

主論文の要旨

**Conditioned medium from stem cells derived from  
human exfoliated deciduous teeth ameliorates  
NASH via the Gut-Liver axis**

〔 ヒト乳歯歯髄幹細胞培養上清は、腸肝相関を通じて  
NASHを改善する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態内科学講座 消化器内科学分野

(指導：石上 雅敏 准教授)

武藤 久哲

## 【緒言】

多能性分化能と低抗原性を備えた間葉系幹細胞(MSC)は、自己複製して脂肪細胞、軟骨、骨等に分化し、多くの成長因子と免疫調節因子を分泌する。これらの可溶性因子は、培養上清として収集することができる。近年、さまざまな種類の MSC に由来する液性因子が、多くの難治性疾患を治療する可能性があることが示されている。乳歯歯髄幹細胞(SHED)は組織採取が簡便であることから、MSC の供給源のひとつとして注目されている。また、その無血清培養上清(SHED-CM)には炎症抑制や再生促進に関わる蛋白を含む多数の液性因子が含まれる。我々はこれまでに四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)による肝線維化マウスモデルに対して、SHED-CM が肝細胞アポトーシス抑制、抗炎症作用を介して、線維化を抑制することを示した。肝細胞癌の背景肝疾患のうち、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の割合が近年世界的に増加しており、今後も増加が見込まれている。一方でNASHに対する確立された有効な薬物療法はなく、新たな治療法の開発が課題である。腸管および腸内細菌と肝臓は互いに密接な関係があり、腸肝相関と呼ばれている。近年では、NASH の原因の一つとして腸内細菌叢の乱れが先行し、さらに腸管壁透過性亢進も加わることで、エンドトキシンなどの腸内細菌産物が門脈に流入し、肝臓にダメージを与えるという腸肝相関を介したメカニズムが注目されている。NASHにおいて、エンドトキシンは肝内マクロファージを刺激し、TNF- $\alpha$ 、iNOSといった炎症性メディエーターを介して肝細胞を慢性的に障害し続け、更に線維化の中心的役割を担う肝星細胞を活性化させることで肝硬変へ進展する。われわれはヒトの病態との類似性が報告されている NASH マウスモデルを用いて、SHED-CM の肝臓における炎症・線維化に対する効果、さらには腸管透過性に対する影響について検討した。

## 【方法】

NASH マウスモデルは、Western Diet および高濃度糖水の経口投与と少量の CCl<sub>4</sub> 腹腔内投与を併用して作成した。このモデルは 12 週でヒト NASH と類似した肝の脂肪化と線維化をきたす。10 週目から 12 週目まで、SHED-CM(0.5 mL)またはコントロールとして無血清 DMEM(0.5 mL)を週に 1 回尾静注した。蛍光標識したデキストラン(FITC-dextran)により腸管上皮の透過を評価する *in vivo* アッセイを行った後に屠殺し、肝臓、回腸、盲腸内容物、および血清サンプルを収集し、組織学的、血清学的、および遺伝子発現分析を行った。

また、*in vitro* での検討として、マウス大腿骨・脛骨より骨髓細胞を採取し、M-CSF 存在下に 1 週間培養し、マクロファージを得た。その後 SHED-CM で 24 時間培養し、DMEM で培養したもの(M0)あるいは IL-4 によって誘導した M2 と、遺伝子発現を比較した。

さらに、腸管上皮の *in vitro* モデルである Caco-2 単細胞層を IFN $\gamma$  および TNF $\alpha$  で傷害し、その後 SHED-CM あるいは DMEM を添加し 24 時間培養、FITC-dextran の透過性を評価するとともに、免疫染色および遺伝子発現解析を行った。

## 【結果】

NASH マウスモデルにおいて、SHED-CM は肝臓における組織学的炎症と線維化を有意に改善した (Figure 1)。遺伝子発現解析においては、SHED-CM によって線維化マーカー (*Colla1*, *Colla2*)、炎症マーカー (*Tnf- $\alpha$* , *Ccl-2*) の他、*Tlr-4* の発現低下を認めた (Figure 2)。SHED-CM によって血中 LPS-binding protein 濃度の低下も確認された。さらに、FITC-dextran を用いた腸管透過性評価によって、SHED-CM 治療は腸管バリア機能を保護することが確認された。回腸における ZO-1 の発現は SHED-CM 群で有意に増強しており、tight junction を保護する作用が示唆された。一方で、次世代シーケンサーを用いた腸内細菌解析においては、SHED-CM による変化は認めなかった (Figure 3)。

マウス骨髄由来マクロファージを用いた実験において、*Tnf- $\alpha$*  と *Tgf- $\beta$*  の発現は、SHED-CM で処理したマクロファージでは、他のマクロファージに比べて有意に抑制されていた。興味深いことに、SHED-CM で処理したマクロファージは、M2 表現型の特徴 (*Arg-1* や *Ym-1* など) を持つとともに、*Mmp-13* の高い発現を示し、抗炎症作用や抗線維化作用を持つユニークな表現型を持つことが明らかになった (Figure 4)。

さらに *in vitro* の検討において Caco-2 単細胞層に対して、SHED-CM はバリア機能を改善させる作用があることが示された。遺伝子発現解析においては、SHED-CM 処理によって *Zo-1* の有意な発現上昇を認め、免疫染色においても SHED-CM で ZO-1 陽性細胞の増加を認めた (Figure 5)。

## 【考察】

我々はこれまでに、SHED-CM には肝細胞保護、抗アポトーシス、血管新生、マクロファージの分化などに関与する複数の液性因子が含まれており、急性肝不全や肝線維化動物モデルにおいて有効であることを報告してきた。本研究において、SHED-CM が NASH マウスモデルにおいても抗炎症作用および抗線維化作用を有することが示された。SHED-CM で刺激された骨髄由来のマクロファージは、*Mmp-13* を強く発現するユニークな表現型を持つと同時に *Arg-1* や *Ym-1* などの M2 (抗炎症) マーカーを発現することを明らかにした。NASH マウスモデルでは、これらのユニークなサブセットのマクロファージが誘導され、肝臓の炎症や線維化の抑制に関与している可能性がある。近年、腸管透過性の亢進により、腸内細菌叢が産生するエンドトキシンが門脈を介して肝臓に曝露されることが、NASH の進行要因の一つとされている。本研究では、SHED-CM が腸管上皮の tight junction を保護し、腸管バリア機能を維持することを示した。この結果、門脈の LPS 濃度を反映する血清 LPS binding protein 濃度が低下し、肝臓での *Tlr-4* の発現が抑制されたと考えられる。SHED-CM による LPS/TLR-4 シグナル経路の抑制効果の一部は、腸管バリアの保護を介している可能性があると考えられた。実際、*in vitro* での SHED-CM 処理が、Caco-2 単細胞層モデルにおける腸管上皮の透過性の機能を維持することを示した。

**【結論】**

SHED-CM が、肝細胞の保護作用や炎症性マクロファージの活性化の抑制に加えて、腸肝相関を介してマウス NASH モデルの線維化を抑制することを明らかにした。これらのデータは、SHED-CM が NASH に対して多面的な治療効果を発揮する可能性を示す。