

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07970

研究課題名(和文) 脂肪幹細胞付きシートによる肝線維化改善の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the Molecular Mechanism of Liver Fibrosis Improvement with Implantation of Adipose Stem Cells Cultured on Discs

研究代表者

尾崎 一晶 (OZAKI, Kazuaki)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20329379

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)：特殊なシート上でヒト脂肪組織由来幹細胞(ADSC)を培養しラット硬変肝に貼付の結果、離れた肝葉でも肝線維化の改善とTGF- β 1、 α -SMAの発現抑制を認め、ADSCの産生した因子が血行性に拡散し作用した可能性が示唆された。ADSC投与にて血清AST、ALT、総蛋白、アルブミン値は用量依存性に改善し、免疫染色で細胞増殖マーカーPCNAの増加を認めたため、肝細胞再生による肝機能の改善が示唆された。ラット肝細胞とADSCを共培養し四塩化炭素を投与したところ、エクソソームを通さない0.03 μ m孔径のフィルターを用いても細胞死は抑制されず、ADSCの産生する因子がエクソソームではない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

肝移植に代わる肝硬変の根治療法が模索されている状況で、我々は脂肪由来幹細胞(ADSCs)をシート上で培養しそのまま硬変肝に貼付する方法で肝線維化が改善することを見出し、その詳細な機序は不明であった。本研究で示唆された「移植したADSCsから放出されるある種の因子が血行性に拡散して作用し、TGF- β 1の発現を抑制することにより肝星細胞の活性化が低下する結果、肝線維化が抑制される」という機序は、今後の臨床試験へ向けてのプロトコール開発に寄与するものであり、学術的意義および社会的意義が高いものとする。

研究成果の概要(英文)：Culturing human adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) on a specialized disc and applying it to cirrhotic livers in rats resulted in the improvement of hepatic fibrosis and suppression of TGF- β 1 and α -SMA expression even in distant liver lobes. This suggests that factors produced by ADSCs might have diffused systemically through the bloodstream. ADSCs administration led to dose-dependent improvements in serum AST, ALT, total protein, and albumin levels. Immunostaining revealed an increase in the cell proliferation marker PCNA, indicating liver function improvement through hepatocyte regeneration. When rat hepatocytes and ADSCs were co-cultured and exposed to carbon tetrachloride, cell death was not suppressed even with a 0.03 μ m filter that prevents exosome passage, suggesting that the factors produced by ADSCs might not be exosomal.

研究分野：肝臓病学

キーワード：ヒト脂肪由来幹細胞 脂肪由来幹細胞付きシート 肝硬変モデルラット 肝線維化改善

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現時点における肝硬変の根治法は肝移植のみであるが、高侵襲、高コストかつドナー不足等の問題があるため、代替となる治療法の確立は喫緊の課題である。近年、脂肪由来幹細胞 (ADSCs) による再生医療が注目されており、肝においては、ADSCs の経脈管投与による肝再生の研究が行われてきたが、ADSCs の肝への定着率の低さや塞栓のリスクなどが懸念されてきた。一方我々は、特殊なシート上で培養した ADSCs をシートごと、実験的に作成したラット硬変肝に貼付する独自の手法で肝線維化が改善するのを確認していたが、その詳細な機序は不明であった。

2. 研究の目的

- (1) 上述の、ADSCs 付きシート貼付による肝線維化改善の機序を分子レベルで明らかにする。
- (2) ADSCs の足場となるシートの最適化を進める。

3. 研究の方法

(1) ADSCs 付きシートの作成：本学の倫理審査委員会の承認および患者からの同意を得て、腹部皮下脂肪吸引術時に採取した脂肪組織を市販の Lipogems®を用いて無菌的に破碎・洗浄・濃縮し、市販のキット (カタログ番号 BMK-R001, バイオ未来工房) を用いて ADSCs を分離し、ハイドロキシアパタイトを塗布した直径 2cm のポリエチレン-ポリプロピレン (PE-PP) シート上に散布し、培養した。なお、細胞の一部を FACS 装置に供し、flow cytometry にて幹細胞およびヒト由来の様々なマーカーについて分析した。さらに、脂肪細胞および骨細胞への分化能を確認するため、それぞれの分化培地で培養後、AdipoRed 染色および Alizarin Red 染色を行った。

