

学位論文（博士）

Extracellular vesicle microRNAs from human bone
marrow MSCs suppress fibrogenesis of hepatic
stellate cells by downregulation of RhoA signaling

（ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の細胞外小胞に含まれ
る microRNA が、RhoA 活性の低下を介して肝星細
胞の線維化を抑制する）

氏名 川本 大樹

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 消化器内科学講座

令和 8 年 1 月

目 次

1. 要旨	3
2. 背景・目的	4
3. 方法	6
4. 結果	1 1
5. 考察	1 9
6. 結語	2 7
7. 謝辞	2 8
8. 参考文献	2 9

1.要旨

本研究では、骨髄間葉系幹細胞(bone marrow mesenchymal stem cells: BMSCs)が放出する細胞外小胞 (extracellular vesicles: EVs) に含まれる microRNA (miRNA) に着目し、肝星細胞 (hepatic stellate cells: HSCs) に対する抗線維化効果とその機序を検討した。健常者および肝硬変患者由来 MSC-EV、ならびに HSC の miRNA 発現プロファイルを網羅的に比較し、MSC-EV に高発現し HSC では低発現の miRNA を 11 種類の miRNA を候補として同定した。これらの miRNA mimic を HSC に導入し、線維化関連遺伝子 (α -smooth muscle actin: α -SMA、collagen I、elastin: ELN) の発現を評価した結果、miR-204-3p、miR-7977、miR-1237-5p、miR-5787、miR-6089 の 5 種類が抗線維化 miRNA として選抜された。5 個の miRNA cocktail を HSC に導入すると、 α -SMA、collagen I、ELN の発現が低下し、MSC-EV による抑制効果と同様だった。RNA-seq に基づく解析では RhoA 活性の有意な抑制が示され、G-LISA により RhoA 活性の低下が確認された RhoA 活性は細胞遊走に関与することから、HSC の遊走能を評価したところ、miRNA cocktail は活性化 HSC の遊走を有意に抑制した。以上より、BMSCs の MSC-EV に高発現している 5 種類の miRNA は、HSC における線維化関連遺伝子発現を抑制し、その機序として RhoA 活性の低下を介した HSC 活性化・遊走能の抑制が関与することが明らかとなった。

2. 背景・目的

非代償性肝硬変症（DLC）の治療は、世界的に重大な医療課題となっている。DLC は慢性肝疾患の End stage であり、広範な肝線維化、肝機能の低下、門脈圧亢進症や肝性脳症などの合併症を特徴とする。非代償性肝硬変にまで至ると肝機能改善は容易ではなく、DLC 患者の生存期間は中央値で3年以下である[1]。医療療法や肝移植技術の進歩にもかかわらず、肝移植術が DLC の唯一の根治法であるが、ドナーの不足や移植手術の侵襲性といった問題があるため、代替療法の開発が求められている。

近年、再生医療が DLC に対する有望な治療戦略として注目を集めている。中でも間葉系幹細胞（mesenchymal stem cells : MSCs）は、その多分化能、免疫調節能、および種々の生理活性分子を分泌する能力により、関心が寄せられている。MSCs は骨髓、脂肪組織、臍帯など様々な組織由来で得ることが可能であるが、骨髓由来 MSCs（bone marrow-derived MSCs : BMSCs）は、治療応用に向けて最も広く研究されてきた細胞種である。この点において、複数の臨床研究により、DLC 患者に対する MSC 療法が肝機能改善に寄与する可能性が示唆されている [2-7]。これらの研究では、血清アルブミン値、血小板数、Child-Pugh スコアの有意な改善が報告されており、重大な有害事象も認められていないことから、本治療法の安全性および有効性が確認されている。我々はこれらを踏まえ、自己 BMSCs を用いた DLC に対する肝再生治療法を開発し、現在、肝動脈内への細胞注入を伴う臨床試験『自己完結型肝硬変再

生療法』(jRCT2063200014)を実施中である。

肝線維化は、活性化肝星細胞 (hepatic stellate cells : HSCs) による線維形成とマクロファージによる線維分解との間のバランスの破綻により生じる病態である。MSCs はこのバランスを是正し、肝再生を促進することで線維化の解消に寄与することが知られている。特に、MSCs の治療効果はパラクリン作用によるものであることが指摘されている [8]。中でも、microRNA (miRNA) を豊富に含有する細胞外小胞

(extracellular vesicles : EVs) は、HSC の活性化を制御し、肝線維化を軽減する可能性があることから、大きな注目を集めている [9]。我々は以前、MSC 由来 EV に含まれる miR6769b-5p がマクロファージに線維分解促進型の表現型を誘導することを報告した [10]。一方、他の研究においても、MSC-EVs がマウスの HSC における線維形成を抑制することが示されている [11,12]。しかしながら、MSC 由来 EV が HSC に対して発揮する抗線維化作用の分子メカニズムは未だ明らかにされていない。そこで本研究では、健常人および DLC 患者由来の MSCs を用いて、MSC-EV に含まれる抗線維化 miRNA の同定および、HSC における細胞外マトリックス (ECM) 産生を抑制するメカニズムの解明を目的とした。

3. 方法

3.1 マウスモデル

6 週齢、体重 19～24 g の雄性 C57BL/6J マウスを、Charles River Laboratories Japan（神奈川）より購入した。マウスは山口大学医学部附属動物実験施設において、特定病原体不在（SPF）条件下で飼育した。すべての動物実験は、山口大学医学部の動物実験指針に従って実施され、同学動物倫理委員会の承認を得て行われた（承認番号：21-S12）。肝硬変（LC）モデルは、四塩化炭素をコーン油に溶解し（0.4 mL/kg、10% v/v）、腹腔内に週 2 回、2 か月間投与することで作製した。治療効果の評価として、Invivofectamine 3.0（Thermo Fisher Scientific）を用いて調製した miRNA cocktail を、尾静脈より 3 日に 1 回、計 3 回投与した。対照群には Dulbecco's リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を投与した。最終投与 72 時間後にマウスを安楽死させ、肝臓を摘出した。

3.2 シリウスレッド染色

肝組織はホルマリン固定後、パラフィン包埋し、厚さ 3 μ m に薄切した。線維化領域の評価には、1%シリウスレッド溶と Van Gieson 溶液 P を 1:29（v/v）で混合した染色液を用いた。観察にはオールインワン蛍光顕微鏡（BZ-X800、KEYENCE）および高度観察モジュール（BZH4XD）を使用した。

3.3 培養細胞

MSC は、医師主導型臨床試験（jRCT2063200014）に参加した DLC 患者 3 名から採取された。

症例 1：30 代女性

症例 2：50 代男性

症例 3：60 代男性

全員アジア人であり、90 日以上の間隔を空けて少なくとも 2 回、Child-Pugh スコア 7～12 を示していた。すべての患者から、文書によるインフォームド・コンセントを取得した。本研究は山口大学医学部附属病院倫理審査委員会の承認を得て実施された

（承認番号：H2020-211-3）。研究はヘルシンキ宣言に従って実施された。健常者由来

MSC（passage 2）は Lonza 社より購入し、passage 4 まで増殖させて使用した。

ドナー 1：26 歳 白人男性

ドナー 2：29 歳 白人女性

ドナー 3：32 歳 その他の人種（販売元記載そのまま）

3.4 細胞培養

MSC は、37°C、5% CO₂条件下で StemFit for MSC 培地（味の素）を用いて培養し

た。ヒト肝星細胞（HHStcC）は ScienCell Research Laboratories より購入した。LX-2

細胞は Merck、LI-90 細胞は Health Science Research Resource Bank より入手した。

これらの HSC は、GlutaMAX 添加 DMEM に 10%ウシ胎児血清（FBS）を加えた培地で培養した。HSC の活性化にはヒト TGF- β （5 ng/mL）を使用した。HHSteC と BMSC の間接共培養は 24 時間行った。Transwell 共培養では、6well plate 下層に HHSteC（ 1×10^5 細胞）、上層インサート（孔径 0.4 μ m）に BMSC（ 5×10^4 細胞）を播種した。ROCK 阻害剤 Y-27632 は最終濃度 10 μ M で使用した。

