

主論文の要旨

**Secreted Ectodomain of SIGLEC-9 and MCP-1  
Synergistically Improve Acute Liver Failure in  
Rats by Altering Macrophage Polarity**

〔 分泌型 SIGLEC-9 細胞外ドメインと MCP-1 は協調的に  
マクロファージ極性を変換しラット急性肝不全を改善する 〕

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：後藤 秀実 教授)

伊藤 隆徳

## 【緒言】

急性肝不全（ALF）は、肝炎ウイルス、薬物、自己免疫肝炎などの原因から、短期間で肝臓に広範な壊死が起こり、全身性炎症に伴う他臓器不全などにより死に至る極めて予後不良な疾患である。ALFの病態が進行した場合は肝移植以外に治療法がないのが現状であるが、肝移植にはドナー不足の問題もあり代替治療法の開発が急務である。

近年、幹細胞や iPS 細胞を用いた再生医学による ALF の治療が期待されているが、倫理的な問題や移植細胞の安定性、拒絶の危険性など、臨床応用には諸問題が存在する。

我々は、2015年、ALFラットモデルに対してヒト間葉系幹細胞のひとつである乳歯歯髄幹細胞（SHED）の培養上清（SHED-CM）を投与することにより肝内マクロファージ(Mφ)をM1(炎症惹起)型からM2(抗炎症・再生促進)型環境へ変化させ、予後が改善することを報告した。しかし、SHED-CM内に含まれる多数の液性因子群のうち、どの因子が直接治療効果に寄与しているかは不明であった。そこでわれわれはSHED-CMのプロテオーム解析を行い、抗炎症・再生効果の主成分となる単球走化性促進因子（MCP-1）と可溶性シアル酸認識蛋白（sSiglec-9）を見出した。しかしながら、ALFモデルに対するMCP-1 / sSiglec-9の治療効果の検証はなされていなかった。

本研究では、MCP-1 / sSiglec-9をD-galactosamine（D-Gal）誘発ラットALFモデルへ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の患者の同意を得て提供された脱落ヒト乳歯よりSHEDを分離、培養した。80%コンフルエント状態で無血清培地交換後48時間培養し、細胞残骸を除去した上清をSHED-CMとして使用した。またSHED-CMからMCP-1 / sSiglec-9を免疫沈降法にて特異的に除去したdSHED-CMを作成した。MCP-1およびsSiglec-9はBD社から購入した。

8週齢雌性S-Dラットに対してD-Gal 1.2g/kgを腹腔内投与しALFモデルを作成し、発症後24時間でSHED-CM、dSHED-CM、MCP-1 / sSiglec-9を単回静脈内投与した。その後12時間の時点で、組織学的染色、Real time RT-PCRにて抗炎症および肝再生効果、ならびに生存率を評価した。更に選択的にM2型Mφを除去するmannosylated-Clodrosome（m-Clodrosome）を併用してMCP-1/sSiglec-9の治療効果を検討した。

また*in vitro*においてラットの初代肝細胞をコラゲナーゼ灌流Percoll比重遠心法で採取したのちにD-Gal+LPSを用いて肝細胞アポトーシスモデルを作成した。更にラットの骨髓単球を両大腿骨から採取しM-CSF添加培養にてMφへ分化させた後に、無血清DMEM群、古典的M2誘導因子であるIL-4群、MCP-1 / sSiglec-9群に分け、細胞形態とReal time RT-PCRによる遺伝子発現解析を行った。その培養上清による肝細胞保護・再生効果をTUNEL染色、Ki-67染色を用いて評価した。

## 【結果】

ラットALFモデルにSHED-CM、dSHED-CM、DMEM（対象群）を投与したところ、

SHED-CM 群は対象群と比較し有意に予後を延長し、肝内炎症細胞浸潤、組織破壊の抑制を認めた。しかし MCP-1 / sSiglec-9 を除去した dSHED-CM 投与群では対象群と比較して差は認められなかった (図 1b, 1c)。肝内の遺伝子発現解析において SHED-CM 群は TNF- $\alpha$ 、IL-1b、IL-6、iNOS といった M1 マーカー発現の低下、TGF- $\beta$ 、IL-10、CD206、Arginase-1 といった M2 マーカー発現の上昇を認めた。dSHED-CM 群では M1 マーカーは改善せず、M2 マーカーはコントロール群と比較し変化を認めなかった (図 1d)。つまり SHED-CM 内の MCP-1、sSiglec-9 は M2 誘導と肝障害の改善に必要不可欠であった。

*in vitro* においてラット骨髄単球由来 M $\phi$  を MCP-1 / sSiglec-9 で刺激したところ M2 様細胞形態変化を起こし、遺伝子発現解析でも M2 関連遺伝子発現の上昇が認められた。更に HGF、VEGF、IGF といった肝再生関連遺伝子発現も上昇していた (図 2a, b)。この効果は MCP-1 / sSiglec-9 の作用受容体である CCR2 の拮抗薬である蛋白 RS504393 を付加した群では打ち消された。