(2) 肝硬変モデルラットの準備：6 週齢の Wister 系雄性ラット 15 匹に 50% 四塩化炭素 (0.1ml/100g 体重) を週に 2 回、8 週間皮下に注射した。別の 5 匹のラットはオリーブ油のみ注射し、対照群とした。8 週間後、四塩化炭素投与群の 5 匹を安楽死させ、肝線維化の程度を評価した。

(3) ADSCs 付きシートのラット肝への貼付：四塩化炭素投与群の残り 10 匹を無作為に 5 匹ずつ 2 群に分け、イソフルラン麻酔下で腹部を剃毛し 70% エタノールで消毒したのち上腹部を切開し、ADSCs が 80% 以上のコンフルエンスに達した直径 2cm のシート (ADSCs 群) または ADSCs を含まないシート (ADSCs 対照群) を肝右葉表面に貼付し、縫合糸で閉腹した。

(4) 血液および肝の採取：ADSCs 群および ADSCs 対照群ともに、同量の四塩化炭素を週 1 回さらに 8 週間注射し、肝線維化を維持した。対照群には同量のオリーブ油を投与した。注射開始後 16 週で全ラットをイソフルランで麻酔し、右頸静脈から血液を採取後断頭し、速やかに肝を摘出した。シートを貼付した右葉のみならず、シートを貼付していない左葉からも 3mm 厚の組織を切り出し、10% ホルマリンで即座に固定した。

(5) 血清中の AST、ALT、総蛋白、アルブミン値の測定：血清を分離後、血清中の AST、ALT、総蛋白およびアルブミン濃度を、動物検体用の自動分析装置を用いて測定した。

(6) 肝組織の病理組織学的評価：肝組織をパラフィンブロックに包埋し 5 μ m 厚の切片を作成後、肝線維化の程度を評価するため Azan trichrome 染色を行った。

(7) ADSCs による肝線維化改善機序の解析：

上述の切片を用いて、TGF- 1、-SMA の免疫組織化学染色を行った。以上の染色強度は、Image-Pro Discovery ソフトウェア (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) を用いて定量した。また、ADSCs がヒト由来であることを示すために Lamin B1 を、同じく幹細胞であることを示すために CD73 を、免疫組織化学染色を行い検討した。

後日、投与する ADSCs を増やして追加実験を行った。すなわち、肝に貼付する ADSCs 付きシート数を 1, 1.5 枚および 2 枚とした 3 群を設定し、上記(5)、(6)および、細胞増殖マーカーである抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色を行った。

in vitro の実験として、ラット肝細胞と ADSCs を共培養し、四塩化炭素投与による細胞生存率の差を比較した。すなわち、独立したウェルで両者を 24 時間培養後、両者に四塩化炭素を添加し 6 時間静置した。その後、培養液を交換して四塩化炭素を除去し、共培養を開始した。この際、ウェルを仕切るフィルター径を、0.6 μ m および 0.03 μ m の異なるものとした。共培養開始 42 時間後に鏡検し、細胞生存率を計測した (n=6)。

4. 研究成果

(1) ヒト皮下脂肪組織から分離、培養した細胞は、flow cytometry および、分化培地で培養後の AdipoRed 染色および Alizarin Red 染色にて、分化能を有する幹細胞であることが確認された。また、上記の方法で四塩化炭素を投与したラットに肝硬変が生じ、屠殺まで維持されるのを組織学的に確認した。

(2) 肝組織の Azan trichrome 染色結果を示す。四塩化炭素投与中でも、ADSCs 付きシートを 8 週間貼付すると、肝線維化は著明に改善した。(図 1A,B,D)。同様の改善は、シートを貼付した右葉のみならず、シートを貼付していない左葉でも認められた。(図 1C,D)。なおシートは、貼付 8 週間後も肝表面に残存していた(図 B 下)。

