HOKKAIDO UNIVERSITY

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
Author(s)	大原, 正嗣
Description	配架番号：2446
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13432号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13432
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74240
Type	doctoral thesis
File Information	Masatsugu_Ohara.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

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）

2019年3月

北　海　道　大　学

大　原　正　嗣

学　位　論　文

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）

2019年3月

北　海　道　大　学

大　原　正　嗣

目　　次

発表論文目録および学会発表目録　・・・・・・・・・・・・・・・・・1 頁

要旨　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2 頁

略語表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5 頁

緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・7 頁

方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・12 頁

結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・25 頁

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・39 頁

結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・42 頁

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・43 頁

利益相反　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・44 頁

引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・45 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の論文に発表した。

1. Masatsugu Ohara, Shunsuke Ohnishi, Hidetaka Hosono, Koji Yamamoto, Kohei Yuyama, Hideki Nakamura, Qingujie Fu, Osamu Maehara, Goki Suda, and Naoya Sakamoto
   Extracellular vesicles from amnion-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic inflammation and fibrosis in rats
   Stem Cells International, 2018, 3212643

本研究は以下の学会に発表した。

1. Masatsugu Ohara, Shunsuke Ohnishi, Koji Yamamoto, Kohei Yuyama, Hideki Nakamura, Qingjie Fu, Osamu Maehara, Goki Suda, Naoya Sakamoto
   Extracellular vesicles from amnion-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic inflammation and fibrosis in rats
   United European Gastroenterology Week 2018, 2018/10/21-24, Vienna, Austria

2. 大原正嗣、大西俊介、坂本直哉
   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
   JDDW(第 26 回日本消化器関連学会週間)、ワークショップ、2018 年 11 月 1-3 日、神戸

要旨

【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・抗線維化治療法の開発が望まれている。一方、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℃、2 回）を用いて EV を抽出した。続いて、走査型電子顕微鏡で形態を、qNano で粒子サイズを、ウエスタンブロット法で EV マーカーとされる CD81 の発現を確認し、EV が抽出されていることを確認した。*in vivo*：6 週齢雄性 Sprague-Dawley (SD)ラットに対して、高脂肪食 (high-fat diet, HFD)を 4 週間投与して NASH モデルを作製した。肝線維症モデルの作製には四塩化炭素 (carbon tetrachloride, CCl_4)を用いた。6 週齢雄性 SD ラットに対して、2 mL/kg (CCl_4：オリーブオイル = 1：1)を 6 週間、週 2 回腹腔内投与した。NASH モデルでは第 3、4 週目に AMSC-EV (15 μg/kg)を静脈内投与し、肝線維症モデルでは第 3 週目に AMSC-EV (20 μg/kg)を静脈内投与した。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および星細胞を用いて検討した。また lipopolysaccharide (LPS)–Toll-like receptor 4 (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 (NF-κB)のリン酸化や NF-κB 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 100 nm 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 HE 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 モデル作製が確認された。マクロファージのマーカーである CD68 染色において AMSC-EV は HFD 投与群と比較し、マクロファージの浸潤を有意に減少させ、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-マクロファージ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、マクロファージの浸潤、星細胞の活性化を有意に抑制した。*in vitro* では AMSC-EV は培養ラットクッパー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 NF-κB のリン酸化および NF-κB 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 LPS 刺激下でのクッパー細胞の活性化を 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お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 はクッパー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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AMSC: amnion-derived mesenchymal stem cell

ANOVA: analysis of variance

CCl_4: carbon tetrachloride

CCL: C-C motif chemokine ligand

CM: conditioned medium

CXCL: chemokine (C-X-C motif) ligand

DMEM: Dulbecco’s modified Eagle’s medium

EV: extracellular vesicle

EX: exosome

FBS: fetal bovine serum

gp: glycoprotein

HE: hematoxylin and eosin

HFD: high-fat diet

HLA: human leukocyte antigen

HSA: human serum albumin

HSC: hepatic stellate cell

IκB-α: inhibitor kappa B-α

IL: interleukin

IL6ST: interleukin 6 signal transducer

LBP: lipopolysaccharide-binding protein

LC-MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LPS: lipopolysaccharide

MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1

MEM: minimal essential medium

MIP: macrophage inflammatory protein

MSC: mesenchymal stem cell

MMP: matrix metalloproteinase

MV: microvesicle

MyD88: myeloid differentiation protein 88

NAFL: non-alcoholic fatty liver

NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease

NASH: non-alcoholic steatohepatitis

NF: normal skin fibroblast

NF-κB: nuclear factor-kappa B
PBS: phosphate-buffered saline
RIPA: radio-immunoprecipitation assay buffer
RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction
SD: standard deviation
SD: sprague-dawley
SEM: scanning electron microscopy
SMA: smooth muscle actin
TBS: tris-buffered saline
TGF: transforming growth factor
TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF: tumor necrosis factor
TNFRSF: tumor necrosis factor receptor superfamily member
TNFR: tumor necrosis factor receptor
TRAF: tumor necrosis factor receptor-associated factor
18S rRNA: 18S ribosomal RNA

緒 言

慢性的な組織障害は徐々に正常の細胞機能を損なわせ、肝、肺、腎などの様々な臓器機能障害を引き起こす (Higashi et al., 2017)。特に肝疾患領域において慢性肝炎の原因には、B 型・C 型ウイルス性肝炎やアルコール性肝炎、非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)、自己免疫性肝疾患などがある。近年、B 型肝炎に対する核酸アナログ製剤や C 形肝炎ウイルスに対する direct acting antivirals (DAA) 治療などの抗ウイルス療法の発展などによりウイルス性肝炎は以前に比較しコントロールされる時代となった一方で、食生活の変化などから NAFLD が増加傾向にある。NAFLD は、明らかな飲酒歴がないにも関わらず、肝組織所見で主に大滴性の肝脂肪沈着を認めたり、画像診断で脂肪肝を認める肝障害で、B 型・C 型ウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性胆管炎など他の肝疾患を除外した病態である。NAFLD には組織学的所見から脂肪沈着のみを認め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。近年わが国における NAFLD は、肥満人口・メタボリックシンドロームの患者数の増加により増加傾向である。また、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 (Amarapurkar et al., 2007)。 また NAFLD 全体の約 1～2 割を占める NASH においては、炎症や細胞障害、線維化を伴い肝硬変へ進行したり、肝細胞癌の発症原因となりえることが報告されている (Younossi et al., 2017a)。NASH は世界中でみても慢性肝疾患の要因として増加傾向であり、肝細胞癌、肝硬変、肝移植の原因疾患としても近年増加傾向である (Goldberg et al., 2017)(図 1)。

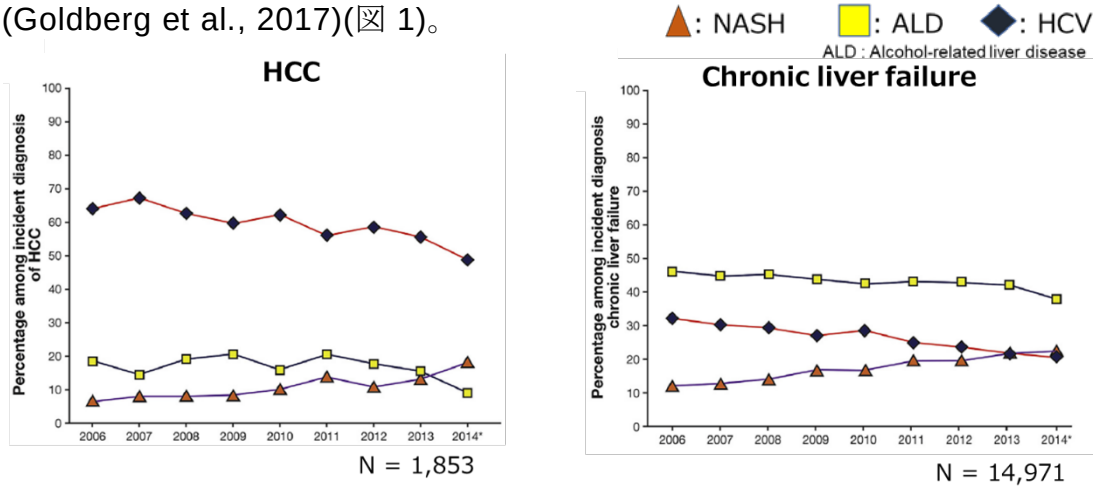


図 1：肝細胞癌・肝不全の成因別経時変化（Goldberg et al.2017 より引用）
左）2006 年から 2014 年に診断された肝細胞癌の成因
右）2006 年から 2014 年に診断された肝不全の成因

さらに NASH 肝硬変に限ると、5 年肝細胞癌発癌率は約 10%、5 年生存率は 75%で、死因は肝細胞癌や肝不全による肝関連死が約 80%と報告されている。そのため、その前段階での肝炎や肝線維症の進展抑制が必要とされている (Hashimoto and Tokushige, 2012)。

NAFLD は元来、脂肪蓄積により炎症性サイトカインやミトコンドリア機能障害などが生じる two hit 説として報告されていたが、現在は multiple parallel hit 説と称され様々な機序から発症することがわかってきている (Liu et al., 2016)。具体的には脂肪化や代謝障害、炎症、細胞障害、アポトーシス、酸化ストレスなどが挙げられ、こうした様々な要因から NAFLD が発症し、これら様々な機序を標的とした治療法の開発研究が行われている (Oseini and Sanyal, 2017)。現在、NAFLD の治療は食事や運動療法による体重減少が有用である。また、インスリン抵抗性を有する NASH においてはチアゾリジン誘導体が有効であることが報告されているが、長期間の効果についてのエビデンスはない (Ratziu et al., 2010)。またビタミン E の有用性も報告はあるが、こちらも長期投与に関するエビデンスが乏しいなどの問題がある (Sanyal et al., 2010)。したがって、いまだ NAFL/NASH に対する有用な治療薬がないのが現状である (Younossi et al., 2017b)。さらに、炎症が持続すると肝臓の線維化が進行し肝硬変にいたり、門脈圧亢進症や肝性脳症、肝不全などを呈す (Berardis et al., 2015)。肝硬変の治療としては、唯一の治療法は肝移植であるが、ドナー不足や費用面、長期間免疫抑制剤が必要になるなどの問題点がある (Campana and Iredale, 2017, Wang et al., 2017)。そのため、NASH や肝線維化に対する抗炎症・抗線維化治療薬の開発が望まれている。

近年、臓器傷害の修復や難治性疾患に対する再生医療が世界中で注目されるようになってきており、幹細胞を用いた細胞治療の研究開発が盛んに行われている。再生医療材料として間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs)は組織幹細胞の一つであり、その定義はプラスチックディッシュに接着すること、CD73 や CD90、CD105 を発現していること、中胚葉系の骨芽細胞・軟骨細胞・脂肪細胞など複数の系譜への分化能力を有していることとされている (Samsonraj et al., 2017)。MSC を利用した治療

は様々な臓器・組織に対して再生医療分野で幅広く研究されている (Tan et al., 2014, Squillaro et al., 2016)。MSC を用いた臨床試験は国内外ですでに 600 を超えておりその治療効果が期待されている。MSC の source としては、骨髄や脂肪組織、滑膜など多数あるが (Samsonraj et al., 2017)、例えば骨髄由来 MSC は骨髄採取が必要となり、身体への侵襲をともなう上に一度の採取で得られる細胞数は少量であることから、移植に必要な細胞数を確保するには一定の培養期間を要する。さらに MSC の増殖能は加齢に伴い低下することが報告されており (Stolzing and Scutt, 2006)、ドナーが高齢であった場合や、また様々な疾患を伴った患者から採取する場合などは治療に必要な質の高い細胞を獲得することが難しく、細胞治療において障害となる可能性がある。これらの問題点は脂肪細胞由来 MSC も同様である。一方、申請者の研究室では、羊膜 (amnion)から分離される MSC (amnion-derived MSC, AMSC)を用いた研究を行っている。胎児を包む卵膜は羊膜と絨毛膜から構成されている。受精後着床した胚盤胞に含まれる内部細胞塊に由来する羊膜芽細胞から羊膜は形成される (Miki and Strom, 2006)。ヒト羊膜には MSC が豊富に含まれていることが知られ、より若い細胞を大量に獲得できるという利点をもっている。また、羊膜は出産の際に破棄される医療廃棄物であり、非侵襲的に採取可能であることから倫理的問題を軽減できると考えられる。さらに羊膜は造血細胞や血管が少なく細胞成分が均一であり、膜状構造であるため酵素を用いて容易に MSC を分離できる。申請者の研究室では、ラット重症腸炎モデル (Onishi et al., 2015)やラット放射線性直腸炎モデル (Ono et al., 2015)、ラット膵炎モデル (Kawakubo et al., 2016)、ラット肝線維症モデル (Kubo et al., 2015)に対して AMSC を投与することにより改善が得られることを報告しており、その機序として投与した AMSC から分泌される液性因子の可能性を報告している。MSC の液性因子によるパラクライン効果としては、免疫調整や抗アポトーシス効果、抗線維化効果、抗炎症効果などが報告されており、既報でも MSC は分泌する液性因子を介したパラクライン効果と直接の分化を介した治療効果を発揮することができると報告されている (Lou et al., 2017, Liang et al., 2014)。しかしながら、投与された細胞の多くは目的の組織に生着できず、肺や肝臓、脾臓へトラップされてしまうことが推定されている (Eggenhofer et al., 2012)。さらに、申請者の研究室ではラットの重症腸炎 (Miyamoto et al., 2017)や硬化性胆管炎 (Sugiura et al., 2018)、皮膚のケロイドの活性化抑制 (Sato et al., 2018)、豚における食道・直腸の内視鏡的粘膜下層切除術後の狭窄 (Mizushima et al., 2017,

Tsuda et al., 2018)を羊膜 MSC の培養上清 (conditioned medium, CM)が改善させることを報告している (表 1)。また液性因子の解析として、CM 中の脂質を液体クロマトグラフ質量分析計 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)にて解析し、palmitoylethanolamide (PEA)という生理活性物質を同定し、この PEA が四塩化炭素誘発肝線維症モデルで抗線維化効果を有することを報告した (Ohara et al., 2018)。

表 1：AMSC および AMSC の培養上清 (CM)の抗炎症・抗線維化効果

Therapy	Model	Author	Year
AMSCs	Dextran sulfate sodium-induced colitis	Onishi R. *et al.*	2015
	Radiation proctitis	Ono M. *et al.*	2015
	Liver fibrosis	Kubo K. *et al.*	2015
	Acute and chronic pancreatitis	Kawakubo K. *et al.*	2016
AMSCs and CM gel	Trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis	Miyamoto S. *et al.*	2017
CM gel	Stricture after esophageal endoscopic submucosal dissection	Mizushima T. *et al.*	2017
	Stricture after rectum endoscpic submucosal dissection	Tsuda M. *et al.*	2018
CM	Sclerosing cholangitis	Sugiura R. *et al.*	2018
	Activation of keloid fibroblasts	Sato C. *et al.*	2018