3.5 MSC 由来 EV の分離および HSC との共培養

EV の分離は既報に従って行った。MSC 培養上清を $10,000 \times g$ で 70 分遠心後、Total Exosome Isolation Reagen を用いて EV を回収した。

HHSteC は 12 ウェルプレートに 1×10^5 細胞／ウェルで播種し、 4×10^6 個の MSC-EV とともに、Exosome 除去 FBS を含む DMEM で 48 時間共培養した。

3.6 EV の特性解析

EV の粒子数および粒径は、単一粒子追跡法（Interferometry Light Microscopy ; Videodrop）で測定した。形態は透過型電子顕微鏡（Tecnai G2 Spirit BioTWIN）で確認し、2%酢酸ウラニルによるネガティブ染色を行った。EV 表面マーカーとして、CD9、CD63、CD81、Hsp70 の発現を Western blot により確認した。

3.7 real time PCR 解析

RNA および miRNA は Qiagen の RNeasy Mini Kit および MinElute Cleanup Kit を用いて抽出した。cDNA 合成は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix および miRCURY

LNA Universal RT Kit を使用した。ACTA2、COL1A1、COL1A2、ELN の定量には Fast SYBR Green Master Mix を使用し、GAPDH を内部コントロールとした。各プライマーの塩基配列は Supplementary table 1.に記載する。miRNA 定量には MiRCURY LNA miRNA PCR Assay を使用し、U6 snRNA を内部対照とした。発現量は $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法で算出した。

Supplementary Table 1. Sequences of primers used for real-time polymerase chain reaction

Gene	Forward	Reverse
ACTA2	AGCATCCTGAGGTGTGGGCTA	CATATCAAGCCAGCCTCCAGAA
COL1A1	CCCGGGTTTCAGAGACAACTTC	TCCACATGCTTTATTCCAGCAATC
COL1A2	AGGGCAACAGCAGGTTCACTTAC	ACCGATGTCCAAAGGTGCAATA
ELN	AGCAAGACCTGGCTTCGGATT	CCAACGTTGATGAGGTCGTGA
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA

3.8 Western blot 解析

細胞溶解液を回収後、SDS サンプルバッファーで処理し、100°Cで5分加熱した。 α -SMA、Collagen I、Elastin、および GAPDH に対する抗体を用いて検出し、ChemiDoc システムで解析した。

3.9 micro array 解析

MSC-EV および HSC 由来 miRNA を抽出し、3D-Gene Human miRNA Oligo Chip を用いて解析した。正規化後、バックグラウンドより 2SD 以上のシグナルを有効とした。

3.10 RNA sequence および経路解析

Total RNA を抽出後、Illumina NextSeq でペアエンド（50 bp）シーケンスを実施した。Ingenuity Pathway Analysis（IPA）を用い、fold change >2.0、 $p < 0.05$ を有意とした。

3.11 miRNA transfection

HSC を 24 ウェルプレートに播種し、11 種の miRNA 模倣体を Lipofectamine RNAiMAX で 48 時間導入した。

3.12 RhoA シグナル活性測定

G-LISA 法により活性型 RhoA（GTP 結合型）を定量した。さらに SRF-RE ルシフェラーゼレポーターアッセイにより RhoA/ROCK 経路活性を評価した。

3.13 細胞運動能評価

タイムラプス移動解析およびスクラッチアッセイを用いて HSC の移動能を評価した。

3.14 統計解析

多群比較は一元配置分散分析後に Tukey 検定または Dunnett 検定を用い、2 群比較は Student の t 検定を使用した。統計解析は JMP Pro18 (JMP Statistical Discovery LLC.)を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差とした。

4. 結果

4.1 MSC は EV を介して HSC の活性化および線維化を抑制する

まず、肝硬変 (LC) マウスモデルを用いて、MSC の *in vivo* 動態を検証した。脾臓内に投与した GFP 陽性マウス BMSCs は、投与 24 時間後に肝線維化領域周辺へ集積することが確認された (Fig. 1A, B)。この所見は、MSC が肝臓内の線維周辺において局所的に作用し得ることを示唆する。次いで、MSC の抗線維化作用における液性因子の関与を検討した。ヒト肝星細胞 (HSCs) を TGF- β で活性化し、ヒト BMSCs と間接共培養したところ、共培養後の HSCs では、 α -smooth muscle actin (α -SMA)、collagen I (COL I)、elastin (ELN) を含む線維化関連遺伝子の発現が有意に低下した (Fig. 1C)。以上より、MSC 由来の液性因子を担う細胞外小胞 (extracellular vesicles: EVs) に着目した。

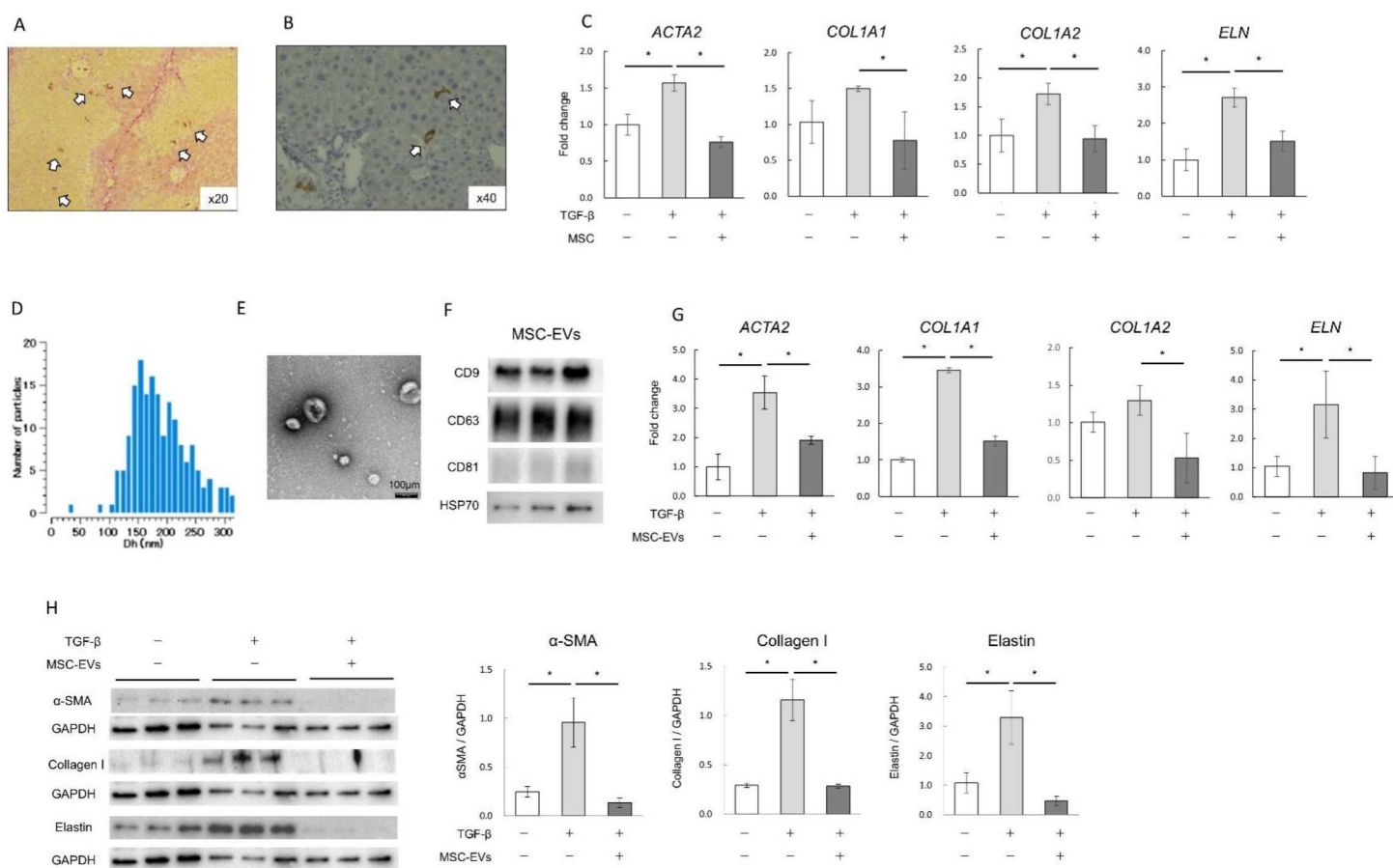
ナノ粒子トラッキング解析 (nanoparticle tracking analysis: NTA) により粒子径分布および濃度を評価した結果、MSC-EVs は 150 nm 付近に主要なピークを示した (Fig. 1D)。粒子径および形態は、透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscopy: TEM) により観察し確認した (Fig. 1E)。さらに、EV のウェスタンブロット解析により、CD9、CD63、CD81、および HSP70 を含む EV の代表的なマーカータンパク質の発現を確認した (Fig. 1F)。続いて、MSC-EVs を HSCs と共培養し、線維化関連遺伝子の発現を評価したところ、MSC-EVs は HSCs における α -SMA、COL I、ならび

