

学位論文(博士)

Trans-portal hepatic infusion of cultured
bone marrow-derived mesenchymal stem cells
in a steatohepatitis murine model

(脂肪性肝炎モデルマウスに対する
経門脈的骨髄由来培養間葉系幹細胞投与)

氏名 佐々木 嶺

所属 山口大学医学院医学系研究科

医学専攻 消化器内科学講座

令和2年11月

目次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4
3. 目的	4
4. 方法	5
(1) 対象	5
(2) 方法	5
(3) 解析	9
5. 結果	10
6. 考察	16
7. 結語	17
8. 謝辞	17
9. 参考文献	17

1. 要旨

【背景】これまで我々は、非代償性肝硬変症に対して自己骨髄間葉系幹細胞(bone marrow stem cells: BMSC)を用いた肝臓再生療法を開発してきた.近年, 核酸アナログ製剤(nucleoside/nucleotide analogue: NA)および直接作用型抗ウイルス薬(direct acting antivirals: DAA)治療が確立し B 型肝炎ウイルス(hepatitis B virus: HBV), C 型肝炎ウイルス(Hepatitis C virus: HCV)が制御される時代が到来し, 今後は肝硬変の成因として非アルコール性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis: NASH)が増えていくと予想される. そこで今回, 四塩化炭素(carbon tetrachloride: CCl₄)単回投与併用コリン欠乏アミノ酸置換(choline-deficient L-amino acid-defined: CDAA)食飼育による脂肪肝炎モデルマウスを用いて, BMSC 経門脈的肝臓投与の肝線維化, 肝脂肪化, 肝内酸化ストレスに対する有効性について評価を行った.

【方法】C57BL/6 Albino マウスを CDAA 食で飼育し, CDAA 食飼育開始後 4 週で CCl₄(0.5mL/kg)を腹腔内に単回投与した. CDAA 食飼育後 12 週で 1×10⁶ 個の Luciferase 陽性同種同系 BMSC (Luc-BMSC)を脾臓に注入した. In vivo imaging system (IVIS) Spectrum BL を用いて Luc-BMSC が経門脈的に肝臓へと集積したことを確認し, 細胞投与後 1 ヶ月における肝線維化, 肝脂肪化, 肝機能および血清脂質および肝内酸化ストレスについて, 細胞非投与群 (Control 群)と比較した.

【結果】血液生化学検査では, Control 群と比較し BMSC 群で有意に血清アルブミン上昇, 血清総ビリルビン低下を認め, また LDL/HDL ratio は低下する傾向を認めた. 肝線維化について, Sirius red 染色陽性面積は Control 群と比べて BMSC 群で有意に低値であり, α -smooth muscle actin(α -SMA)蛋白および Collagen1A1(*Col1a1*) mRNA 発現は BMSC 群で有意に抑制された. 肝脂肪化面積は BMSC 群で有意に低値であり, 特にミトコンドリア内の脂肪酸 β 酸化能を反映する peroxisome proliferator-activated receptor- α (*Ppara*)および carnitine palmitoyltransferase 1a (*Cpt1a*) mRNA 発現は有意に亢進していた. 酸化ストレスについて, BMSC 群において 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)陽性細胞は有意に少なく, また肝内の superoxide dismutase 2(SOD-2)蛋白発現は有意に亢進し肝内の酸化ストレスが抑制されていた.

【結論】我々の検討において, 脂肪性肝炎モデルマウスに対して BMSC の経門脈肝臓直接投与の有効性が確認された.

2. 研究の背景

B型肝炎ウイルス(hepatitis B virus: HBV), C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus: HCV), 非アルコール性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis: NASH), アルコールなどによって引き起こされる慢性肝障害によって肝臓の線維化は進行し, 最終的に肝硬変となるが, 現代医療においても肝硬変の根治療法は肝移植しかない. 当科ではこれまで四塩化炭素誘導肝線維化モデルマウスにおいて, 骨髄細胞を投与すると既存の肝線維化を溶解し, 生命予後を有意に改善させることを報告し, その後肝硬変に対する自己骨髄細胞投与療法として臨床研究を行ってきた¹⁻³⁾. さらに, マウスやイヌの肝線維化モデルを用いて骨髄間葉系幹細胞(BMSC)の肝硬変症に対する有効性を評価し, より低侵襲かつ治療効果が長期に持続する培養 BMSC 肝動脈投与療法を開発した⁴⁻⁶⁾.

近年, 核酸アナログ製剤 (nucleoside/nucleotide analogue: NA)および直接作用型抗ウイルス薬(direct acting antivirals: DAA)治療が確立し HBV および HCV が制御できるようになり, 今後は NASH が成因の肝硬変が増加することが予想される. 既に米国では NASH 由来の肝硬変および NASH 由来の肝細胞癌(hepatocellular carcinoma: HCC)が肝移植の 2 番目の原因となっており^{7,8)}, NASH の制御は今後の肝疾患診療において非常に重要な課題である. 非アルコール性肝疾患(nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD)および NASH の肝疾患関連死に最も強く相関する因子は肝線維化であると多数報告されているが⁹⁻¹¹⁾, peroxisome proliferator-activator receptor (PPAR)作動薬やスタチン, ビタミン E といった肝脂肪化, 炎症, 酸化ストレスをターゲットとした治療薬は存在するものの, 肝線維化改善効果のある承認薬は未だにない.

3. 目的

今回我々は, NASH を想定した四塩化炭素(carbon tetrachloride: CCl₄)単回投与併用コリン欠乏アミノ酸置換(choline-deficient L-amino acid-defined: CDAA)食飼育による脂肪肝炎モデルマウスを用いて, 同種同系培養 BMSC の経門脈的肝臓投与の肝線維化, 肝脂肪化および肝内酸化ストレスに対する有効性について評価を行った。

4. 方法

(1) 対象

マウスは Charles River Laboratories Japan, INC.(Kanagawa, Japan)より購入した B6N-Tyr^{c-Brd}/BrdCrCrl マウス(B6 Albino)を使用した. マウスは山口大学医学部の動物実験施設にて飼育され、山口大学が定める動物使用に関する規則に従い、実験プロトコルの承認を得た (Approval number: 21-S13).

(2) 方法

【CCl₄単回投与併用 CDAA 食による脂肪肝炎モデルマウス】

CDAA 食と CCl₄を用いた脂肪肝炎モデルのプロトコルを示す(Fig.1a). 10 週齢のオス B6 albino マウスを CDAA 食 (#518753; Diets Inc., Pennsylvania, USA)で 4 週間飼育し, 肝小葉の炎症および肝線維化を誘導するため, Komiya らのモデルを参考に 0.5mL/kg の CCl₄ (Wako, Osaka, Japan) を腹腔内に単回投与した¹²⁾. その後も CDAA 食を給餌しながら継続飼育し, 12 週間経過時点で犠死させ, 肝臓および血液を採取した.

