

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	渡邊 雄介
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 845 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Mesenchymal Stem Cells and Induced Bone Marrow-Derived Macrophages Synergistically Improve Liver Fibrosis in Mice (間葉系幹細胞と誘導型マクロファージはマウスに置いて、相互的に作用して肝線維化を改善する)
論文審査委員	主査 教授 若井 俊文 副査 准教授 高村 昌昭 副査 教授 寺井 崇二

博士論文の要旨

【背景と目的】非代償性肝硬変は致死性の疾患であり、侵襲度の高い肝移植以外に根本治療は確立されていない。非代償性肝硬変は一度進行すると、肝硬変の原因となるウイルスなどを除去したとしても肝線維化は改善しない症例も多く、肝移植に代わる治療開発（肝再生療法）が期待されている。そんな状況の中、申請者らは肝硬変への自己の骨髄細胞投与による細胞治療を開発・研究してきたが、骨髄中の細胞はヘテロな集団であり、真に有効な細胞と、肝線維化を改善し再生を促進する詳細な機序は未解明なままである。また機序に関して、投与細胞だけでなくホストの血球による線維化改善機構が関連するとの報告もある。そこで今回申請者らはマウスで自己の骨髄細胞由来間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell, MSC) と誘導型マクロファージ (induced-bone marrow derived macrophage, id-BMM) を用いて肝線維化改善・再生促進を実証し、ホスト細胞を含めた機序の解明を試みた。

【方法】C57BL/6 マウスの骨髄から MSC・id-BMM を高純度に培養した。両細胞の相互作用確認のため共培養の検証を行った。四塩化炭素由来肝硬変モデルマウスを作成し、培養した細胞を投与した。投与は MSC100%投与 (MSC100)、id-BMM100%投与 (id-BMM100)、両細胞 50% : 50%の混合投与 (50/50) とコントロール群の 4 群 (各 n=12、細胞投与量は  $1 \times 10^6$  個で統一) で行い、肝線維量の変化・血液検査における肝機能の変化・肝での線維化改善因子である Matrix metalloproteinases (MMPs) 群の変化の PCR 法による測定・再生因子である Hepatocyte growth factor (HGF) や Oncostatin M (OSM) などの変化の PCR 法による測定・肝内に局在するホスト由来の血球の変化の PCR 法と免疫染色法による測定について、各群を比較検討した。そして投与細胞に標識を付けて (MSC には DsRed の、id-BMM には GFP の標識を付けて)、標識した細胞を投与した後に細胞がマウス体内でどのような動態を示し、肝線維化改善・肝再生にどのように寄与するか、マウスが生きたままの状態を観察するライブイメージングを、二光子励起顕微鏡を用いて施行した。

【結果】In vitro では、MSC・id-BMM の共培養にて MSC の作用で id-BMM は M2 タイプにシフトしていた。M2 タイプとなった id-BMM は、高い血球遊走能力と貪食能力を持つマクロファージとなっていた。

In vivo では、肝線維量はコントロールと比較して、MSC100 で 5.40% (p=0.201)、id-BMM100 で 18.8% (p=0.036)、50/50 で 27.3% (p=0.002) の減少量であり 50/50 で最も線維化改善を認めた。採血結果から 50/50 で最も肝機能の改善を認めた。さらに 50/50 投与群の肝で最も MMP 発現が高まり、再生因子の発現も高まった。同時に 50/50 の肝で最も宿主血球が末梢血から遊走しており、それらが MMP を発現していた。ライブイメージングでは GFP 標識した id-BMM は投与後に肝へ多く遊走し、数時間かけて肝内の廃棄物（デブリ）を貪食する様子を直接的に視覚で捉えた。この id-BMM のデブリ貪食行為によって肝内で再生因子の上昇を認めると判明した。

【考察と結論】 50/50 で最も肝線維化改善と再生促進の効果が高かった。これは MSC・id-BMM の相互作用により id-BMM が M2 タイプマクロファージとなり、多くの宿主血球を肝内に誘導し MMP の発現を高めたことと、多くの肝内デブリを貪食したことで肝再生因子の発現を高めたためと考察される。MSC と id-BMM はそれぞれ単独で投与するよりも、相互的に働くことで肝線維化改善・再生促進を効果的に行う可能性が示唆された。本実験結果は、当科でデザインした、ヒトの他家由来 MSC の肝硬変患者への投与という臨床治験において、何故効果を示すのかを解明する基盤となると考えられる。MSC は臨床治験のように他家細胞を利用し、マクロファージは自己の体内のものを誘導することで本研究結果と同様のことがヒトでも行える可能性を持っている。本研究を活かして肝再生療法の開発に結び付けたい。

#### 審査結果の要旨

マウスで自己の骨髄細胞由来間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell, MSC) と誘導型マクロファージ(induced-bone marrow derived macrophage, id-BMM)を用いて肝線維化改善・再生促進を実証し、宿主細胞を含めた機序の解明を目指し、C57BL6 マウスの骨髄から MSC・id-BMM を高純度に培養し、両細胞の相互作用確認のため共培養の検証を行った。四塩化炭素由来肝硬変モデルマウスを作成し、培養した細胞を投与した。投与は MSC100%投与(MSC100)、id-BMM100%投与(id-BMM100)、両細胞 50% : 50%の混合投与 (50/50) とコントロール群の 4 群 (各 n=12、細胞投与量は  $1 \times 10^6$  個で統一) で行い、肝線維量の変化・血液検査における肝機能の変化・肝での線維化改善因子である Matrix metalloproteinases (MMPs)群の変化の PCR 法による測定・再生因子である Hepatocyte growth factor (HGF)や Oncostatin M(OSM)などの変化の PCR 法による測定・肝内に局在する宿主由来の血球の変化の PCR 法と免疫染色法による測定について、各群を比較検討した。そして投与細胞に標識を付けて (MSC には DsRed の、id-BMM には GFP の標識を付けて)、標識した細胞を投与した後に細胞がマウス体内でどのような動態を示し、肝線維化改善・肝再生にどのように寄与するか、マウスが生きたままの状態を観察するライブイメージングを、二光子励起顕微鏡を用いて施行した。In vitro では、MSC・id-BMM の共培養にて MSC の作用で id-BMM は M2 タイプにシフトしていた。M2 タイプとなった id-BMM は、高い血球遊走能力と貪食能力を持つマクロファージとなっていた。In vivo では、肝線維量はコントロールと比較して、MSC100 で 5.40% (p=0.201)、id-BMM100 で 18.8% (p=0.036)、50/50 で 27.3% (p=0.002) の減少量であり 50/50 で最も線維化改善を認めた。採血結果から 50/50 で最も肝機能の改善を認めた。さらに 50/50 投与群の肝で最も MMP 発現が高まり、再生因子の発現も高まった。ライブイメージングでは GFP 標識した id-BMM は投与後に肝へ多く遊走し、数時間かけて肝内の廃棄物（デブリ）を貪食する様子を直接的に視覚で捉えた。この id-BMM のデブリ貪食行為によって肝内で再生因子の上昇を認めると判明した。

MSC と id-BMM はそれぞれ単独で投与するよりも、相互的に働くことで肝線維化改善・再生促進を効果的に行う可能性が示唆され、本研究成果を *Stem cells Transl Med* 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ました。