

主論文の要旨

**Multifaceted Therapeutic Benefits of Factors Derived
From Dental Pulp Stem Cells for Mouse Liver Fibrosis**

マウス肝線維症に対する
歯髄幹細胞由来因子の多面的治療効果

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
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)

平田 真里奈

【緒言】

肝硬変は、HBV・HCV等の肝炎ウイルス、アルコールなどの様々な要因による慢性肝炎の終末像である。抗ウイルス療法の進歩によりウイルス性肝炎はある程度コントロールできるようになってきたが、非代償性肝硬変まで進行した場合には肝移植以外に根本的な治療法がないのが現状である。本邦においては脳死ドナー不足、また生体ドナーにかかるリスクを考慮すると移植によらない新たな治療法の開発が望まれる。

肝臓における線維化(LF)においては、肝内のマクロファージは慢性炎症反応を修飾し、また活性化された肝星細胞(HSC)はコラーゲンを分泌、線維素が蓄積すると考えられている。

近年、LFに対する新たな治療法として幹細胞移植が注目されている。これまでに、骨髄、臍帯、脂肪由来間葉系幹細胞の移植によるLFの治療効果が報告されており、それらの治療メカニズムはパラクライン効果によるとされる。

われわれは新たな幹細胞ソースとしてヒト脱落乳歯歯髄幹細胞(SHED)に着目した。SHEDは優れた細胞増殖能、多分化能、液性再生因子の産生能を示す幹細胞である。SHEDは神経堤由来の細胞と考えられ、間葉系幹細胞と神経幹細胞の両方のマーカーを発現する。SHEDの移植により種々の疾患動物モデルにおいてパラクライン効果による機能回復が報告されており、これらのパラクライン因子はSHEDの無血清培養上清(SHED-CM)に多く含まれることがわかっている。また近年我々は脊椎損傷、急性肝炎、肺線維症、多発性硬化症、関節リウマチモデルにおけるSHED-CMの効果を検討し、SHED-CMによる抗炎症性マクロファージの誘導が治療効果の主体をなすことを報告してきた。しかしながら、LFに対するSHED-CMの治療効果の検討は過去に報告がない。

今回、四塩化炭素(CCl₄)投与LFモデルマウスに対してSHED-CMを投与し、その治療効果を検証した。

【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よりSHEDを分離、培養した。対照群として、細胞バンクから購入したヒト皮膚線維芽細胞(Fibro)を使用した。各細胞を10cmディッシュで培養し、80%の細胞密度になったところで無血清培地(DMEM)に交換、さらに48時間培養した後に上清を回収した。上清を遠心し細胞残骸などを除去したものをCMとして使用した。

6週齢雌性C57BL/6Jマウスに対して、1.0mg/kgのCCl₄溶液を1週間に2回、4週間腹腔内投与した(合計8回)。8回目にCCl₄溶液を投与した24時間後、SHED、SHED-CM、Fibro-CM、PBS、DMEMをそれぞれ500μl頸静脈より投与した。頸静脈投与24時間後、屠殺し試料を採取した。血液検査、H-E染色、シリウスレッド染色、免疫組織化学染色およびReal time RT-PCRを用い、組織学的解析、遺伝子発現解析を行った(表1)。さらに、SHED-CMが含有するタンパク中、LF改善に有用であると報告されているHGFを免疫沈降法により特異的に除去したもの(dHGF-CM)を作製し、同様に解析した。

SHED-CM、dHGF-CM が含有する HGF の濃度を ELISA 法で測定した。

In vitro では、マウス肝臓より肝細胞を採取後、CCl₄で刺激し、肝細胞のアポトーシスを誘発した。SHED-CM もしくは DMEM 処理を行った後、アポトーシス細胞を TUNEL 染色を用いて検証した。また、マウス大腿骨髄より採取した骨髄細胞を M-CSF を用いてマクロファージへ分化誘導し、SHED-CM もしくは DMEM を作用させたときの回復期マクロファージへの誘導能を Real time RT-PCR で解析した。