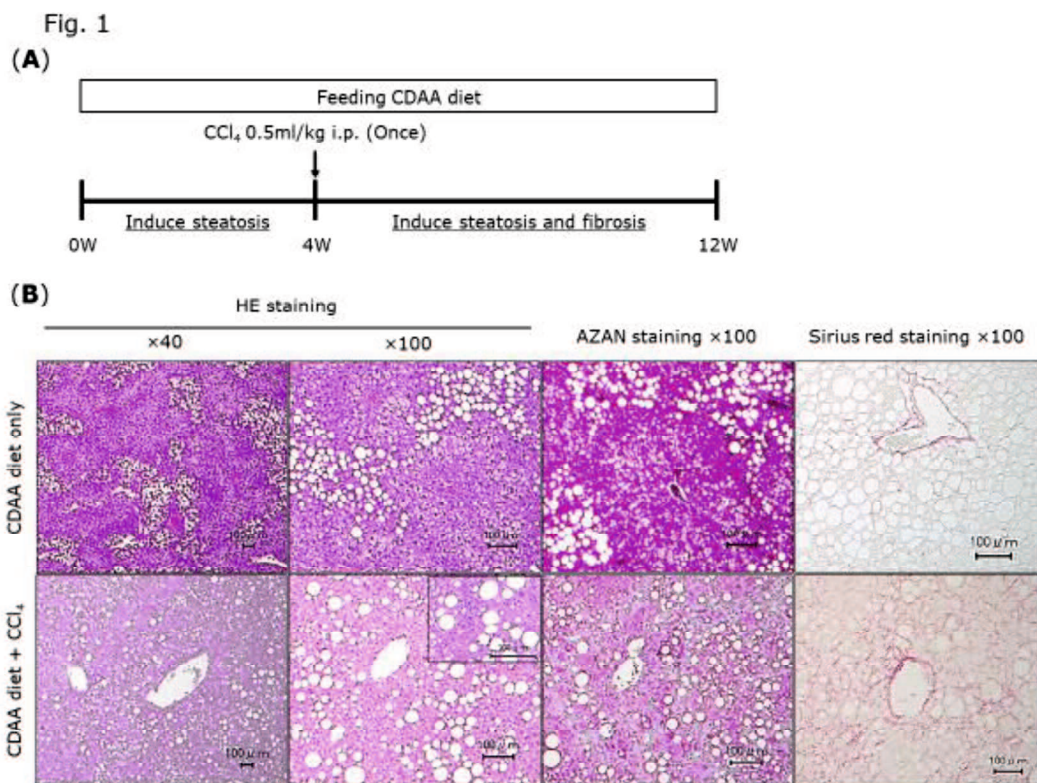


Fig. 1. CCl₄単回投与併用コリン欠乏アミノ酸置換食による脂肪肝炎モデルマウスの作出プロトコル

- (a) モデルプロトコル. 4 週間コリン欠乏アミノ酸置換(choline-deficient L-amino acid-defined: CDAA) 食飼育し, 0.5mL/kg の carbon tetrachloride (CCl₄)を腹腔内に単回投与する. その後も CDAA 食の飼育を継続し, 飼育開始後 12 週時点(12W)でマウスを犠死させる. (b) 上記モデルマウスの肝組織切片.

HE 染色 (magnification x40, x100, x200)、AZAN 染色 (magnification x100)、Sirius red 染色 (magnification x100) をそれぞれ示す。Scale bars は $100\ \mu\text{m}$ を表す。

【Luciferase 陽性骨髄由来間葉系幹細胞の作成】

Cyagen Biosciences Inc. (Tokyo, Japan)より購入した B6 マウス由来 BMSC (passage 6)に, Lentivirus (#79692-G; BPS Bioscience, San Diego, CA, USA)を用いて Luciferase を transduction し, passage 8 の BMSC (Luc-BMSC)を使用した。培地は, Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)に 10% fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific)と $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ の gentamicin (Thermo Fisher Scientific)を添加したものをを用いた。BMSC は 37°C , 5% CO_2 の条件で培養した。細胞投与の際には, BMSC を 0.25%トリプシン-EDTA (# 25200-072; Thermo Fisher Scientific)で 37°C , 5分間反応させた後, BMSC を culture dish から回収し phosphate buffered saline (PBS) (Thermo Fisher Scientific)を用いて 1.0×10^6 cells/ $100\ \mu\text{L}$ に調整した。

【研究モデルプロトコル】

脂肪肝炎モデルにおける CDAA 食飼育開始 12 週後, すなわち CCl_4 投与 8 週後にマウスを ISOFLURANE Inhalation Solution (Pfizer, Tokyo, Japan)で麻酔を行い, Luc-BMSC (1.0×10^6 cells/body)を脾臓に注入した。その後, Luciferin (E160A; Promega Corporation, Madison, WI, USA)を $150\ \mu\text{g}/\text{body}$ で尾静脈注射し, マウス体内の Luc-BMSC の発光を In vivo imaging system (IVIS Spectrum BL, PerkinElmer, Japan)を用いて投与後 1, 3, 5, 7 日目に評価した($n = 8$)。Control 群のマウスは, 脾臓へ $100\ \mu\text{L}$ の PBS を投与した($n = 8$)。その後も CDAA 食飼育を継続し, Luc-BMSC 投与 4 週間後にマウスを犠死させ, 血液および肝臓を採取した(Fig. 2a)。

【血清学的検査】

血液を BD Microtainer SST (BD Bio-sciences, Franklin Lakes, NJ, USA)に採取したのち, 遠心分離(800g, 5分)し血清を回収した。血清中の albumin (Alb), 総ビリルビン(T-bil), 低比重リポタンパク(LDL), 高比重リポタンパク(HDL)を Hitachi 7180 automatic analyzer (Hitachi High-Tech Corporation, Tokyo, Japan)を用いて分析した。Alb は BCG 法, T-bil は酵素法, LDL および HDL は直接法を用いた。

【免疫染色実験】

全ての免疫染色実験において, 4%パラホルムアルデヒド(Wako)で固定した肝臓から $3\ \mu\text{m}$ パラフィン切片として作出したものをを使用した。免疫染色には, Vectastain ABC kit (PK-4001; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を使用し, ABC 法を用いて標的蛋白の検出を行った。一次抗体は, anti-F4/80 antibody (ab111101; Abcam, Tokyo, Japan),

anti-inducible nitric oxide synthase(iNOS) antibody (ab15323; Abcam), anti-CD163 antibody (ab182422; Abcam), anti-8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG) antibody (bs-1278R; Bioss Inc., Woburn, MA, USA)を使用した。A fluorescence microscope (BIOREVO BZ-9000; Keyence, Osaka, Japan)を使用して、マウス 1 匹あたり 100 倍視野で 5 枚ずつ撮影し（各群 5 匹）、BZ analyzer II (Keyence)を用いて陽性細胞数を算出した。

