

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	野尻 俊介
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 1039 号
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 23 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	Synthesized HMGB1 peptide attenuates liver inflammation and suppresses fibrosis in mice. (HMGB1 合成部分ペプチドはマウスモデル肝において抗炎症・抗線維化作用を表す)
論文審査委員	主査 教授 若井 俊文 副査 教授 阿部 理一郎 副査 准教授 坂田 純

### 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命的な疾患であり、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 (STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE 2019)、これに基づき、肝硬変の新規治療として、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を実施している。一方で、細胞投与に依らずに、より安全に高品質な再生治療効果をもたらす方法 (セルフリーの再生医療) についても研究を進めており、その一環として昨年申請者らは、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に対してより高い治療効果を得られる可能性を報告した (NATURE PARTNER JOURNALS REGENERATIVE MEDICINE 2020)。今回申請者らは大阪大学再生誘導医学寄附講座玉井克人教授らにより合成されたHMGB1 (high mobility group box-1 protein) の部分ペプチドが生体内の骨髄間葉系幹細胞を血中に誘導する可能性があるとの報告に着目し、大阪大学再生誘導医学寄附講座の協力を得て、同ペプチドを用いて肝硬変モデルマウスにて効果の検証を行った。

【方法】HMGB1はあらゆる有核細胞内の核内に存在する非ヒストン核蛋白質であり、DNAと結合して様々な転写因子活性を調節しているが、そのDNA結合部位はBox AとBox Bの大きく2つに分けられている。それぞれの部位には核内転写調節だけではなく細胞外で直接受容体のリガンドとなる部位も含まれていることが知られている。Box Bにはマルチリガンド受容体のRAGE (receptor for advanced glycation end-products)

やTLR4 (Toll - like receptor 4)との結合部位が知られておりNF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$  B) 活性化の誘導を介して様々な炎症性サイトカインを放出し炎症を惹起させる働きが知られている。一方でBox Aは上記のBox Bに対してアンタゴニストとして働く作用や、PDGFR $\alpha$  (platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$ )陽性骨髄間葉系幹細胞に対しマイグレーション活性を示すことが近年解明されてきており、玉井克人教授らはこれらの事実に着目しBox A部分のみを人工合成したペプチドの開発に成功した。同ペプチドはこれまで表皮水疱症や脳梗塞の分野で治験が開始されており、静脈内投与をすることで骨髄の間葉系幹細胞を血中に動員する機序が報告されている。そこで、今回申請者は同ペプチドを四塩化炭素を用いた肝硬変モデルマウスに投与し、間葉系幹細胞を投与した際と同様の変化を確認できるか、血清学的評価や組織学的評価手法を用いて経時的に検証した。また、それらの変化が肝内のどのような環境変化を引き起こしたことによる結果か、シングルセル RNA シークエンス法を用いて網羅的に解析し、特に肝臓で抗線維化の実働部隊となるマクロファージの変化に注目して詳細な解析を行った。

【結果】合成されたHMGB1の部分ペプチドは投与1週目時点から有意なAST, ALTの低下作用を呈し、ALBの上昇作用を呈した。線維化に関しては投与2週目以降でSirius Red染色での線維比率の有意な減少、Hydroxyprolineの有意な減少を見ることができた。これらの効果は投与4週ではさらに明らかな変化として確認でき、間葉系幹細胞投与と同等の高い治療効果を確認できた。HMGB1ペプチドのin vitroでのマクロファージへの影響は有意ではなく、同ペプチドが直接的にマクロファージに作用するものではないことが示唆されたが、4週投与後のマウス肝組織内のCD45陽性細胞に対するシングルセルRNAシークエンスではマクロファージの集団でのコントロールに比した遺伝子の変化が最も多く、in vivoでは間接的にマクロファージにダイナミックな影響を及ぼしていることが確認された。申請者らは更に近年Natureに発表されたScar associated macrophage (SAM: TREM2+CD9+)に絞って解析を行ったところ、マクロファージの抗炎症性マーカーCD206陽性のSAMの肝内での大幅な上昇を認め、同ペプチドが肝内の主要なマクロファージを抗炎症方向に変化させることで抗線維化効果を発現していることが示唆された。

今回の成果により肝硬変治療における新たなセルフリー治療の可能性が得られ、現在同ペプチドを用いた慢性肝疾患に対する医師主導治験を開始している。細胞投与やエクソソーム投与に比較し、人工ペプチドは一定の品質を確保しやすく、より安全により定量的に評価できる点から創薬にも結び付きやすく、今後の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

【目的】合成HMGB1 (high mobility group box-1 protein)の部分ペプチドが生体内の骨髄間葉系幹細胞を血中に誘導する可能性があるとの報告に着目し、HMGB1ペプチドを用いて肝硬変モデルマウスにて効果の検証を行った。【方法】HMGB1はあらゆる有核細胞内の核内に存在する非ヒストン核蛋白質であり、DNAと結合して様々な転写因子活性を調節しているが、そのDNA結合部位はBox AとBox Bの大きく2つに分けられる。Box A部分のみを人工合成したペプチドを四塩化炭素を用いた肝硬変モデルマウスに投与し、間葉系幹細胞を投与した際と同様の変化を確認できるか、血清学的評価や組織学的評価手法を用いて経時的に検証した。また、それらの変化が肝内のどのような環境変化を引き起こしたことによる結果か、シングルセルRNAシークエンス法を用いて網羅的に解析し、特に肝臓で抗線維化の実働部隊となるマクロファージの変化に注目して詳細な解析を行った。【結果】合成されたHMGB1の部分ペプチドは投与1週目時点から有意なAST, ALTの低下作用を呈し、ALBの上昇作用を呈した。線維化に関しては投与2週目以降でSirius Red染色での線維比率の有意な減少、Hydroxyprolineの有意な減少を見ることができた。シングルセルRNAシークエンスではマクロファージの集団でのコントロールに比した遺伝子の変化が最も多く、in vivoでは間接的にマクロファージにダイナミックな影響を及ぼしていることが確認された。マクロファージの抗炎症性マーカーCD206陽

性の SAM の肝内での大幅な上昇を認め、同ペプチドが肝内の主要なマクロファージを抗炎症方向に変化させることで抗線維化効果を発現していることが示唆された。

本研究成果を *Inflamm Regener.* 2021, 41:28 に誌上発表しており、学位論文として価値のある研究成果であると判断した。