次に *in vitro* での D-gal+LPS による障害肝細胞において上記各種刺激後の M $\phi$  上清を添加し、細胞保護・再生効果を検討したところ、アポトーシス抑制効果を認めたのは MCP-1 / sSiglec-9 誘導 M $\phi$  上清を用いた群のみであった。誘導 M $\phi$  上清ではなく、MCP-1 / sSiglec-9 蛋白のみを投与した群ではアポトーシスは抑制されなかった (Figure 3a, b)。興味深い事に、IL-4 誘導 M $\phi$  上清群ではアポトーシスは抑制されなかった。更に MCP-1 / sSiglec-9 誘導 M $\phi$  上清群では Ki-67 陽性増殖細胞の増加が認められた (Figure 3c, d)。

最後に ALF ラットモデルに対する MCP-1 / sSiglec-9 の効果を *in vivo* において検証した。MCP-1 / sSiglec-9 治療群では、PBS 群 (対象群) と比べて有意な予後の延長と肝組織の改善、AST・ALT の低下、TUNEL 陽性アポトーシス細胞の減少と Ki-67 陽性増殖細胞の有意な増加を認めた。一方、MCP-1、あるいは sSiglec-9 単独投与群ではこれらの効果は認められなかった (Figure 4a-f)。肝内遺伝子発現解析では、M1 マーカー発現の有意な低下、ならびに M2 マーカー発現の有意な上昇、また HGF の上昇を認めた (Figure 5a)。肝組織の蛍光免疫染色では治療群では、iNOS 陽性 M1 型 M $\phi$  が減少し Arginase-1 陽性 M2 型 M $\phi$  の増加が認められた (Figure 6a-c)。また MCP-1 / sSiglec-9 と同時に m-Clodrosome を投与すると、M2 誘導は抑制され、組織破壊の抑制は認められず、コントロール群と比較し AST・ALT も有意に高値であった (Figure 7a, b)。つまり m-Clodrosome を用いた M2 M $\phi$  除去は MCP-1 / sSiglec-9 の効果をキャンセルさせた。これにより MCP-1 / sSiglec-9 治療は M2 を誘導することにより効果を発揮することが裏付けられた。

## 【考察】

歯髄幹細胞から見出した M2 M $\phi$  誘導蛋白である MCP-1 / sSiglec-9 はラット ALF モデルの炎症を改善し肝細胞再生を促すことで予後を改善することが明らかになった。

これまでに肝内 M $\phi$  の M1 / M2 バランスは肝障害惹起や修復、再生に密接に関係することが知られている。近年、様々な幹細胞を用いた再生医療における炎症制御は M2 誘導メカニズムによるものであるという報告が散見される。しかしながら、直接効果を示

す液性因子は今まで明らかにされていなかった。我々は歯髄幹細胞由来のパラクライン因子の中からALFモデルにおける炎症抑制、再生促進に関わる有用な因子として初めてM2誘導蛋白であるMCP-1とsSiglec-9を同定した。

本研究では、MCP-1 / sSiglec-9誘導M2Mφは*in vitro*においてIL-4誘導M2Mφでは認められなかった肝細胞保護・再生効果を示した。近年、Mφには多様性が存在しM2型の中でも誘導因子により性質が異なることが報告されている。MCP-1 / sSiglec-9誘導MφとIL-4誘導MφはともにM2マーカーを発現していたものの再生因子の遺伝子発現には差を認めており、それぞれのMφ性質に違いがある可能性が示唆された。またMCP-1 / sSiglec-9の肝細胞への直接投与は肝細胞保護・再生効果を示さなかったことよりMCP-1 / sSiglec-9は誘導Mφが産生する再生関連因子により効果を示すものと考えた。

MCP-1は、単球含む炎症細胞を組織ヘリクルートするケモカインである。我々は過去にMCP-1の受容体であるCCR2の糖鎖部にsSiglec-9が結合することによりMCP-1と協調的にM2誘導効果を発現することを報告した。Siglecは細胞質の免疫受容体を介して、免疫細胞の様々なシグナルを調節するシアル酸結合 I 型膜貫通Ig様レクチンであるが、分泌型細胞外ドメインであるsSiglec-9の生体内での役割はほとんど知られていない。本研究結果よりsSiglec-9とMCP-1単独投与では*in vivo*における効果は認められず、抗炎症・再生効果を発揮するためには2因子が共に必須であることが判明した。これらの因子が他のALFモデルでも効果を示すかどうか、また細胞内でどのような機序で働くかを検討することが今後の臨床応用のために必須の課題と思われる。

## 【結論】

SHED-CMから見出した生体の自己組織再生能力を引き出す新しいM2型Mφ誘導因子であるMCP-1 / sSiglec-9は、急性肝不全の新たな治療戦略となる可能性が示唆された。