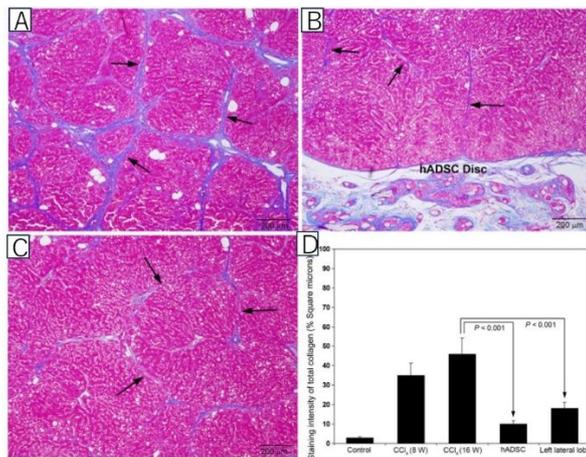


図 1 肝組織の Azan trichrome 染色

(3) TGF- β 1 および α -SMA の染色は、オリーブ油を 16 週間投与した対照群では全く認めなかった(図 2A, 3A)。四塩化炭素投与中は、肝の線維化部分で TGF- β 1 および α -SMA の顕著な染色が認められたが(図 2B, 3B) ADSCs 付きシートの 8 週間貼付にていずれも染色強度が顕著に減少した(図 2D, 3D)。これは、シートを貼付していない左葉でも同様であった(図 2E, 3E)。TGF- β 1 は、静止肝星状細胞から筋線維芽細胞様細胞への分化を誘導し、肝線維化を誘発する重要な因子である。また α -SMA の発現は静止肝星状細胞の活性化のマーカーと考えられていることから、移植した ADSCs から放出されるある種の因子が血行性にパラクリン機構を介して作用し、TGF- β 1 の発現を抑制することにより肝星細胞の活性化が低下し、肝線維化が抑制されたことが強く示唆された。