【結果】

LF モデルマウスでは、未治療群(Pre)と PBS 投与群で著名な線維の残存が認められた。一方 SHED 投与群では線維化の改善を認めた(図 1B、C)。SHED-CM 投与群においても、SHED 投与群と同等の抗線維化効果を認めた(図 2A、C、D)。また、SHED-CM 投与群においては他群と比較し炎症性マーカー(*TNF- α* ,*IL-1 β* ,*iNOS*)の発現が有意に減少しており、抗炎症効果が認められた(図 2B、3A-C)。その一方、M2 マクロファージマーカー(*CD206*, *Arginase 1*)に関しては SHED-CM 投与群でも他群と比較し有意な差を認めなかった(図 3D、E)。

LF 改善に寄与するマクロファージが産生する線維素溶解酵素である MMP13 に関し検討を行った。LF を誘導したマウスに SHED-CM もしくは DMEM を投与し *MMP13* の遺伝子発現解析を行ったところ、SHED-CM 投与 6 時間後において DMEM 投与群と比較し有意な差を持って *MMP13* が高発現していることが認められた(図 4A)。免疫蛍光染色を用いた検討の結果 SHED-CM 投与群において、マクロファージマーカーである CD11b と MMP13 の共陽性細胞の割合が有意に増加していることが明らかとなった(図 4B、C)。また、*in vitro* においてマウス大腿骨髄より骨髄細胞を採取し、M-CSF を用いてマクロファージへ分化誘導し SHED-CM、DMEM を作用させたところ、SHED-CM 群では、有意に *MMP13* の発現が増加した(図 4D)。

肝臓においてコラーゲン産生細胞である HSC のアポトーシスを、免疫蛍光染色法を用いて検討した。DMEM 投与群と比較し SHED-CM 投与群では TUNEL 陽性細胞の数が減少していた。重要なことに SHED-CM 投与群では、Collagen I +HSC が TUNEL 陽性を示した。一方、DMEM 投与群では肝細胞が TUNEL 陽性であった(図 5A、B)。

マウス肝臓より肝細胞を採取し CCl₄/SHED-CM もしくは CCl₄/DMEM で 24 時間培養を行った後、TUNEL 染色を用いてアポトーシスを起こした肝細胞の割合を検証した。SHED-CM 培養群では、DMEM 培養群に比べ TUNEL 陽性細胞数が有意に減少していた(図 6A-C)。

SHED-CM が LF 治療に有用な多数の因子を含んでいることを見出した。その中でも病態改善に有用であると多数報告されている HGF に着目した。免疫沈降法を用いて HGF のみを特異的に除去した dHGF-CM を作製し(図 7A)、同様に解析した。組織学的解析では、dHGF-CM 投与群において SHED-CM 投与群のような線維化の改善は認められなかった(図 7B)。また、遺伝子発現解析では、炎症性マーカー(*TNF- α* ,*IL-1 β*)、HSC 活性化マーカー(*α -SMA*)の発現抑制は認められなかった(図 7C)。

【考察】

SHED-CM は、LF モデルマウスにおいて、肝臓の炎症反応を抑制し、線維素溶解酵素を高発現する回復期マクロファージの増加を促した。また、HSC のアポトーシスを誘導し、肝細胞を保護することで病態の悪化を防いだ(図 7D)。

我々はサイトカインアレイによる解析で SHED-CM 中に 79 のタンパクを同定している。その中でも 11 の因子に関しては、LF に対する病態改善効果があると報告されている(表 1)。SHED-CM 中に含有される因子の各々の濃度は低い、それらが複合的に働くことで劇的な治療効果がもたらされたと考えられる。

我々は SHED-CM が抗炎症性 M2 マクロファージを誘導することを報告してきた。しかし、今回の LF における検討では M2 マクロファージの誘導を検出できず、MMP13 を高発現するマクロファージの誘導を認めた。これらのことを踏まえると、SHED-CM には疾患や病態により異なる性質のマクロファージを誘導する能力があると考えられる。

また、SHED-CM から HGF を特異的に除去することにより治療効果を得ることができなくなったことから SHED-CM が含有する HGF が LF の病態改善に効果があることが示唆された。

【結論】

SHED-CM は抗炎症効果、肝細胞の保護効果、HSC のアポトーシス誘導による抗線維化効果、MMP13 を高発現するマクロファージの誘導による線維素溶解効果によってマウス LF の病態改善を促した。SHED-CM が LF ひいては肝硬変治療に有用であることが示唆された。