

令和4年1月

福嶋健志 学位論文審査要旨

主査 磯本 一
副主査 汐田 剛史
同 難波 範行

主論文

Secreted matrix metalloproteinase-14 is a predictor for antifibrotic effect of IC-2-engineered mesenchymal stem cell sheets on liver fibrosis in mice

(マトリックスメタプロテアーゼ-14分泌は、IC-2により製造された間葉系幹細胞シートのマウスでの肝線維化抑制効果の予測因子である)

(著者：福嶋健志、板場則子、河野洋平、岡崎静麻、榎田信平、倉信奈緒美、村上潤、榎田誠、永島英樹、神崎晋、難波範行、汐田剛史)

令和3年 Regenerative Therapy 18巻 292頁～301頁

主論文作成場所 鳥取大学医学部周産期・小児医学分野

参考論文

1. Increased IRS2 mRNA expression in SGA neonates: PCR analysis of insulin/IGF signaling in cord blood

(SGA新生児におけるIRS2 mRNA発現の増加：臍帯血におけるインスリン/IGFシグナル伝達のPCR分析)

(著者：藤本正伸、鞆嶋(園山)有紀、福嶋健志、今本彩、宮原史子、宮原直樹、西村玲、山田祐子、三浦真澄、足立香織、難波栄二、花木啓一、神崎晋)

平成29年 Journal of the Endocrine Society 1巻 1408頁～1416頁

学位論文要旨

Secreted matrix metalloproteinase-14 is a predictor for antifibrotic effect of IC-2-engineered mesenchymal stem cell sheets on liver fibrosis in mice

(マトリックスメタプロテアーゼ-14分泌は、IC-2により製造された間葉系幹細胞シートのマウスでの肝線維化抑制効果の予測因子である)

肝線維症は細胞外マトリックスが過剰に蓄積することによって引き起こされ、進行すると肝硬変へと移行する。非代償性肝硬変は肝移植以外に有効な治療法がないため、新たな治療法の開発が課題となっている。筆者らの教室では、骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSCs) に Wnt/ β カテニンシグナル抑制性低分子化合物 IC-2 にて製造した細胞シート (IC-2 シート) を肝線維化モデルマウスに移植し、肝線維化を抑制できることを報告してきた。今回、この効果を多くのドナーの複数ロット由来の BM-MSCs で評価し、肝線維化抑制効果の予測因子の検討を行い、加えて、肝硬変の有病者の多い高齢者由来の BM-MSCs を使用して、IC-2 への反応性を検討した。

方法

多数のドナーの複数ロットの BM-MSCs から作製した IC-2 シートの肝線維化抑制効果を検討するために、15 人のドナーから継代数の異なる 29 ロットの BM-MSCs を得た。BM-MSCs の各ロットから作製した IC-2 シートを、四塩化炭素を 10 週間、週 2 回投与した肝線維化マウスの肝臓表面に 3 層で 1 か所に移植した。IC-2 シートの移植群 (IC-2 群) と偽手術群 (Sham 群) で比較検討を行った。線維化の評価は、Azan 染色、Sirius Red 染色による組織学的評価と、コラーゲンの主成分であるヒドロキシプロリンの定量、肝星細胞の活性化の指標である α -平滑筋アクチン (α -SMA) の発現量、血清学的な肝障害マーカーの比較をした。

また、肝線維化抑制効果の予測因子の検討は、マウス線維肝に移植する IC-2 シートと同一の IC-2 シートの製造時の培養上清と細胞ライセートの両分画で、それぞれのマトリックスメタプロテナーゼ (MMP) の量と活性、抗酸化蛋白、再生関連因子などの諸因子を測定した。IC-2 シート移植 1 週間後の肝ヒドロキシプロリンを定量し、諸因子との関係を単変量解析にて検討した。

さらに、人工関節置換術を施行された高齢者の骨髄液から採取した BM-MSCs を使用して、IC-2 の濃度を変動させ、細胞生存率と Wnt/ β -カテニンシグナル強度への影響を検討

した。また、高齢者由来BM-MSCsに対してIC-2投与によるMMP-14産生量を測定し、若年者由来のBM-MSCsでのMMP-14産生量と比較した。

結 果

IC-2群で組織学的に肝線維化領域の減少と偽小葉様構造の改善を認めた。また、IC-2群で α -SMAの発現量や肝ヒドロキシプロリン量は有意に減少した。血清ALT値、血清総ビリルビン値はIC-2群で有意に減少した。以上より、IC-2シートは肝障害及び肝線維化を有意に減少させた。

肝線維化抑制効果の予測因子の検討では、細胞培養上清中のMMP-14が肝ヒドロキシプロリン量と逆相関していた事実より、培養上清中のMMP-14量が、IC-2シート移植による肝線維化治療効果の予測因子になることを示した。また、ROC曲線解析からMMP-14が肝ヒドロキシプロリン量を30%抑制するためのカットオフ値は0.918 fg/cellであった。また、細胞ライセート中のMMP-13活性とチオレドキシニン量は肝ヒドロキシプロリン量と負の相関を示した。

高齢者由来BM-MSCsの細胞生存率は0~50 μ MのIC-2濃度で濃度依存性に低下し、Wnt/ β カテニンシグナル強度は30 μ M IC-2で30~40%程度抑制された。以上より高齢者由来BM-MSCsへのIC-2の添加濃度は30 μ Mが至適と判断したが、以前の若年者のBM-MSCの濃度と同様であった。高齢者由来BM-MSCsによる培養上清中MMP-14産生量は、IC-2添加により著しく増加し、若年者由来のBM-MSCよりも高値であった。以上より、高齢者由来BM-MSCsは、IC-2への反応性が高く、IC-2シートの細胞源として使用可能であると考えられた。

考 察

IC-2シートは、MMPs、特にMMP-14の産生と分泌を増加させ、肝線維化抑制効果を発揮した。これはIC-2のWnt/ β -カテニンシグナル抑制によるものでなく、IC-2の独自のユニークな作用と考えられた。IC-2によるMMP-14の発現誘導が若年者より高齢者で高く、これは細胞外マトリックスの再構成によるBM-MSCsの加齢による特性のためである事が示唆されたが、IC-2によるMMP-14の産生能亢進の機序は今後明らかにしていきたい。

結 論

IC-2シートより分泌されるMMP-14量は肝線維化抑制効果の指標として有用であることが示唆された。また、高齢患者においても非代償性肝硬変の治療に有用であることが示唆された。