



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	<a href="http://hdl.handle.net/2115/74239">http://hdl.handle.net/2115/74239</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/</a>
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_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称      博士（医 学）      氏 名 大原 正嗣

主査      武富 紹信  
審査担当者 副査      本間 明宏  
副査      平野 聡  
副査      岩永 敏彦

### 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)

本研究で申請者は、ラットを用いた NASH (non-alcoholic steatohepatitis) および肝線維症モデルに対して、羊膜間葉系幹細胞由来細胞外小胞 (extracellular vesicles from amnion-derived mesenchymal stem cells, AMSC-EVs) 投与による抗炎症・抗線維化効果について検討した。

*In vivo* では、6 週齢ラットで high-fat diet (HFD) 誘導 NASH モデルを作成し、AMSC-EV を投与した。評価項目としては、マクロファージ浸潤の評価目的に肝組織の CD68 免疫染色による病理学的評価及び炎症関連遺伝子発現について検討した。CD68 染色におけるマクロファージの浸潤を AMSC-EV 投与群では HFD 投与群に比較して、有意に抑制しており、炎症関連遺伝子の発現も有意に抑制した。続いて 6 週齢ラットで、carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) 誘導肝線維症モデルを作成し、AMSC-EV を投与した。評価項目は肝病理学的評価を用いた。線維化定量目的に行った Masson's trichrome 染色では CCl<sub>4</sub> 投与群に比較し AMSC-EV 投与群で有意に線維化を抑制した。また星細胞の活性化マーカーである  $\alpha$ SMA 染色や CD68 染色いずれにおいても同様に抑制した。これらよりマクロファージおよび星細胞の活性化抑制を介して肝の炎症・線維化を改善させている可能性が示唆されたため、*in vitro* ではラット肝から抽出したクッパー細胞、星細胞を使用した。抗炎症効果を検討目的に lipopolysaccharide 刺激に対して AMSC-EV の効果を検討し、いずれの細胞においても炎症性サイトカインの発現を抑制した。さらにシグナル経路については、nuclear factor-kappa B のリン酸化やその転写活性を AMSC-EV が抑制した。以上より AMSC-EV はクッパー細胞や星細胞の活性化を抑制することにより肝の炎症・線維化を抑制していることを考察し、今後の NASH・肝線維症への新規治療薬の一助となることを示した。

審査にあたり、まず副査の本間教授より、他の疾患モデルの検討の有無、AMSC-EV 投与量の設計、有害事象についての質問があり、申請者は所属研究室にて現在、薬剤誘導腸炎モデルについての効果を検討中であること、複数回投与などの方がより効果が期待できる可能性があり今後検討していくこと、EV 投与自体に関しての安全性は他の MSC 由来 EV で報告はあるが、今回の基礎実験での死亡ラットについては CCl<sub>4</sub> 長期投与による肝不全死が考慮されると回答した。続いて、副査の平野教授より、MSC の有効性および EV の放出のされ方や細胞内への取りこまれる仕組みについて質問があった。申請者は、MSC の有効性についてはその自己複製能や組織分化能の他に、MSC が分泌する多数の液性因子がもたらすパラクライン効果が主であり、EV もその一部と考えられるが、まだその詳細については解明しきれていないこと、EV は多包性エンドソームの過程を経て細胞膜と融合し放出されたり、細胞膜が陥没し細胞外に放出されることまではわかっており、細胞内に取り込まれる過程を観察する実験系は可能であるがまだ詳細は不明であると回答した。また副査の岩永教授からは、EV の静脈投与における肝臓への集積の有無、細胞特異的に取り込まれるのかについて質問があり、申請者は蛍光標識をした AMSC-EV を投与することで、実際の体内動態を検証することが可能ではあるが、未だそのような検討はされていないと回答した。最後に主査の武富教授より、動物モデルとヒトの NASH との整合性および、脂肪化の改善効果の有無、CCl<sub>4</sub> 誘発肝線維症モデルにおける AMSC と AMSC-EV の効果の違いについて質問があった。まず、NASH モデルについては炎症細胞浸潤の程度や体重の推移などヒトの NASH といまだ一致しない点も多く、モデル作成自体も今後の検討課題であること、また脂肪化については Oil-red-O 染色では有意差を認めなかったこと、MSC 投与が肝線維化を改善させる既報と同様なプロトコール実験を行いその効果は遜色はない可能性があり、由来細胞の性質を引き継ぐとされている EV の効果が期待されると回答した。

この論文は、AMSC-EV がラットの NASH・肝線維症モデルにおける治療効果およびその作用メカニズムを示した点で高く評価され、今後の肝の炎症・線維症に対する新規治療法開発につながることを期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。