に ELN を含む線維化関連遺伝子およびタンパク質の発現を抑制した (Fig. 1G, H)。

以上から、MSC-EVs は MSC が HSCs に及ぼす抗線維化作用の一端を担う可能性が示

唆された。

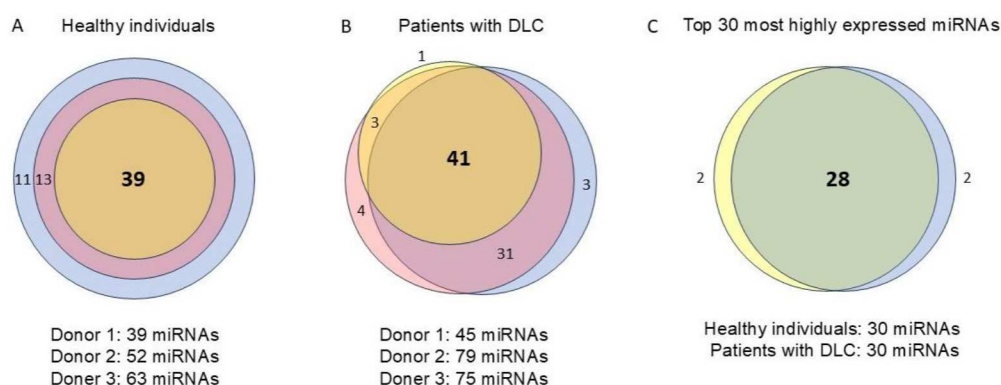
Figure 1



4.2 DLC 患者由来 MSC-EV に高発現の miRNA は健常者由来 MSC-EV と類似している

次に、MSC-EV 中の miRNA 発現プロファイルを網羅的にマイクロアレイ解析し、健常者 3 名と DLC 患者 3 名から得られた MSC-EV を比較した。正規化強度値が 1,000 以上の miRNA を選択した結果、健常者 3 名で共通して 39 種類の miRNA が発現しており、その発現パターンには大きな差が認められなかった (Fig. 2A)。一方、DLC 患者 3 名でも共通して 40 種類の miRNA が発現していたが、発現パターンはより多様であった (Fig. 2B)。しかし、健常者群と DLC 患者群において最も強く発現していた上位 30 種の miRNA を比較したところ、28 種が共通していた (Fig. 2C および Table 3)。これにより、MSC-EV における miRNA の発現プロファイルは、DLC 患者においても健常者と類似していることが示された。

Figure 2



4.3 MSC-EV に高発現の 5 種の miRNA は HSC に対して抗線維化作用を有する

MSC-EVs で高発現しており、標的である HSCs には低発現の miRNA が、HSC 活性化および線維化を抑制し得るとの仮説を立てた。そこで、MSC-EVs に含まれる miRNA の発現量ならびに抗線維化作用を検討した。まず、健常者由来 MSC-EVs の miRNA プロファイルを、複数の HSCs と比較した。その結果、健常者由来 MSC-EVs において発現強度が 1,000 を超え、かつ HSCs では 50 倍以上低値を示す 11 種の miRNA を抽出した (Table 2)。次いで、11 種のうち 10 種の miRNA mimic を HSCs へ導入し、細胞外マトリックス (ECM) 関連遺伝子の発現を評価した。すなわち、10 種 miRNA 導入群における ECM 遺伝子発現が 11 種 miRNA 導入群より高値であった場合、除外された miRNA が抗線維化 miRNA であると判定した。COL1A1 発現解析に基づき、抗線維化作用を有する可能性のある 5 種の miRNA (miR-204-3p、miR-7977、miR-5787、miR-6089、miR-1237-5p) を同定した (Fig. 3A)。これら 5 種の抗線維化 miRNA は、DLC 患者由来 MSC-EVs においても高発現を示した (Table 2)。

ここで MSC-EVs を HHSteCs に投与し培養したところ、HHSteCs 内における 5 種抗線維化 miRNA の発現は、未処理 HHSteCs と比較して有意に上昇していた (Fig. 3B)。そこで、5 種 miRNA cocktail が HSC 活性化および線維化を抑制し得るかをさらに検討した。その結果、5 種 miRNA cocktail は、HSCs における α -SMA、COL I、ならびに ELN の発現を抑制した (Fig. 3C, D および Supplementary Fig. 1)。以上よ

り、同定した 5 種抗線維化 miRNA が実際に HSCs の線維産生抑制作用を有すること
 が示された。さらに、5 種 miRNA cocktail の in vivo での効果を検証したところ、
 miRNA cocktail 投与により線維化の有意な減少が確認された (Fig. 3E)。

Table 2

	HSCs				MSC-EVs derived from healthy individuals					MSC-EVs derived from patients with DLC				
	HHStEC	LI-90	LX2	Average	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Average	ExR (vs HSCs)	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Average	ExR (vs HSCs)
hsa-miR-204-3p	0	18	7	8	3504	3562	6495	4520	542	5106	5712	1937	4252	510
hsa-miR-7977	30	22	32	28	2741	3139	4919	3600	129	3540	7122	3788	4817	172
hsa-miR-5787	52	26	21	33	2790	4196	4675	3887	118	3857	3104	3801	3587	109
hsa-miR-7704	82	50	38	57	3923	5637	7282	5614	99	6711	11345	10341	9466	167
hsa-miR-3960	116	84	99	100	7041	8010	13730	9594	96	9911	20800	19239	16650	167
hsa-miR-6075	26	22	13	20	1170	1750	2388	1769	87	1497	3480	2328	2435	120
hsa-miR-6089	51	48	55	51	2803	3707	5629	4046	79	3794	8137	9941	7291	142
hsa-miR-6126	75	93	56	75	3813	4305	7585	5234	70	6475	12598	6222	8432	113
hsa-miR-1908-5p	59	69	76	68	2987	3564	5897	4149	61	3851	10352	2602	5602	82
hsa-miR-1237-5p	29	44	28	34	1397	1832	2621	1950	58	3291	4564	5781	4545	135
hsa-miR-6893-5p	37	31	50	39	1539	1777	2907	2074	53	2288	3965	3925	3393	86