また、液性因子の一つとして細胞外小胞 (extracellular vesicles, EV)という物質がある。EV は細胞から放出される粒子であり(Giebel et al., 2017)、構成物質として、30-120 nm の exosome (EX)と 50 nm-1 μM の microvesicle (MV)、apoptotic bodies などがある (Nooshabadi et al., 2018)。EX はエンドサイトーシスにより形成したエンドソームで、内側に出芽するように形成する膜小胞が腔内小胞と呼ばれるが、これを含む多胞性エンドソームが細胞膜と融合し、細胞外へ放出される小胞体を EX という。一方、MV は細胞膜から直接出芽する小胞体のことをいう。

EX と MV を区分けする特異的なマーカーはまだなく、国際細胞外小胞学会では実験的に得られたこれらの粒子をまとめて EV とみなすこととなっている (Borger et al., 2017)。EV の抽出方法としては、超遠心法や密度勾配遠心法、限外濾過法などが存在するが、現在は、超遠心法が gold-standard とされている。特に EX は CD9、CD63、CD81 といった表面抗原

がマーカーとして使用されることが多く、観察には電子顕微鏡が必要である。

EV には様々なサイトカインや mRNA、microRNA、growth factor、ミトコンドリアなどが多数内包されており、MSC 由来の EV は細胞増殖や抗炎症効果、免疫調整、抗線維化、抗アポトーシス効果といった由来細胞である MSC の作用と同等の作用をもつことが報告されている (Katsuda et al., 2013)ほか、EV は細胞間コミュニケーションを担う役割を果たすとも報告されている。動物モデルに対しての MSC-EV の効果については、脳神経疾患や心疾患、腎疾患や肝疾患などで報告されており、難治性疾患の新規治療法の一つとして盛んに研究されている (Borger et al., 2017)。

本研究では、ラットでの高脂肪食 (high-fat diet, HFD)誘発 NASH モデル、四塩化炭素 (carbon tetrachloride, CCl_4)誘発肝線維症モデルにおける羊膜 MSC 由来 EV (AMSC-EV)の効果を検討し、そのメカニズムを検証することを目的とした。

方法

1. 羊膜由来間葉系幹細胞 (AMSC)の分離・培養

試薬及び材料

Collagenase	(Nippi, Tokyo, Japan)
Dispase Ⅰ	(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)
FBS	(Life Technologies, Carlsbad, MD, USA)
MEM-alpha	(Life Technologies)
PBS	(Life Technologies)
Penicillin	(Wako Pure Chemical Industries)
Streptomycin	(Wako Pure Chemical Industries)
0.5%trypsin-EDTA	(Life Technologies)

AMSC および正常皮膚線維芽細胞(normal skin fibroblast, NF)の分離・培養については、北海道大学大学院医学研究院における倫理委員会および北海道大学大学病院自主臨床研究審査委員会にて承認を得て行った。妊娠中女性および患者さんに対してインフォームドコンセントを実施し同意を得て卵膜および非炎症性疾患の別手術時に余剰として廃棄する予定の正常皮膚を採取した。AMSC は申請者の研究室でこれまで報告してきた方法にて分離・培養した (Mizushima et al., 2017)。具体的には、帝王切開で胎児を娩出後、剪刀で卵膜を 5 cm 四方に切り、用手的に羊膜と絨毛膜に分けた。羊膜を phosphate-buffered saline (PBS)で洗浄後、collagenase (40 μg/mL)と dispase Ⅰ (200 PU/mL)を添加し 37℃で 1 時間振盪させ、結合組織を消化し細胞を分離した。10% fetal bovine serum (FBS)・penicillin (100 U/mL)・streptomycin (100 μg/mL)を添加した minimal essential medium (MEM)-alpha を用いて 15 cm uncoated plastic dish に播種し、室温 37℃・湿度 95%・5%二酸化炭素濃度下で培養を行った。プラスチック接着細胞が 80%コンフルエントになるまで 3-4 日おきに MEM-alpha を交換し、接着していない浮遊細胞を除いた。継代は 0.5% trypsin-EDTA を用いて接着細胞を剥離し、新たな培養皿に 1.0×10^5 cells/cm^2 の濃度で播種し培養を継続した。そして多分化能および CD44、CD73、CD90、CD105 などの表面マーカーの発現、CD11b、CD19、CD34、CD45、HLA (human leukocyte antigen)-DR などの血球系マーカーが陰性であることを確認した (Onishi et al., 2015, Kubo et al., 2015, Mizushima et al., 2017) MSC を利用している。正常皮膚線維芽細胞の分離・培養については既報と同様の方法

で回収した (Sato et al., 2018)。NF は 10%FBS・penicillin (100 U/mL)・streptomycin (100 μg/mL)を添加した MEM-alpha を用いて 15 cm uncoated plastic dish に播種し培養した。

2. 細胞外小胞 (EV)の抽出

試薬及び材料

CP60E ultracentrifuge	(Hitachi, Tokyo, Japan)
FBS	(Life Technologies)
MEM-alpha	(Life Technologies)
PBS	(Life Technologies)
Penicillin	(Wako Pure Chemical Industries)
RPS40T rotor	(Hitachi)
Streptomycin	(Wako Pure Chemical Industries)
13PAtube	(Hitachi)
0.22-μm filter	(Steritop, Merck Millipore, Billerica, MA, USA)

AMSC-EV および NF-EV を回収するために、AMSC および NF の培養上清から EV を既報の方法を用いて抽出した (Li et al., 2013, Kalra et al., 2013)。10%FBS・penicillin (100 U/mL)・streptomycin (100 μg/mL)を添加した MEM-alpha を用いて、AMSC を 15 cm uncoated plastic dish に播種し、室温 37℃・湿度 95%・5%二酸化炭素濃度下で培養を行った。80-90% confluent になった時に、上清を除去し PBS で 3 回洗浄後、無血清の penicillin (100 U/mL)・streptomycin (100 μg/mL)のみを添加した MEM-alpha 20 mL に置換し 48 時間培養した。48 時間後に培養上清を回収し、2,500 rpm、4℃で 5 分間、遠心して夾雑物を除いたものを馴化培地 (conditioned medium, CM)とした。回収した CM を 0.22 μm の filter で濾過し、そのまま超遠心用チューブへ分注し、100,000g、4℃で 70 分間、超遠心を行った。上清を破棄して PBS で懸濁し、再度 100,000g、4℃で 70 分間、超遠心を行い、上清を破棄し残存ペレットを細胞外小胞回収液として下記実験で使用した。使用までは分注しておき－80℃で保存した。NF-EV の培養方法・回収方法も前述と同様に実施した。

3. 細胞外小胞 (EV)の同定方法

試薬及び材料

qNano system (Izon Science, Christchurch, New Zealand)
Qubit protein assay kit (Life Technologies)
Qubit 2.0 (Life Technologies)
1 次抗体
CD81 (HansaBioMed Life Sciences, Tallinn, Estonia)
2 次抗体
Peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)

EV の粒子径を、ナノパーティクルアナライザーqNano を用いて電気抵抗ナノパルス法で計測した。電気抵抗ナノパルス法は、ナノポアを挟んだ溶液中に電圧を印加し、溶液中に含まれるナノ粒子がナノポアの細孔を通過する際に発生する電気抵抗ナノパルスを計測し、ナノ粒子の直径を 1 個ずつ絶対値で計測する方法である。本研究では、直径 50-400 nm の粒子を計測可能なナノポア NP200 を用いた。超遠心後に沈渣として得られた細胞外小胞を 100 μL PBS に懸濁した後、qNano 装置に導入し、電圧 0.12 V、ナノポアストレッチ 47.0 mm、プレッシャー値 5 の条件で計測した。粒子直径は標準サイズ粒子 CPC200 で補正し算出した。EV 中のタンパク量の測定には、Qubit2.0 を使用した。典型的な EV マーカーとしての CD81 の発現をウエスタンブロット法にて検出した。(ウエスタンブロットの方法については、方法 11.ウエスタンブロット参照)。

4. 走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscopy, SEM)
試薬及び材料
Glutaraldehyde (TAAB Laboratories, Reading, England)
Isoamyl acetate (Kanto Chemical, Tokyo, Japan)
Hitachi-2 dryer (Hitachi)
Hitachi E-1030 device (Hitachi)
Hitachi S-4500 SEM (Hitachi)

EV を上記の方法にて回収して、ただちに EV を 2%グルタールアルデヒド中で少なくとも 4 時間固定した。段階的にエタノールで脱水し、酢酸イソアミルで 2 回処理し、Hitachi HCP-2 乾燥機で臨界点乾燥させた後、日立 E -1030 で白金-パラジウムコーティングした。日立 S-4500 SEM を用い

てサンプルを撮影した。

5. 動物

メーカーより以下の実験動物を購入した。

6 週齢雄 Sprague-Dawley (SD)ラット　（Japan SLC, Hamamatsu, Japan）

動物実験プロトコールは「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に則り、北海道大学動物実験委員会の承認を得た。

SD ラットを室温 24℃に維持された、12 時間明期－12 時間暗期の明暗サイクルの飼育環境の下で、1 ケージあたり 3 匹のラットを飼育した。

6. HFD 誘発 NASH ラットモデルの作製と実験プロトコール

試薬及び材料

HFD	(Orienal Yeast, Tokyo, Japan)
Normal diet	(Oriental Yeast)
PBS	(Life Technologies)

ラット NASH モデルは、4 週間にわたり 2 日に 1 回 HFD を交換し自由摂食させ作製した。

ラットを以下の 3 群に分けて検討を行った。

「①コントロール群 (n = 6)」、「②HFD 誘発 NASH ラット群 (n = 11)」、「③HFD 誘発 NASH ラット・AMSC-EV 投与群 (n = 11)」

①：Normal diet を与え、開始第 3，4 週目に陰茎静脈より PBS 200 μL を投与した。

②：HFD を与え、開始第 3，4 週目に陰茎静脈より PBS 200 μL を投与した。

③：HFD を与え、開始第 3，4 週目に陰茎静脈より PBS 200 μL で懸濁した AMSC-EV (15 μg/kg)を投与した。

第 5 週目にすべてのラットを屠殺し、肝臓の採取を行った（図 2A）。

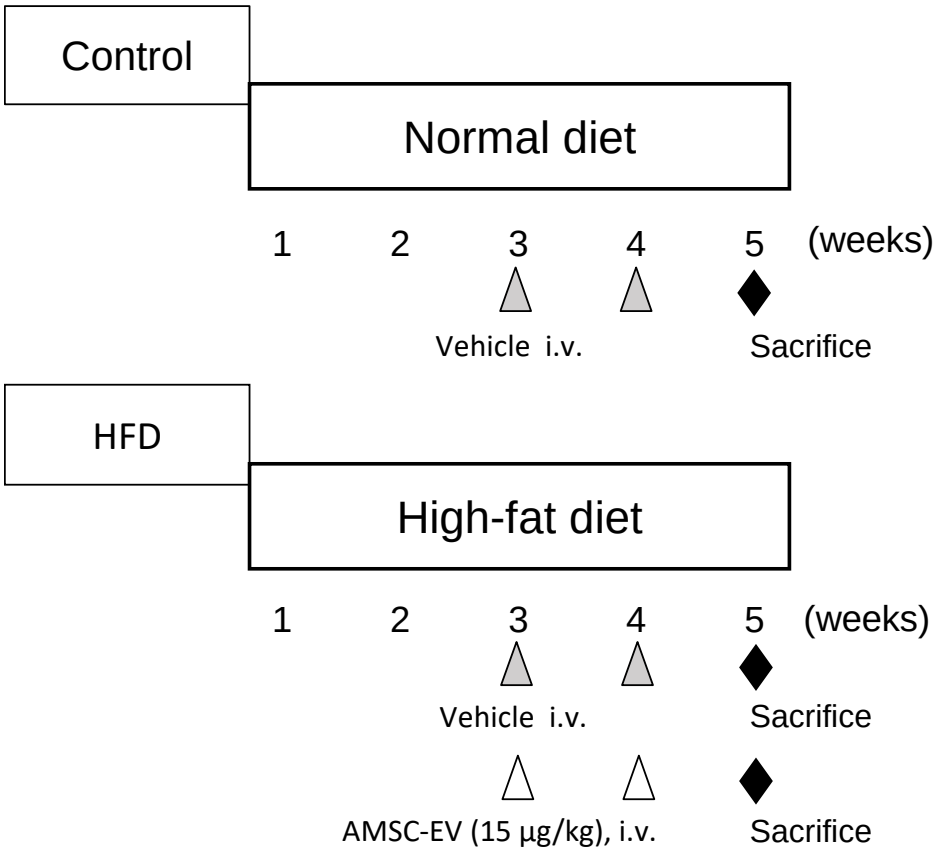


図 2A：HFD 誘発 NASH ラットモデルにおける実験プロトコール

7. 四塩化炭素 (CCl_4)誘発肝線維症モデルの作製

<u>試薬及び材料</u>

CCl_4 (Wako Pure Chemical Industries)

PBS (Life Technologies)

ラット肝線維症モデルは週 2 回、6 週間にわたり四塩化炭素とオリーブオイルを 1:1 で混合した溶液 2 mL/kg を腹腔内投与し作製した。

ラットを以下 3 群に分けて検討を行った。

「①コントロール群 (n = 6)」、「②CCl_4 誘発肝線維症ラット群 (n = 15)」、「③CCl_4 誘発肝線維症ラット・AMSC-EV 投与群 (n = 15)」

①：オリーブオイルを腹腔内投与し、開始第 3 週目に陰茎静脈より PBS 200 μL を投与した。

②：CCl_4 を投与し、開始第 3 週目に陰茎静脈より PBS 200 μL を投与し

た。
③：CCl_4 を投与し、開始第 3 週目に陰茎静脈より PBS 200 µL で懸濁した AMSC-EV (20 µg/kg)を投与した。
第 7 週目にすべてのラットを屠殺し、肝臓の採取を行った（図 2B）。

