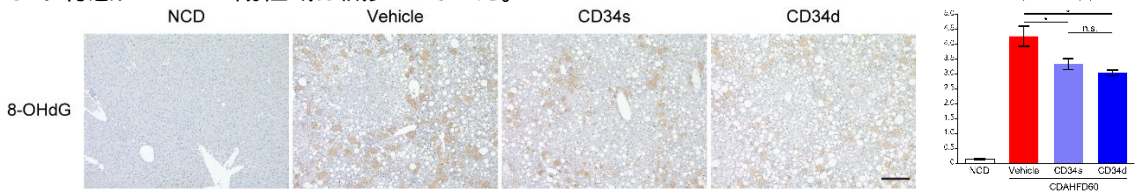


## 実験

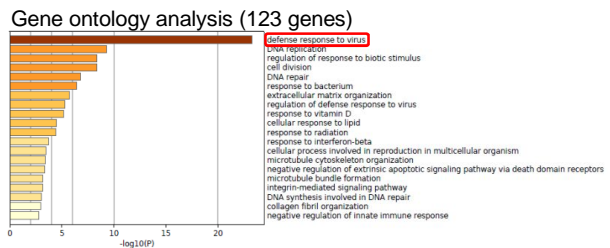
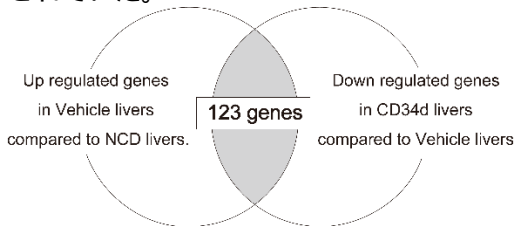
軽度線維化群、高度線維化群の両群で細胞移植により Sirius-red 染色による肝線維面積率は減少し、また SMA 陽性域も減少しており、線維を産生する星細胞の活性化が抑制されていた。さらにコラーゲン蓄積量の定量評価のため、Hydroxyproline 量を測定したところ、細胞移植により有意に減少していた。



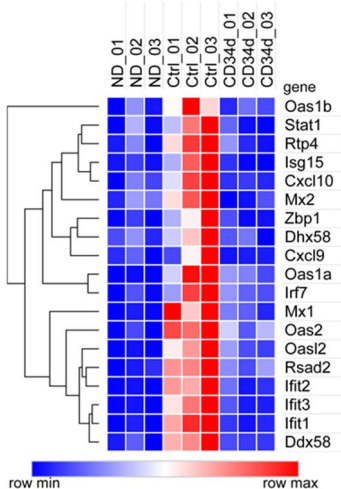
生化学検査ではAST、ALTは有意に低下した。また、細胞死を示すTUNEL陽性の肝細胞数も減少していた。一方で細胞増殖を示すKi-67陽性肝細胞は増加していた。肝細胞の細胞死が抑制していたため、肝細胞の酸化ストレスを評価するため8-OHdG免疫染色を行ったところ、細胞移植により有意に8-OHdG陽性域は減少していた。



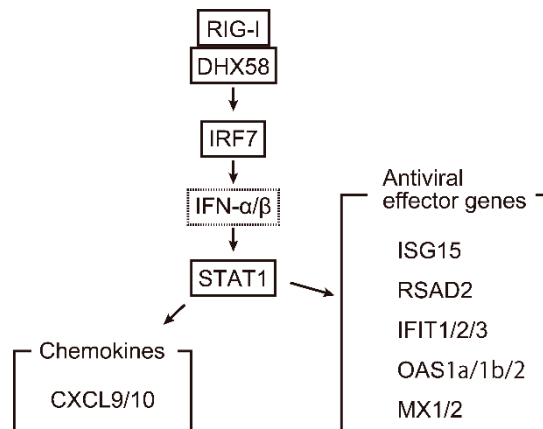
これらの抗線維化作用、抗炎症作用が起こったメカニズムを明らかにするために、NCD群、Vehicle群、CD34d群の三群でRNA-seq解析を行った。RNA-seqデータを基にNCD群と比べVehicle群で発現亢進した遺伝子群の中から、CD34d群で有意に減少した遺伝子群を123個抽出した。それらを用いてGO解析を行うと“Defense response to virus”というカテゴリーに所属する遺伝子群が突出して抑制されており、特に*Ddx58(Rig-I)/Irf7/Stat1/Cxcl10*シグナル経路が抑制されていた。