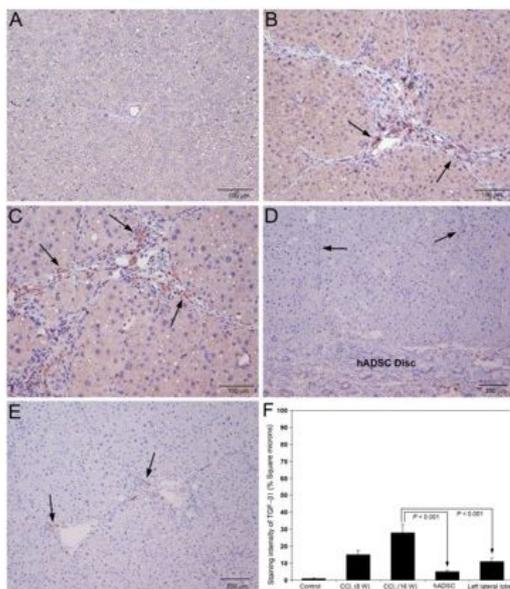


図 2 肝組織の TGF- β 1 の免疫染色

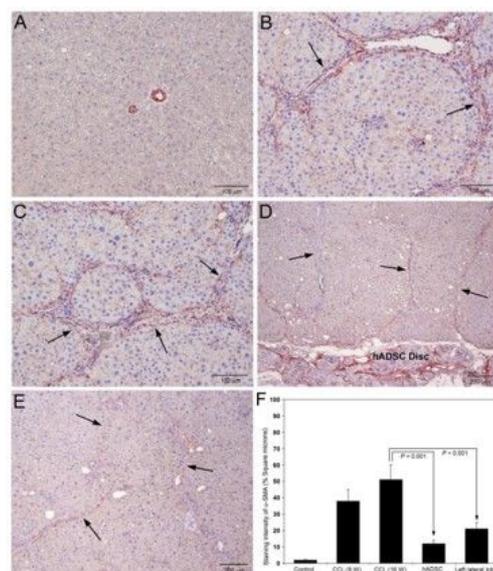


図 3 肝組織の α -SMA の免疫染色

(4) シートのみ貼付した対照群の肝組織では Lamin B1 陽性細胞を認めなかったが(図 4A) ADSCs 付きシートを貼付した肝組織では認められ(図 4B) CD73 も陽性であった(図 4D)。Lamin B1 はヒトの細胞で高度に保存されたマーカーであり、CD73 は脂肪由来幹細胞を示すマーカーであるため、シートで肝表面に移植したヒト由来 ADSCs は、異種であるラット肝組織中でも、少なくとも 8 週間は保たれることが確認された。なお、CD73 は T リンパ球や B リンパ球のサブセット、胆道上皮細胞、類洞内皮細胞にも発現しているため、ADSCs を含まないシート近傍の肝実質でも中程度の染色が認められた(図 4C)。

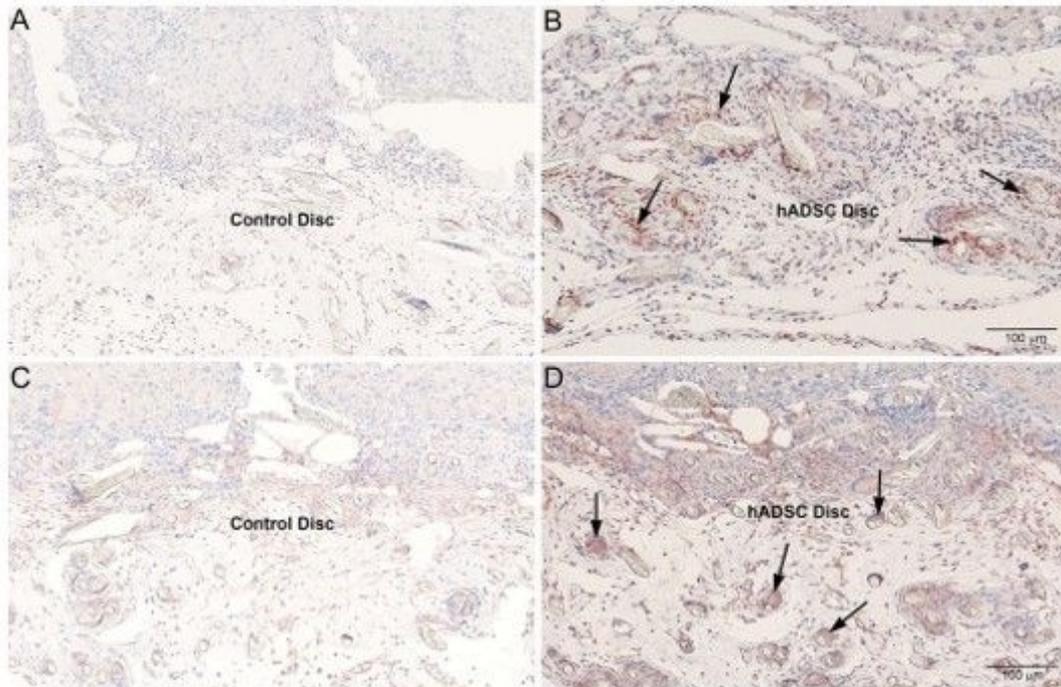


図4 ADSCs 付きシート貼付 8 週後の肝組織における Lamin-B1 および CD73 の免疫染色

(5) 血清 AST および ALT 値は、8 週間の四塩化炭素の投与により著しく上昇したが、ADSC 付きシート貼付 8 週後にほぼ基準値へ回復した。対照群と治療群で有意差はなかった。血清総蛋白は、8 週間の四塩化炭素の投与により減少したが、ADSC 付きシート貼付 8 週後、基準値に回復した ($P < 0.01$)。血清アルブミン値は、オリーブ油投与群と比較し、四塩化炭素投与 8 週および 16 週後の両方で有意に ($P < 0.001$) 低下したが、ADSC 付きシート貼付 8 週後は基準値に回復した。