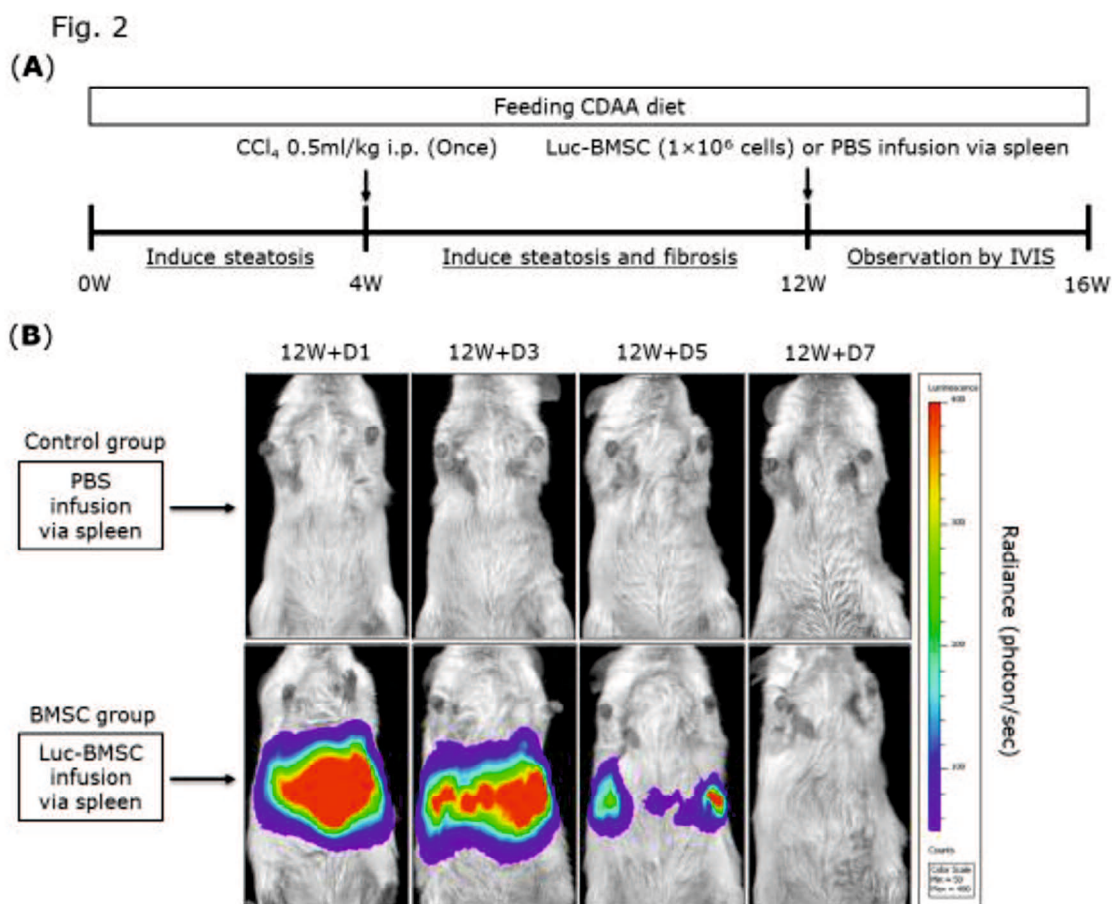


Fig. 2. 脂肪肝炎モデルマウスに対する骨髄由来培養間葉系幹細胞の経門脈的肝臓投与評価のプロトコル

(a) 研究プロトコル. 4 週間 choline-deficient L-amino acid-defined (CDAA) diet で飼育し, 0.5mL/kg の carbon tetrachloride (CCl₄)を腹腔内に単回投与する. その後も CDAA 食での飼育を継続し, 飼育開始後 12 週時点(12W)で Luciferase 蛋白を強制発現させた同種同系骨髄由来間葉系幹細胞(Luciferase-positive bone marrow derived mesenchymal stem cells: Luc-BMSC)を 1.0×10^6 cells / 100μ L で調整し, これを脾臓に投与する. Control 群には phosphate buffered saline (PBS)を脾臓に投与する. その後, 経時的(1 day, 3 day, 5 day, 7 day after Luc-BMSC infusion; 12W+D1, 12W+D3, 12W+D5, 12W+D7, respectively)に In vivo imaging system (IVIS)を用いて Luc-BMSC の体内動態を観察し, Luc-BMSC 投与 4 週後(16W)にマウスを犠死させ検体を採取する. (b) IVIS による Luc-BMSC の体内動態の評価. Control 群は PBS のみを, BMSC

群は 1.0×10^6 cells の Luc-BMSC in PBS を脾臓に注入し、投与 1 日後(12W+D1)から 7 日後(12W+D7)まで経時的に観察した。画像は代表例を示す。

【組織学的評価】

組織学的評価は BIOREVO BZ-9000 を用いて組織写真を撮像し評価を行った。線維化面積は組織面積中のシリウスレッド染色陽性面積の割合を BZ analyzer II (Keyence)を用いて算出した。また肝脂肪化の評価は肝内の脂肪滴の面積を算出し、総面積との比で算出した。それぞれの計測において、血管は除外して算出した。マウスは各群それぞれ 8 匹ずつ用いて、100 倍視野で 5 枚の組織写真を撮像し、その平均値を算出した。

【RT-PCR】

RNA の抽出は肝右葉より RNeasy Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)を用いて行った。cDNA の合成には ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix と gDNA Remover (Toyobo, Tokyo, Japan) を用いて行った。遺伝子発現の解析には Step One Plus real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific)を用いた。遺伝子発現の相対的定量化には β -actin (*Actb*) をコントロールとして使用した。今回の検討で用いたプライマーを Table 1 に示す。

Genes	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>Coll1a1</i>	CCCACCCAGCTCAGATTCA	GGCAATTAGAGTCAGCAGAAATACA
<i>Cpt1a</i>	GAAGCCTTGGGTGGATATGTGA	ATGGAACTGGTGGCCAATGA
<i>Ppara</i>	ACTGTCCTTGGTGCCATCCTC	GGATGCTGGTATCGGCTCAATAA
<i>Fas</i>	ACATGGACAAAGAACCATTATGCT	CTGGTTTGCATTGCACTTGGTA
<i>Acaca</i>	TGATGGTACCACAGCCCATTACA	GGCAATCTCAGTTCAAGCCAGTC
<i>Srebpl</i>	AGCCTGGCCATCTGTGAGAA	CAGACTGGTACGGGCCACAA
<i>Actb</i>	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC	ATGGAGCCACCGATCCACA

Table 1. Real time PCR にて用いたプライマー表

Abbreviations: *Coll1a1*; Collagen1A1, *Cpt1a*; carnitine palmitoyltransferase 1A, *Ppara*; peroxisome proliferator-activated receptor- α , *Fas*; fatty acid synthase, *Acaca*; acetyl-CoA carboxylase α lpha, *Srebpl*; sterol regulatory element binding protein-1, *Actb*; β -actin.

