

CLiP 細胞由来の細胞外小胞による新規肝線維化修復治療の開発

1. 研究の目的

(1) 背景

① 肝線維化治療薬開発の重要性

肥満、飲酒、喫煙など生活習慣に起因する臓器の慢性炎症は、慢性腎臓病、慢性閉塞性肺疾患、脂肪性肝炎・肝硬変、慢性膵炎など、罹患臓器の線維化が特徴として挙げられる。人類は未だこの臓器の線維化を制御する効果的な手段を有しておらず、この解決は医療に飛躍的な進歩をもたらすものと期待できる。

② 低分子化合物誘導性肝前駆細胞 (Chemically-induced Liver Progenitors: CLiPs)

我々の研究グループでは、低分子化合物(A-83-01, CHIR99021)を用いたケミカルダイレクトリプログラミングによって、成熟肝細胞から肝前駆細胞(CLiPs)へ誘導しうることを見出した (Cell Stem Cell 20:41, 2017)。CLiPsは自己複製能および肝細胞と胆管細胞のいずれの細胞にも分化しうる多分化能を有する。さらにヒト成熟肝細胞より樹立したhuman CLiPs (hCLiPs)を、急性肝障害モデルマウス (TK-NOGマウス)に経脾的肝移植すると、肝障害によって脱落したマウス肝細胞がhCLiPsより分化したヒト肝細胞に効率よく置換され、マウス血清より高濃度のヒトアルブミンを検出することができた (eLife 8:4, 2019)。

③ human CLiPs (hCLiPs)による肝線維化抑制効果

hCLiPsの肝線維化改善効果の有無を調べるため、四塩化炭素(CCl₄)の少量長期投与による肝線維化モデルマウスに移植したところ、hCLiPsの肝内生着はほとんど起こらないにも関わらず肝線維化改善効果がみられることを見出した。

(2) 細胞外小胞 (extracellular vesicle; EV) 治療の創出

① EV治療の潮流

全身のあらゆる細胞は、エクソソームなど細胞外小胞(extracellular vesicle; EV)と呼ばれる脂質二重膜構造の小胞を分泌している。これには蛋白質やmiRNAなどが内包されており、細胞間情報伝達の役割を担う機能性微粒子である。新潟大学の寺井崇二教授らの研究グループでは肝硬変を対象とした他家脂肪組織由来幹細胞製剤ADR-001の治療を進めており、研究分担者の落谷孝広も分担した共同研究で、脂肪由来間葉系幹細胞が分泌するEVが肝硬変改善活性の本態であることを実証した (NPJ Regen Med 6:19, 2021)。EV治療は、細胞移植治療と異なり、免疫抑制下でなくとも投与可能と想定される点や、ドナー不足の問題が少ない点など多くの利点を有していると考えられ、新たな創薬モダリティとして世界的に研究開発が加速している。

② 3年以内に何をどこまで明らかにしようとするのか

hCLiPsによる肝線維化改善効果もhCLiP由来細胞外小胞 (hCLiP-EV)によって説明できるか評価するため、肝線維化における病態形成の中心を担う肝星細胞 (肝臓の線維芽細胞)とhCLiPsの共培養実験、およびhCLiP-EVの曝露実験を実施したところ、肝星細胞の活性化指標である α SMA (α -smooth muscle actin)の発現抑制がみられることを確認し得た。

そこで本研究では、hCLiP-EV投与によって肝線維化が改善することをin vivoで実証する。hCLiP-EVの内包物の分析から、EVがその標的細胞へ与える影響を説明しうる分子群を同定し、いかにして肝線維化改善に寄与するのか、そのメカニズムを解明する。これにより新たなEV創薬開発に必要なProof of Conceptを取得し、今後の臨床応用へ向けた取り組みを加速させる。

2. 研究の計画

(1) 不死化 hCLiPs の樹立

一定品質のhCLiP-EVを安定的に供給するための戦略のひとつとして、遺伝子導入によるhCLiPsの不死化の有益性を評価する。CDK4, Cyclin D1, TERTが発現することにより不死化したhCLiPsを樹立する。不死化hCLiPとの共培養によっても、標的細胞にhCLiP共培養と同一の変化が生じるか検証することで、EVリソースとしての不死化hCLiPsの機能を評価する。

(2) hCLiP-EV の肝線維化改善効果の実証

hCLiPsの肝線維化改善効果を証明した際と同様に、CCl₄肝線維化モデルマウスを作製し、これにhCLiP-EVを尾静注する。CCl₄肝線維化モデルマウスは、hCLiPs移植の際は、ヒト細胞の生着を得るために免疫不全マウス (NOD-SCID) を用いたが、hCLiP-EVは免疫原性が低いと考えられるため、野生型マウスでの実験もNOD-SCIDマウスと同時に進行させる。CCl₄を週2回・8週間の腹腔内投与の後にhCLiP-EVを投与し、2週後に肝臓を摘出し、肝組織内のコラーゲンを構成するアミノ酸の一種であるヒドロキシプロリン量を定量することにより、線維化の程度を評価する。また肝臓組織標本を作製し、シリウスレッド染色等により病的に肝線維化改善効果が見られるか確認する。

