

平成29年2月

梶見吉朗 学位論文審査要旨

主査 久留一郎

副主査 磯本 一

同 汐田剛史

主論文

Human mesenchymal stem cell-engineered hepatic cell sheets accelerate liver regeneration in mice

(ヒト間葉系幹細胞由来肝細胞化細胞シートはマウスの肝再生を促進する)

(著者：板場則子、梶見吉朗、沖中香緒理、An Afida Ashla、河野洋平、尾崎充彦、森本稔、杉山直幸、大橋一夫、岡野光夫、汐田剛史)

平成27年 SCIENTIFIC REPORTS DOI:10.1038/srep16169

参考論文

1. Hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by tetracycline-regulated hepatocyte nuclear factor 3β

(テトラサイクリン誘導性HNF3 β 発現によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の肝細胞分化)

(著者：石井恭子、吉田陽子、明地雄司、坂部友彦、西尾れん、池田礼美奈、寺林慶、梶見吉朗、権田一絵、岡本秀治、田窪千子、但馬史人、土谷博之、星川淑子、栗政明弘、梅澤明弘、汐田剛史)

平成20年 Hepatology 48巻 597頁～606頁

2. Involvement of microRNAs in regulation of osteoblastic differentiation in mouse induced pluripotent stem cells

(マウス誘導性多能性幹細胞の骨芽細胞分化の制御におけるmicroRNAの関与)

(著者：岡本秀治、梶見吉朗、星川淑子、田窪千子、領家和男、汐田剛史)

平成24年 PLOS ONE DOI:10.1371/journal.pone.0043800

3. Identification of the small molecule compound which induces hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells

(ヒト間葉系幹細胞の肝細胞分化誘導性低分子化合物の同定)

(著者：板場則子、坂部友彦、神吉けい太、安積遵哉、清水寛基、河野洋平、枡見吉朗、阿部健一郎、殿井貴之、岡博之、櫻井敏彦、斎本博之、森本稔、馬淵洋、松崎有未、汐田剛史)

平成27年 Regenerative Therapy 2巻 32頁～41頁

学 位 論 文 要 旨

Human mesenchymal stem cell-engineered hepatic cell sheets accelerate liver regeneration in mice

(ヒト間葉系幹細胞由来肝細胞化細胞シートはマウスの肝再生を促進する)

ヒト間葉系幹細胞は再生医療の有用な細胞ソースである。ヒト間葉系幹細胞のWnt/ β -cateninシグナルの抑制により肝細胞への分化誘導が可能であり、本研究ではヒト間葉系幹細胞を肝細胞へ分化誘導する低分子化合物のスクリーニングを行い、ヒト間葉系幹細胞を肝細胞へ効率的に分化誘導するヘキサクロロフェンを同定した。さらに、温度応答性培養皿上で分化誘導を行い、肝細胞機能を獲得した細胞シートを作製し、急性肝障害モデルマウスに移植した結果、肝障害を抑制し、生存率を有意に改善した。作用機序として、細胞シート由来補体C3の発現とその下流シグナルC5a、NF- κ B、IL-6/STAT3経路の活性化、酸化蛋白チオレドキシンの産生亢進による酸化ストレスの抑制、EGFRシグナルの活性化が推定された。ヒト間葉系幹細胞由来肝細胞化細胞シートは肝再生を促進し、肝障害を抑制した。

方 法

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株UE7T-13細胞にTCFモチーフを有するレポーター遺伝子を安定導入した細胞株を作製し、10種類の低分子化合物のWnt/ β -cateninシグナルの抑制効果を評価した。最も抑制したヘキサクロロフェンについて肝細胞分化誘導を検討し、アルブミンなどの肝細胞分化マーカー、肝特異的蛋白、尿素合成能、グリコーゲン合成能を評価した。温度応答性培養皿上でヘキサクロロフェン存在下にUE7T-13細胞を培養し、細胞シートを作製し、四塩化炭素誘発性急性肝障害マウスの肝表面へ移植し、血清トランスアミナーゼ、総ビリルビン、生存率を解析し、細胞シートの治療及び予防効果を検討した。移植1週後に肝臓を摘出、組織学的評価、プロテオミクス解析、ウェスタンブロット、RT-PCRを実施し検討した。

結 果

ヘキサクロロフェンは、TCFレポーター活性を時間及び濃度依存性に抑制した。ヘキサクロロフェンはUE7T-13細胞の肝細胞分化を誘導した。温度応答性培養皿上でUE7T-13細胞を

ヘキサクロロフェン存在下に培養し、作製した細胞シートの移植により、四塩化炭素誘発性急性肝障害を細胞シートの枚数依存性に有意に抑制し、急性肝障害マウスの生存率を有意に改善させた。この際、急性肝障害後のマウス肝細胞において肝再生が有意に活性化していた。作用機序として、ヘキサクロロフェンに誘導される補体C3の発現増強とその下流のC5a、NF- κ B、IL-6、STAT3シグナル活性化を認めた。プロテオミクス解析により、抗酸化蛋白チオレドキシンの増加とチオレドキシソキシソ酸化還元経路の活性化を認めた。また、EGFRシグナルの活性化を認め、これらが細胞シートの作用機序として重要と推定された。

考 察

ヘキサクロロフェンは、ヒト間葉系幹細胞のWnt/ β -cateninシグナルを強力に抑制し、ヒト間葉系幹細胞の肝細胞分化を誘導した。ヒト間葉系幹細胞をヘキサクロロフェン存在下に培養し、作製した細胞シートの移植は、急性肝障害を細胞シート枚数依存性に抑制することを見出した。急性肝障害抑制は肝再生促進によって起こり、肝再生促進機序として、補体C3の発現増加によるC5a、NF- κ B、IL-6/STAT3経路の活性化が重要と推定された。補体C3による肝再生促進効果は、既報（平成15年 The Journal of Experimental Medicine 198巻 913項～923項）と一致した。また、ヘキサクロロフェンによる抗酸化蛋白チオレドキシソキシソ酸化還元経路の活性化とEGFRシグナルの活性化が重要な作用機序と推定された。

結 論

ヘキサクロロフェンは、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の肝細胞分化を誘導することを見出した。ヘキサクロロフェンと温度応答性培養皿を併用し、作製した細胞シートは、強力にマウスの急性肝障害を抑制し、生存率を有意に改善した。この効果は、肝再生促進効果によって起こり、誘導された補体C3によるC5a、NF- κ B、IL-6/STAT3シグナル経路の活性化、チオレドキシソキシソ酸化還元経路の活性化による酸化ストレス抑制、EGFRシグナルの活性化が肝再生促進機序として重要であることが示唆された。