【Western blotting】

Western blotting は過去に報告されている方法に従って行った¹³⁾。細胞溶解に用いた液には 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, そして 200 mM の dithiothreitol (#1610610; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)を含んでいる。細胞を溶解した液を 12% acrylamide gels (#456-1045; Bio-Rad Laboratories, Inc.)の上で電気泳動させた。用いた抗体

は, Anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) antibody (ab5694; Abcam)、anti-superoxide dismutase 2 (SOD-2) antibody (ab13533; Abcam), anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody (ab9485; abcam), そして horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (dilution 1:5000, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) である。蛋白のバンドは ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) を用いて検出した。各検体中の蛋白発現については、検体中の GAPDH 量を計測し補正を行った。

【in vitro での共培養実験】

実験には、ヒト肝芽腫細胞株である HepG2 細胞を Summit Pharmaceuticals International (Tokyo, Japan) より購入し使用した。HepG2 細胞は 10% FBS (Thermo Fisher Scientific) と 100 μ g/mL の gentamicin (Thermo Fisher Scientific) を添加した DMEM (Thermo Fisher Scientific) で培養した。HepG2 細胞は 12 ウェルのプレート (Becton Dickinson Labware, NJ, USA) 上に播種し、脂肪化を誘導するため 0.5mM の遊離脂肪酸 (free fatty acid: FFA) 化合物 (oleic acid/palmitic acid, 2:1) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に 24 時間暴露させた。その後、脂肪化を誘導した HepG2 細胞を 1) FFA のみでの培養, 2) FFA と BMSC の共培養の 2 群に群別した。BMSC との共培養群では、 5×10^4 個の BMSC を 0.4 μ m の小孔を有する Cell Culture Insert (Becton Dickinson Labware) へ播種し、既に脂肪化を誘導させた HepG2 細胞を培養している 12 ウェルプレート上へ設置した。この小孔を通じて BMSC が培養されたウェルからセクレトームのみが HepG2 細胞が培養されているウェルへと移行できる環境に調整した。48 時間後、細胞を Oil-red O 染色し (Sigma-Aldrich)、脂肪蓄積について評価を行った。また Oil-Red O 染色後に、100% イソプロパノール (Wako) で 5 分インキュベートし各ウェルの Oil-Red O 染色液を抽出したのちに、492nm の波長での吸光度を Infinite M 200Pro (Tecan, Kanagawa, Japan) を用いて測定した。

【統計解析】

データの解析は Student の t 検定を用いて行い、 $p < 0.05$ を統計学的有意であると判定した。データは平均 \pm 標準偏差 (SD) として表記した。

5. 結果

脂肪肝炎モデルの作出

CDA 食の給餌に CCl₄単回投与を併用すると, CCl₄非投与マウスと比較して、肝臓への脂肪沈着だけでなく肝小葉への炎症細胞浸潤および pericellular fibrosis の様な肝細胞を取り囲む肝線維化を誘導できた(Fig.1 b).

BMSC の肝臓への分布の確認

Luciferin を尾静脈投与し、脾臓より投与した Luc-BMSC を発光させ IVIS にて Luc-BMSC の体内動態を経時的に観察した(Fig. 2a). 投与 1 日後(12W+D1)より、脾臓から投与した Luc-BMSC は門脈を通じて肝臓へと到達した. その後は全身へ分布することなく、肝臓および脾臓に集積したまま、細胞投与して 7 日後(12W+7D)に体内からの発光は消失した. 細胞投与後から体内の発光消失までの期間は 3.9 ± 0.4 日 ($n = 8$)であった(Fig. 2b).

BMSC 投与による肝線維化の改善

Sirius red 染色で肝線維化を評価した結果, BMSC 群の Sirius red 染色陽性面積は, Control 群と比べて有意に低値であった(Control 群 vs. BMSC 群 = $5.4 \pm 0.9\%$ vs. $1.5 \pm 0.2\%$, $n=8$ 匹ずつ; $p < 0.01$) (Fig. 3a). また, 肝 α -SMA 蛋白 ($n=3$ 匹ずつ) および Collagen1A1(*Col1a1*)/*Actb* ratio($n=8$ 匹ずつ; $p < 0.01$)も BMSC 群で有意に抑制されていた(Fig. 3b, 3c).

Fig. 3

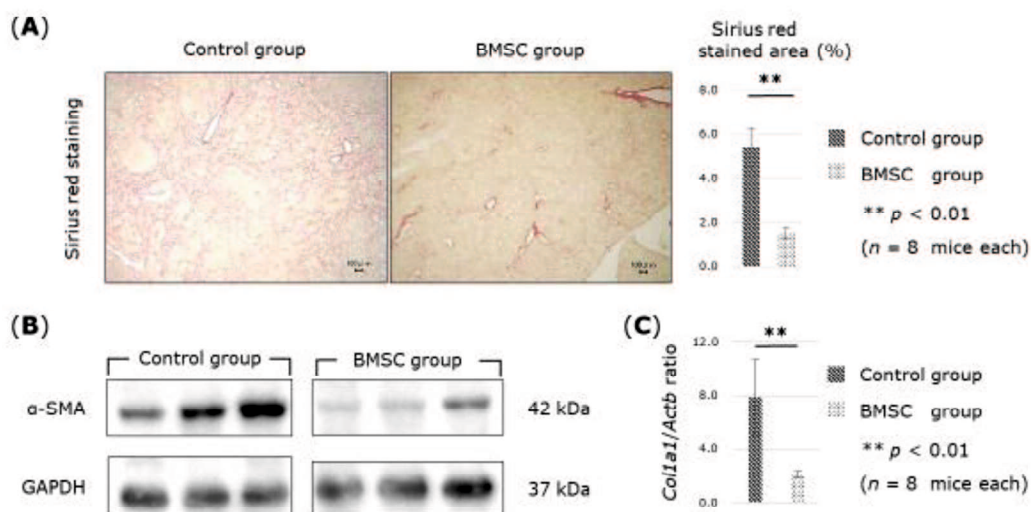


Fig. 3. 肝線維化評価

(a) Sirius red 染色陽性面積は BMSC 群で有意に低値であった. エラーバーは標準偏差を表す. 各群 $n=8$ 匹ずつ. **, $p < 0.01$. Magnification $\times 40$, scale bars $100 \mu\text{m}$. (b) Western blotting において α -smooth muscle actin (α -SMA)蛋白発現は BMSC 群において抑制されていた. コントロールとして, Glyceraldehyde 3-

phosphate dehydrogenase (GAPDH)を使用した。(c) collagen1a1(*Coll1a1*) の mRNA 発現も BMSC 群において有意に抑制されていた。n=8 匹ずつ。**, p < 0.01.