Sup Fig 1

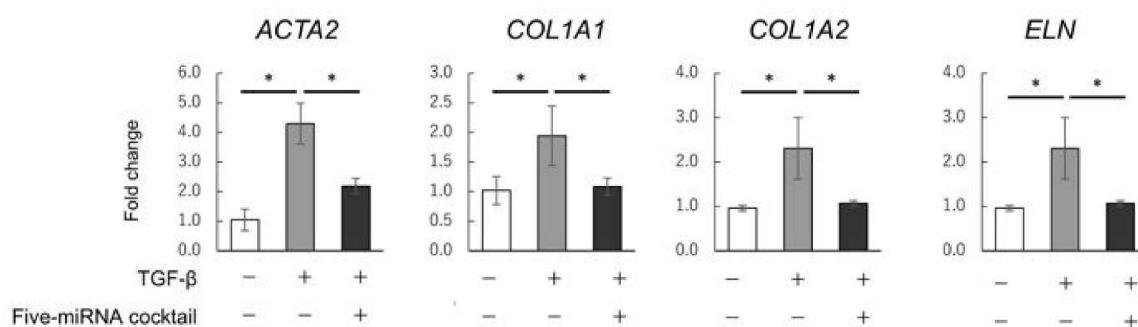
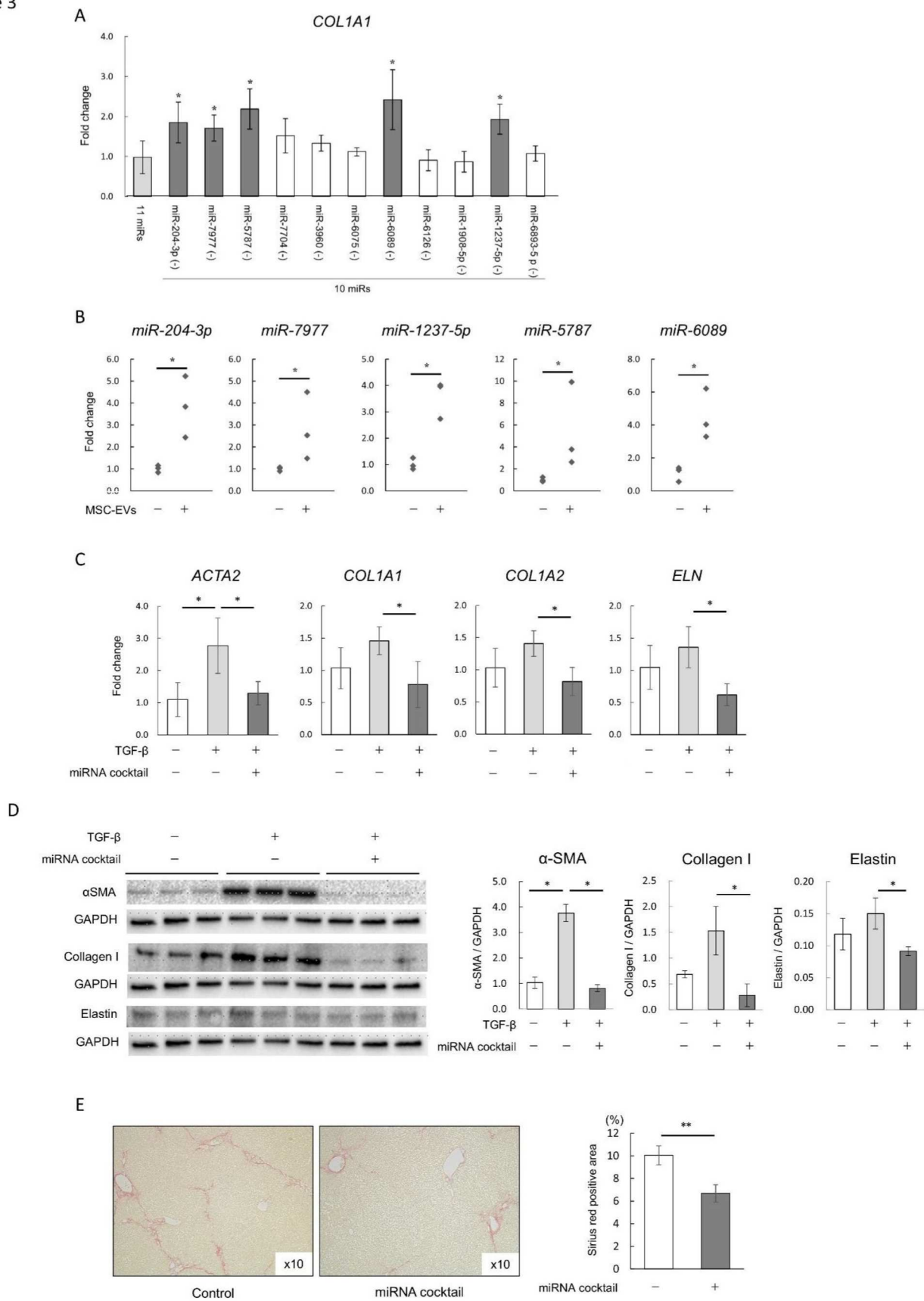


Figure 3



4.4 五種 miRNA カクテルは RhoA シグナル経路の抑制を介して HSC の活性化と遊走を抑制する

5 種 miRNA cocktail が HSCs に対して抗線維化作用を発揮する機序の解明を進めた。

5 種 miRNA cocktail を導入した HSCs の RNA-seq data を用いて pathway 解析を実施

したところ、Rho Family GTPase シグナルに関連する経路が多く抽出され、特に

RhoA シグナルが有意に低下していることが示された (Fig. 4A)。次いで、G-LISA ア

ッセイにより HSCs における RhoA 活性を評価した結果、5 種 miRNA cocktail 導入後

に RhoA 活性の低下が確認された (Fig. 4B)。さらに、RhoA/ROCK 経路下流の転写

因子である SRF 活性を指標とする SRF-RE ルシフェラーゼレポーターアッセイにおい

ても、5 種 miRNA カクテル導入により RhoA/ROCK 経路活性が有意に低下した

(Fig. 4C)。加えて、活性化 HSCs を Y-27632 で処理したところ、RhoA シグナルの阻

害により活性化 HSCs の線維化が抑制されることを確認した (Supplementary Fig.

2)。さらに、5 種抗線維化 miRNA の各 miRNA を単独で HSCs に導入し RhoA 活性を

評価したところ、miR-6089 を除く 4 種の miRNA が RhoA 活性を抑制した (Fig.