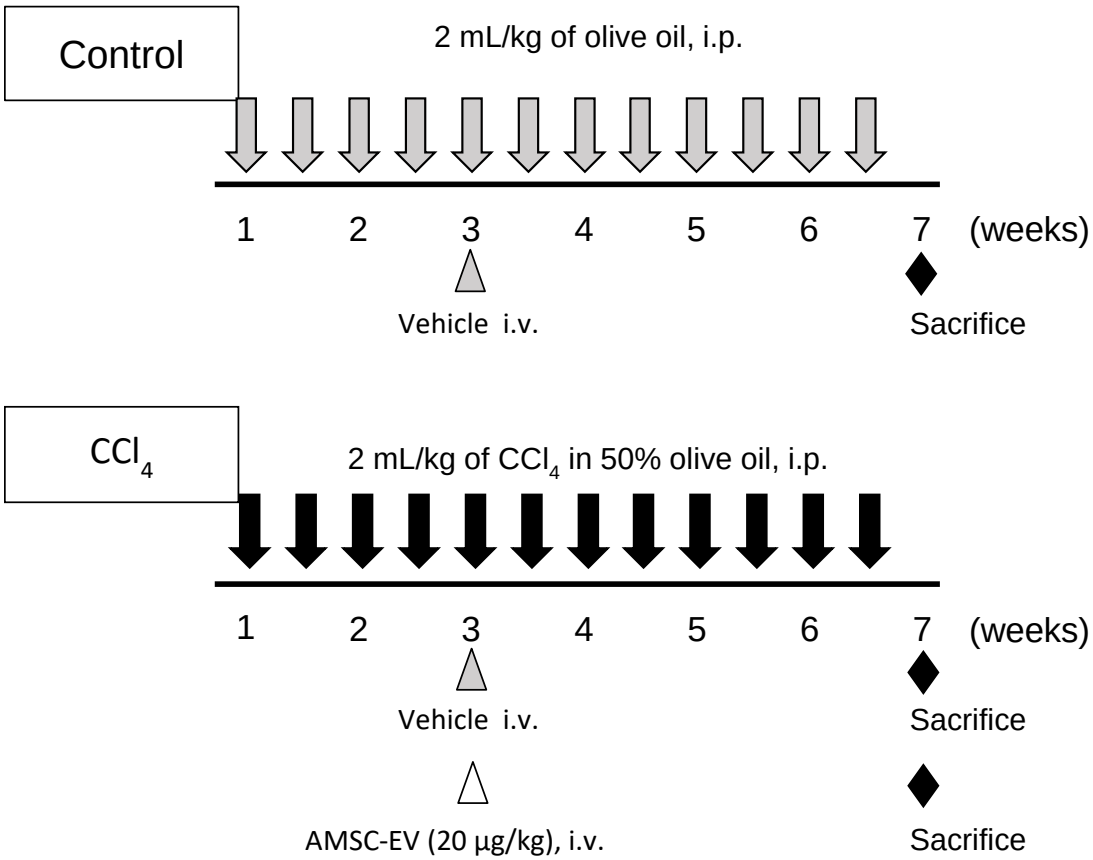


図 2B：CCl_4 誘発肝線維症ラットモデルにおける実験プロトコール

8. ラット肝臓の病理組織学的評価

8-1. Hematoxylin and eosin (HE)染色および Masson’s trichrome 染色

<u>試薬及び材料</u>

Formaldehyde saline	(Wako Pure Chemical Industries)
HE	(Wako Pure Chemical Industries)
Masson’s trichrome	(Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan)
PBS	(Life Technologies)

プロトコールに従い、全てのラットを NASH モデルでは第 5 週目、肝線

維症モデルでは第 7 週目に屠殺し、肝臓を摘出した。検体を 40 g/L formaldehyde saline で固定、paraffin で包埋し、薄切し 5 μm 厚の切片を作製した。HE および Masson’s trichrome 染色を行った。線維化面積の定量には、ラット 1 匹あたり 100 倍視野で無作為に 10 視野の撮影を行い、画像解析ソフト (WinROOF, Mitani, Fukui, Japan)を用いた。

8-2. 免疫染色

抗体

Anti-rat CD68 monoclonal antibody (AbD Serotec, Kidlington, United Kingdom)

Anti-rat α-smooth muscle actin (SMA) antibody (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

マクロファージの肝への浸潤を評価するために CD68 免疫染色を行った。肝臓の未染切片を上記試薬で浸し 40 分間静置して染色した。また肝星細胞の活性化を評価するために α-SMA 抗体を用いて室温で 30 分間静置し染色した。光学顕微鏡を用いて、ラット 1 匹あたり、100 倍視野で無作為に 10 視野の撮影を行った。画像解析ソフト (WinROOF, Mitani)を用いた。

各試薬は以下希釈濃度で使用した。

CD68 (1:50)

α-SMA (1:800)

9. ラット肝臓からの RNA 抽出、逆転写、定量的 RT-PCR

試薬及び材料

2-mercaptoethanol	(Wako Pure Chemical Industries)
PBS	(Life Technologies)
RNA later	(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
Platinum SYBR Green PCR mix	(Invitrogen)
QuantiTect Reverse Transcription Kit	(Qiagen, Hilden, Germany)
RNeasy Mini Kit	(Qiagen)

摘出した肝臓の一部でメスを用いて RNA 用の検体を採取した。

RNA の抽出は、RNeasy Mini Kit を用いて以下の方法で行った。検体を

RNA later に浸透させ−30℃で保存した。RNA 抽出時は、Buffer RLT 600 μL・2-mercaptoethanol 6 μL・5.0 mm ジルコニアビーズを加えた 2.0 mL 破砕用 tube に検体を入れ、ビーズクラッシャー(μT-01, TITEC, Koshigaya, Japan)を用いて 60 秒間肝組織を破砕した。続いて 15,000 rpm、3 分間、室温で遠心し、上清を microtube に移し、70% ethanol 600 μL を加えピペッティングにより混和した。700 μL のサンプルを 2 mL collection tube 中にセットした RNeasy スピンカラムに入れ、8,000g で 15 秒間、室温で遠心し、ろ液を廃棄した。700 μL の Buffer RPE を RNeasy スピンカラムに添加し 8,000g で 15 秒間、室温で遠心し、ろ液を廃棄した。500 μL の Buffer RPE を RNeasy スピンカラムに添加し 8,000g で 15 秒間、室温で遠心し、ろ液を廃棄した。同作業を 2 回行った。2 回目の際は 2 分間遠心した。RNeasy スピンカラムを新しい microtube にセットし、40 μL の RNeasy free water を直接スピンカラム・メンブレンに添加し、8,000g で 1 分間、室温で遠心し、RNA を含む溶出液を回収した。

RNA の濃度測定は、分光光度計(Nano Drop 2000, Thermo Scientific)を用いて行った。逆転写の過程は QuantiTect Reverse Transcriptional Kit を用いて以下の手法にて行った。

gDNA Wipeout Buffer 2 μL・RNA サンプル 1 μg・RNase free water が計 14 μL となるように調製し、42℃で 2 分間インキュベートし、氷上で冷却した。Quantiscript Reverse Transcriptase 1 μL・Quantiscript RT Buffer 4 μL・RT Primer Mix 1 μL を加え、42℃で 15 分間インキュベートし、Quantiscript Reverse Transcriptase を不活性化するために 95℃で 3 分間インキュベートした。

200 μL 96-well plate に、Platinum SYBR Green qPCR SuperMIX-UDG with ROX 25 μL・Forward primer 0.5 μL・Reverse primer 0.5 μL・total RNA 1 μg を加え、計 25 μL になるように RNase free water で調製した。50℃ 2 分間、95℃ 2 分間の後、95℃ 15 秒間、60℃ 30 秒間を 40 サイクルの条件にて、7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて定量的 RT-PCR を行った。遺伝子発現レベルは 18S ribosomal RNA (18S rRNA)および β-actin を内在性コントロールとして用いて、comparative threshold cycle (ddCt) method で計算した。使用した primer は全て、北海道システムサイエンス社より購入した (表 2)。

表 2：プライマー配列

rat TNF-α F	GGCTCCCTCTCATCAGTTCCA

rat TNF-α R	CGCTTGGTGGTTTGCTACGA
rat IL-1β F	CCTATGTCTTGCCCGTGGAG
rat IL-1β R	CACACACTAGCAGGTCGTCA
rat IL-6 F	CCCTTCAGGAACAGCTATGAA
rat IL-6 R	ACAACATCAGTCCCAAGAAGG
rat MCP-1 F	CTGTCTCAGCCAGATGCAGTTAA
rat MCP-1 R	AGCCGACTCATTGGGATCAT
rat TGF-β F	CTGCTGACCCCCACTGATAC
rat TGF-β R	AGCCCTGTATTCCGTCTCCT
rat CD68 F	TCACAAAAAGGCTGCCACTCTT
rat CD68 R	TCGTAGGGCTTGCTGTGCTT
rat CD11c F	CTGTCATCAGCAGCCACGA
rat CD11c R	ACTGTCCACACCGTTTCTCC
rat CD163 F	TGTAGTTCATCATCTTCGGTCC
rat CD163 R	CACCTACCAAGCGGAGTTGAC
rat α-SMA F	GACACCAGGGAGTGATGGTT
rat α-SMA R	GTTAGCAAGGTCGGATGCTC
rat collagen1a1 F	GATGGCTGCACGAGTCACAC
rat collagen1a1 R	ATTGGGATGGAGGGAGTTTA
rat MMP2 F	CTTGCTGGTGGCCACATTC
rat MMP2 R	CTCATTCCCTGCGAAGAACAC
rat TIMP1 F	GACCACCTTATACCAGCGTT
rat TIMP1 R	GTCACTCTCCAGTTTGCAAG
rat 18S rRNA F	GCAATTATTCCCCATGAACG
rat 18S rRNA R	GGCCTCACTAAACCATCCAA

human TNF-α F	CAGCCTCTTCTCCTTCCTGA
human TNF-α R	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA
human β-actin F	CCAACCGCGAGAAGATGA
human β-actin R	CCAGAGGCGTACAGGGATAG

F; forward, R; reverse

10. ラット初代培養星細胞およびクッパー細胞を用いた実験

試薬と材料

Collagenase (Nippi, Tokyo, Japan)

Ficoll PM400 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA)

星細胞・クッパー細胞の抽出は既報の方法を参考に行った (Mederacke et al., 2015)。まずラットにペントバルビタールにて麻酔を導入し、腹部を切開し、腹部臓器を露出させ、門脈に 20G のサーフロー針を挿入した後、上大静脈をクランプし、下大静脈を切開しコラゲナーゼ灌流を行った。その後 Ficoll PM400 を用いて密度勾配遠心を行い、星細胞およびクッパー細胞を回収した。クッパー細胞は AMSC-EV および NF-EV で 30 分間前処理した後に LPS 2.5 ng/mL で 3 時間刺激した (EV は 12-well plate で 0.5 μg/well の用量とした)。LPS 刺激後 RNA 抽出を行い、*Tnf-α* や *Il-1β*、*Mcp-1* の発現を定量的 RT-PCR 法にて解析した。また、星細胞に関しては AMSC-EV と LPS (2.0, 5.0 ng/mL)を添加し、3 時間後に RNA 抽出を行い、*Tnf-α* の発現を定量的 RT-PCR 法で解析した。

11. Western Blot Analysis (IκB-α、p65 のリン酸化、CD81)

細胞

HEK293/hTLR4A-MD2-CD14 (Invivogen, San Diego, CA, USA)

緩衝液の組成

TBST (TBS with 0.05% Tween 20, Wako Pure Chemical Industries)

試薬及び材料

D-MEM (Wako Pure Chemical Industries)

ECL Prime detection reagent (GE Healthcare)
FBS (Life Technologies)
Immobilon-P polyvinylidene difluoride membranes (Merck Millipore)
LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
PBS (Life Technologies)
Protease/phosphatase inhibitor cocktail (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)
SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
TBS (Wako Pure Chemical Industries)
4 x Laemmli sample buffer (Bio-Rad)
5% PhosphoBLOCKER blocking reagent (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA)

1 次抗体

Actin (Abcam, Cambridge, United Kingdom)
IκB-α (Cell Signaling Technology)
phospho IκB-α (Cell Signaling Technology)
p65 (Cell Signaling Technology)
phospho p65 (Cell Signaling Technology)

2 次抗体

peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch)
peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch)

TLR4 を強発現した HEK293 (HEK293/hTLR4A-MD2-CD14)を使用し、各々同様の検討を行った。HEK293/hTLR4A-MD2-CD14 を 6-well plate に 2×10^6 cells/well で播種し、10% FBS・penicillin (100 U/mL)・streptomycin (100 μg/mL)を添加した D-MEM で 24 時間培養後、上清を吸引除去し PBS で洗浄した。AMSC-EV あるいは同量の PBS を無血清の D-MEM に添加し、60 分間 pre-incubation し、10 ng/mL LPS を加えて、2 時間静置した。冷却した PBS で洗浄し、スクレイパーで細胞を回収し、5,000 rpm、5 分、4℃で遠心し上清を吸引除去した。その後、RIPA buffer (Radio-immunoprecipitation assay buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 1.0% (w/v) NP-40 substitute)と protease/phosphatase inhibitor cocktail (100x)の混合液でピペッティングし 30 分氷上で静置し細

胞を溶解させた。その後 15,000 rpm, 20 分間, 4℃で遠心しその上清をタンパク抽出液とした。その後、BCA protein assay kit を用いて、タンパク濃度を測定した。タンパク量を 10 μg、PBS、4 x Laemmli sample buffer を計 12 μL となるように調製し、95℃で 5 分間熱した。SDS-PAGE (200 V, 約 60 分)にて展開し、その後 PVDF membrane に転写させた (1.3 A, 25 V, 7 分間)。続いて、5% PhosphoBLOCKER blocking reagent を用いてブロッキングを施行した。1 次抗体を加えて、室温振盪した後に、1xTBST で 5 分間ずつ 3 回洗浄した。2 次抗体を TBST 中で 30 分間反応させた。その後 1xTBST で 5 分間ずつ 3 回洗浄し ECL Prime detection reagent を加え ImageQuant LAS-4000 で解析した。また、EV マーカーである CD81 の検出も行った。EV 500 ng、PBS、 4 x Laemmli sample buffer を計 12 μL となるように調製した。その後の方法は前述と同様である(尚、1 次抗体は 200 倍、2 次抗体は 2000 倍希釈とした)。

上記抗体は以下希釈濃度で使用した。
actin (1:5,000)
IκB-α (1:2,000)
phospho IκB-α (1:2,000)
p65 (1:2,000)
phospho p65 (1:2,000)
peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG (H+L) (1:10,000)
peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L) (1:10,000)

12. Transient Transfection 及び Reporter Gene Assay
細胞
HEK293 (RIKEN BRC)
HEK293/hTLR4A-MD2-CD14 (Invivogen)
試薬及び材料
D-MEM (Wako Pure Chemical Industries)
Dual Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA)
FBS (Life Technologies)
Lipofectamine®LTX (Invitrogen)
Luciferase plasmid DNA with 25 ng of Renilla pGL4.74[hRluc/TK] vector (Promega)

Luciferase reporter gene luc2P (pGL4.32[luc2P/NF-κBRE/Hygro], Promega)
Opti-MEM® (Life Technologies)

HEK293 に TLR4 を強発現させた HEK293 (HEK293/hTLR4A-MD2-CD14)を使用し、各々同様の検討を行った。使用細胞を 24-well plate に 1.25×10^5 cells/well で播種し、10%FBS・penicillin (100 U/mL)・streptomycin (100 μg/mL)を添加した D-MEM で 37℃、24 時間培養した。Internal control としての Renilla pGL4.74 vector 25 ng と luciferase reporter gene luc2P を組み込んだ nuclear factor kappa B (NF-κB) response element を含む plasmid DNA 500 ng を、Lipofectamine®LTX を用いてトランスフェクトさせた*(一方の実験では tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor6 (TRAF6)を併用添加した)。37℃で 24 時間培養した後、AMSC-EV あるいは同量の PBS を加え、LPS 10 ng/mL の濃度となるように加え、6 時間静置した。Reporter gene assay は Dual Luciferase® Reporter Assay System (Promega)を用いて検討した。PBS で各 well を洗浄後、Passive Lysis buffer 100 μL/well を加え、室温下で 15 分間静置した。Lysate 10 μL・Luciferase Assay Buffer Ⅱ 50 μL・Stop & Glo® Buffer 50 μL を microplate 中の well に混和し、発光強度を GloMax®-Multi Detection System (Promega)を用いて測定した。