BMSC 投与による血清学的マーカーの改善

血液生化学検査では, BMSC 群は Control 群と比較して有意に血清アルブミン値は上昇 (Control 群 vs. BMSC 群 = 2.3 ± 0.5 g/dL vs. 3.0 ± 0.4 g/dL, n=8 匹ずつ; p<0.01)し, 血清総ビリルビンは低下(0.4 ± 0.3 mg/dL vs. 0.1 ± 0.1 mg/dL, n=8 匹ずつ; p<0.05)した。また, LDL/HDL ratio は低下する傾向を認めた (0.4 ± 0.4 % vs. 0.2 ± 0.1 %, n=8 匹ずつ; p = 0.11)(Table 2).

	Albumin (g/dl)	T-bil (mg/dl)	LDL/HDL
Control 群	2.3 ± 0.5	0.4 ± 0.3	0.4 ± 0.4
BMSC 群	$3.0 \pm 0.4^{**}$	$0.1 \pm 0.1^*$	0.2 ± 0.1

Table 2. ルシフェラーゼ陽性骨髄由来間葉系幹細胞経門脈的肝臓投与後 4 週間の血清学的検査の比較.

Abbreviations: T-bil, total bilirubin; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein. Data are means \pm SD, n = 8 each.

*, p < 0.05 vs. Control 群, **, p < 0.01 vs. Control 群.

BMSC 投与による肝脂肪化の改善

BMSC 群で脂肪滴沈着面積は有意に低値(Control 群 vs. BMSC 群 = $34.7 \pm 2.1\%$ vs. $21.2 \pm 3.3\%$, $n=8$ 匹ずつ; $p < 0.01$)であった (Fig.4a). また *Ppara* および carnitine palmitoyltransferase 1a (*Cpt1a*)の発現は BMSC 群で有意に亢進していたが ($n=8$ 匹ずつ; $p < 0.01$, $p < 0.05$, 同順), fatty acid synthase(*Fas*), acetyl-CoA carboxylase alpha(*Acaca*), sterol regulatory element binding protein-1(*Srebp1*)の発現は両群間に差は認められなかった ($n=8$ 匹ずつ) (Fig.4b).

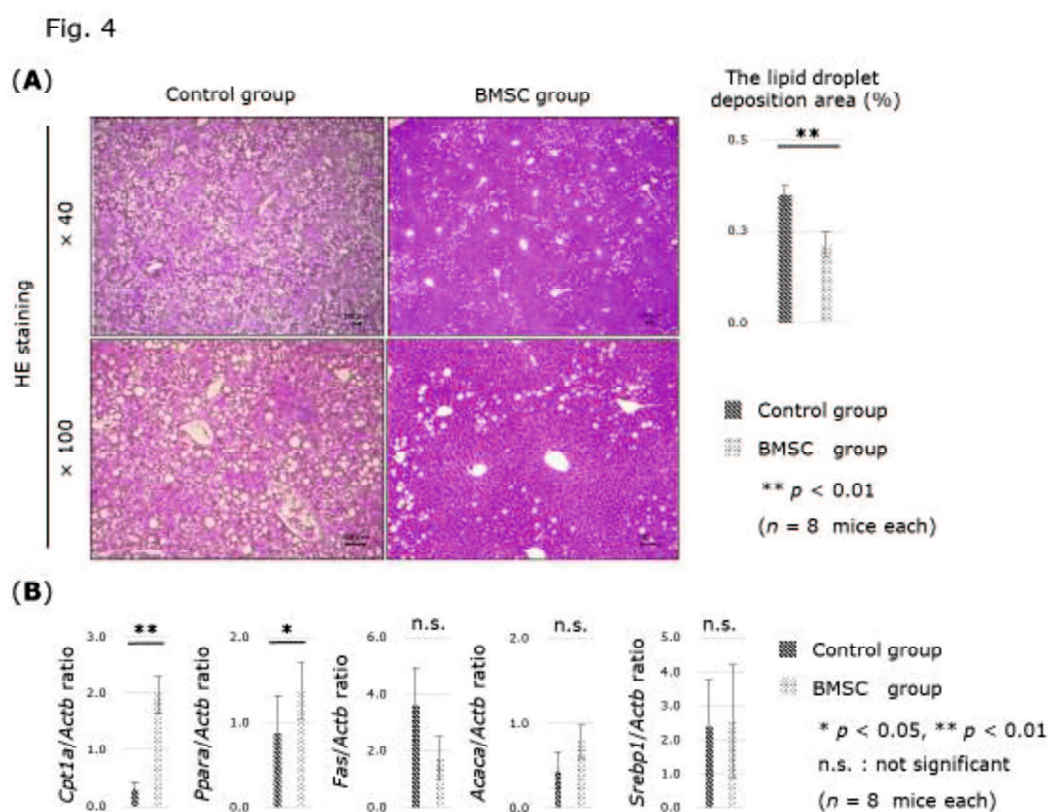


Fig. 4. 肝脂肪化および肝内脂質代謝の評価.

(a) Hematoxylin and eosin (HE) staining. BMSC 群で脂肪滴沈着面積は有意に低値であった(Control 群 vs. BMSC 群 = $34.7 \pm 2.1\%$ vs. $21.2 \pm 3.3\%$). エラーバーは標準偏差を表す. $n=8$ 匹ずつ. **, $p < 0.01$. Magnification $\times 40$ and $\times 100$. (b) 脂質代謝に関連する肝内 mRNA 発現を示す. $n=8$ 匹ずつ. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, n.s.; not significant.

BMSC 投与によるマクロファージ誘導

汎マクロファージマーカーである F4/80 陽性細胞数は両群に差は認めなかった (Control 群 vs. BMSC 群 = 192.4 ± 19.4 vs. 153.3 ± 19.9 cells/マウスあたり 5 視野, $n=5$ 匹ずつ; not significant, Fig. 5a). 一方, M1 マクロファージマーカーである iNOS 陽性細胞は Control 群で有意に多く (Control 群 vs. BMSC 群 = 84.9 ± 6.5 vs. 12.4 ± 2.8 cells/マウスあたり 5 視野, $n=5$ 匹ずつ; $p < 0.01$, Fig. 5b), M2 マクロファージマーカーである CD163 陽性細胞は BMSC 群で有意に多かった (Control 群 vs. BMSC 群 = 19.3 ± 6.0 vs. 67.5 ± 9.6 cells/マウスあたり 5 視野, $n=5$ 匹ずつ; $p < 0.01$, Fig. 5c).

