

犬の肝疾患に対する脂肪由来間葉系幹細胞を用いた 幹細胞療法に関する研究

手嶋 隆洋

日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医学科 獣医内科学研究室・講師

日獣生大研報 67, 9-10, 2018.

背景

近年、再生医療に関連した研究が世界中で盛んに行われおり、脂肪由来間葉系幹細胞 (Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: AT-MSCs) は iPS 細胞や ES 細胞と同様に再生医療への導入を目指して研究が進んでいるひとつのソースである 1)。獣医学分野においても免疫抑制作用や抗炎症作用を有する AT-MSCs を利用した幹細胞療法への関心は高く 2)、国内においてもすでに多数の施設が AT-MSCs による幹細胞療法を実施している。しかし、イヌやネコの AT-MSCs に関する研究報告はそれほど多くないため、確固たるエビデンスのないままに臨床応用されている事例も少なくない。

そこで本研究では、イヌ AT-MSCs を臨床応用へと展開するための基礎研究のひとつとして、① *in vivo* における犬の急性肝炎モデルに対する AT-MSCs の効果、② *in vitro* における犬肝細胞癌に対する AT-MSCs の効果、を解析した。

in vivo における犬の急性肝炎モデルに対する AT-MSCs の効果³⁾

本検討では、CCl₄ によって誘発した急性肝障害モデル犬に対して AT-MSCs を投与し、その効果を 15 日間に亘って継時的に解析した。AT-MSCs は別個体の脂肪組織より分離培養したものを使用し、橈側皮静脈もしくは脾静脈から投与することで、末梢静脈もしくは門脈を経由した投与経路での効果もあわせて検討した。

血液生化学検査における肝障害マーカー (ALT, AST, ALP) は AT-MSCs の投与によって顕著な減少が認められ、投与経路の違いによる明らかな差はなかった。また、血中総白血球数は門脈経路で投与した場合のみ明らかな減少が認められた。AT-MSCs 投与 4 日後に腹腔鏡下にて採取した肝組織中に生着している AT-MSCs の細胞数を比較したところ、門脈経路で投与した群は末梢静脈で投与した群

より有意な増加が認められた。また、15 日目に採取した肝組織中でも同様の結果が認められたが、肺組織中に生着している AT-MSCs の細胞数は末梢静脈経路で投与した群で顕著に高かった。肝組織の炎症細胞の浸潤度、壊死の程度、線維化に関して病理組織学的に検討したところ、これらは AT-MSCs の投与によって有意な改善が認められ、その効果は門脈経路で投与した群でより顕著であった。肝組織から抽出した mRNA によって炎症性および抗炎症性サイトカインや成長因子を比較したところ、炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8, IFN γ) は門脈経路で AT-MSCs を投与した場合で顕著な減少がみられ、抗炎症性サイトカイン (IL-4, IL-10) は門脈経路で投与した場合に顕著な増加が認められた。また、幹細胞増殖因子 (HGF) や血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の発現は門脈経路で投与した群に上昇が認められた。

本検討結果より、犬の急性肝障害モデルに対する AT-MSCs 投与には治癒促進効果が認められ、AT-MSCs は同種異系であっても利用可能であることが確認された。また、傷害部位へ直接的に投与することで、さらに効果が期待できることが明らかとなった。しかし、目的臓器である肝臓よりも肺での生着数が明らかに多かった末梢静脈からの投与であっても治癒促進効果が認められた。そのため、傷害部位に生着した AT-MSCs のみが効果を発現するのではなく、投与した AT-MSCs から分泌される様々な液性因子が組織修復や抗炎症効果に大きく寄与している可能性が示唆された。

in vitro における犬肝細胞癌に対する AT-MSCs の効果⁴⁾

近年の AT-MSCs から得られる治療効果の報告 5-7) や、前述の急性肝障害モデルを対象とした検討結果をもとに、本検討では AT-MSCs から分泌される液性因子が犬肝細胞癌細胞に与える影響を解析した。はじめに AT-MSCs の培養上清を添加した条件下で肝細胞癌細胞の増殖能を MTT アッセイによって比較した。その結果、AT-MSCs

培養上清を添加することで有意な増殖能の上昇が認められた。また、Transwell を用いた細胞浸潤アッセイにおいても、AT-MSCs 培養上清の添加によって、顕著な浸潤能の増加が認められた。肝細胞癌の増殖や浸潤に関与する因子 (TGF β 1, EGF, HGF, PDGF β , VEGFA, IGF2, MMP2, MMP9) の発現について検討したところ、MMP9 を除く因子は AT-MSCs 培養上清の添加によって顕著な発現の増加が認められた。

本検討結果より、AT-MSCs を投与しなくても AT-MSCs より分泌される液性因子のみで犬肝細胞癌細胞の増殖能や浸潤能は亢進することが明らかとなった。また、本検討で得られた変化には様々な因子の影響が考えられるため、AT-MSCs から分泌される液性因子について更なる研究が必要であると考えられた。

今後の展望

今回は肝臓をターゲットに代表的な病態である炎症と腫瘍に与える AT-MSCs の効果を解析した。本研究の目的はイヌ AT-MSCs を利用した幹細胞療法を臨床応用へと展開するために必要不可欠となる AT-MSCs の機能を解明することである。AT-MSCs には様々な効果が期待されるが、特に免疫抑制作用と抗炎症作用に着目して研究を進めることで、獣医療におけるエビデンスに基づいた AT-MSCs による幹細胞療法の実現に貢献したい。

謝 辞

本研究の発想、そして第一歩として得られた今回の成果は、留学後に着手し得られた結果であり、多くの諸先生方のご指導、ご支援の賜物である。テキサス大学サウスウエスタンメディカルセンターへの留学をご紹介くださった盆子原誠教授、テキサス大学でご指導くださいました有泉清志教授、そして、快く留学を後押しして下さり、帰国後は全く新たな本研究テーマへの着手を見守っていただいた小山秀一教授、松本浩毅准教授に深謝致します。また、本

研究に共に取り組んでくれた獣医内科学研究室の卒業生、室員に感謝致します。

参 考 文 献

- 1) MIZUNO, H., TOBITA, M. and UYSAL, A.C. (2012). Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*, 30, 804-810.
- 2) HOFFMAN, A.M. and DOW, S.W. (2016). Concise Review: Stem Cell Trials Using Companion Animal Disease Models. *Stem Cells*, 34, 1709-1729.
- 3) TESHIMA, T., MATSUMOTO, H., MICHISHITA, M., MATSUOKA, A., SHIBA, M., NAGASHIMA, T. and KOYAMA H. (2017). Allogenic Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Acute Hepatic Injury in Dogs. *Stem Cells Int.*, 2017, 3892514.
- 4) TESHIMA, T., MATSUMOTO, H. and KOYAMA, H. (2018). Soluble factors from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote canine hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion. *PLoS One*, 13, e0191539.
- 5) SALGADO, A.J., REIS, R.L., SOUSA, N.J. and GIMBLE, J.M. (2010). Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 5, 103-110.
- 6) MAKRIDAKIS, M., ROUBELAKIS, M.G. and VLAHOU, A. (2013). Stem cells: insights into the secretome. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1834, 2380-2384.
- 7) KAPUR, S.K. and KATZ, A.J. (2013). Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie.*, 95, 2222-2228.