13. 統計的解析

データは平均値と標準誤差で表した。グループ間のパラメーターは、一元配置分散分析（one-way analysis of variance, ANOVA）で群間の有意差の有無を検討し、Tukey's test によりそれぞれの群間の差を検定した。2 群での検定には、student t-test を用いた。$P < 0.05$ を統計学的有意差があると判断した。全ての解析は GraphPad Prism version 7 (Graphpad, San Diego, CA, USA)を使用した。

結果

1. AMSC-EV の同定

まず、AMSC の培養上清から得られた細胞外小胞 (AMSC-EV)を確認するために、形態を走査型電子顕微鏡で、球形の小胞であることを確認した(図 3A)。qNano では粒子サイズを測定し、分布は 50-150 nm の範囲にあり、100 nm 程度のところに peak を認めた (図 3B)。また、EV マーカーである CD81 をウエスタンブロット法で確認した（図 3C)。また皮膚線維芽細胞の培養上清から得られた細胞外小胞については qNano およびウエスタンブロット法での CD81 のマーカーを確認した。

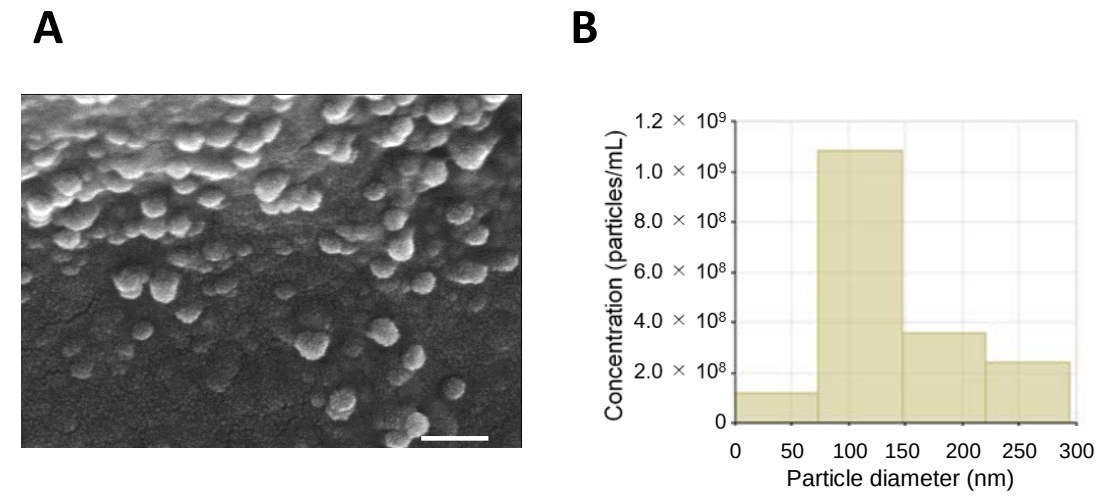


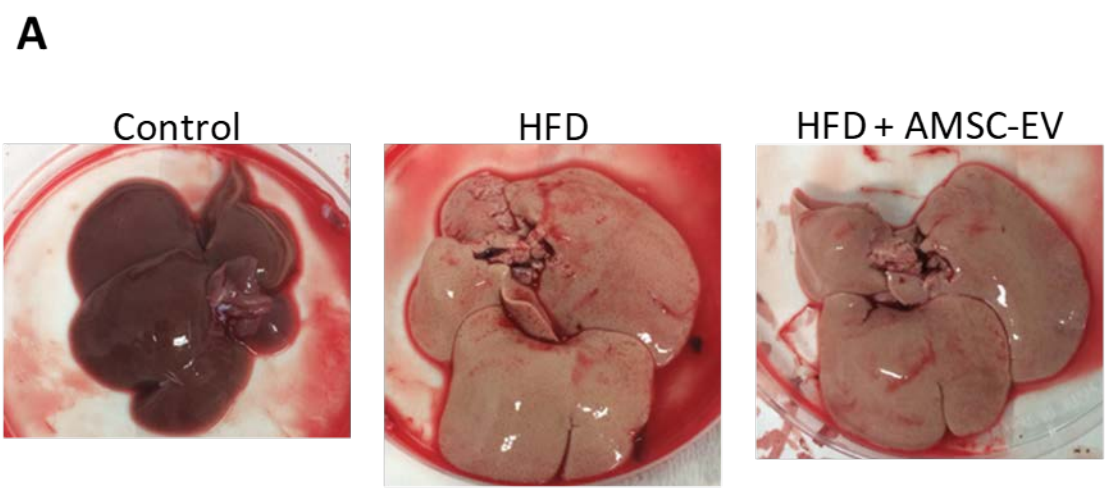
図 3：AMSC-EV の確認・同定

(A) 走査型電子顕微鏡写真、(B) qNano における粒子サイズ分布、(C)

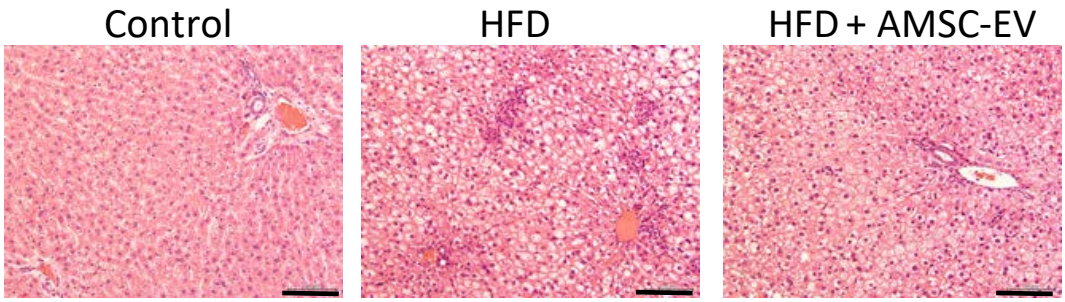
CD81 抗体を用いたウエスタンブロット法を示す。　Scale bar は 100 nm を示す。AMSC, amnion-derived mesenchymal stem cell; EV, extracellular vesicle.

2.高脂肪食 (HFD)誘発 NASH ラットモデルに対する AMSC-EV 投与の効果

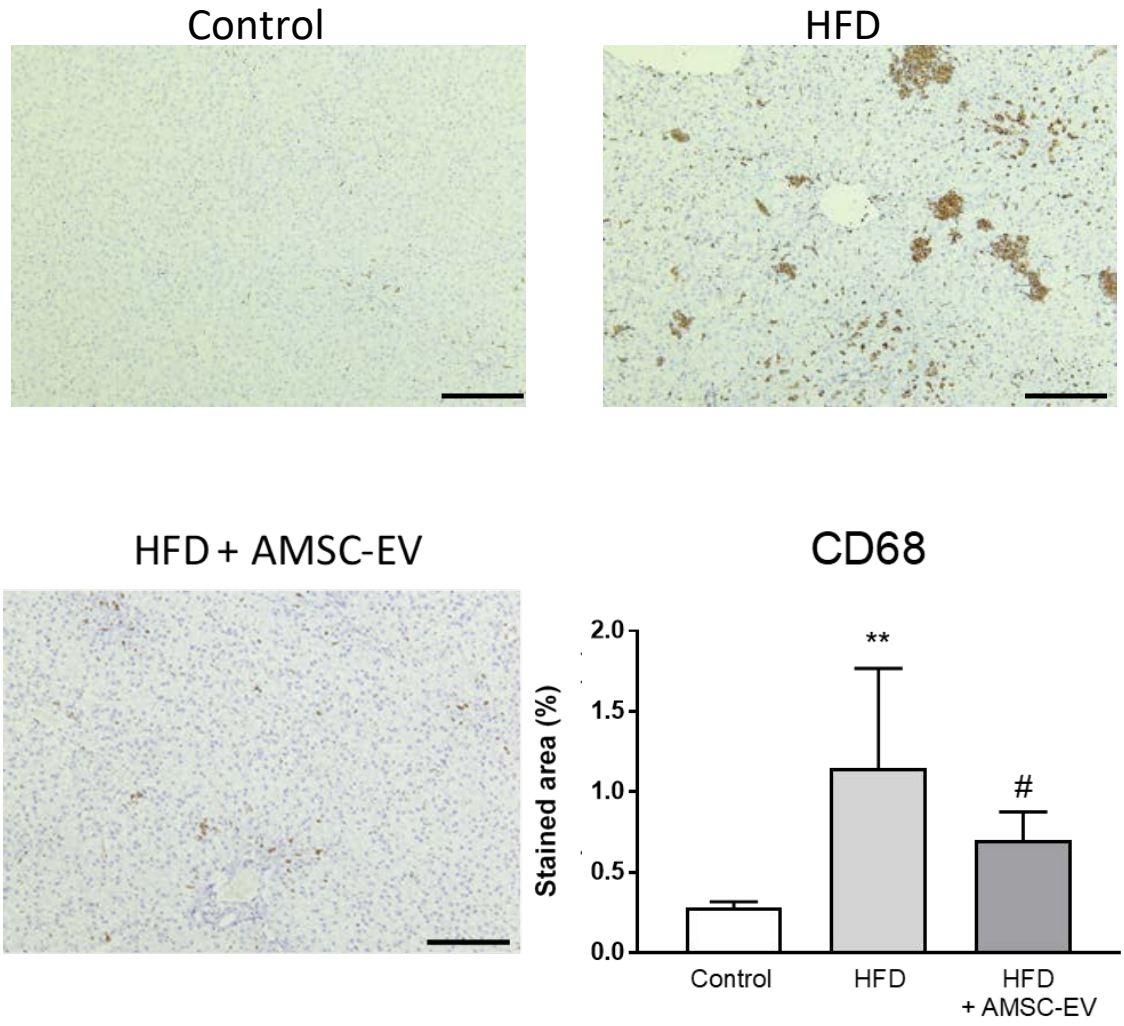
1 で得られた AMSC-EV を用いて HFD 誘発 NASH モデルにおける効果を検証した。摘出肝臓では HFD を投与した群において肝臓は腫大しておりやや白色調であった (図 4A)。HE 染色では HFD 投与群において脂肪滴の沈着を認め、炎症細胞の浸潤を認めた (図 4B)。免疫組織学的検査では、全マクロファージのマーカーである CD68 染色において HFD 投与群で有意に発現が増加していたが、AMSC-EV 投与群では有意に減少していた (図 4C)。また炎症に関連するサイトカインの遺伝子発現について定量的 RT-PCR 法で検討すると、HFD 群で *Tnf-α*、interleukin- (*Il-*) *6*、monocyte chemoattractant protein- (*Mcp-*) *1* の発現が有意に上昇しており、AMSC-EV 群で *Tnf-α*、*Il-1β*、*Il-6* の発現が有意に抑制されていた (図 4D-G)。さらに transforming growth factor- (*Tgf-) β* の発現が AMSC-EV 投与群で有意に減少していた (図 4H)。そして全マクロファージのマーカーである *Cd68* (図 4I)、炎症性の M1 マクロファージのマーカーである *Cd11c* (図 4J)の発現が HFD 群で有意に上昇していたが、AMSC-EV 投与群では有意にその発現を抑制していた。一方で M2 マクロファージのマーカーである *Cd163* の発現は 3 群間で有意差を認めなかった (図 4K)。

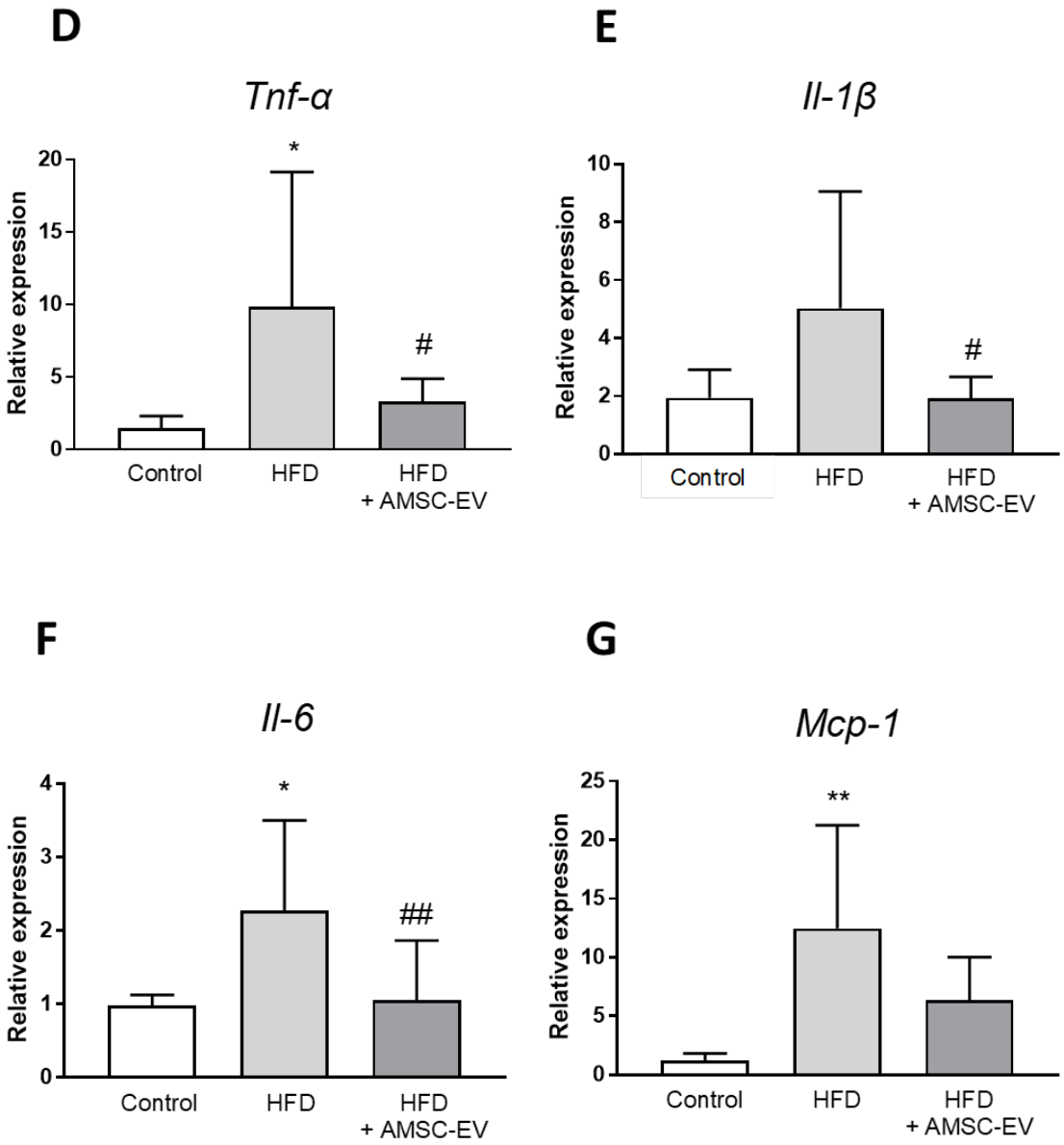


B


Control
HFD
HFD + AMSC-EV

C


Control
HFD
HFD + AMSC-EV
CD68
Stained area (%)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
#
Control
HFD
HFD
+ AMSC-EV