4D)。

RhoA シグナルは細胞運動性の制御に関与することが知られている [13]。そこで、

HSCs における RhoA 活性低下を機能的に検証するため、タイムラプス解析およびス

クラッチアッセイにより HSC の遊走能を評価した。その結果、5 種 miRNA cocktail

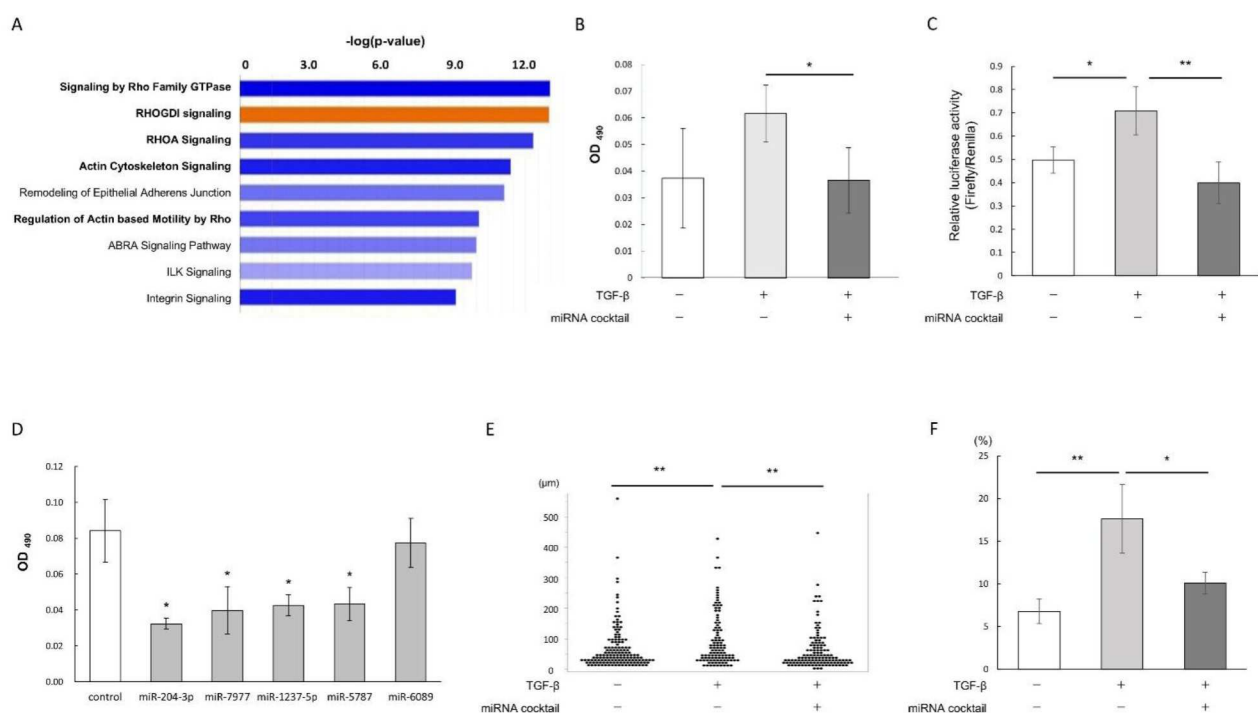
を投与した HSCs では、活性化 HSCs と比較して細胞遊走が低下していた (Fig. 4E)。

また、スクラッチアッセイにおいても、5 種 miRNA cocktail は活性化 HSCs の遊走を

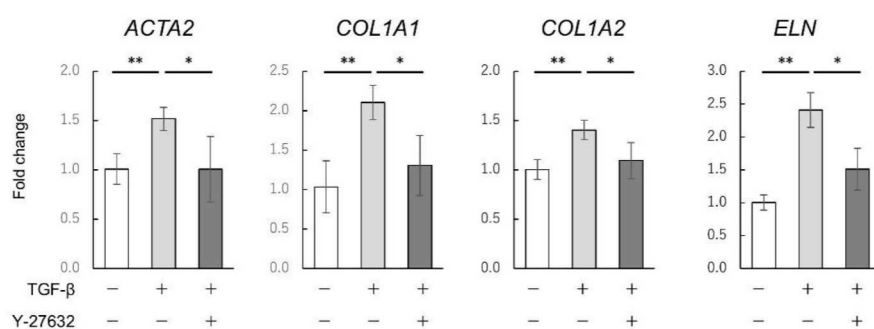
抑制した (Fig. 4F)。以上より、5 種 miRNA cocktail は RhoA シグナル伝達経路の抑

制を介して、HSC 活性化および遊走能を抑制することが示唆された。

Figure 4



Supplementary Fig. 2



5. 考察

肝硬変患者の肝臓では、miR-122 や miR-29 を含む複数の miRNA 発現が健常者と比較して低下しており、これが HSC 活性化と関連することが報告されている[14]。したがって、HSC における miRNA 発現は肝線維化に対する治療標的となり得ると考えられる。本研究では、MSC 由来 EV (MSC-EVs) に含有される miRNA が HSC の線維化形成に及ぼす抑制効果を検討した。MSC は、Notch 依存的な細胞間接触を介して HSC 活性化を抑制することが報告されている[15–17]。また、MSC が分泌する神経成長因子や肝細胞増殖因子が、HSC のアポトーシス誘導および抑制に重要であることも示されている[18–20]。以上を踏まえ、本研究では MSC-EVs による HSC 線維化抑制効果を評価した。その結果、MSC と HSC の共培養系ならびに MSC-EVs を HSC に投与したもののいずれにおいても同様の抑制効果が認められ、MSC が HSC 線維化を抑制する機序の一端を MSC-EVs が担う可能性が示唆された。MSC-EVs は免疫調節作用も有し、MSC あるいは MSC 条件培地を投与した動物モデルでは、炎症の軽減と線維化抑制を伴って肝内の線維化促進性サイトカイン TGF- β 産生が低下することが報告されている[8–10]。一方、本研究の共培養実験では、MSC-EVs が HSC 線維化を直接的に抑制し得ることが示された。

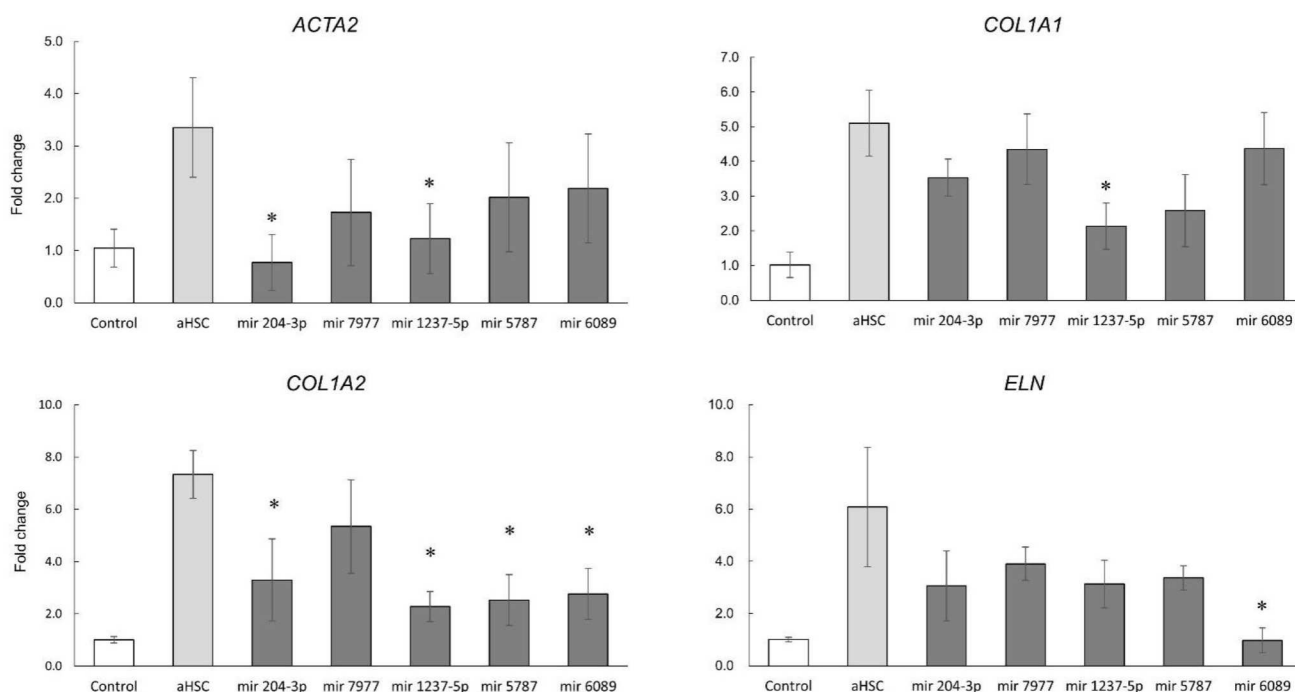
EV は mRNA、miRNA、その他の低分子 RNA、タンパク質、脂質など多様な分子を輸送し得るが、本研究では抗線維化作用を担う候補として miRNA に着目した。骨髓