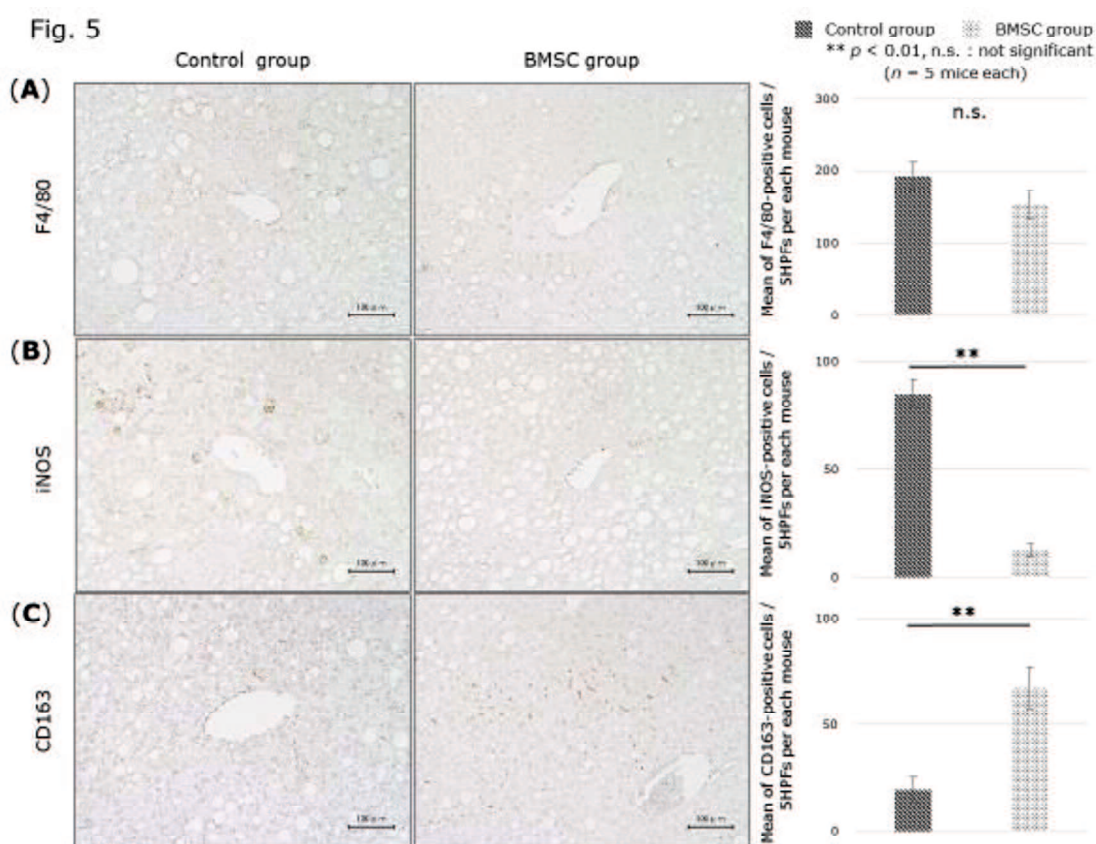


Fig. 5. マクロファージのフェノタイプ分布の評価.

得られた肝組織切片の(a) F4/80, (b) iNOS and (c) CD163 の免疫染色を示す. マウス肝臓切片 ($n=5$ 匹ずつ) を 100 倍視野で 5 枚ずつ撮像し免疫染色で陽性となった細胞数の平均値を示す. スケールバーは $100 \mu\text{m}$ を示す. エラーバーは標準偏差を示す. **, $p < 0.01$, n.s.; not significant.

BMSC 投与による酸化ストレスの改善

Control 群と比較すると, BMSC 群において 8-OHdG 陽性細胞数は有意に少なかった (Control 群 vs. BMSC 群 = 68.6 ± 9.7 vs. 36.4 ± 7.1 個/5 視野 per each mouse, $n=5$ 匹ずつ; $p < 0.05$, Fig.6a). また抗酸化ストレスに働く superoxide dismutase 2 (SOD-2) の蛋白発現は BMSC 群で亢進していた ($n=3$ each)(Fig. 6b).

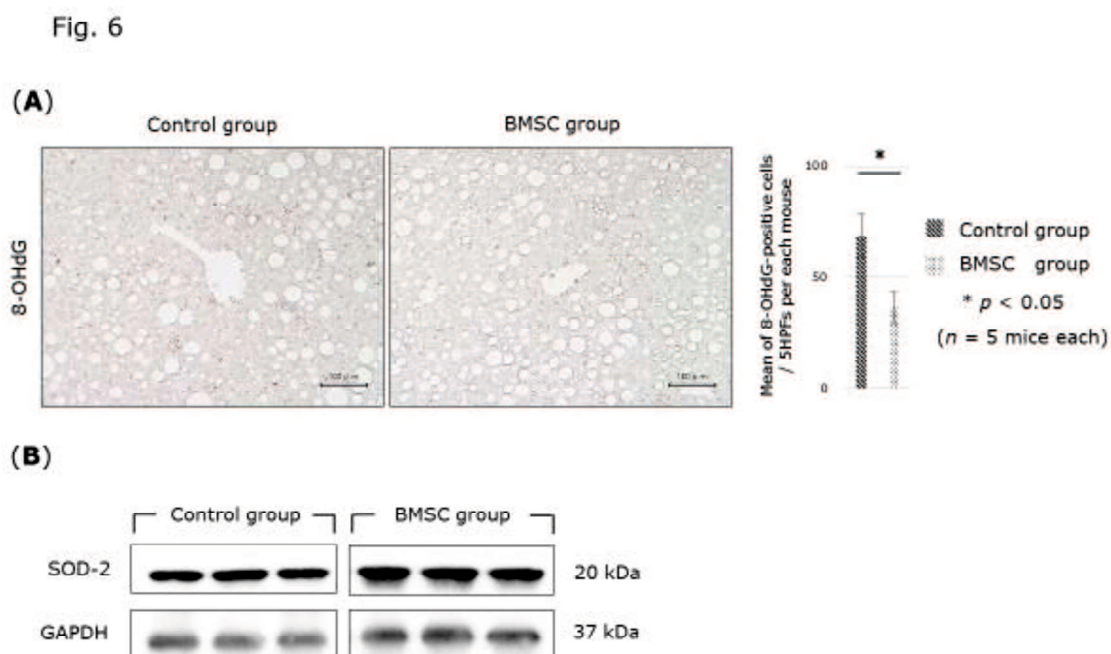


Fig 6. 肝内酸化ストレスについての評価.