D
Tnf-α
Relative expression
20
15
10
5
0
*
#
Control
HFD
HFD
+ AMSC-EV
E
Il-1β
Relative expression
10
8
6
4
2
0
#
Control
HFD
HFD
+ AMSC-EV
F
Il-6
Relative expression
4
3
2
1
0
*
##
Control
HFD
HFD
+ AMSC-EV
G
Mcp-1
Relative expression
25
20
15
10
5
0
**
Control
HFD
HFD
+ AMSC-EV

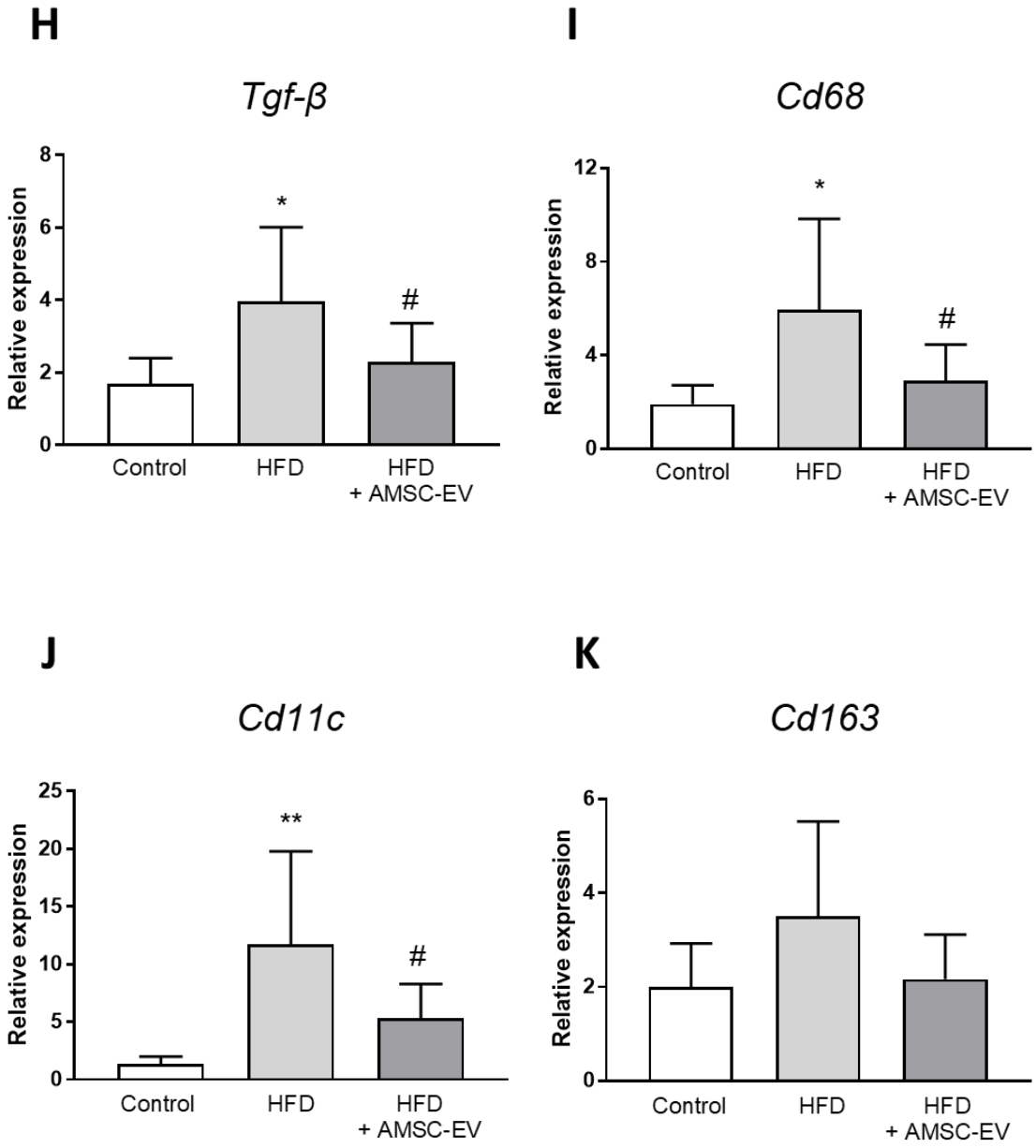


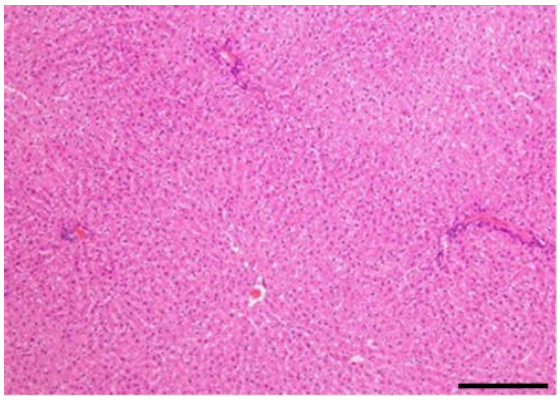
図 4：HFD 誘発 NASH ラットモデルにおける AMSC-EV の効果
コントロール群 (n = 6)、HFD 誘発 NASH ラット群 (n = 11)、HFD 誘発 NASH ラット・AMSC-EV 投与群 (n = 11)の 3 群。(A)摘出肝臓の肉眼所見、(B)HE 染色、(C)CD68 染色、(D-K)*Tnf-α, Il-1β, Il-6, Mcp-1, Tgf-β, Cd68, Cd11c, Cd163* の定量的 RT-PCR 法を示す。Scale bars は 200 μm を示す。統計値は平均値±標準偏差で示した。$^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$: vs control 群、$^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$: vs HFD 群。

3. 四塩化炭素 (CCl_4)誘発肝線維症モデルにおける AMSC-EV の効果

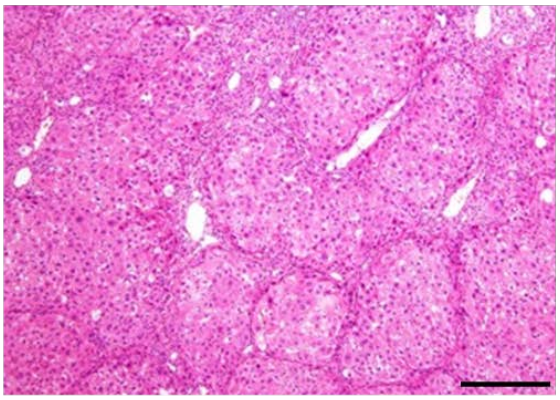
続いて CCl_4 誘発肝線維症モデルにおける AMSC-EV の効果を検証した。CCl_4 投与群、CCl_4＋AMSC-EV 投与群はそれぞれ 15 匹の 6 週齢雄性 SD ラットを用いた。CCl_4 投与群では第 6，7 週で 5 匹、CCl_4＋AMSC-EV 投与群でも第 6，7 週で 4 匹死亡した。そのため解析はコントロール群 6 匹、CCl_4 群 10 匹、CCl_4＋AMSC-EV 群 11 匹での解析となった。HE 染色では線維架橋が形成されており偽小葉の形成などが観察された (図 5A)。Masson’s trichrome 染色では、CCl_4 投与群で線維化を認めるが、AMSC-EV 投与群では有意に線維化を抑制していた (図 5B)。また肝星細胞の活性化マーカーとなる α-SMA 染色でも、CCl_4 投与群で有意に活性化が認められたが、AMSC-EV 投与群では有意に抑制していた (図 5C)。全マクロファージのマーカーである CD68 染色でも同様に CCl_4 投与群で有意に発現は上昇していたが、AMSC-EV 投与群で有意に低下していた (図 5D)。

A

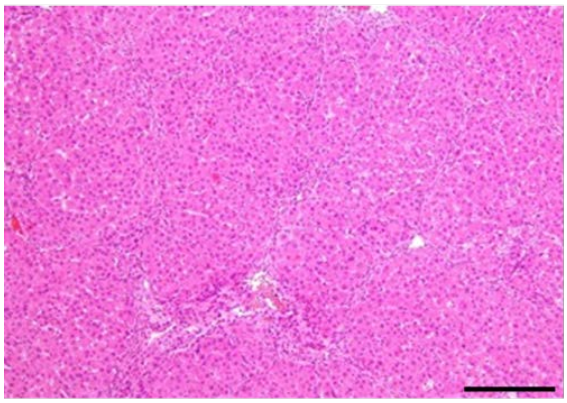
Control



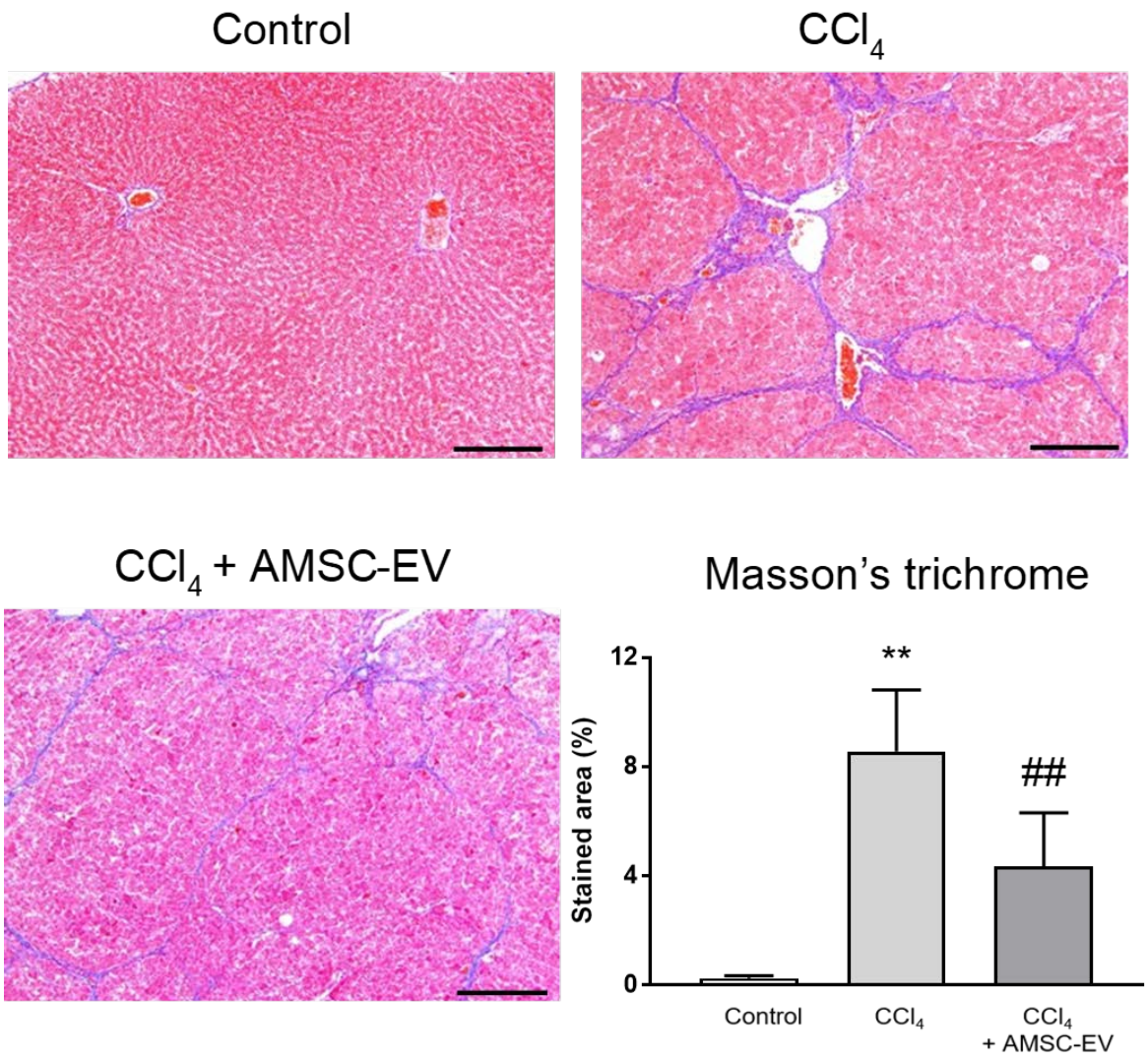
CCl_4



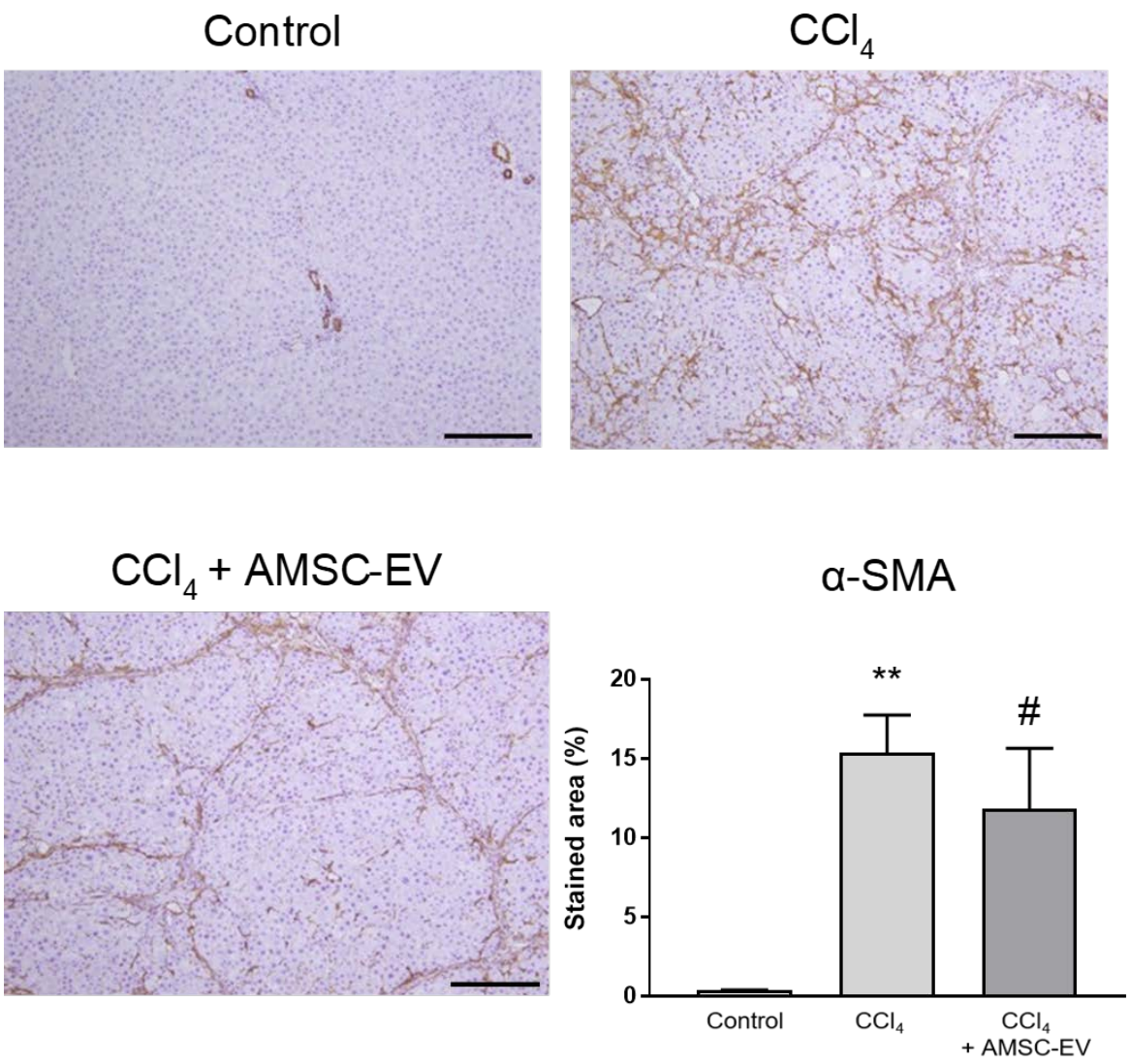
CCl_4 + AMSC-EV



B


Control
CCl4
CCl4 + AMSC-EV
Masson's trichrome
Stained area (%)
12
8
4
0
**
##
Control
CCl4
CCl4
+ AMSC-EV