MSC 由来 EV と脂肪組織 MSC 由来 EV の miRNA プロファイルを比較した報告はあるものの[21]、健常者と LC 患者の MSC-EVs 間で miRNA プロファイルを比較した報告はない。本研究では、健常者由来 MSC-EVs の miRNA プロファイルは比較的均一であったのに対し、代償不全肝硬変（DLC）患者由来 MSC-EVs では多様性が認められた。EV は親細胞の機能を反映することが知られており、老化あるいは加齢に伴う MSC の分泌物および EV 内容物の変化が、MSC 機能の変容に寄与する可能性が指摘されている[22]。実際に、LC 患者では骨髄 MSC 数の減少や液性因子分泌の低下が報告されている[23]。本研究で観察された DLC 患者由来 EV の miRNA プロファイルの多様性は、MSC の老化・加齢を反映している可能性がある。しかし、両群に共通して高発現する miRNA が抗線維化作用を有することから、両群の EV はいずれも同様の抗線維化作用を示すことが期待される。

本研究では、MSC-EVs 中の抗線維化 miRNA 同定のために 2 段階の選抜を行った。第 1 段階では、MSC-EVs で高発現かつ HSCs で低発現の miRNA を抽出した。これは、EV 輸送により標的細胞内 miRNA 量が相対的に増加しやすい条件であるためであり、定量的スクリーニングに相当する。MSC-EVs に含まれる単一 miRNA の抗線維化作用については複数の報告がある[24-28]。しかし、MSC-EVs は複数の miRNA を搭載し、各 miRNA は多数の標的遺伝子発現を抑制し得るため、MSC-EVs に含まれる miRNA 間相互作用を評価することが、受容細胞に対する作用機序の理解に重要であ

る。そこで第2段階として、11種中10種のmiRNAを導入した際にCollagen I発現が増加する場合、除外されたmiRNAを抗線維化miRNAと判断する機能的選抜を行った[29]。この戦略により、miR-204-3p、miR-7977、miR-1237-5p、miR-5787、miR-6089の5種を抗線維化miRNAとして同定した。これら5種を単独でHSCsへ導入しても、 α SMA、Collagen I、ELNなど全ての線維化関連遺伝子を一様には抑制しなかった (Supplementary Fig. 3)。一方、5種miRNAカクテルの導入は、MSC-EVs共培養系で認められた抑制効果と同程度にこれら遺伝子の発現を抑制した。以上より、MSC-EVs中の抗線維化miRNAは相補的に作用し、EVの作用を模倣する可能性が示唆された。

Supplementary Fig. 3

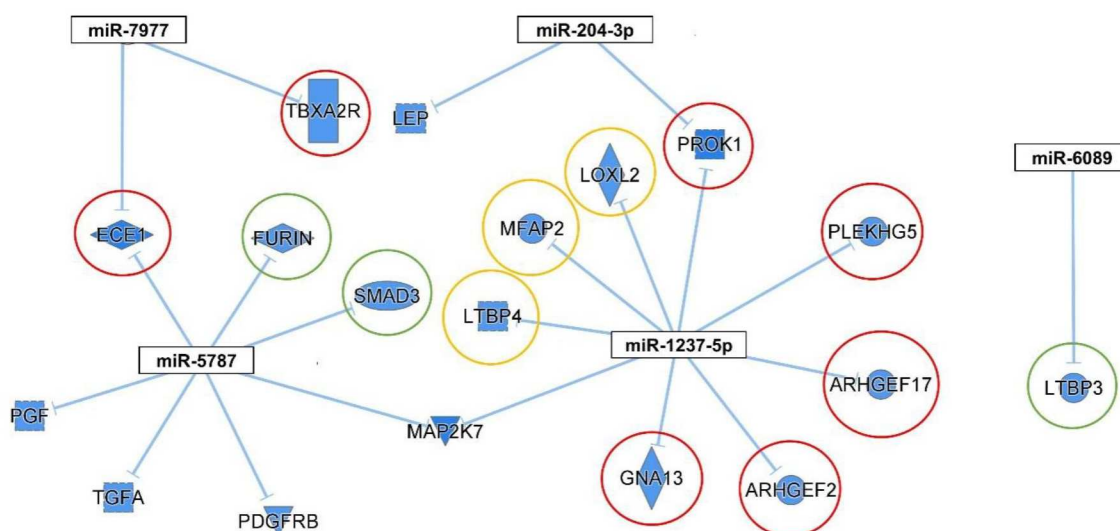


次いで、MSC-EVs が HSCs に作用する機序を明らかにするため、5 種 miRNA カクテル導入 HSCs の遺伝子発現を網羅的に解析した。Ingenuity Pathway Analysis (IPA) により、Rho ファミリー GTPase シグナル、とりわけ RhoA の抑制、および Rho GDP-dissociation inhibitors (RhoGDIs) の増強が示された[30]。RhoA は細胞骨格ダイナミクス、細胞極性、遊走を制御する低分子 GTPase であり、肝線維化の過程では RhoA/ROCK 経路が HSC 活性化を調節する。ROCK 阻害薬 Y-27632 を用いた先行研究では、RhoA/ROCK 経路阻害が in vitro で HSC 活性化を抑制し、in vivo で肝線維化を抑制することが示されている[31,32]。本研究でも、G-LISA アッセイにより、miR-6089 を除く 4 種 miRNA が RhoA 活性を抑制することを確認した。これと整合して、miRDB に基づく予測では、これら 4 種 miRNA の標的に RhoA 活性化に関与するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) 遺伝子が含まれていた (Supplementary Table 2)。

miRNA No.	Target genes
miR-204-3p	ARHGEF39; Rho guanine nucleotide exchange factor 39
miR-7977	ARHGEF12; Rho guanine nucleotide exchange factor 12
miR-1237-5p	ARHGEF17; Rho guanine nucleotide exchange factor 17
miR-5787	ARHGEF15; Rho guanine nucleotide exchange factor 15 ARHGEF39; Rho guanine nucleotide exchange factor 39
miR-6089	-