(3) hCLiP-EV の標的細胞に生じる表現型変化を説明する hCLiP-EV 内包分子の同定

EVの生理活性の特徴として欠かせない点がmiRNAの細胞間輸送である。ホルモンやサイトカインなど、蛋白質やペプチドによる細胞間情報伝達は古くから知られていたが、miRNAなど核酸を細胞間輸送することによる情報伝達の実態は未だ十分に明らかになっておらず、これを担うのがEVだと考えられる。hCLiP-EVに含まれるmiRNAを次世代シーケンサー解析 (miRNA-seq) により定量し、そのうち、成熟肝細胞からCLiPs樹立の際に変動するmiRNAを抽出し、線維化抑制や肝細胞再生に寄与することが期待できるmiRNAを複数同定する。in vitro実験系を用いて、標的細胞において当該miRNA下流に存在する分子の発現変化を検証し、特に重要なhCLiP-EV内包miRNAを同定する。さらにin vitroでみられたmiRNA下流の発現変化の妥当性を、マウス検体によって検証する。

3. 研究の成果

(1) 不死化 hCLiPs の樹立

マウスにhCLiP-EVを投与するにあたり、十分量かつ一定品質のhCLiP-EVを安定的に供給するため、CDK4 (R24C), Cyclin D1, TERTの強制発現によるhCLiPの不死化株を作成した。更にオンコスタチンMを用いた肝分化誘導処理を行った際のアルブミン分泌活性とCYP3a4代謝活性を評価したところ、EpCAMのプロモーター活性に応じてCDK4 (R24C), Cyclin D1, TERTを発現させる戦略が最もhCLiPsの肝細胞様形質を保持している事がわかり、hCLiPの機能維持にEpCAMが重要な役割を果たしていることが確認された。

この方法で樹立した細胞集団をフローサイトメトリーによってシングルセルクローン化し、最もアルブミン分泌能の高いクローンを更に選び出した (im-hCLiPc2)。作成したクローンの肝線維化改善効果を評価するため、肝線維化における病態形成の中心を担う肝星細胞 (肝臓の線維芽細胞) とim-hCLiPc2の共培養実験を行い、肝星細胞の活性化指標であるαSMAの発現抑制がみられることを確認できた。

(2) hCLiP-EV の肝線維化改善効果の実証

im-hCLiPc2の培養上清より超遠心法にてEVの取得実験を行い、ウエスタンブロットおよびnanotracking analysisの結果から、EVとして取り扱って差し支えない品質のサンプルが収集できることを確認した。電子顕微鏡観察においても、脂質二重膜で構成された小胞が取得できていることを確認した。そこで、CCl₄肝線維化モデルマウスを作製し、これにim-hCLiPc2を尾静注する実験を実施した。野生型マウスに対しCCl₄投与量の予備検討を行い、NOD-SCIDマウスと同濃度のCCl₄を投与すると強い腹膜炎を発症することが判明したため、希釈率を変更した上での投与を週2回・8週間継続中である。その後にim-hCLiPc2を投与し、更に2週後に肝臓を摘出し、肝線維化の程度を評価した。結果、統計学的に有意な肝線維化改善効果は得られておらず、EVの投与量や投与スケジュールの条件を変更して再検討する

べきと考えられた。またim-hCLiPc2由来のEVの肝星細胞への曝露実験の結果からも、 α SMAの発現抑制効果は濃度依存的に増強されるものではなく、至適濃度の設定が重要であることが明らかになった。

(3) hCLiP-EV の標的細胞に生じる表現型変化を説明する hCLiP-EV 内包分子の同定

成熟肝細胞、不死化前hCLiP、不死化後hCLiP、シングルセルクローニング後hCLiPのそれぞれの培養上清よりEVを収集し、miRNA-seqを実施した。EVに含有されるmiRNAの種類は不死化およびクローン化の過程で大きな変動がないことを確認できた。含有されるmiRNAのうち約80%はWNT pathway, TNF pathway, TGF β pathway, MAPK pathwayのすべてに関与するmiRNAであった。

4. 研究の反省・考察

(1) 不死化 hCLiPs の樹立

従来、肝細胞は2次元培養が困難であり、肝細胞における基礎的研究は主に肝細胞がん細胞株を用いて実施されてきた。2015年にHuchらにより肝細胞のオルガノイド培養法が報告された(*Cell* 160:299, 2015)が、マトリゲル内での培養法は、増殖が活発な細胞を十分に得る際の作業効率面で課題がある。その点、hCLiPを用いることでレンチウイルス導入実験やシングルセルクローニングの簡便さが確認され、今回取得した不死化hCLiP株は、肝細胞のin vitro実験モデルとして様々な用途で活用が可能であると考えられる。実際、本成果は日本消化器関連学会週間の国際シンポジウムで口頭発表に採択され、高い評価を得ることができた。