C


Control
CCl4
CCl4 + AMSC-EV
α-SMA
Stained area (%)
20
15
10
5
0
**
#
Control
CCl4
CCl4
+ AMSC-EV

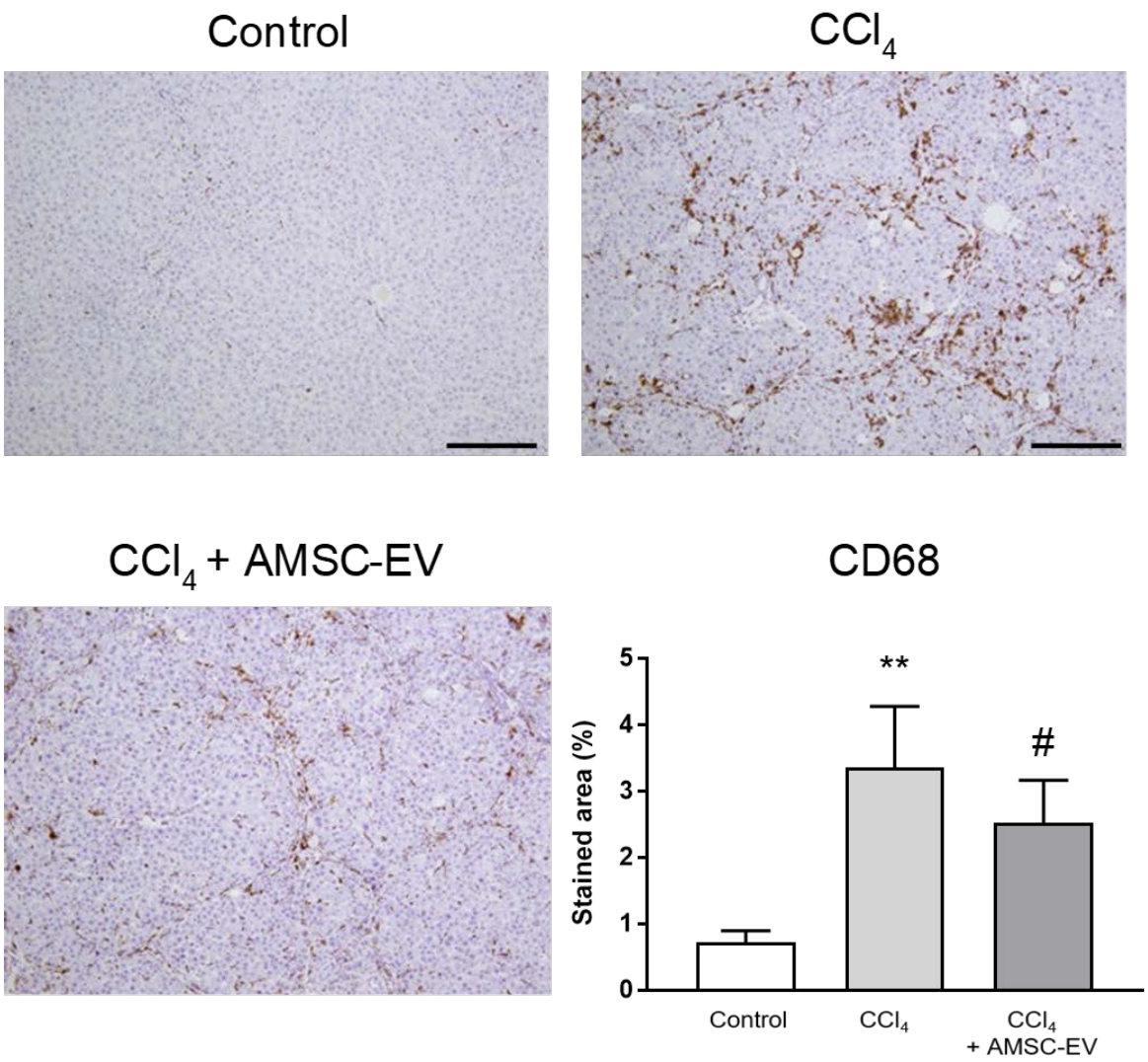
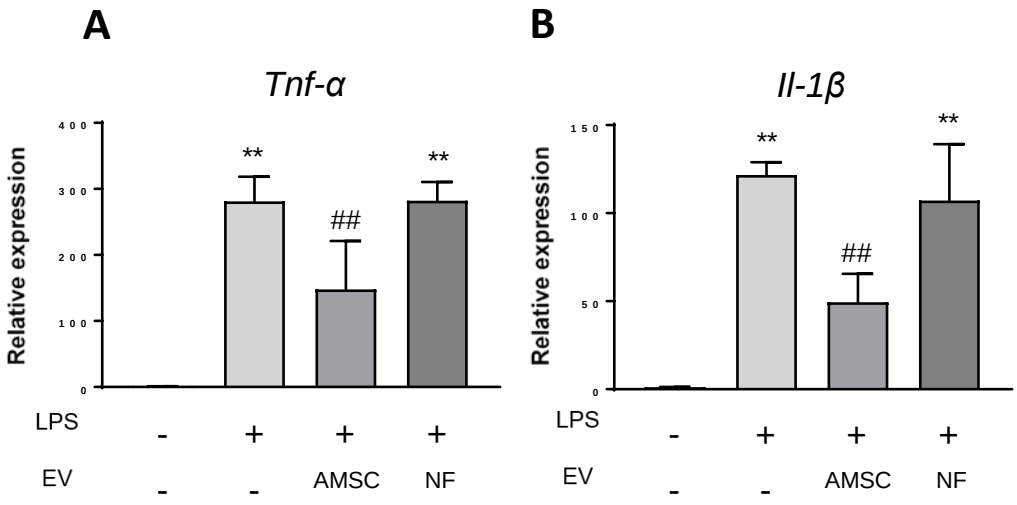


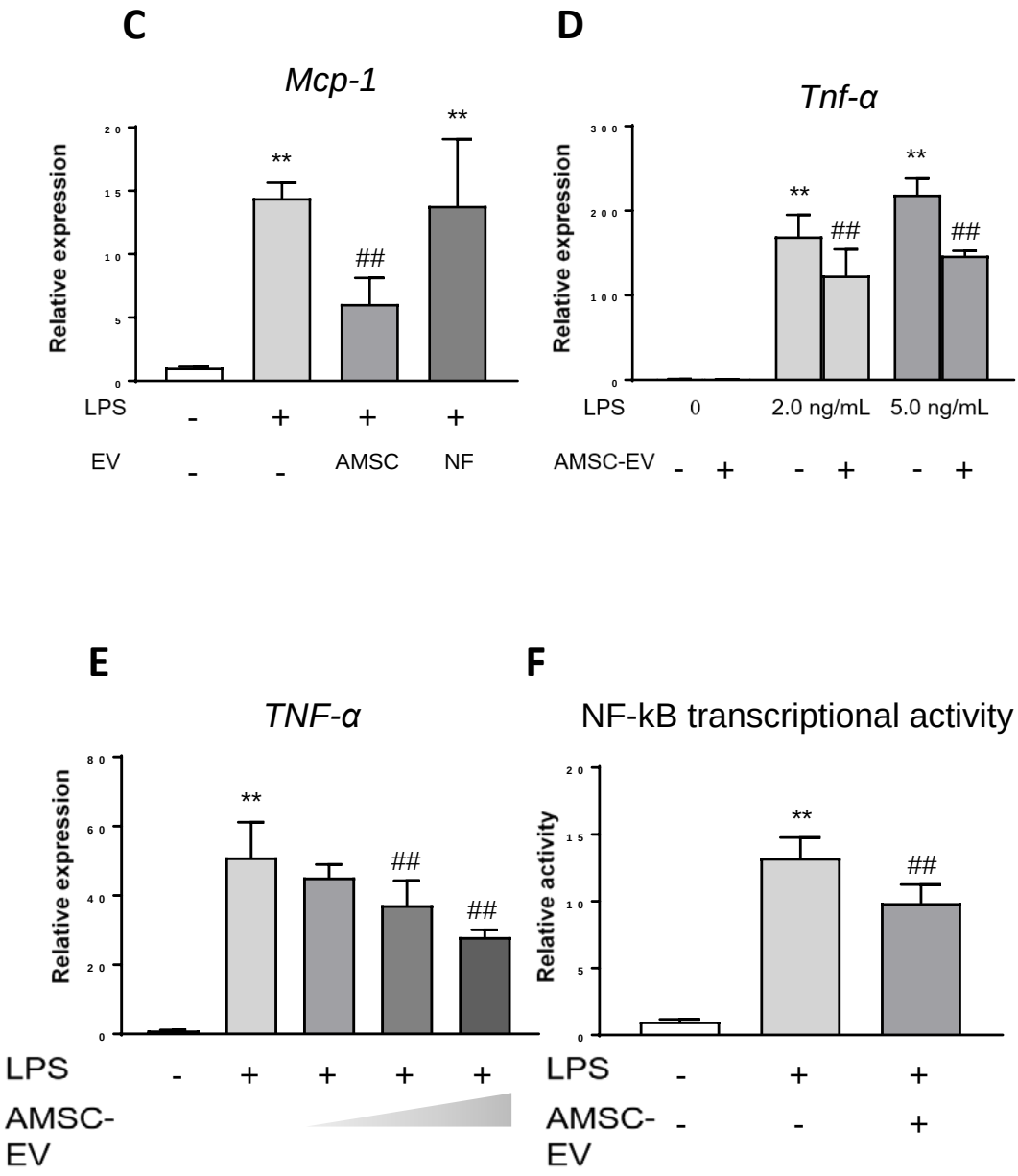
図 5：CCl_4 誘発肝線維症ラットモデルにおける AMSC-EV の効果
コントロール群 (n = 6)、CCl_4 誘発肝線維症ラット群 (n = 10)、CCl_4 誘発肝線維症ラット・AMSC-EV 投与群 (n = 11)の 3 群。(A) HE 染色、(B) Masson's trichrome 染色、(C) α-SMA 染色、(D) CD68 染色。Scale bars は 200 μm を示す。統計値は平均値±標準偏差で示した。
$^{**}p < 0.01$: vs control 群、$^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$: vs CCl_4 投与群。

4. AMSC-EV は LPS 誘導のクッパー細胞や星細胞の活性化を抑制する (*in vitro*)

In vivo での結果よりラットクッパー細胞や星細胞における AMSC-EV の抗炎症効果について検討した。クッパー細胞に LPS 刺激を行うと *Tnf-α* や *Il-1β*，*Mcp-1* の発現が上昇したが、AMSC-EV はこれらの発現を有意に抑制した (図 6A-C)。一方、AMSC-EV に対しての比較対照として添加した NF-EV はこれらのサイトカインの発現を抑制しなかった。さらに、星細胞においても LPS 刺激で *Tnf-α* の発現が増加したが、AMSC-EV によって抑制された (図 6D)。

続いて、293/hTLR4A-MD2-CD14 および HEK293 細胞を用いて LPS により誘導される NF-κB の活性化を AMSC-EV が抑制するかを検討した。まず 293/hTLR4A-MD2-CD14 において LPS 刺激下で AMSC-EV が用量依存性に Tnf-α の発現を抑制していることを確認した (図 6E)。また、LPS 刺激で増加する NF-κB の転写活性は、AMSC-EV によって有意に抑制された (図 6F)。さらに、LPS 添加により p65、IκB-α のリン酸化が認められたが、これを AMSC-EV は抑制した (図 6G)。一方で、TRAF6 の強発現でも NF-κB の転写活性が増加したが、AMSC-EV はその転写活性を抑制しなかった (図 6H)。これらの結果から AMSC-EV が LPS/TLR4 経路の比較的早い段階に作用しそのシグナルを抑制している可能性が示唆された。




C
Mcp-1
Relative expression
20
15
10
5
0
**
**
##
LPS - + + +
EV - - AMSC NF
D
Tnf-α
Relative expression
300
200
100
0
**
**
##
##
LPS 0 2.0 ng/mL 5.0 ng/mL
AMSC-EV - + - + - +
E
TNF-α
Relative expression
80
60
40
20
0
**
##
##
LPS - + + + +
AMSC-EV
F
NF-kB transcriptional activity
Relative activity
20
15
10
5
0
**
##
LPS - + +
AMSC-EV - - +

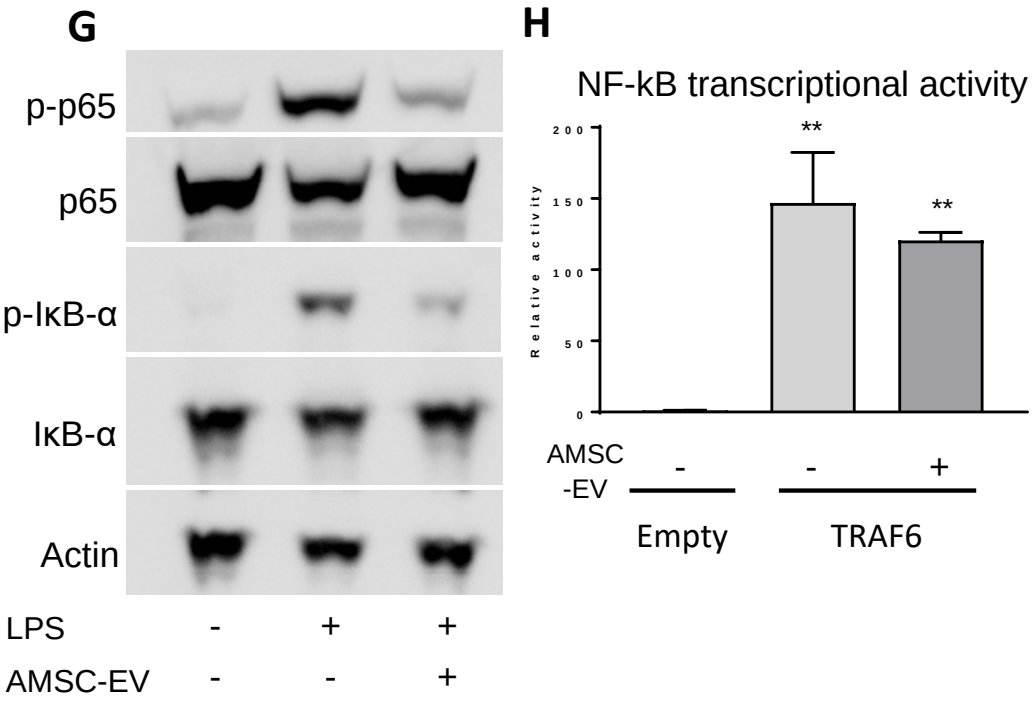


図 6：培養ラットクッパー細胞と星細胞における炎症反応に対する AMSC-EV と NF-EV の効果

クッパー細胞における LPS 刺激後の (A) *Tnf-α*, (B) *Il-1β*, (C)*Mcp-1* の発現を定量的 RT-PCR 法にて検討した。星細胞における LPS 刺激後の (D) *Tnf-α* の発現を定量的 RT-PCR 法で解析した。293/hTLR4A-MD2-CD14 cells における LPS 刺激後の (E) TNF-α の発現を定量的 RT-PCR 法で、(F) NF-κB の転写活性を、(G) IκB-α や p65 のリン酸化についてウエスタンブロット法で検討した。(H) TRAF6 を強発現させた HEK293 における NF-κB の転写活性を検討した。

