

(様式3号)

## 学位論文の要旨

氏名 原 和冴

〔題名〕 より効果的な肝臓再生療法の提供のための基礎研究  
—骨髄間葉系幹細胞の培養法の検討と補助療法の開発—

### 〔要旨〕

背景および目的：山口大学医学部附属病院消化器内科学では非代償性肝硬変症に対して自己骨髄由来間葉系幹細胞（BMSC）を用いた肝臓再生療法を開発し、臨床研究にて安全性と一定の有効性を報告してきた。肝線維化の改善に伴う肝再生の促進が重要であることから、BMSC培養の適正化や肝星細胞の線維産生を抑制する補助療法の追加により治療効果が高まると期待される。本研究ではBMSC培養において不足しているアスコルビン酸の効果検証と細胞外マトリックス構成蛋白を標的遺伝子とするHomo sapiens microRNA-5682 (hsa-miR-5682) を用いた抗線維化補助療法の開発を試みた。

方法：アスコルビン酸添加培地を使用したBMSCの培養法の検討では、アスコルビン酸による細胞増殖能や分化能、細胞代謝への影響を検討した。抗線維化核酸医薬品の開発において、hsa-miR-5682をヒト肝星細胞およびマウス肝星細胞株に導入し、細胞増殖能と各種細胞外マトリックス蛋白への影響を評価した。さらに、遺伝子発現についてSAGE解析を行い、マウスに対してオルソログとして作用するか検証した。

結果：アスコルビン酸添加培地を使用したBMSCの培養法の検討では、BMSCの分離・増殖が促進し、脂肪細胞への分化を亢進した。さらにアスコルビン酸添加により、HIF1 $\alpha$ の分解促進によるミトコンドリア活性化が引き起こされると示唆された。抗線維化核酸医薬品の開発では、hsa-miR-5682はヒトおよびマウス肝星細胞の細胞増殖を有意に低下し、細胞外マトリックス蛋白の発現抑制を確認した。hsa-miR-5682はBMSCと線維産生抑制効果を示したが、BMSCの作用機序への関与は否定的であった。

結論：現行のBMSC培養ではアスコルビン酸不足による細胞増殖・分化が抑制されており、BMSCを効率よく分離培養するためにはアスコルビン酸の補充が必要だと考える。また、hsa-miR-5682は細胞増殖の抑制と細胞外マトリックス蛋白を網羅的に発現抑制することで、ヒトおよびマウス肝星細胞の線維産生を抑制した。hsa-miR5682はBMSCとは異なる機序で線維産生を抑制し、BMSCを用いた肝臓再生療法の補助療法を目的とした新規抗線維化核酸医薬品になり得る。

### 作成要領

1. 要旨は、800字以内で、1枚でまとめること。
2. 題名が欧文の場合は、和訳を（）書きで記載すること。

学位論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 第1579号	氏 名	原 和冴
論文審査担当者	主査教授	西川 潤	
	副査教授	山本 健	
	副査教授	野島 順三	
学位論文題目名 (題目名が英文の場合は、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。) より効果的な肝臓再生療法の提供のための基礎研究 ―骨髄間葉系幹細胞の培養法の検討と補助療法の開発―			
学位論文の関連論文題目名 (題目名が英文の場合は、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。) Evaluation of the effects of ascorbic acid on metabolism of human mesenchymal stem cells (ヒト間葉系幹細胞の代謝に対するアスコルビン酸の効果の評価)			
掲載雑誌名: Stem Cell Research & Therapy, 9:93:1-12 (2018年 4月 掲載)			
(論文審査の要旨) 非代償性肝硬変症に対する有効な治療法は肝移植のみであるが、手術のリスクや長期にわたる免疫抑制剤の内服など患者への負担は多く、ドナー不足により実施は限られているため、現代医療において内科的新規治療法の開発が望まれている。山口大学大学院医学系研究科消化器内科学では自己骨髄間葉系幹細胞 (autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells: autologous BMSC) を用いた肝臓再生療法を開発し、臨床研究にて安全性と一定の有効性を報告してきた。本研究では、肝臓再生療法をより効果的な治療法として改良することを目的に、BMSC の培養効率を高める製造面と、肝線維化改善効果を補助療法で高める臨床面の双方から基礎的検討を行った。			
<u>アスコルビン酸を用いたヒト BMSC 培養法の開発</u> : 現在標準的に行われている BMSC の分離増殖培養はウシ胎児血清を添加した Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) が使用されている。DMEM はマウス由来細胞の培養を目的に作製されたものであり、ヒトなどアスコルビン酸が合成できない動物種の細胞を培養する際は、生体内と比較してアスコルビン酸の不足が予想され、分離増殖培養への影響が考えられる。そこでアスコルビン酸添加培地 (AsA-medium) を作製し、BMSC に対するアスコルビン酸の影響を検討した。すると、コラーゲン産生の亢進を背景とした BMSC の細胞分離の促進を認め、細胞増殖も亢進した。しかし、分化能の促進や HIF1 $\alpha$ の分解促進によるミトコンドリア活性化が引き起こされることが明らかとなり、肝臓再生療法においては AsA-medium を培養初期に使用することで最終投与細胞数の確保に効果的であると考えられる。			
<u>抗線維化核酸医薬品の開発</u> : 肝臓再生療法では肝線維化の改善に伴う肝臓再生の促進が重要であり、BMSC の細胞間相互作用に、肝星細胞の線維産生を抑制する補助療法を追加することで治療効果が高まると考え、細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) の構成成分である線維性コラーゲンや弾性線維を標的遺伝子とする Homo sapiens microRNA-5682 (hsa-miR-5682) を用いた抗線維化補助療法の開発を試みた。その結果、hsa-miR-5682 はヒトおよびマウス肝星細胞の細胞増殖を有意に低下し、細胞外マトリックス蛋白の発現抑制効果を確認した。さらに hsa-miR-5682 は BMSC と同等の線維産生抑制効果を示したが、BMSC による作用機序への関与は否定的であり、hsa-miR5682 は BMSC と異なる機序で線維産生を抑制し、BMSC を用いた肝臓再生療法の補助療法を目的とした新規抗線維化核酸医薬品になり得る。			
本研究で得られた知見は、保健学の発展に貢献したと評価し、博士 (保健学) の学位を授与するに値すると総合的に判断された。			