(6) 肝に貼付する ADSCs 付きシート数を 1, 1.5 枚および 2 枚と増やして検討したところ、血清 AST、ALT、総蛋白、アルブミン値は用量依存性に改善したが、肝線維化の改善は plateau であった。しかし、免疫染色で細胞増殖マーカー PCNA は用量依存性に増加した (図 5)。したがって、ADSCc 投与による肝機能改善の機序が肝細胞再生であることが示唆された。

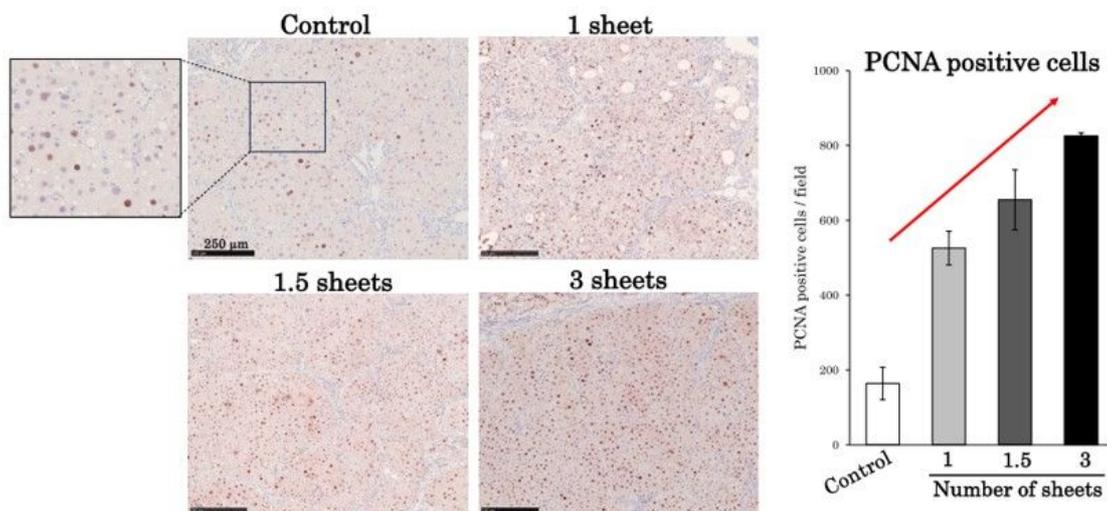


図5 ADSCs 付きシート貼付 8 週後の肝組織における PCNA の免疫染色

(7) ラット肝細胞と ADSCs を共培養し四塩化炭素を投与した結果、ウェル間を仕切るフィルターの孔径が $0.6\mu\text{m}$ でも、エクソソームを通さない $0.03\mu\text{m}$ であっても、細胞生存率に差は認めなかった。したがって、ADSCs の産生する因子がエクソソームではない可能性が示唆された (図 6)。

