



Title	羊膜間葉系幹細胞由来細胞外小胞の慢性肝障害モデルに対する抗炎症・抗線維化効果 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	大原, 正嗣
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13432号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/74239
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号 : 2446
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Masatsugu_Ohara_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 大原 正嗣

学 位 論 文 題 名

羊膜間葉系幹細胞由来細胞外小胞の慢性肝障害モデルに対する抗炎症・抗線維化効果
(Extracellular vesicles from amnion-derived mesenchymal stem cells ameliorate
hepatic inflammation and fibrosis in rats)

【背景と目的】非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)は肥満人口の増加に伴い全世界的に急増している。我が国においてもメタボリックシンドロームの患者数が増加し、検診や人間ドックのデータでは、日本人の 30%の割合で脂肪肝を合併していることが報告されている。NAFLD は組織学的所見から脂肪沈着のみである非アルコール性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver, NAFL)と脂肪沈着だけでなく炎症細胞や線維化を伴う非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)に分類される。NASH は脂肪肝に組織学的な炎症細胞浸潤、線維化などをともなった病態であり、経時的変化で肝硬変・肝細胞癌を発症することがわかっている。本疾患は近年、ウイルス性肝炎と比較して増加傾向であるが、NASH に対する標準治療はなく治療薬の開発が望まれている。さらに肝線維症・肝硬変についても最終的な治療としては肝移植しかないのが現状であり、抗炎症・抗線維化治療法が開発が望まれている。間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell, MSC) は再生医療の分野において様々な臓器傷害に対しての有効性が示され、その機序として細胞外小胞(Extracellular vesicles, EVs)を含む液性因子によるパラクライン効果が重要と考えられている。本研究では MSC の source として医療廃棄物である羊膜 (amnion)を使用し、羊膜 MSC 由来 EV (AMSC-EV)の *in vivo* (高脂肪食誘発 NASH モデルおよび四塩化炭素誘発肝線維症モデル)、*in vitro* での抗炎症・抗線維化効果について明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】AMSC-EV の抽出 : AMSC を confluent になるまで培養してから無血清培地に交換して、48 時間培養し無血清培養上清を回収した。その培養上清を超遠心法 (100,000g、70 分、4°C、2 回) を用いて抽出した。続いて、走査型電子顕微鏡で形態を、qNano で粒子サイズを、ウェスタンブロット法で EV マーカーとされる CD81 を検出し、EV が抽出されていることを同定した。*in vivo* : 6 週齢雄性 Sprague-Dawley (SD)ラットに対して、高脂肪食を 4 週間投与して NASH モデルを作成した。肝線維症モデルは 2 mL/kg (CCl₄:オリーブ油=1:1) を 6 週間、週 2 回腹腔内投与して作成した。AMSC-EV は、NASH モデル (15 µg/kg) では第 3、4 週目、肝線維症モデル(20 µg/kg)では第 3 週目に静脈内投与した。肝組織の免疫染色および炎症・線維化関連因子の発現を定量的 RT-PCR 法で測定した。*in vitro* : AMSC-EV の炎症反応や線維化に対する効果について、培養ラットクッパー細胞(Kupffer cells, KCs)および星細胞 (Hepatic stellate cell, HSCs)を用いて検討した。また Lipopolysaccharide (LPS)-Toll like receptor4 (TLR4) signal に関して Human embryonic kidney cells (HEK293)、TLR4 を強発現させた HEK293 (293/hTLR4A-MD2-CD14) を

用いて、nuclear factor kappa B (NFκB)のリン酸化や NFκB の転写活性について、ウエスタンブロット法や Reporter-gene assay を用いて検討した。

【結果】 走査型電子顕微鏡では球形の小胞であることが観察され、qNano ではその粒子サイズはおよそ 100nm にピークを持つ粒子であった。CD81 のウエスタンブロットでバンドは検出され、以上より EV であることを確認した。ラット NASH モデルでは H&E 染色で脂肪滴の蓄積を認め炎症細胞浸潤を認めることから NASH モデル作成が確認された。CD68 染色において AMSC-EV は Kupffer 細胞数を HFD 投与群と比較し有意に減少させ、tumor necrosis factor (TNF)-α や interleukin (IL) - 1β などの炎症性サイトカインの mRNA 発現を有意に抑制していた。特に M1-macrophage のマーカーとされる CD11c の mRNA 発現を有意に抑制していた。肝線維症モデルでは AMSC-EV は線維化, Kupffer 細胞の数, 星細胞の活性化を有意に抑制した。in vitro では AMSC-EV は培養ラット Kupffer 細胞および星細胞において LPS 刺激下での TNF-α の発現を抑制した。また、LPS 刺激のシグナル伝達における NFκB のリン酸化および NFκB の転写活性を抑制した。しかし、TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)の plasmid をトランスフェクションし強発現させた場合はこの転写活性を抑制できなかった。

【考察】 これまで MSC-EV の動物肝障害モデルにおける効果の報告は 2013 年以降に散見されるようになったが、NASH モデルにおける効果や AMSC-EV を用いた報告はこれまでなかった。MSC を用いた NASH への有効性についてはパラクライン効果を介していると報告されている。NASH 発症は multiple parallel hit 説といわれるように様々な機序が判明し、LPS-TLR4 signal を介した炎症誘導もその機序の一つである。本研究では in vitro での Kupffer 細胞の活性化を AMSC-EV が抑制しており、HEK293 を用いた実験では AMSC-EV は TRAF6 より上流の比較的早いステップの部分に作用している可能性が示唆された。MSC の NASH や肝線維症モデルへの有効性は報告されているが、MSC の静脈内投与は肺塞栓症などを引き起こし動物死の原因になることも報告されており、非細胞治療への関心が高まりつつある。EVs は、パラクライン効果の主要因子の一つであることが想定され、今後の非細胞治療としての役割が期待されている。

【結論】 AMSC-EV は Kupffer 細胞や星細胞の活性化の抑制を介して、炎症および線維化を抑制していることが示唆された。AMSC-EV 投与は慢性肝障害に対する新規治療法として期待される。