(a) 肝組織切片での 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の免疫染色(magnification x200). マウス肝臓切片 ($n=5$ 匹ずつ) を 100 倍視野で 5 枚撮像し免疫染色で陽性となった細胞数の平均値を示す. スケールバーは $100 \mu\text{m}$ を表す. エラーバーは標準偏差を示す. *, $p < 0.05$. (b) Western blotting による肝臓内の superoxide dismutase 2 (SOD-2) 蛋白発現の比較. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 蛋白をコントロールとして使用した. $n=3$ each.

HepG2 と BMSC の共培養による基礎的実験

脂肪を蓄積させた HepG2 細胞を BMSC と共培養して 48 時間後に, HepG2 細胞の脂肪沈着を Oil-red O 染色で評価した(Fig.7a). その結果, BMSC と共に培養した HepG2 細胞は Control 群と比較し脂肪沈着が有意に少なく, また各 well 内の Oil-red O 染色液を抽出し 492nm で吸光度を測定すると, BMSC と co-culture した群は吸光度が有意に低かった (Control 群 vs. BMSC co-culture 群 = 1.4 ± 0.1 vs. 1.2 ± 0.1 , $n=12$ each; $p < 0.01$, Fig. 7b).

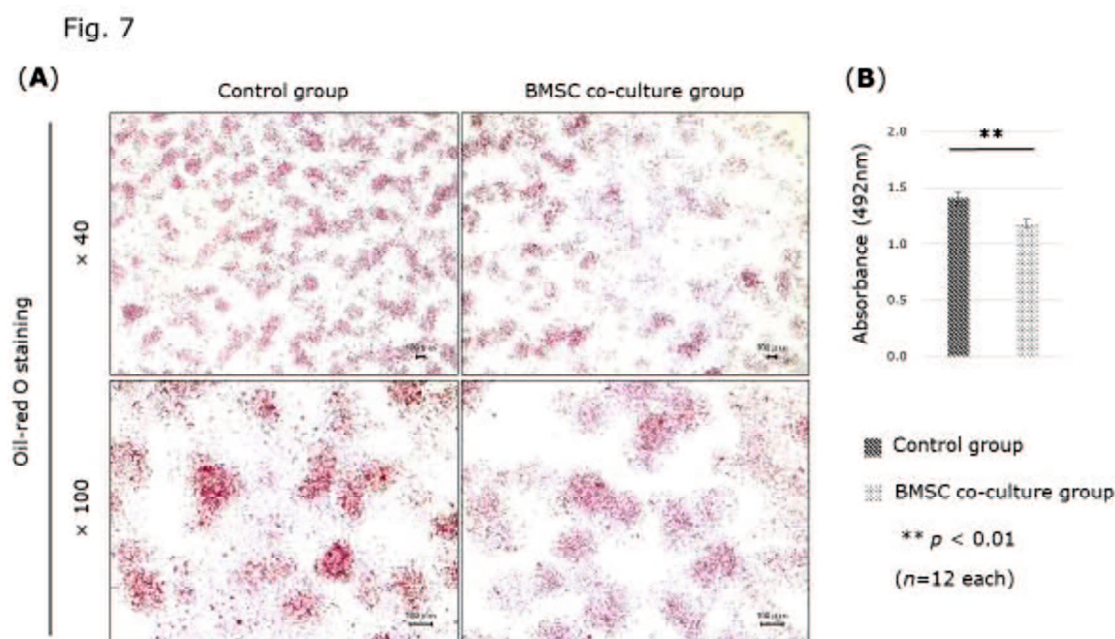


Fig 7. 脂肪化 HepG2 細胞に対する BMSC との共培養実験

(a) HepG2 細胞の Oil-red O 染色 (magnification $\times 40$, $\times 100$). Control 群 ; HepG2 細胞を 12 ウェルプレート内で 0.5mM の遊離脂肪酸化合物 (free fatty acid: FFA) に 72 時間暴露させる. BMSC co-culture 群; HepG2 細胞を 0.5mM の FFA を 24 hours 時間暴露させた後, 5×10^4 BMSC を $0.4 \mu\text{m}$ の小孔があいた Cell Culture Insert へ播種し, HepG2 細胞を培養している 12 ウェルプレート上へ設置する. その後 48 時間培養した. スケールバーは $100 \mu\text{m}$ を表す. (b) Oil-red O 染色液を抽出し, 492nm での吸光度の平均値を算出し比較 ($n = 12$ each). (Control 群 vs. BMSC co-culture 群 = 1.4 ± 0.1 vs. 1.2 ± 0.1). エラーバーは標準偏差を表す. $n=12$ each, $**$; $p < 0.01$.

6. 考察

これまで我々は、四塩化炭素誘導肝線維化モデルに対する BMSC の末梢静脈投与および肝動脈投与の有効性と安全性を報告してきた¹⁻⁶⁾。今回我々は、脂肪肝炎マウスモデルを作成し、このモデルに BMSC を門脈経由で肝臓に投与すると肝線維化、肝脂肪化および酸化ストレスが改善することを確認した。

NAFLD および NASH において肝疾患関連死に最も強く関係するものは肝線維化と報告されていることから⁹⁻¹¹⁾、肝線維化の制御は非常に重要な課題である。過去の研究ではマウス NASH モデルやラット NASH モデルに対して BMSC を用いて肝脂肪化および肝線維化が改善したという報告が散見されるが¹⁴⁻¹⁶⁾、投与された BMSC の体内動態および肝脂肪化や肝線維化改善効果の機序については不明な点が多い。今回、我々は脾臓から投与した BMSC は門脈を通じて肝臓へと移行し、その後、全身に分布することなく肝臓へと留まり、BMSC 投与後 3.9±0.4 日後に体内から消失することを確認した。これまでに、投与された BMSC は肝細胞に分化することで肝機能を改善させるという報告がある¹⁷⁾。しかしながら今回の検討では、BMSC の作用機序としては、マクロファージや肝細胞といった肝内に常在する他の細胞に作用し、細胞間相互作用を通じて線維化および脂肪化が改善する可能性が示唆された。

マクロファージは NASH の発症に関与しており、抗炎症作用を持つ MSC がマクロファージに作用することで線維化や脂肪化を改善させるという報告がある¹⁸⁻²¹⁾。我々の検討においても、肝内の M1 マクロファージが M2 マクロファージに phenotype を switch し、その分布が大きく変化していることが示された。これまでも、M1 マクロファージの減少および M2 マクロファージ増加により炎症性サイトカインである interleukin (IL)-6 や IL-1 β を抑制し、抗線維化因子である IL-10 を放出し肝星細胞(hepatic stellate cells: HSCs)の活性化を抑え、extra-cellular matrix (ECM)分解酵素である matrix metalloproteinase(MMP)-9 や MMP-12 を増加させることで肝線維化を改善させうることは in vivo および in vitro でも報告されている²²⁻²⁵⁾。さらに M2 マクロファージは、抗酸化ストレスに作用する SOD-2 蛋白を増加させることも報告されていることから²⁶⁾、今回 M2 型マクロファージ増加に起因する SOD-2 蛋白が増加することで肝内の酸化ストレスが制御された結果、肝内の 8-OHdG 陽性細胞が減少した可能性が示唆された。

