

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 竹内 卓  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 1016 号  
学位授与の日付 令和3年9月21日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 Small extracellular vesicles derived from interferon- $\gamma$  pre-conditioned mesenchymal stromal cells effectively treat liver fibrosis.  
(インターフェロン  $\gamma$  で刺激した間葉系幹細胞由来のエクソソームは肝線維化を効果的に改善する)  
論文審査委員 主査 教授 阿部 理一郎  
副査 教授 若井 俊文  
副査 准教授 小林 隆

### 博士論文の要旨

【背景】肝硬変はB型肝炎、C型肝炎、脂肪肝、アルコール摂取などが主な原因で長期に肝臓が障害を受け徐々に線維化が進み、黄疸、腹水、肝性脳症、静脈瘤破裂、肝細胞癌などを来す致死的な疾患であり、日本には40万人程度の患者が存在するとされている。肝臓は障害を受けても再生しやすい臓器として知られているが、肝障害が進行し硬くなり再生が困難な肝硬変の状態に至った肝臓になると、根治的治療法は肝臓そのものを置き換える肝移植しかないため、ドナーの提供を受けて治療が受けられる患者数はかなり限られ10%未満である。そのため、肝硬変の原因である線維を改善し、肝臓の再生を誘導する新たな治療法が望まれている。

【目的】申請者らの研究室では肝硬変の治療として、2017年より国内最初の他家間葉系幹細胞を用いた肝硬変に対する企業治験 (Phase I、II) を開始しており、海外の報告では自己のマクロファージを用いた肝硬変治療法の開発が行われている。申請者らは基礎研究として、間葉系幹細胞が、他の細胞に抗炎症性の指令を出す『指揮細胞』として働き、実際に肝臓で働くマクロファージに指令を与え、肝硬変の組織修復を促すことを明らかにした。(STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE 2019)。そこで、今回申請者らは間葉系幹細胞から多量に産生され体液を介した伝達物質として放出される100nm前後の細胞外小胞 (エクソソーム) に着目し、マクロファージにどのような影響を与え、マウス肝硬変モデルに肝線維化の改善効果を示すかを検討した。その際には、間葉系幹細胞の培養時にサイトカインなどの免疫調整因子も加え、分泌されるエクソソームに内包される遺伝情報の発現変化などを検証し、線維化改善へより有効な治療効果の追求を目的とした。

【方法】インターフェロン  $\gamma$  は活性化Tリンパ球やNK細胞により産生され、様々な免疫系細胞を刺激する多指向性サイトカインとして知られているが、間葉系幹細胞に対しては抗炎症性を強く誘導する報告が多数されている。そこで、今回申請者はインターフェロン  $\gamma$  刺激下で培養した間葉系幹細胞から産生されるエクソソームが、肝硬変モデルマウスにどのような影響を与えるか、通常培養の間葉系幹細胞とともに

に二光子励起顕微鏡を用いたライブイメージングの手法を用い、マクロファージやマウス肝硬変モデルへ投与し、このエクソソームの影響を視覚的に検証した。また、それらのエクソソームはどのようなタンパク質やmiRNAなどの情報伝達物質が含まれるか、インターフェロン $\gamma$ の刺激前のエクソソームと性質が異なるかを検証した。さらに、それらのエクソソームが、生体に投与された際にどのような機能を発現するか、四塩化炭素を用いたマウス肝障害モデルを用い、間葉系幹細胞とエクソソームをそれぞれインターフェロン $\gamma$ 刺激の有無と合わせて尾静注投与を行い、肝障害改善効果を血清学的評価、組織学的評価、シングルセルRNAシーケンス法などを用い検証した。

【結果】エクソソームは情報伝達役として、マクロファージをin vitroで抗炎症性へと変化させ、運動能の向上、食能の亢進をもたらした。また、エクソソームはインターフェロン $\gamma$ で間葉系幹細胞を刺激した後では大幅に変わり、特にアネキシンA1、ラクトトランスフェリン、アミノペプチダーゼNなどの抗炎症性マクロファージを誘導するタンパクが増えていた。また、肝硬変モデルマウスを用いてのin vivoの実験では、間葉系幹細胞の投与と遜色のない肝障害改善効果、線維化改善効果を持ち合わせていることを明らかにした。インターフェロン $\gamma$ で間葉系幹細胞を刺激した後で得られるエクソソーム投与後の肝臓の免疫細胞の変化を見るために、シングルセルRNA解析を行ったが、マクロファージを抗炎症性に誘導するばかりでなく制御性T細胞の発現上昇を認めることもわかった。このように肝内の免疫系をより強く抗炎症性に極性変化させていることが確認された。また、二光子顕微鏡にてインターフェロン $\gamma$ で間葉系幹細胞を刺激した後で得られるエクソソームの投与後は、マクロファージが肝障害部に効率良く集まり、肝細胞死細胞の食食を行っている細胞を多く確認できた。

今回の成果により間葉系幹細胞の肝硬変の治療効果にエクソソームが重要な働きを担っており、そのエクソソームの中に含まれる有効物質を変えることにより、より高い治療効果を得られる可能性が示唆された。今後は細胞を投与する治療と共に、細胞を投与せずエクソソームのみを投与する治療法開発への発展が期待でき、今まで肝臓の線維化改善、再生促進に働く有効な薬物がなかった現状に対して、今後有効成分を更に選択し有効成分だけを用いた治療や、有効成分をより濃縮したエクソソームを投与する治療法などへの応用も期待でき、肝硬変治療において重要な知見となると考えられた。

#### 審査結果の要旨

肝硬変は長期に肝臓が障害を受け徐々に線維化が進み、肝細胞癌などを来す致命的な疾患である。肝硬変の原因である線維を改善し再生を誘導する治療法が望まれている。

申請者らは肝硬変の治療として、間葉系幹細胞(MSC)を用いた企業治験を開始している。MSCはマクロファージに指令を与え、肝硬変の組織修復を促す知見から、MSCから放出されるエクソソーム(EV)に着目した。

IFN- $\gamma$ 刺激下で培養したMSCから産生されるEVが、肝硬変モデルマウスにどのような影響を与えるか、ライブイメージングの手法を用い検証した。また、EVはどのようなタンパク質含むかを検証した。さらに、生体に投与された際にどのような機能を発現するか、四塩化炭素を用いたマウス肝障害モデルを用い、肝障害改善効果を検証した。

EVは情報伝達役として、マクロファージを抗炎症性へと変化させ、運動能の向上、食能の亢進をもたらした。また、EVはIFN- $\gamma$ でMSCを刺激した後アネキシンA1などの抗炎症性マクロファージを誘導するタンパクが増えた。また、肝硬変モデルマウスでは、肝障害改善効果、線維化改善効果がみられた。

今回の成果によりMSCの肝硬変の治療効果にEVが重要な働きを担っており、EVの中に含まれる有効物質を変えることにより、より高い治療効果を得られる可能性が示唆され、この点に本論文の学位論文としての価値を認める。