さらに IPA の microRNA Target Filter を用い、予測標的を“RhoA signaling”“RHOGDI signaling”“hepatic fibrosis/hepatic stellate cell activation”“elastic fiber formation”の各カテゴリで絞り込みを行った (Supplementary Fig. 4A)。その結果、RhoA シグナル関連遺伝子として、endothelin-converting enzyme 1 (ECE1)、prokineticin 1 (PROK1)、thromboxane A2 receptor (TBXA2R)、G protein subunit alpha 13 (GNA13)、RhoGEF 2 および 17 (ARHGEF2、ARHGEF17)、ならびに pleckstrin homology and RhoGEF domain-containing protein 5 (PLEKHG5) が同定された。特に、G protein-coupled receptor (GPCR) -G α 12/13-RhoGEF-RhoA 軸は RhoA 活性化の中核経路であり [33,34]、4 種 miRNA がこのカスケード構成要素を標的とすることが予測された。実際に本研究の RNA-seq 解析では、5 種 miRNA カクテルが HSCs における

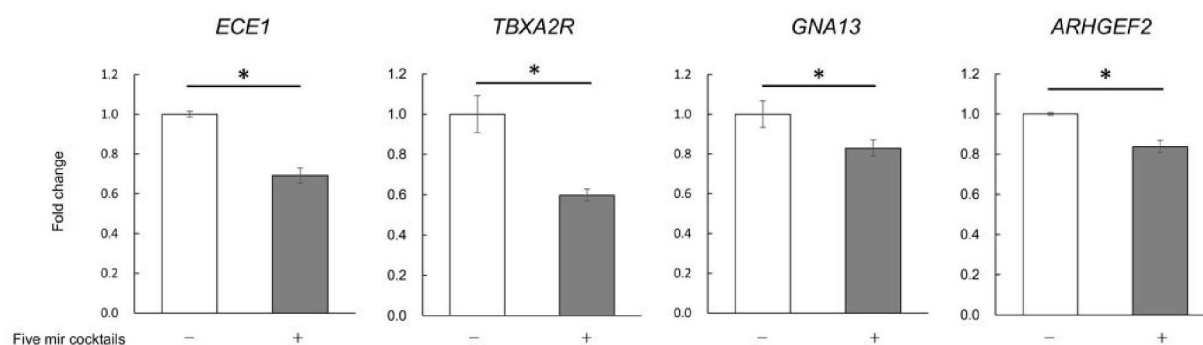
Supplementary Fig. 4A



ECE1、TBXA2R、GNA13、ARHGEF2 の発現を抑制することが示された

(Supplementary Fig. 5)。

Supplementary Fig. 5



TGF- β シグナルに関しては、latent transforming growth factor beta binding protein 3

(LTBP3)、furin (FURIN)、SMAD family member 3 (SMAD3) が同定され、これ

らは TGF- β の分泌・活性化および下流の細胞内シグナル伝達に寄与する。さらに、

弾性繊維産生経路では、latent transforming growth factor beta binding protein 4

(LTBP4)、microfibril-associated protein 2 (MFAP2)、lysyl oxidase-like 2

(LOXL2) が同定され、弾性線維の組み立ておよびリモデリングにおける異なる段階

を代表する分子であった。加えて、SMAD3、MFAP2、LOXL2 の阻害が HSC 活性化

を減弱させることが報告されている [35–38]。以上を総合すると、5 種 miRNA cocktail

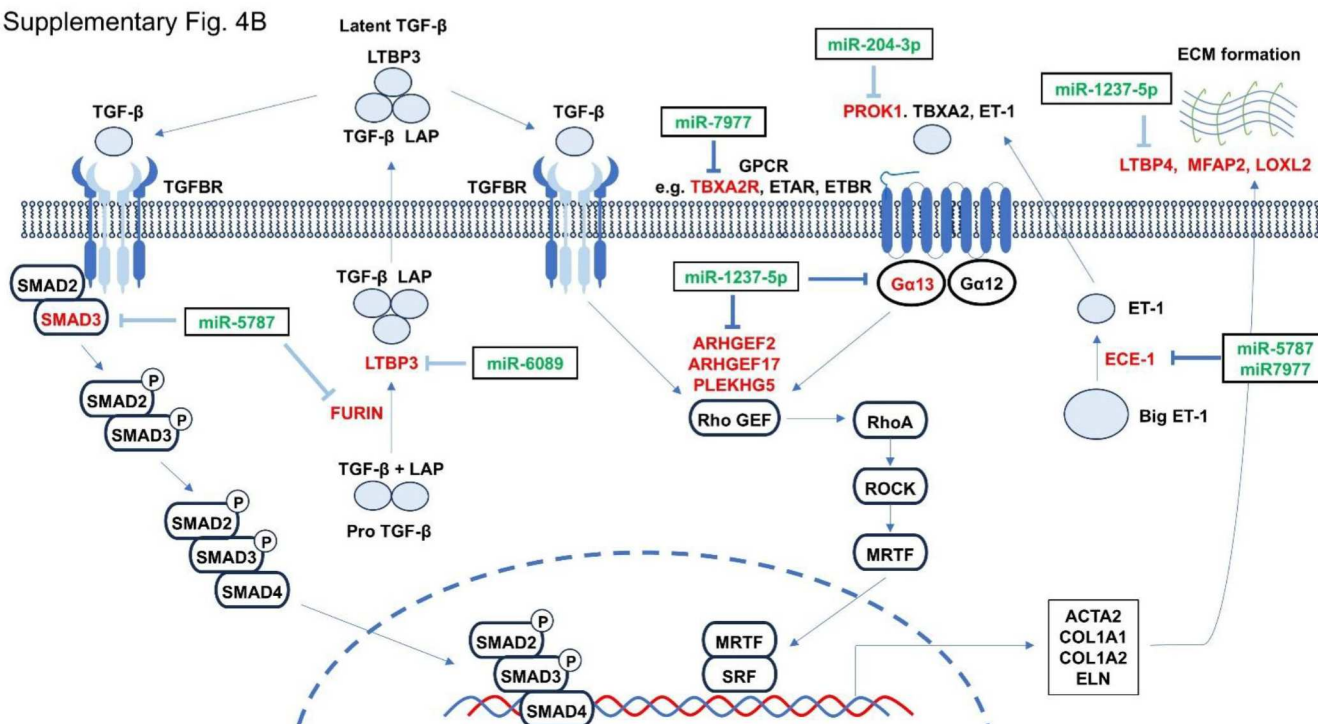
は、上流調節因子、RhoA 中核シグナル、並行する TGF- β 経路、ならびに下流 ECM

産生といった複数層を協調的に抑制することで HSC 活性化を抑える可能性が示唆され

る。この多標的抑制は代償的シグナルを制限し、抗線維化反応に加算的効果をもたら

す可能性がある (Supplementary Fig. 4B)。ただし、詳細な作用機序の解明にはさらなる検討を要する。

Supplementary Fig. 4B



in vivo 実験においても、5 種 miRNA cocktail 投与により肝線維化面積が減少し、今後 LC に対する治療薬としての可能性が示された。リポソームを介した送達、直接トランスフェクションと比較して、生理的な miRNA 量比の保持や in vivo での安定性向上といった利点を有する可能性がある。本研究の治療的示唆としては、合成 miRNA cocktail をリポソームに封入し、線維化肝組織へ標的送達することで、抗線維化治療の特異性と有効性を高め得る点が挙げられる。

一方で、本研究には限界（limitation）がある。第一に、MSC 投与後の LC モデルマウスの肝臓における miRNA 発現変化を評価できていない点である。第二に、5 種 miRNA cocktail の in vivo における作用機序が十分に解明されていない点である。以上より、MSC-EV 由来 miRNA を用いた LC に対する抗線維化治療の臨床応用は有望である一方、さらなる検証が不可欠である。