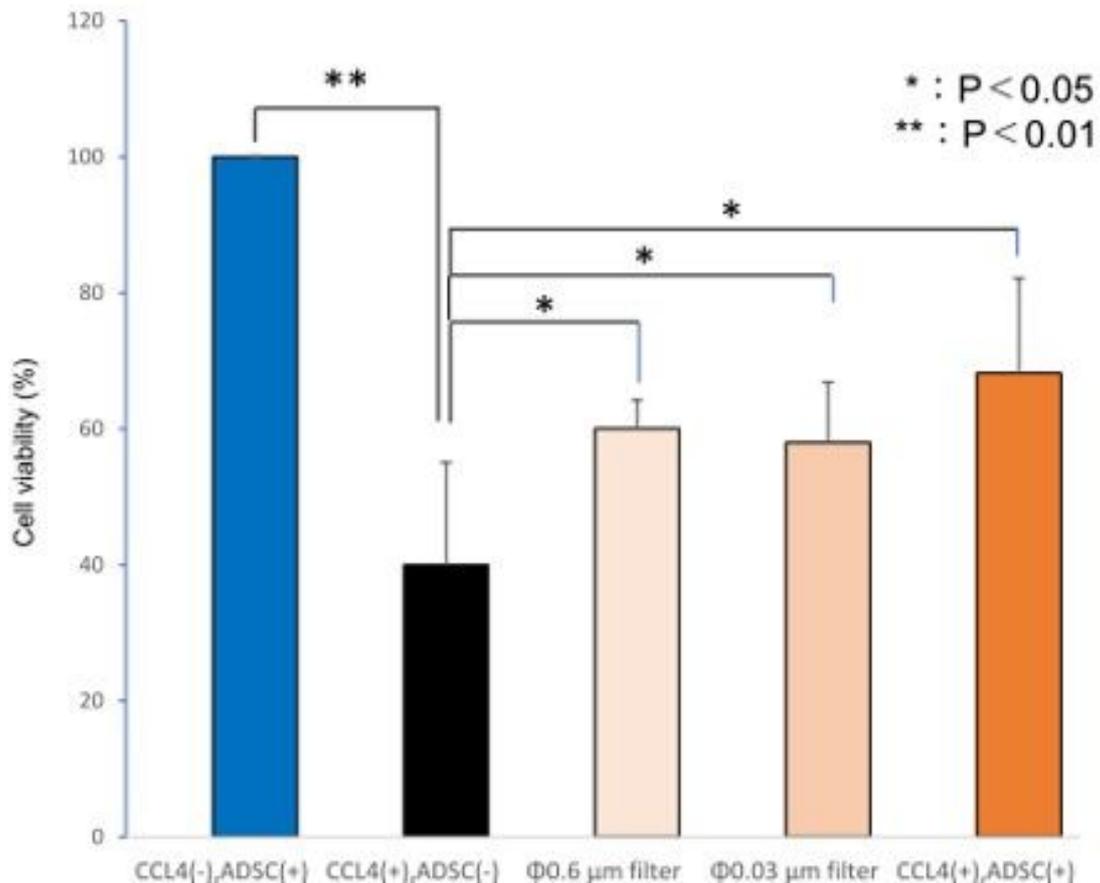


図 6 四塩化炭素投与下でのラット肝細胞と ADSCs の共培養における細胞生存率

(8) ADSCs の足場となるシートの最適化について : ADSCs を肝表面に移植する足場 (scaffold) として、本研究で用いた、ハイドロキシアパタイトで被覆された非生分解性のポリエチレン-ポリプロピレン性シートは有用と考えられた。しかし究極的には、宿主の免疫学的反応を惹起せず最終的には完全に消失する「生分解性」の足場が望ましいと考えられる。そこで、線維メーカーと提携し、種々の素材、製法によるシートの提供を受けてラット肝に貼付する予備実験を繰り返したが、本研究実施期間中には、ADSCs の足場として最適なシートを見出すことはできなかった。今後も研究を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nomura Masateru, George Joseph, Hashizume Chieko, Saito Takashi, Ueda Yoshimichi, Ishigaki Yasuhito, Tsuchishima Mutsumi, Tsutsumi Mikihiro	4. 巻 28
2. 論文標題 Surgical implantation of human adipose derived stem cells attenuates experimentally induced hepatic fibrosis in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular 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） 10.1186/s10020-022-00566-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野村匡晃
2. 発表標題 硬変肝に対するヒト脂肪組織由来幹細胞シート貼付後の動態とその有用性
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋爪智恵子、堤幹宏、土島睦
2. 発表標題 硬変肝に対するヒト脂肪組織由来幹細胞シート貼付後の動態とその有用性の検討
3. 学会等名 第29回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋爪智恵子、堤幹宏、土島睦
2. 発表標題 ヒト脂肪組織由来幹細胞（hADSCs）シート数と肝硬変における肝機能改善効果：硬変肝ラットモデルでの検討
3. 学会等名 第31回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2023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
研究 分担 者	飯田 安保 (IIDA Yasuo) (10337173)	金沢医科大学・一般教育機構・准教授 (33303)	

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
---------	---------