

主論文の要旨

**Multifaceted therapeutic benefits of factors
derived from stem cells from human exfoliated
deciduous teeth for acute liver failure in rats**

〔 急性肝障害モデルラットに対する乳歯歯髄幹細胞
由来パラクライン因子群の治療効果の検討 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：日比 英晴 教授)

松下 嘉泰

【緒言】

劇症肝炎は短期間で高頻度に死に至る原因不明の難治性疾患である。有効な治療法としては臓器移植が挙げられるが、ドナー不足等の問題があり、罹患患者全てが受けられないのが現状である。これまでに間葉系幹細胞移植による劇症肝炎動物モデルの病態改善効果が報告されてきた。しかしながら細胞生着率は低く、その治療効果の多くは細胞自身が分泌するパラクライン因子群によるものであると考えられている。パラクライン因子群のみの投与で治療効果が得られれば、細胞移植を要しない新しい治療法の開発が期待できる。我々はこれまでに神経損傷モデルを用いた研究で、ヒト乳歯歯髄幹細胞 (SHED) 由来無血清培養上清(CM)の強力な炎症制御効果を報告してきた。SHED-CM は損傷部位に集積する炎症性 M1 型マクロファージを抗炎症性 M2 型マクロファージに変換することで組織再生を促す。本研究では、SHED、および SHED-CM を劇症肝炎モデルラットへ投与し、その治療効果、および治癒メカニズムを検討した。さらに、SHED-CM のプロテオーム解析を行い、CM 中に含まれる液性因子の機能分類を行った。

【材料と方法】

本学倫理委員会承認のもと本学附属病院で患者の同意を得て提供されたヒト乳歯歯髄より SHED を分離・培養した。比較対照群として、Lonza 社から購入したヒト骨髄間葉系幹細胞 (BMSC) およびヒト線維芽細胞 (Fibro) を使用した。各細胞を培養し、80%コンフルエント状態で無血清培地 (DMEM) に交換した。48 時間培養後に上清を回収した。さらに上清を遠心分離し細胞残骸などを除去したものを CM として使用した。

9 週齢雌 SD ラットを麻酔し、肝毒素である D-galactosamine (GalN) をラットに腹腔内投与し、劇症肝炎モデルを制作した。24 時間後に末梢血中の肝酵素 AST/ALT 値の測定により劇症肝炎の発症を確認した。その後、SHED (1.0×10^6 個)、Fibro (1.0×10^6 個)、SHED-CM、BMSC-CM、Fibro-CM、コントロールとして PBS、または DMEM を 1cc 静脈内に単回投与した。生存率、血液検査により経時的な肝障害レベルを検証した。GalN 投与から 36 時間後に肝臓組織を採取し、HE 染色により病理組織学的に肝障害の程度を解析した。免疫組織学的解析にて、SHED の肝臓への生着率の経時的変化、肝臓細胞死、および M1/M2 マーカーの発現を解析した。さらに、Real time RT-PCR 法を用い炎症性/抗炎症性因子の遺伝子発現を解析した。以上から各 CM の治療効果を検討した。

ヒト 274 種類サイトカインアレイ解析を行い、SHED-CM に含まれる液性因子群の同定および機能分類を行った。

【結果】

劇症肝炎モデルラットに SHED、または、SHED-CM を静脈内投与すると生存率が著しく向上した。Fibro、Fibro-CM や BMSC-CM を投与しても生存率の向上は得られ

なかった。SHED、および SHED-CM 投与群においては、肝臓組織の破壊が強く抑制され、AST および ALT の上昇も抑制されていた。免疫組織学的解析にて、SHED は、移植後 3 日で、ほぼ肝臓組織から消失していた。SHED-CM 投与群は有意に TUNEL 陽性アポトーシス細胞が減少していた (図 1a-f)。また、Real time RT-PCR 法による炎症性/抗炎症性因子の遺伝子発現解析では、炎症性サイトカイン (Il-1 β 、Tnf- α 、Il-6) や iNos の発現は投与した 3 種 CM 投与群全てで減少した。一方、抗炎症性サイトカイン (Il-10、Tgf- β 1)、M2 型マーカー (Cd206、Arginase1) および血管新生因子 Vegf の発現は SHED-CM 投与後 12 時間で有意に増加した (図 2)。免疫組織学的解析では、SHED-CM 群において有意に CD206/IL-10 陽性 M2 型肝臓マクロファージ数が増加し、iNOS 陽性の炎症性 M1 型マクロファージ数が減少した (図 3a-e)。

274 種類サイトカインアレイの解析によって、SHED-CM に多く含まれる 48 種類の液性因子を見出した (図 4a)。さらに機能分類の結果、SHED-CM は抗アポトーシス/肝臓細胞保護、血管新生、肝幹細胞増殖促進効果、抗炎症、マクロファージ性状制御といった肝臓再生促進機能を有する 10 因子を含むことが明らかとなった (図 4b)。

【考察】

SHED、および SHED-CM を劇症肝炎モデルラットへ静脈内投与すると病態改善効果が得られた。SHED、および SHED-CM の治療効果は同等であったことから、病態改善効果は SHED のパラクライン効果によるものであったと考えられた。

また、サイトカインアレイ解析から SHED-CM には、抗アポトーシス/肝臓細胞保護、血管新生、肝幹細胞増殖促進、抗炎症、マクロファージ性状制御といった治療効果を発揮する 10 種類の肝臓再生促進因子が含まれていることが明らかとなった。これらの因子が複合的に作用し、劇症肝炎の病態が改善したと考えられた。

近年、炎症期における肝臓マクロファージの炎症性 M1 型と抗炎症性 M2 型のバランス制御が肝機能の改善に重要な役割を果たすと考えられている。M2 型を誘導することが治癒・再生促進への鍵となる。しかし、劇症性炎症疾患では M1 型優位で M2 型はわずかにしか存在せず、より効率的に M2 型へ誘導する方策が世界中で模索されている。本研究において、SHED-CM によって誘導された M2 型肝臓マクロファージが劇症肝炎モデルラットの病態改善を促すことが明らかとなった。本研究結果から、SHED-CM による M2 型マクロファージの効率的誘導を基盤とする、これまでにない劇症肝炎治療法の有用性が示唆された。

【結語】

SHED、および SHED-CM を劇症肝炎モデルラットへ静脈内投与すると病態が著しく改善した。本研究により幹細胞由来の液性因子の投与による、細胞移植を伴わない新しい劇症肝炎治療法の可能性が示唆された。