

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	渡邊 貴之
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 958 号
学位授与の日付	令和2年9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	Development of a non-alcoholic steatohepatitis model with rapid accumulation of fibrosis, and its treatment using mesenchymal stem cells and their small extracellular vesicles (線維化を伴う非アルコール性脂肪性肝炎のモデルマウスの開発、および間葉系幹細胞とその細胞分泌小胞を投与した際の治療効果の検証)
論文審査委員	主査 教授 若井 俊文 副査 教授 平島 正則 副査 准教授 小林 隆

博士論文の要旨

背景：

Nonalcoholic steatohepatitis ; NASHは国内に約100から200万人存在すると推定されているが、食事療法、運動療法など一般療法以外に有効な治療法は確立されていない。間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells ; MSC) は、免疫抑制作用と調節作用があり、低抗原性でもあることから様々な炎症性疾患への治療応用が試みられている。近年さらに、そのMSCの培養液から超遠心にて抽出された、細胞分泌小胞 (small extracellular vesicles ; sEV) が、細胞間相互作用の媒体として重要な役割をもち、MSCのパラクラインによる治療効果を担っていると考えられている。またsEVはdrug delivery systemの新たな運搬体としても期待されつつあり、将来的にはMSCそのものでなく、MSC由来のsEVを用いた新規治療法の可能性も見えてきている。申請者は中枢性摂食調節に重要な役割を果たす4型メラノコルチン受容体 (melanocortin type4 receptor ; MC4R) の欠損したMC4R-KOマウス用い、NASHにおけるMSC、およびMSC由来のsEVが抗炎症効果、肝線維化改善効果があるかを検証した。

方法：

MC4R-KOマウス (8週齢、オスマウス) に高脂肪食負荷 (Western diet ; WD) を8週間行い脂肪化を起こしたのち、WDを継続しながら大腸菌0-111由来のリポ多糖 (Lipopolysaccharide ; LPS) 0.3 mg/kgを4週間、週2回腹腔内投与を行った。この方法で作成したマウスモデルを12W LPS modelとし、LPSの代わりにリン酸緩衝生理食塩水 Phosphate buffered saline ; PBSを腹腔内投与したcontrol (12W control model)、および従来の方法でWDを20週かけて投与し作成するNASHモデルマウス (20W model) を用いて、計3群で比較し、生化学的解析および組織学的解析、Reverse transcription polymerase chain reaction ; RT-PCRによる遺伝子学的解析を行った。

次に作成したNASHモデルマウスを用いて、MSCを 1×10^6 /匹、sEVを1.0 μ g、2.5 μ g、5.0 μ g /匹と濃

度を振り分けて尾静脈内投与を行い、4週間後に効果を確認した。Control と MSC、sEV 1.0 μ g、2.5 μ g、5.0 μ g の計 5 群で生化学的解析、組織学的解析を行った。また投与後 24 時間後の肝臓内マクロファージの極性変化を解析するためフローサイトメトリーを行い、さらに RT-PCR による遺伝子学的解析を行った。

結果：

WD と LPS 投与により 12 週で作成した 12W LPS model は、20W model より劣るものの、12W control model と比較し生化学的所見、RT-PCR にて優位な炎症所見を認めた。組織学的所見では、Hematoxylin eosin ; HE 染色で脂肪化を、Sirius red 染色で線維化を確認し、生化学的所見、遺伝子解析と同様、20W model より劣るが 12W control model と比較し線維化の促進を認めた。さらに α smooth muscle actin ; α SMA 染色、Toll like receptor 4 ; TLR4 染色を行い、LPS を介した TLR4 への刺激が線維化を促進していることが示唆された。F4/80 染色で、NASH の特徴であり、線維化の起点となることが示されている、Crown like structures ; CLS の形成を確認した。以上の結果より、LPS を用いたことで、線維化が促進された NASH モデルマウスを確立した。

次に MSC 1 \times 10⁶ /匹と MSC 由来の sEV 1.0 μ g、2.5 μ g、5.0 μ g /匹の投与後の解析を行った。MSC および sEV とともに生化学的所見にて肝機能障害の低下、アルブミンの上昇を認め、特に sEV は容量依存性に効果を認めた。組織学的所見にて Sirius red 染色で線維化の改善と、F4/80 染色で CLS の減少を認めた。組織学解析においても、sEV は容量依存性に線維化改善と CLS の減少を示した。以上より MSC と同様に、sEV は容量依存性に抗炎症効果、抗線維化効果を示した。

MSC、sEV 投与後 24 時間後の肝臓内マクロファージは、MSC、sEV どちらも Ly6c low マクロファージの比率が増殖しており、抗炎症マクロファージとされている、M2 マクロファージ への極性変化が示唆された。また RT-PCR による遺伝子学的解析においてマトリックスメタロプロテアーゼ Matrix metalloproteinase ; Mmp の上昇を認め、これらの結果が肝臓内のホメオスタシスの維持に貢献していることが推測された。

結論：

申請者は MC4R-KO マウスを用いた新たな NASH モデルを開発し、炎症、線維化形成を確認した。そのモデルマウスを用いて MSC および MSC 由来の sEV 投与により、炎症と線維化の改善を認め、容量依存性に改善傾向があることを示した。その一部に M2 マクロファージへの極性変化が抗線維化効果に関与していることが示唆された。

審査結果の要旨

本研究は、中枢性摂食調節に重要な役割を果たす 4 型メラノコルチン受容体 (melanocortin type4 receptor ; MC4R) の欠損した MC4R-KO マウス用い、Nonalcoholic steatohepatitis ; NASH における間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells ; MSC)、および MSC 由来の細胞分泌小胞 (small extracellular vesicles ; sEV) が抗炎症効果、肝線維化改善効果があるかを検証した。

大腸菌 0-111 由来のリポ多糖 (Lipopolysaccharide ; LPS) を用いた線維化が促進された NASH モデルマウスにおいて MSC と同様に、sEV は容量依存性に抗炎症効果、抗線維化効果を示した。MSC、sEV 投与後 24 時間後の肝臓内マクロファージは、MSC、sEV どちらも Ly6c low マクロファージの比率が増殖しており、抗炎症マクロファージとされている M2 マクロファージ への極性変化が示唆された。MC4R-KO マウスを用いた新たな NASH モデルを開発し、炎症、線維化形成を確認した。そのモデルマウスを用いて MSC および MSC 由来の sEV 投与により、炎症と線維化の改善を認め、容量依存性に改善傾向があることを示した。その一部に M2 マクロファージへの極性変化が抗線維化効果に関与していることが示唆された。

MSC および MSC 由来の sEV 投与により、炎症と線維化の改善を認め、容量依存性に改善傾向があることを実証し、本研究成果を Regenerative Therapy 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。