統計値は平均値±標準偏差で示した。

$^{**}p < 0.01$: vs control 群、$^{\#\#}p < 0.01$: vs LPS 群。

5. AMSC-EV は初代培養ラット星細胞の活性化を抑制する。

前述の方法でラット肝臓から星細胞を分離し使用した。AMSC-EV は *α-Sma* の発現を有意に抑制し matrix metalloproteinase- (*Mmp-*) *2* の発現を増加させていた。*Collagen1a1* の発現については有意差を認めなかったが、tissue inhibitor of metalloproteinase- (*Timp-*) *1* の発現は AMSC-EV により減少傾向を認めた (図 7A-D)。

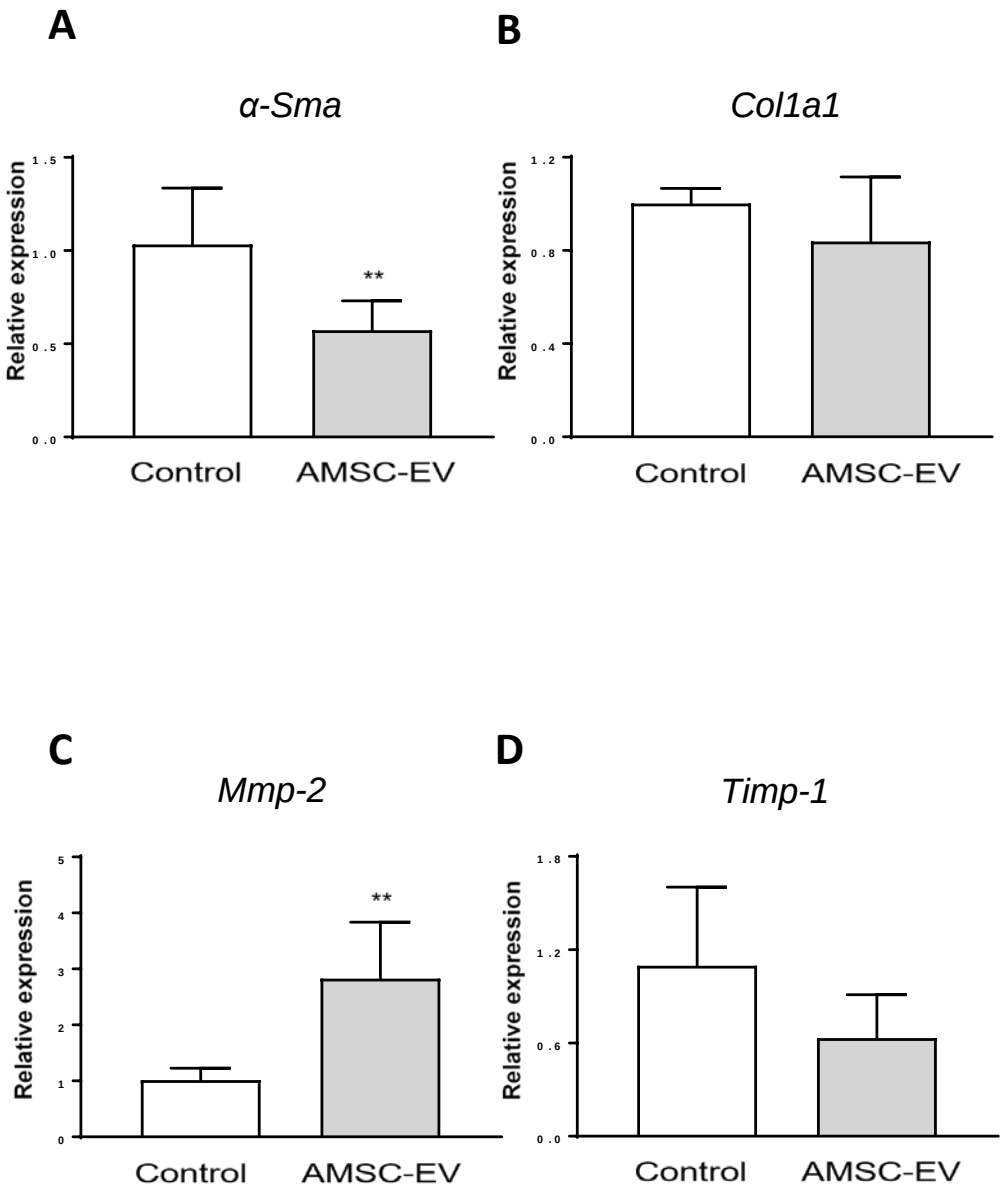


図 7：初代培養ラット星細胞の活性化に対する AMSC-EV の効果

(A) *α-Sma*, (B) *Col1a1*, (C) *Mmp-2*, (D) *Timp-1* の発現を定量的 RT-PCR 法にて検討した。統計値は平均値±標準偏差で示した。$^{**}p < 0.01$: vs control 群。

考察

本研究では、ラットの慢性肝障害モデルとして、AMSC-EV の抗炎症・抗線維化効果について検討した。NASH モデルでは組織学的所見および炎症関連遺伝子発現の改善を認め、肝線維症モデルでは組織学的所見の改善を認めた。*in vitro* では、AMSC-EV のクッパー細胞や星細胞の活性化抑制を認めた。

MSC-EV の肝疾患動物モデルにおける既報は、急性肝障害モデル (Tan et al., 2014, Yan et al., 2017, Damania et al., 2018, Tamura et al., 2016)や肝不全 (Chen et al., 2017)・四塩化炭素誘発肝線維症モデル (Li et al., 2013)、thioacetamide 誘発肝線維症 (Mardpour et al., 2017)などが報告されている。そして EV は生理学的活性をもつタンパク質や脂質、mRNA や microRNA などを内包し (Merino-Gonzalez et al., 2016)、これらの中でも interleukin 6 signal transducer (IL6ST) / glycoprotein (gp) 130 や tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A (TNFRSF1A) / TNFR1、chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL) 2 / macrophage inflammatory protein- (MIP-) 2 などが肝再生に関わるプライミング因子に関連があることが報告されている (Tan et al., 2014)。一方で、AMSC-EV のラット NASH モデルや肝線維症モデルにおける有効性については、これまで報告されていなかった。AMSC-EV 内に含まれるどういった活性因子がこうした抗炎症・抗線維化効果に起因しているのかなどの検証が今後の課題と考えている。

NAFLD の動物モデルとしては、遺伝子変異を加えたモデルや、コリン欠乏性高脂肪食、メチオニン・コリン欠乏高脂肪食やこれにスクロースやフルクトースを加えた餌など様々なモデルの報告がなされているが、まだヒトの臨床像と酷似した理想的なモデルは存在していない (Jahn et al., 2018)。本検討での NASH モデルは明らかな線維化を誘導しないものの脂肪化と炎症細胞浸潤を伴うものであった。Lee らは MSC 投与が肥満関連症候群に有用な治療ツールとなりえることを報告している (Lee et al., 2017)。さらに MSC の Lysate でも耐糖能を改善させることから、これらの事象がパラクライン効果を介しているとも報告した。NASH 発症の機序としては、multiple parallel hit 説が近年は提唱されている (Buzzetti et al., 2016)。本研究では、NASH モデルにおける炎症について検討した。NASH の早期の段階では、クッパー細胞が活性化し、IL-1 や MCP-1、C-C motif chemokine ligand (CCL)5 などのサイトカインやケモカインを分泌する

(Dixon et al., 2013)ことで、NASH における炎症反応制御・炎症細胞の誘導などの役割を担っている (Duarte et al., 2015, Liu et al., 2016)。CD68 は全マクロファージの共通マーカーであり (Badylak et al., 2008)、CD11c は炎症性の M1 マクロファージのマーカーの一つとされており (Van Gassen et al., 2015)、炎症抑制性の M2 マクロファージは CD163 や CD206 などがマーカーとされている (Roszer, 2015)。本研究では、ラット NASH モデルにおいてクッパー細胞の活性化を抑制し、特に M1 マクロファージの発現を抑制していた。そして炎症性サイトカイン（*Tnf-α*、*Il-1β*、*Il-6*）の発現も抑制した。さらに LPS は TLR4 シグナル経路を介してクッパー細胞を活性化し (Su, 2002)、NASH 発症を誘導する重要な因子の一つであるため (Oseini and Sanyal, 2017)、*in vitro* での LPS 刺激下における AMSC-EV の効果を検討した。LPS/TLR4 シグナルでは、Myeloid differentiation protein 88 (MyD88)が活性化し、TRAF6 の活性化が誘導され、さらに p65 などの NF-κB のリン酸化、IκB-α のリン酸化がおこり、核内に移行して転写される (Liew et al., 2005, Mitchell et al., 2016)。申請者の研究室では、AMSC の培養上清がマクロファージ細胞 (RAW264.7)に対しての抗炎症効果を有することを報告した (Onishi et al., 2015)。本研究では、AMSC-EV がクッパー細胞や星細胞において LPS 誘導性の炎症性サイトカインの発現を抑制した。さらに、p65 や IκB-α のリン酸化、NF-κB の転写活性を抑制した。しかしながら、HEK293 において TRAF6 の強発現によって誘導される NF-κB の転写活性を AMSC-EV は抑制しなかった。これらのことより、AMSC-EV は LPS/TLR4 経路での早期のステップに作用している可能性が示唆された。

一方、肝線維症を誘発する動物モデルは、CCl_4 や thioacetamide、胆管結紮モデルや遺伝子改変動物など多数あるが、現時点では CCl_4 が肝線維症モデルとして広く用いられている (Delire et al., 2015)。CCl_4 は cytochrome P450 2E1 により代謝され、反応性の高いトリクロロメチルラジカルを生じ肝障害を誘導するが、これを反復投与することにより、創傷治癒を繰り返し、星細胞の活性化や細胞外マトリクスのバランスの不均衡などから進行性の肝線維症を引き起こす。Li らは、CCl_4（0.6 mL/kg）をマウスの腹腔内に週 2 回、6 週間投与し、肝左葉右葉に直接 PBS 330 μL に懸濁したヒト臍帯 MSC から得られた EV 250 μg を局注した (Li et al., 2013)。彼らは CCl_4 誘発肝線維症において、ヒト臍帯 MSC-EV の肝内投与が線維被膜形成や肝形態を改善させ、肝内の炎症やコラーゲン蓄積を改善させることを報告した。本研究でも同様に、AMSC-EV が線維蓄積や星細

胞の活性化を抑制した。また、*in vitro* では AMSC-EV は線維化において重要な要因となる星細胞の活性化 (Campana and Iredale, 2017)を抑制した。さらに星細胞の活性化や肝線維化を誘導するクッパー細胞の活性化 (Duffield et al., 2005)を抑制していた。しかしながら、6 週間高用量の四塩化炭素投与により作製された、高度な肝線維症の *in vivo* モデルにおいて肝線維化に関連する遺伝子発現を有意に抑制する結果は得られなかった。AMSC-EV 投与の頻度や用量を増加させることによって、より高い治療効果を期待できるかもしれない。

申請者の研究室では以前、AMSC 投与がラットにおける CCl_4 誘発肝線維症モデルを改善させること、そして抗線維化効果に寄与するクッパー細胞に対しての AMSC の抗炎症効果を報告した (Kubo et al., 2015)。同様に本研究でも AMSC-EV の抗炎症・抗線維化効果について示した。MSC は肝疾患における抗炎症・抗線維化治療として新たな治療アプローチとして提唱されている (Gazdic et al., 2017)。しかしながら、MSC の静脈内投与は肺塞栓症や動物死を引き起こすことが報告されており、関連する製造プロセスの容易さ、およびこれらの不可能なアプローチのより安全なプロファイルのために細胞治療よりもむしろ非細胞治療への期待が大きくなってきている(Lai et al., 2010, Rani et al., 2015, Furlani et al., 2009)。EV はパラクライン活性に関連する主要成分の 1 つであり、MSC 由来 EV は再生医療における細胞フリー治療の選択肢として望まれている (Han et al., 2016)。さらに、MSC 移植を EV と置き換えることによって、関連する安全性の懸案事項および制限の多くを緩和することが可能になるかもしれない (Sun et al., 2016)。そして、MSC-EV は、先天的および適応性の免疫応答を誘発する傾向が低いなど、患者の安全性に特定の利点を提供する可能性がある (Yu et al., 2014)。

現在、MSC の source としては様々な組織が使用されているが、申請者の研究室で使用している羊膜由来 MSC は侵襲なく組織採取が可能であり、多量の MSC を回収できることから、EV の回収にも有用な MSC と考えられる。MSC-EV が動物疾患モデルに有用であると 2010 年に報告されて 8 年が経過するが、EV 自体の役割はまだまだ不明な点も多く、基礎的研究から羊膜由来 MSC-EV を用いた他の動物モデルへの有用性についても今後検討されるべきである。

結論

本研究において、以下の知見が得られた。

1. AMSC-EV は、クッパー細胞の活性化を抑制することによって、ラット NASH モデルにおける炎症を改善させた。

2. 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ってラット肝線維症モデルにおける炎症や線維化を改善させた。

3. AMSC-EV は LPS/TLR4 シグナル経路において、早期のステップに作用し、NF-κB のリン酸化や炎症性サイトカインの発現を抑制することで抗炎症効果を有していた。

本研究において、AMSC-EV はラット慢性肝障害モデルに対する治療効果が示され、新たな治療法である可能性が示唆された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、有益な御指導・御助言を頂きました、北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室　坂本直哉教授に深く感謝いたします。

研究に対して素人であった私に、その心構え、信念、実験方法、データ解析、論文作成そして海外での発表方法など、あらゆる面において御指導・御支援頂きました北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室　大西俊介准教授には感謝の念に堪えません。厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究に尊い生命を提供して頂きました実験動物諸霊に深く感謝いたします。

利益相反
なし

引用文献

Amarapurkar, D. N., Hashimoto, E., Lesmana, L. A., Sollano, J. D., Chen, P. J., Goh, K. L. & ASIA-PACIFIC WORKING PARTY ON, N. (2007). How common is non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region and are there local differences? J. Gastroenterol. Hepatol., 22**,** 788-793.