“Defense response to virus”のヒートマップ



*Ddx58(Rig-I)/Irf7/Stat1/Cxcl10*シグナル経路

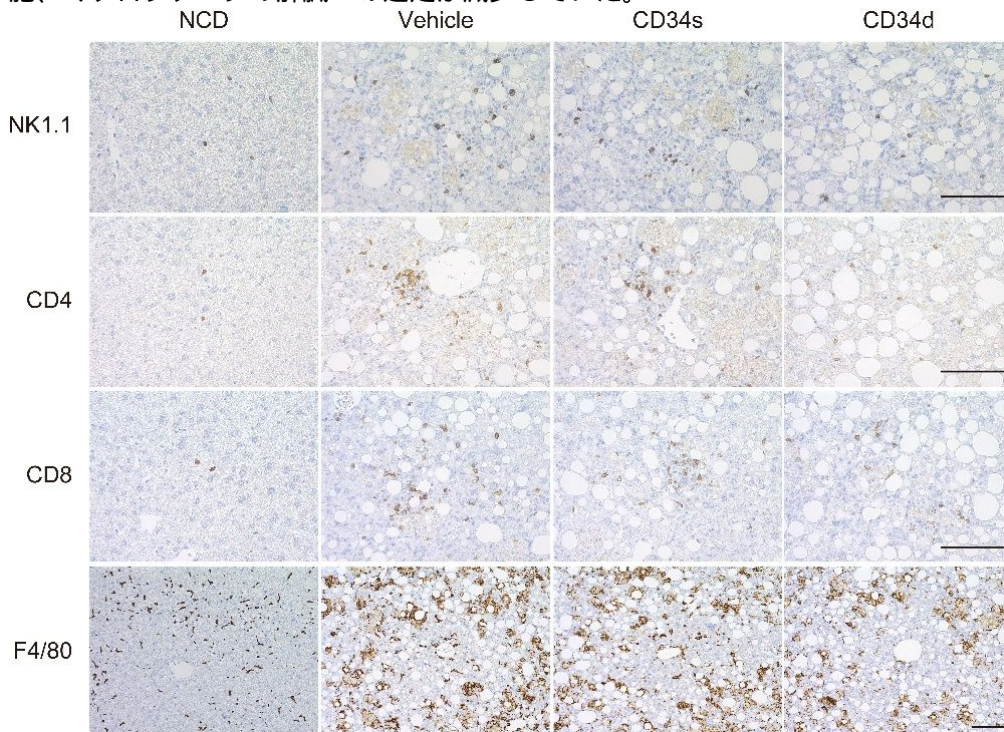


RIG-I と DHX58 は細胞質内のウイルス由来の RNA を認識する、RIG-I like receptor family



(RLRs)の一つである。近年 RLRs がウイルス由来だけでなく自身の RNA を認識し、炎症や自己免疫性疾患を引き起こすことが報告されている。さらに、NASH 患者や CDAHFD を給餌した NASH モデルマウスにおいて RLRs の一つである MDA5 が特に macrophage で発現増加しており、NASH の炎症に関わることが報告された(Kawaguchi S et al; Inflammation,2022)。MDA5 は RNA-seq 解析では抽出されなかったが、Real-time PCR 解析では NCD 群と比較し Vehicle 群で増加し、CD34d 群で減少傾向を認めた。

肝組織中の各 IFN 濃度を測定すると、CD34d 群で IFN- $\gamma$  が減少しており、*Irf7* の発現抑制から IFN- $\gamma$  が減少し、*Stat1* シグナルが抑制されたものと考えられた。さらに CXCL10 蛋白濃度も減少していたため、CXCL10 により動員される NK 細胞、T 細胞、マクロファージの肝臓への遊走も抑制されることが予想され、各種免疫細胞を免疫染色で確認したところ、NK 細胞、CD4 陽性 T 細胞、マクロファージの肝臓への遊走が減少していた。



以上のことから、CD34 陽性細胞移植は線維化の程度に関わらず、NASH モデルマウスの肝線維化を抑制し、その機序の一つとして CD34 陽性細胞移植が、RLRs/IRF7/IFN- $\gamma$ /STAT1/CXCL10 シグナルを抑制することで、肝細胞の脂肪毒性に伴い異常に活性化した自然免疫を調整したことが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 増田 篤高
2. 発表標題 培養CD34陽性細胞はNASH脂肪肝に生着し肝線維化を抑制する
3. 学会等名 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田 篤高
2. 発表標題 培養CD34+細胞移植のNASHモデル脂肪肝に対する肝線維化抑制作用と肝再生促進作用
3. 学会等名 JDDW2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田 篤高
2. 発表標題 Ex vivo expanded CD34+ cell transplantation attenuates liver fibrosis via inhibition of STAT1/CXCL10 axis in the NASH mouse
3. 学会等名 AASLD (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田 篤高
2. 発表標題 The anti-fibrotic effect of ex vivo-expanded CD34+ cell transplantation in a mouse model of NASH
3. 学会等名 APASL-single topic conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田 篤高
2. 発表標題 NASHモデルマウスにおける培養CD34陽性細胞移植の抗線維化・抗炎症作用と免疫細胞遊走抑制
3. 学会等名 肝類洞壁細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田 篤高
2. 発表標題 培養CD34陽性細胞はNASHモデル脂肪肝に生着し、炎症・線維化を抑制する
3. 学会等名 酸化ストレスと肝研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田 篤高
2. 発表標題 NASHモデルマウスにおける培養CD34陽性細胞移植療法の抗線維化作用
3. 学会等名 肝類洞壁細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田 篤高
2. 発表標題 培養CD34陽性細胞はNASH脂肪肝に生着し肝線維化を抑制する
3. 学会等名 日本消化器病学会総会
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
---------	---------