また、今回の研究において BMSC 投与により肝脂肪化の改善を認めた。CDA 食モデルでは、コリンを基質としたホスファチジルコリンの合成量が低下し、疎水性のトリグリセリドを豊富に含む very low density lipoprotein (VLDL)が肝細胞から分泌されないために肝脂肪蓄積が誘発される²⁷⁾。今回、BMSC 群において脂肪合成系を反映する FAS や ACACA, Srebp1 の発現には差がなく、一方で脂肪代謝を反映する PPAR α や CPT-1 の発現が亢進していた。Lee らは脂肪組織由来のヒト MSC を投与すると肥満マウスの PPAR α および PPAR γ の発現を亢進させると報告しており¹⁵⁾、また PPAR α 標的遺伝子には CPT-1 が含まれることが知られている²⁸⁾。したがって、BMSC 投与により PPAR α を介した CPT-1 発

現亢進によりミトコンドリア内での β 酸化が亢進し、肝脂肪化が改善した可能性が示唆された。さらに *in vitro* においても HepG2 細胞の脂肪蓄積は BMSC と共培養することで改善することからも BMSC には肝脂肪化を改善させる作用があることが確認された。

7. 結語

我々の検討において、脂肪性肝炎モデルマウスに対する経門脈的 BMSC 肝臓投与の有効性が確認された。

8. 謝辞

山田 磨理子氏, 大田 久美江氏, 望月 里紗氏の技術的な支援に心より感謝申し上げます。また本研究は、山口県の再生医療研究開発 (R&D) センターを推進するプロジェクトによって支援頂き、更に坂井田 功教授への JSPS 科研費助成番号 JP17H04162 および高見 太郎先生への JP17K09428 によっても支援頂きましたことを重ねて感謝申し上げます。

9. 参考文献

1. Sakaida I, Okita K, et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology*. 2004;40(6):1304-11.
2. Terai S, Sakaida I, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells*. 2006;24(10):2292-8.
3. Iwamoto T, Sakaida I, et al. Splenectomy enhances the anti-fibrotic effect of bone marrow cell infusion and improves liver function in cirrhotic mice and patients. *J Gastroenterol*. 2012;47(3):300-12.
4. Tanimoto H, Terai S, Sakaida I, et al. Improvement of liver fibrosis by infusion of cultured cells derived from human bone marrow. *Cell Tissue Res*. 2013;354(3):717-28.
5. Matsuda T, Takami T, et al. A canine liver fibrosis model to develop a therapy for liver cirrhosis using cultured bone marrow-derived cells. *Hepatol Commun*. 2017;1(7):691-703.
6. Nishimura T, Takami T, et al. Liver regeneration therapy through the hepatic artery-infusion of cultured bone marrow cells in a canine liver fibrosis model. *PLoS ONE*. 2019; 14(1): e0210588.
7. Lade A, Noon LA, Friedman SL. Contributions of metabolic dysregulation and inflammation to nonalcoholic steatohepatitis, hepatic fibrosis, and cancer. *Curr Opin Oncol*. 2014;26(1):100-107
8. Belletani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2017;37(1):81-84.
9. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow up. *Hepatology*, 2015;61(5):1547-

54.

10. Angulo P, Kleiner DE, Bendtsen F, et al. Liver fibrosis, but no other histologic features, is associated with long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2015;149(2):389-97.
11. Dulai PS, Singh S, Loomba R, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Hepatology*, 2017; 65(5):1557-1565.
12. Komiya C, Ogawa Y, et al. Antifibrotic effect of pirfenidone in a mouse model of human nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Rep*, 2017;7: 44754.
13. Fujisawa K, Hara K, Takami T, et al. Evaluation of the effects of ascorbic acid on metabolism of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1): 93
14. Winkler S, et al. Human mesenchymal stem cells towards non-alcoholic steatohepatitis in an immunodeficient mouse model. *Exp Cell Res*. 2014;326(2): 230-9.
15. Lee CW, et al. Mesenchymal stromal cell-based therapies reduce obesity and metabolic syndromes induced by a high-fat diet. *Transl Res*. 2017;182;61-74.
16. Cao M, Pan Q, Dong H, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells improve glucose homeostasis in high-fat diet-induced obese mice. *Stem Cel Res Ther* 2015;6:208.
17. Banas A, Ochiya T, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*. 2007;46: 219-228.
18. Itoh M, Suganami T, Ogawa Y, et al. CD11c⁺ resident macrophages drive hepatocyte death-triggered liver fibrosis in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis. *JCI Insight*. 2017;2(22).
19. Nakashima H, Nakashima M, Hanaka H, et al. Activation and increase of radio-sensitive CD11b⁺ recruited Kupffer cells/macrophages in diet-induced steatohepatitis in FGF5 deficient mice. *Sci Rep*. 2016;6: 34466.
20. Krenkel O, Puengel T, Tacke F, et al. Therapeutic inhibition of inflammatory monocyte recruitment reduces steatohepatitis and liver fibrosis. *Hepatology*. 2018;67(4):1270-1283.
21. Wan J, Benkdane M, Lafdil F, et al. M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2014;59: 130-142.
22. Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2(MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut*. 2012;61: 416-426.
23. Yang ZZ, Cheng Z, et al. Mesenchymal stem cell-derived conditioned medium

attenuate angiotensin II-induced aortic aneurysm growth by modulating macrophage polarization. *J Cell Mol Med*, 2019;23(12):8233-8245.

24. Cho DI, Kim MR, et al. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp Mol Med*.2014;46(1): e70.

25. Calvente CJ, Tameda M, Johnson CD, et al. Neutrophils contribute to spontaneous resolution of liver inflammation and fibrosis via microRNA-223. *J Clin Invest* 2019;130: 4091-4109.

26. Brandon G, Shakeel M, et al. Scavenging reactive oxygen species selectively inhibits M2 macrophage polarization and their pro-tumorigenic function in part, via Stat 3 suppression. *Free Radi Bio and Med* 2020;147: 48-60.

27. Sha W, et al. Metabolomic profiling can predict which humans will develop liver dysfunction when deprived of dietary choline. *FASEB J*, 2010;24(8):2962-75.

28. C Mascaró, D Haro, et al. Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 1998;273(15):8560-3.