Badylak, S. F., Valentin, J. E., Ravindra, A. K., Mccabe, G. P. & Stewart-Akers, A. M. (2008). Macrophage phenotype as a determinant of biologic scaffold remodeling. Tissue Eng. Part A*,* 14**,** 1835-1842.

Berardis, S., Dwisthi Sattwika, P., Najimi, M. & Sokal, E. M. (2015). Use of mesenchymal stem cells to treat liver fibrosis: current situation and future prospects. World J. Gastroenterol.*,* 21**,** 742-758.

Borger, V., Bremer, M., Ferrer-Tur, R., Gockeln, L., Stambouli, O., Becic, A. & Giebel, B. (2017). Mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles and their potential as novel immunomodulatory therapeutic agents. Int. J. Mol. Sci.*,* 18.

Buzzetti, E., Pinzani, M. & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Metabolism*,* 65**,** 1038-1048.

Campana, L. & Iredale, J. P. (2017). Regression of liver fibrosis. Semin. Liver Dis.*,* 37**,** 1-10.

Chen, L., Xiang, B., Wang, X. & Xiang, C. (2017). Exosomes derived from human menstrual blood-derived stem cells alleviate fulminant hepatic failure. Stem Cell Res. Ther.*,* 8**,** 9.

Damania, A., Jaiman, D., Teotia, A. K. & Kumar, A. (2018). Mesenchymal stromal cell-derived exosome-rich fractionated secretome confers a hepatoprotective effect in liver injury. Stem Cell Res. Ther.*,* 9**,** 31.

Delire, B., Starkel, P. & Leclercq, I. (2015). Animal models for fibrotic liver diseases: What we have, what we need, and what is under development. J. Clin. Transl. Hepatol., 3, 53-66.

Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T. & Nagy, L. E. (2013). Kupffer cells in the liver. Compr. Physiol., 3, 785-797.

Duarte, N., Coelho, I. C., Patarrao, R. S., Almeida, J. I., Penha-Goncalves, C. & Macedo, M. P. (2015). How inflammation impinges on NAFLD: A role for Kupffer cells. Biomed. Res. Int., 2015, 984578.

Duffield, J. S., Forbes, S. J., Constandinou, C. M., Clay, S., Partoliia, M., Vuthoori, S., Wu, S., Lang, R. & Iredale, J. P. (2005). Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. Journal of Clinical Investigation, 115, 56-65.

Eggenhofer, E., Benseler, V., Kroemer, A., Popp, F. C., Geissler, E. K., Schlitt, H. J., Baan, C. C., Dahlke, M. H. & Hoogduijn, M. J. (2012). Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. Front. Immunol., 3, 297.

Furlani, D., Ugurlucan, M., Ong, L., Bieback, K., Pittermann, E., Westien, I., Wang, W., Yerebakan, C., Li, W., Gaebel, R. et al. (2009). Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. Microvasc. Res., 77, 370-376.

Gazdic, M., Arsenijevic, A., Markovic, B. S., Volarevic, A., Dimova, I., Djonov, V., Arsenijevic, N., Stojkovic, M. & Volarevic, V. (2017). Mesenchymal stem cell-dependent modulation of liver diseases. Int. J. Biol. Sci., 13, 1109-1117.

Giebel, B., Kordelas, L. & Borger, V. (2017). Clinical potential of mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles. Stem Cell Investig., 4, 84.

Goldberg, D., Ditah, I. C., Saeian, K., Lalehzari, M., Aronsohn, A., Gorospe, E. C. & Charlton, M. (2017). Changes in the prevalence of hepatitis C virus infection, nonalcoholic steatohepatitis, and alcoholic liver disease among patients with cirrhosis or liver failure on the waitlist for liver transplantation. Gastroenterology, 152, 1090-1099.

Han, C., Sun, X., Liu, L., Jiang, H., Shen, Y., Xu, X., Li, J., Zhang, G., Huang, J., Lin, Z., Xiong, N. & Wang, T. (2016). Exosomes and their therapeutic potentials of stem cells. Stem Cells Int., 2016, 7653489.

Hashimoto, E. & Tokushige, K. (2012). Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: Growing evidence of an epidemic? Hepatol. Res., 42, 1-14.

Higashi, T., Friedman, S. L. & Hoshida, Y. (2017). Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. Adv. Drug. Deliv. Rev., 121, 27-42.

Jahn, D., Kircher, S., Hermanns, H. M. & Geier, A. (2018). Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view. Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis., 18.

Kalra, H., Adda, C. G., Liem, M., Ang, C. S., Mechler, A., Simpson, R. J., Hulett, M. D. & Mathivanan, S. (2013). Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. Proteomics, 13, 3354-3364.

Katsuda, T., Kosaka, N., Takeshita, F. & Ochiya, T. (2013). The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. Proteomics, 13, 1637-5163.

Kawakubo, K., Ohnishi, S., Fujita, H., Kuwatani, M., Onishi, R., Masamune, A., Takeda, H. & Ssakmoto, N. (2016). Effect of fetal membrane-derived mesenchymal stem cell transplantation in rats with acute and chronic pancreatitis. Pancreas, 45, 707-713.

Kubo, K., Ohnishi, S., Hosono, H., Fukai, M., Kameya, A., Higashi, R., Yamada, T., Onishi, R., Yamahara, K., Takeda, H. et al. (2015). Human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates liver fibrosis in rats. Transplant. Direct., 1, e16.

Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S., Choo, A., Chen, T. S., Salto-tellez, M., Timmers, L., Lee, C. N., El Oakley, R. M. et al. (2010). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. Stem Cell Res., 4, 214-222.

Lee, C. W., Hsiao, W. T. & Lee, O. K. (2017). Mesenchymal stromal cell-based therapies reduce obesity and metabolic syndromes induced by a high-fat diet. Transl. Res., 182, 61-74.

Li, T., Yan, Y., Wwang, B., Qian, H., Zhang, X., Shen, L., Wang, M., Zhou, Y., Zhu, W., Li, W. & Xu, W. (2013). Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. Stem Cells Dev., 22, 845-854.

Liang, X., Ding, Y., Zhang, Y., Tse, H. F. & Lian, Q. (2014). Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. Cell Transplant., 23, 1045-1059.

Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K. & O'neill, L. A. (2005). Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. Nat. Rev. Immunol., 5, 446-458.

Liu, W., Baker, R. D., Bhatia, T., Zhu, L. & Baker, S. S. (2016). Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. Cell Mol. Life. Sci., 73, 1969-1987.
Lou, G., Chen, Z., Zheng, M. & Liu, Y. (2017). Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. Exp. Mol. Med., 49, e346.

Mardpour, S., Hassani, S. N., Mardpour, S., Sayahpour, F., Vosough, M., Ai, J., Aghdami, N., Hamidieh, A. A. & Baharvand, H. (2018). Extracellular

vesicles derived from human embryonic stem cell-MSCs ameliorate cirrhosis in thioacetamide-induced chronic liver injury. J. Cell Physiol.,233, 9330-9344.

Mederacke, I., Dapito, D. H., Affo, S., Uchinami, H. & Schwabe, R. F. (2015). High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. Nat. Protoc., 10, 305-315.

Merino-Gonzalez, C., Zuniga, F. A., Escudero, C., Ormazabal, V., Reyes, C., Nova-Lamperti, E., Salomon, C. & Aguayo, C. (2016). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote angiogenesis: Potencial clinical application. Front. Physiol., 7, 24.

Miki, T. & Strom, S. C. (2006). Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. Stem Cell Rev., 2, 133-142.

Mitchell, S., Vargas, J. & Hoffmann, A. (2016). Signaling via the NFkappaB system. Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med., 8, 227-241.

Miyamoto, S., Ohnishi, S., Onishi, R., Tsuchiya, I., Hosono, H., Katsurada, T., Yamahara, K., Takeda, H. & Sakamoto, N. (2017). Therapeutic effects of human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation and conditioned medium enema in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. Am. J. Transl. Res., 9, 940-952.

Mizushima, T., Ohnishi, S., Hosono, H., Yamahara, K., Tsuda, M., Shimizu, Y., Kato, M., Asaka, M. & Sakamoto, N. (2017). Oral administration of conditioned medium obtained from mesenchymal stem cell culture prevents subsequent stricture formation after esophageal submucosal dissection in pigs. Gastrointest. Endosc., 86, 542-552.

Nooshabadi, V. T., Mardpour, S., Yousefi-Ahmadipour, A., Allahverdi, A., Izadpanah, M., Daneshimehr, F., AI, J., Banafshe, H. R. & Ebrahimi-Barough, S. (2018). The extracellular vesicles-derived from mesenchymal stromal cells: A new therapeutic option in regenerative medicine. J. Cell.

Biochem., 119, 8048-8073.
Ohara, M., Ohnishi, S., Hosono, H., Yamamoto, K., Fu, Q., Maehara, O., Suda, G. & Sakamoto, N. (2018). Palmitoylethanolamide ameliorates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. Front. Pharmacol., 9, 709.

Onishi, R., Ohnishi, S., Higashi, R., Watari, M., Yamahara, K., Okubo, N., Nakagawa, K., Katsurada, T., Suda, G., Natsuizaka, M., Takeda, H. & Sakamoto, N. (2015). Human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates dextran sulfate sodium-induced severe colitis in rats. Cell Transplant., 24, 2601-2614.

Ono, M., Ohnishi, S., Honda, M., Ishikawa, M., Hosono, H., Onishi, R., Nakagawa, K., Takeda, H. & Sakamoto, N. (2015). Effects of human amnion-derived mesenchymal stromal cell transplantation in rats with radiation proctitis. Cytotherapy, 17, 1545-1559.

Oseini, A. M. & Sanyal, A. J. (2017). Therapies in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Liver Int., 37, 97-103.

Rani, S., Ryan, A. E., Griffin, M. D. & Ritter, T. (2015). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Toward cell-free therapeutic applications. Mol. Ther., 23, 812-823.

Ratziu, V., Charlotte, F., Bernhardt, C., Giral, P., Halbron, M., Lenaour, G., Hartmann-Heurtier, A., Bruckert, E., Poynard, T. & Group, L. S. (2010). Long-term efficacy of rosiglitazone in nonalcoholic steatohepatitis: results of the fatty liver improvement by rosiglitazone therapy (FLIRT 2) extension trial. Hepatology, 51, 445-453.

Roszer, T. (2015). Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. Mediators Inflamm., 2015, 816460.

Samsonraj, R. M., Raghunath, M., Nurcombe, V., Hui, J. H., Van Wijnen, A. J. & Cool, S. M. (2017). Concise review: Multifaceted characterization of

human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine. Stem Cells Transl. Med., 6, 2173-2185.

Sanyal, A. J., Chalasani, N., Kowdley, K. V., Mccullough, A., Diehl, A. M., Bass, N. M., Neuschwander-Tetri, B. A., Lavine, J. E., Tonascia, J., Unalp, A., Van Natta, M., Clark, J., Brunt, E. M., Kleiner, D. E., Hoofnagle, J. H. & Robuck, P. R. (2010). Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. N. Engl. J. Med., 362, 1675-1685.

Sato, C., Yamamoto, Y., Funayama, E., Furukawa, H., Oyama, A., Murao, N., Hosono, H., Kawakubo, K., Sakamoto, N. & Ohnishi, S. (2018). Conditioned medium obtained from amnion-derived mesenchymal stem cell culture prevents activation of keloid fibroblasts. Plast. Reconstr. Surg., 141, 390-398.

Squillaro, T., Peluso, G. & Galderisi, U. (2016). Clinical trials with mesenchymal stem cells: An update. Cell Transplant., 25, 829-848.
Stolzing, A. & Scutt, A. (2006). Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. Aging Cell, 5, 213-224.

Su, G. L. (2002). Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 283, 256-265.

Sugiura, R., Ohnishi, S., Ohara, M., Ishikawa, M., Miyamoto, S., Onishi, R., Yamamoto, K., Kawakubo, K., Kuwatani, M. & Sakamoto, N. (2018). Effects of human amnion-derived mesenchymal stem cells and conditioned medium in rats with sclerosing cholangitis. Am. J. Transl. Res., 10, 2102-2114.

Sun, L., Xu, R., Sun, X., Duan, Y., Han, Y., Zhao, Y., Qian, H., Zhu, W. & Xu, W. (2016). Safety evaluation of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stromal cell. Cytotherapy, 18, 413-422.

Tamura, R., Uemoto, S. & Tabata, Y. (2016). Immunosuppressive effect of

mesenchymal stem cell-derived exosomes on a concanavalin A-induced liver injury model. Inflamm. Regen., 36, 26.

Tan, C. Y., Lai, R. C., Wong, W., Dan, Y. Y., Lim, S. K. & Ho, H. K. (2014). Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models. Stem Cell Res. Ther., 5, 76.

Tsuda, M., Ohnishi, S., Mizushima, T., Hosono, H., Yamahara, K., Ishikawa, M., Abiko, S., Katsurada, T., Shimizu, Y. & Sakamoto, N. (2018). Preventive effect of mesenchymal stem cell culture supernatant on luminal stricture after endoscopic submucosal dissection in the rectum of pigs. Endoscopy, 50, 1001-1016.

Van Gassen, N., Staels, W., Van Overmeire, E., De Groef, S., Sojoodi, M., Heremans, Y., Leuckx, G., Van De Casteele, M., Van Ginderachter, J. A., Heimberg, H. et al. (2015). Concise review: Macrophages: Versatile gatekeepers during pancreatic beta-cell development, injury, and regeneration. Stem Cells Transl. Med., 4, 555-563.

Wang, J., Cen, P., Chen, J., Fan, L., Li, J., Cao, H. & Li, L. (2017). Role of mesenchymal stem cells, their derived factors, and extracellular vesicles in liver failure. Stem Cell Res. Ther., 8, 137.

Yan, Y., Jiang, W., Tan, Y., Zou, S., Zhang, H., Mao, F., Gong, A., Qian, H. & Xu, W. (2017). hucMSC exosome-derived GPX1 is required for the recovery of hepatic oxidant injury. Mol. Ther., 25, 465-479.

Younossi, Z. M., Loomba, R., Anstee, Q. M., Rinella, M. E., Bugianesi, E., Marchesini, G., Neuschwander-Terai, B. A., Serfaty, L., Negro, F., Caldwell, S. H. et al. (2017a). Diagnostic modalities for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and associated fibrosis. Hepatology, 68, 349-360.

Younossi, Z. M., Loomba, R., Rinella, M. E., Bugianesi, E., Marchesini, G., Neuschwander-Terai, B. A., Serfaty, L., Negro, F., Caldwell, S. H., Ratziu,

V. et al. (2017b). Current and future therapeutic regimens for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Hepatology, 68, 361-371.

Yu, B., Zhang, X. & Li, X. (2014). Exosomes derived from mesenchymal stem cells. Int. J. Mol. Sci., 15, 4142-4157.