6.結語

本研究は MSC-EV に含まれる 5 種類の抗線維化 miRNA を同定し、RhoA シグナルの抑制を介した線維化抑制メカニズムを明らかにした。これらの知見は、MSC-EV の治療的メカニズムの解明に寄与するものであり、将来的には肝線維症に対する miRNA ベースの治療法開発に向けた重要な基盤となる。

7. 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導いただいた第一内科松本 俊彦先生、高見 太郎教授
に深く感謝申し上げます。技術的支援をいただいた第一内科スタッフ、山田 真理子
様、大田 久美江様、石井 由香様、堀田 理沙様、総合科学実験センター 生体分析
実験施設 吉村 安寿弥先生、ニコン株式会社 前田 美和様に感謝申し上げます。

8. 参考文献

1. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006;44:217–231.
2. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11–16.
3. Lu W, Qu J, Yan L, et al. Efficacy and safety of mesenchymal stem cell therapy in liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Stem Cell Res Ther* 2023;14:301.
4. Houlihan DD, Newsome PN. Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease. *Gastroenterology* 2008;135:438–450.
5. Souza BS, Nogueira RC, de Oliveira SA, et al. Current status of stem cell therapy for liver diseases. *Cell Transplant* 2009;18:1261–1279.
6. Bird TG, Lorenzini S, Forbes SJ. Activation of stem cells in hepatic diseases. *Cell Tissue Res* 2008;331:283–300.
7. Muraca M. Evolving concepts in cell therapy of liver disease and current clinical perspectives. *Dig Liver Dis* 2011;43:180–187.
8. Lee C, Kim M, Han J, et al. Mesenchymal stem cells influence activation of hepatic stellate cells, and constitute a promising therapy for liver fibrosis. *Biomedicines* 2021;9:1598.

9. Zhang Y, Dou J, Dai S. et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate liver fibrosis by inhibiting hepatocyte ferroptosis and macrophage polarization via the miR-455-3p/PLAU axis. *Stem Cell Res Ther* 2025;16:412.
10. Nishi M, Matsumoto T, Fujisawa K, et al. Mesenchymal stem cells induce a fibrolytic phenotype by regulating mmu-miR-6769b-5p expression in macrophages. *Stem Cells Dev* 2020;29:1457–1466.
11. Lai RC, Yeo RW, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosomes. *Semin Cell Dev Biol* 2015;40:82–88
12. Pomatto M, Gai C, Negro F, et al. Differential therapeutic effect of extracellular vesicles derived by bone marrow and adipose mesenchymal stem cells on wound healing of diabetic ulcers and correlation to their cargoes. *Int J Mol Sci* 2021;22:3851.
13. Byrne KM, Monsefi N, Dawson JC, et al. Bistability in the Rac1, PAK, and RhoA signaling network drives actin cytoskeleton dynamics and cell motility switches. *Cell Syst* 2016;2(1):38-48.
14. Schueller F, Roy S, Vucur M, et al. The role of miRNAs in the pathophysiology of liver diseases and toxicity. *Int J Mol Sci.* 2018;19:261.
15. Sun C, Shi C, Duan X, Zhang Y, Wang B. Exosomal microRNA-618 derived from mesenchymal stem cells attenuate the progression of hepatic fibrosis by targeting Smad4.

Bioengineered 2022;13:5915–5927.

16. Chen S, Xu L, Lin N, et al. Activation of Notch1 signaling by marrow-derived mesenchymal stem cells through cell-cell contact inhibits proliferation of hepatic stellate cells. Life Sci. 2011;89:975-981.

17. Lin N, Yao Z, Xu L, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells utilize the notch signaling pathway to induce apoptosis of hepatic stellate cells via NF- κ B sensor. Biol Chem. 2020;401:505-515.

18. Lin N, Hu K, Chen S, Nerve growth factor-mediated paracrine regulation of hepatic stellate cells by multipotent mesenchymal stromal cells. Life Sci. 2009;85:291-5.

19. Wang PP., Xie DY, Liang XJ, et al. HGF and direct mesenchymal stem cells contact synergize to inhibit hepatic stellate cells activation through TLR4/NF- κ B pathway. PLoS ONE. 2012;7:e43408.

20. Rong X, Liu J, Yao X, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate liver fibrosis through the Wnt/ β -catenin pathway. Stem Cell Res Ther. 2019;10:98.

21. Shen J, Cao J, Chen M, et al. Recent advances in the role of exosomes in liver fibrosis. J Gastroenterol Hepatol 2023;38(7):1083–1088.

22. Boulestreau J, Maumus M, Rozier P, et al. Mesenchymal stem cell derived

extracellular vesicles in aging. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:107.

23. Bihari C, Anand L, Rooge S, et al. Bone marrow stem cells and their niche components are adversely affected in advanced cirrhosis of the liver. *Hepatology.* 2016;64:1273–1288.

24. Song BW, Oh S, Chang W. Multiplexed targeting of microRNA in stem cell-derived extracellular vesicles for regenerative medicine. *BMB Rep* 2022;55:65–71.

25. Chiabotto G, Ceccotti E, Tapparo M, Camussi G, Bruno S. Human liver stem cell derived extracellular vesicles target hepatic stellate cells and attenuate their profibrotic phenotype. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:777462.

26. Zhang J, Qiu X, Lei Y, et al. Engineered EVs from LncEEF1G-overexpressing MSCs promote fibrotic liver regeneration by upregulating HGF release from hepatic stellate cells. *Exp Mol Med* 2025;57:584–600.

27. He L, Xu J, Huang P, et al. miR-9-5p and miR-221-3p promote human mesenchymal stem cells to alleviate carbon tetrachloride-induced liver injury by enhancing human mesenchymal stem cell engraftment and inhibiting hepatic stellate cell activation. *Int J Mol Sci* 2024;25:7235.

28. Matsumoto Y, Itami S, Kuroda M, et al. MiR-29a assists in preventing the activation of human stellate cells and promotes recovery from liver fibrosis in mice. *Mol Ther* 2016;24:1848–1859.

29. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663–676.
30. Krek A, Grün D, Poy MN, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 2005;37:495–500.
31. Moon MY, Kim HJ, Kim MJ, et al. Rap1 regulates hepatic stellate cell migration through the modulation of RhoA activity in response to TGF- β 1. *Int J Mol Med* 2019;44:491–502
32. Murata T, Arii S, Nakamura T, et al. Inhibitory effect of Y-27632, a ROCK inhibitor, on progression of rat liver fibrosis in association with inactivation of hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2001;35:474–481
33. Rasheed SAK, Subramanyan LV, Lim WK, et al. The emerging roles of G α 12/13 proteins on the hallmarks of cancer in solid tumors. *Oncogene*. 2021;41(2):147–158.
34. Gardi C, Arezzini B, Monaco B, et al. F2-isoprostane receptors on hepatic stellate cells. *Lab Invest*. 2008;88:124-131.
35. Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, et al. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology*. 2001;34:89-100.
36. Jeong D-H, Hwang M, Park J-K, et al. Smad3 Deficiency Ameliorates Hepatic Fibrogenesis through the Expression of Senescence Marker Protein-30, an Antioxidant-

Related Protein. Int J Mol Sci. 2013;14:23700-23710.

37. Sun Y, Chen X, Chen L, et al. MFAP2 promotes HSCs activation through FBN1/TGF β /Smad3 pathway. J Cell Mol Med. 2023;27(21):3235-3246.

38. Ikenaga N, Peng Z-W, Vaid KA, et al. Selective targeting of lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) suppresses hepatic fibrosis progression and accelerates its reversal. Gut. 2017;66(9):1697-170