

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 岩澤 貴宏
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 1043 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 Combination therapy of Juzentaihoto and mesenchymal stem cells attenuates liver damage and regresses fibrosis in mice.
(十全大補湯と間葉系幹細胞の併用療法は肝硬変の治療効果を高める)

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

肝臓は肝炎ウイルス感染、アルコール、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) など、いくつかの要因によって損傷を受けることが知られている。肝臓には高い再生能力があり、自然に線維化が退縮することもあるが、慢性的な肝臓の損傷は線維化や肝硬変につながる。進行した肝硬変の根本的な治療法は肝移植だが、この手術は侵襲的であり、肝臓提供者が少ないという問題がある。肝星細胞 (HSC) の活性化や線維化を抑制するとともに、抗炎症性マクロファージを誘導するような肝硬変の治療法が望まれている。

目的

間葉系幹細胞 (MSC) は、肝障害を軽減し、炎症や肝線維化を抑制する細胞源であることが知られており、他物質の刺激によってその治療効果を高めることが報告されている。

また、一部の漢方薬には、抗炎症作用や抗酸化作用があり、特に十全大補湯 (Juzentaihoto; JTT) は黄耆、桂皮、地黄、芍薬、蒼朮、川芎、当帰、人參、茯苓、甘草から構成される漢方薬だが、マクロファージ (Mφ) やNK細胞などに作用することが報告されている。そこでMSCと併用することで作用の増強される可能性が推測された。

Mφは線維化にも関与しており、T-reg細胞やNK細胞など免疫系の細胞も抗炎症作用や抗線維化に関与していることが報告されている。MSCの免疫細胞への作用がこのような効果を増強し、JTTによってより効果が増強することを推測しマウスによる実験を行った。

方法・結果

本研究では主に3つの研究を行った。

- ①肝硬変モデルマウスでのJTTの効果検証
 - ②肝硬変モデルマウスでのJTTの濃度による効果の検証
 - ③肝硬変モデルマウスでのJTT、MSC、JTT+MSC併用療法での効果の検証
- ①JTTが肝障害に対する効果の検証のため、四塩化炭素 (CCL4) にて肝硬変モデルマウスを作成し、JTTを餌

に混ぜて内服させ比較した。AST/ALT は改善を認めたと、線維化改善の効果は乏しかった。しかし、新規の肝障害は抑えられていると考え、CCL4 を投与する前から JTT を内服させ、同様に肝硬変モデルマウスにて比較したところ、線維化が予防される結果となった。

②JTT の内服量による効果の影響を確認するために食餌に 1.5%JTT 含ませた群 (低用量群) と 3.0%含ませた群 (高用量群)、無治療群と比較検討した。結果は低用量群でも AST/ALT の改善を認め、用量依存的に改善を認める結果となった。

③JTT と MSC の併用による相乗効果を、同様の肝硬変モデルマウスを用いて、無治療群、MSC 群、JTT 群、JTT-MSC 群と比較して評価した。MSC 群、JTT 群ともに、無治療群と比較して、AST/ALT が有意に低下したが、JTT-MSC 群では、さらに改善した。また、JTT 群および JTT-MSC 群は、MSC 群および無治療群と比較して、血清 ALB 濃度が有意に上昇していた。

次にシリウスレッドで染色した面積を計算し、肝臓のヒドロキシプロリン量を定量することで、線維化を評価した。その結果、MSC および JTT-MSC 併用群では、JTT 群および無治療群に比べて線維化が抑制されており、MSC 療法がより効率的に線維化を退縮させることを示唆していると考えた。

作用機序の検索として、FACS にて各投与群のマウスの肝内血球細胞を分析した。JTT を投与された群では NKp46 陽性細胞や CD25/CD4 陽性細胞が増加しており、MSC 投与群では認めなかった。反対に、CD11b+Ly6chigh/CD11b+Ly6cmiddle 比は、JTT 群に比べて MSC 群では効率的に減少を認めた。

つまり JTT を投与されると NK 細胞や Treg 細胞を増やす方向に働き、MSC を投与されると抗炎症性 Mφ を増やす作用をもつことが示唆され、併用によってより強い効果が確認できた。

次に各投与群のマウスの肝組織を用いてメタボローム解析を行ったところ、MSC と JTT では代謝回路の中で異なる作用点で代謝改善作用を示しており、JTT の方が脂質メディエーターをより強く正常化させる傾向にあることが示唆された。

考察

本研究では、JTT と MSC の併用療法が相乗的に肝障害を軽減し、肝線維化を退縮させることを明らかにした。

JTT と MSC はともに肝障害を軽減したが、2つの治療法の作用機序は異なっていた。JTT は NK 細胞と T-reg 細胞を増加させ、血清 ALB を増加させ、さらに、脂質、TCA サイクル、尿素サイクルの経路を効果的に正常化した。一方、MSC は線維化を抑制し、抗炎症性 Mφ を増加させた。これらの異なる作用機序により、申請者の肝硬変モデルの損傷を効果的に退けることができたと考えている。

MSC と JTT はともに、血清の AST と ALT を同程度に低下させたが、MSC は JTT に比べて血清の ALB レベルを強く上昇させなかった。ALB は肝細胞で産生されることから、JTT は肝細胞の機能に影響を与えていると考えられる。

JTT は臨床現場で使用されており、Kawai らは化学療法に JTT を併用することで、栄養障害を予防し、非小細胞肺癌の術後再発患者の無増悪生存期間を改善したと報告している。JTT が免疫細胞に影響し抗炎症性作用を持ちうることは FACS の結果からも推測される。

MSC は複数の活性因子を産生し、JTT は多数の化合物を含むため、治療効果に関連するメカニズムの特定することは困難である。しかし、近年では漢方薬の精製や MSC 由来のエクソソームと呼ばれる小胞が MSC の機能に影響していることが報告されている。

今後は、これらの物質を組み合わせることで、様々な疾患を治療することが可能になると考えた。

審査結果の要旨

【目的】十全大補湯 (Juzentaihoto; JTT) はマクロファージ (Mφ) や NK 細胞などに作用することが報告

され、間葉系幹細胞と併用することで作用の増強される可能性がある。Mφ は線維化にも関与しており、T-reg 細胞やNK 細胞など免疫系の細胞も抗炎症作用や抗線維化に関与していることが報告されている。間葉系幹細胞の免疫細胞への作用がこのような効果を増強し、JTT によってより効果が増強することをマウス実験により検証した。

【方法】 本研究では主に3つの研究を行った。①肝硬変モデルマウスでの JTT の効果検証、②肝硬変モデルマウスでの JTT の濃度による効果の検証、③肝硬変モデルマウスでの JTT、MSC、JTT+MSC 併用療法での効果の検証。

【結果】 ①四塩化炭素 (CCL4) を投与する前から JTT を内服させ、肝硬変モデルマウスにて比較したところ、線維化が予防される結果となった。②食餌に 1.5%JTT 含ませた群 (低用量群) と 3.0%含ませた群 (高用量群)、無治療群で比較検討した結果、低用量群でも AST/ALT の改善を認め、用量依存的に改善を認めた。③MSC および JTT-MSC 併用群では、JTT 群および無治療群に比べて線維化が抑制されており、MSC 療法がより効率的に線維化を退縮させていた。

本研究では、JTT と MSC の併用療法が相乗的に肝障害を軽減し、肝線維化を退縮させることを明らかにし、本研究結果を *Regen Ther.* 2021 Dec; 18: 231-241. 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。