

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏 名	小島 雄一
学 位	博士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博 (医) 第 911 号
学位授与の日付	令和2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	Mesenchymal stem cells cultured under hypoxic conditions had a greater therapeutic effect on mice with liver cirrhosis compared to those cultured under normal oxygen conditions (通常酸素条件下よりも低酸素条件下で培養した間葉系幹細胞の方が肝硬変マウスに対してより大きな治療効果を認めた)
論文審査委員	主査 教授 若井 俊文 副査 教授 平島 正則 副査 教授 木下 義晶

### 博士論文の要旨

【目的】進行した非代償性肝硬変では肝移植が唯一の治療法であるが、慢性的なドナー不足は深刻であり、肝線維化改善を目的とした新たな治療法が必要である。いくつかの臨床試験が行われているが、中でも間葉系幹細胞 (MSC) による細胞療法が注目されている。MSC は様々な増殖因子やサイトカイン、ケモカイン、エクソソームを産生し、骨髄や脂肪組織、臍帯組織などから採取することで容易に培養することができ、低抗原性で他家細胞の使用も可能である。宿主の状態に応じて間接的に抗炎症や抗線維化、抗酸化、抗アポトーシス、血管新生、免疫抑制効果などを媒介する。しかし、MSC の最適な起源や培養条件、投与経路は定まっていないことから、本研究では肝硬変マウスの治療におけるヒト骨髄由来 MSC の低酸素培養がもたらす治療効果の有効性について検討した。

【方法】通常酸素条件 (約21%) で培養した LONZA 製の MSC (norMSC) と低酸素条件 (約5%) で培養した Thermo Fisher Scientific 製の MSC (hypoMSC) を使用した。それぞれの細胞特性の差異を解析するため in vitro にて肝硬変患者血清を培地に添加した場合としていない場合で、CAGE 法 (Cap analysis of gene expression analysis) で遺伝子発現の違いを解析し治療効果に及ぼす影響を考察した。四塩化炭素 (CC14) 誘導肝硬変マウスに norMSC と hypoMSC を各  $1 \times 10^6$  個/匹、 $2 \times 10^5$  個/匹、 $4 \times 10^4$  個/匹ずつ投与し、血液検査や肝組織学的検査、肝組織の酸化ストレス、細胞のアポトーシスについて治療効果を検討した。さらに、各 MSC の肝臓への遊走を確認するため、2 光子励起顕微鏡を用いて生体内イメージングを行った。

【結果】in vitro では hypoMSC に肝硬変患者血清を加えて培養した群で、マクロファージを抗炎症 M2 方向へ極性変化させる因子のひとつである PGE2 の合成酵素 PTGS2 や PTGES、アポトーシス抑制や酸化ストレス抑制に関わる miR-210、血管新生と関わる ALDH、血管新生や好中球と関連が示唆される IL-8 の発現上昇が顕著であった。in vivo では control 群に比べ、いずれの MSC 投与群でも用量依存性に ALT 低下と肝組織

の線維化面積減少、hydroxyproline 減少を認めたが、hypoMSC 投与群では norMSC より ALT は低下し、線維化面積と hydroxyproline も減少する傾向を認めた。in vivo のマウス肝臓における酸化ストレスマーカーを測定したところ、hypoMSC 投与群では control 群に比べ、総グルタチオンや過酸化脂質の低下を認めた。また、マウス骨髄から M-CSF で誘導したマクロファージを肝硬変患者血清で刺激した各 MSC と共培養し、リアルタイム PCR で発現遺伝子を調べると、肝硬変患者血清で刺激した hypoMSC と共培養したマクロファージ群でより抗炎症 M2 方向へ極性変化する傾向を認めた。肝細胞と肝星細胞に miR-210 mimic もしくは miR-210 inhibitor を導入し、アクチノマイシン D を用いてアポトーシスを誘導すると、肝細胞に miR-210 を導入した群でアポトーシスは減少したことから、hypoMSC は miR-210 を介して肝細胞のアポトーシスを減少させる可能性が示唆された。5×10<sup>5</sup> 個ずつの norMSC と hypoMSC を肝硬変マウスの尾静脈から注入し、6 時間後に 2 光子励起顕微鏡を用いて生体内イメージングを行ったところ、ほとんどの MSC は肺にトラップされていた。肝臓へ遊走する MSC はわずかであり、norMSC と hypoMSC で有意な差はみられなかった。

【考察・結論】既報ではリポ多糖類 (LPS) と TNF- $\alpha$  で前処理された MSC、または IL-1 $\beta$  と IFN- $\gamma$  で前処理された MSC で PGE2 が上方制御されたと報告されたが、申請者らは低酸素培養で PGE2 が上方制御されることを発見した。また、申請者らの結果は PGE2 のマクロファージへの作用により抗炎症性 (M2) マクロファージマーカーを誘導したという既報と一致していた。miR-210 は低酸素誘導性 miR であり、抗酸化作用やアポトーシスの抑制、血管新生などにおいて重要な役割を果たしている。申請者らは miR-210 が肝細胞のアポトーシスを減少させることを発見した。また、IL-8 や ALDH が hypoMSC で上方制御されていることも発見した。ヒト脂肪由来 MSC が分泌した IL-8 が血管新生を促進することで乳癌の進行を促進したという報告や、高いアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を持つ MSC は強力な血管再生のポテンシャルがあるという報告があることから、IL-8 と ALDH の両方が肝線維化の抑制と肝再生に寄与する可能性がある。低酸素条件下で培養された MSC にはいくつかの利点がある。既報では低酸素条件下で培養された骨髄由来 MSC は肝切除されたマウスで VEGF を高度に発現し肝再生を促進したと報告されている。一方、既報ではほとんどの MSC は肺にトラップされると報告されており、申請者らの結果とも一致していた。MSC の治療効果の機序を解明するうえで、MSC の遊走性は重要な検討事項であり、エクソソームの役割などさらなる研究が必要である。

本研究では使用する細胞が事前に準備されていたため、hypoMSC と norMSC は同一ドナーの MSC ではないことが反省点である。しかし、MSC は医療廃棄物から入手できることや容易に培養できること、低酸素などの刺激で事前に調整できること、オンデマンドに使用できることなど、細胞療法において多くの利点がある。最適な細胞起源や培地、培養条件、エクソソームなどについてはさらなる研究が必要である。

#### 審査結果の要旨

間葉系幹細胞 (MSC) の最適な起源や培養条件、投与経路は定まっていないことから、本研究では肝硬変マウスの治療におけるヒト骨髄由来 MSC の低酸素培養がもたらす治療効果の有効性について検討した。通常酸素条件 (約 21%) で培養した LONZA 製の MSC (norMSC) と低酸素条件 (約 5%) で培養した Thermo Fisher Scientific 製の MSC (hypoMSC) を使用した。それぞれの細胞特性の差異を解析するため in vitro にて肝硬変患者血清を培地に添加した場合としていない場合で、CAGE 法で遺伝子発現の違いを解析し治療効果に及ぼす影響を考察した。四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 誘導肝硬変マウスに norMSC と hypoMSC を各 1×10<sup>6</sup> 個/匹、2×10<sup>5</sup> 個/匹、4×10<sup>4</sup> 個/匹ずつ投与し、血液検査や肝組織学的検査、肝組織の酸化ストレス、細胞のアポトーシスについて治療効果を検討した。さらに、各 MSC の肝臓への遊走を確認するため、2 光子励起顕微鏡を用いて生体内イメージングを行った。in vitro では hypoMSC に肝硬変患者血清を加えて培養した群で、マクロファージを抗炎症 M2 方向へ極性変化させる因子のひとつである PGE2 の合成酵素 PTGS2 や PTGES、ア

ポトーシス抑制や酸化ストレス抑制に関わる miR-210、血管新生に関わる ALDH、血管新生や好中球と関連が示唆される IL-8 の発現上昇が顕著であった。in vivo では control 群に比べ、いずれの MSC 投与群でも用量依存性に ALT 低下と肝組織の線維化面積減少、hydroxyproline 減少を認めたが、hypoMSC 投与群では norMSC より ALT は低下し、線維化面積と hydroxyproline も減少する傾向を認めた。5×10<sup>5</sup> 個ずつの norMSC と hypoMSC を肝硬変マウスの尾静脈から注入し、6 時間後に 2 光子励起顕微鏡を用いて生体内イメージングを行ったところ、ほとんどの MSC は肺にトラップされていた。肝臓へ遊走する MSC はわずかであり、norMSC と hypoMSC で有意な差はみられなかった。MSC は医療廃棄物から入手できることや容易に培養できること、低酸素などの刺激で事前に調整できること、オンデマンドに使用できることなど、細胞療法において多くの利点があることを明らかにし、本研究成果を Regen Ther 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。