(2) hCLiP-EV の肝線維化改善効果の実証

創傷治癒作用のみが語られることの多いEV治療であるが、用法・用量の策定は入念に実施する必要があることが確認された。現在、複数のモデルマウスにおいて、複数のEV投与量・スケジュールでの評価をすでに開始しており、治療効果が得られる条件が定まりつつある。さらなる検討を継続する方針である。

(3) hCLiP-EV の標的細胞に生じる表現型変化を説明する hCLiP-EV 内包分子の同定

hCLiP-EVの治療効果を説明しうるmiRNAとして、現在200種類を超えるmiRNA候補が抽出されている。これらより寄与度の高いmiRNAを戦略的に選択し、in vitro実験系を用いて、標的細胞において当該miRNA下流に存在する分子の発現変化を検証する。さらにin vitroでみられたmiRNA下流の発現変化の妥当性を、マウス検体によって検証する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① **Matsuzaki J**, Kato K, Oono K, Tsuchiya N, Sudo K, Shimomura A et al. Prediction of tissue-of-origin of early-stage cancers using serum miRNomes. *JNCI Cancer Spectr* 7:pkac080 (2023)
- ② Saeki C*, **Matsuzaki J*** (co-first author), Kuroda M*, Fujita K, Ichikawa M, Takizawa S et al. Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for hepatic necroinflammation in patients with autoimmune hepatitis. *BMJ Open Gastroenterol* 9:e000879 (2022)
- ③ Urabe F, **Matsuzaki J**, Takeshita F, Kishida T, **Ochiya T**, Hirai K. Independent verification of circulating miRNA as diagnostic biomarkers for urothelial carcinoma. *Cancer Sci* 113:3510-3517 (2022)
- ④ Urabe F, **Matsuzaki J**, Ito K, Takamori H, Tsuzuki S, Miki J et al. Serum miRNAs as liquid biopsy biomarker for the prediction of oncological outcomes in patients with bladder cancer. *Int J Urol* 29:968-976 (2022)
- ⑤ Takizawa S, **Matsuzaki J**, **Ochiya T**. Circulating microRNAs: challenges with their use as liquid biopsy biomarkers. *Cancer Biomark* 35:1-9 (2022)
- ⑥ Inokuchi K, Mori H, **Matsuzaki J**, Hirata K, Harada Y, Suzuki H et al. Masaoka

T. The efficacy and safety of low-dose rifabutin-based 7-day triple therapy as a third- or later-line *Helicobacter pylori* eradication regimen. *Helicobacter* 27:e12900 (2022)

- ⑦ Takamori H*, Urabe F*, **Matsuzaki J**, Kimura S, Sasaki H, Kimura T et al. Circulating microRNA profiling for prediction of oncological outcomes in prostate cancer patients following radical prostatectomy. *Prostate* 82:1537-46 (2022)
- ⑧ Miura T, Mitsunaga S, **Matsuzaki J**, Takizawa S, Kato K, Ochiai A et al. Serum microRNAs as new criteria for referral to early palliative care services in treatment-naïve advanced cancer patients. *Oncotarget* 13:1341-49 (2022)

(2) 口頭発表

- ① **松崎 潤太郎**, 加藤 健, **落谷 孝広**. 早期がん診断に重要な血清miRNAの網羅的探索. 第7回リキッドバイオプシー研究会. 東京. 2023年1月
- ② 山口 智子, **松崎 潤太郎**, **落谷 孝広**. Engineering of human liver progenitor-like cells for a new exosomal therapy of liver fibrosis. International Session (Symposium 2) “From basic to clinical research: The strategy for new treatments for liver fibrosis and cirrhosis” 第30回日本消化器関連学会週間. 福岡. 2022年10月
- ③ 及川 千尋, **松崎 潤太郎**, **落谷 孝広**, 齋藤 義正. 膵発がん過程における膵上皮由来EVの形質変化の追跡. Poster Session. 第9回日本細胞外小胞学会学術集会. 東京. 2022年10月
- ④ **松崎 潤太郎**, 加藤 健, **落谷 孝広**. がん部位診断への貢献度の高い血清miRNAの探索. Mini Symposia 「新たながんリキッドバイオプシー技術開発と応用可能性」 第81回日本癌学会学術総会. 横浜. 2022年9月
- ⑤ 葉 子祥, **松崎 潤太郎**, 及川 千尋, 金井 弥栄, 齋藤 義正. 誘導性CRISPR/dCas9を用いたC19MCの肝内胆管癌オルガノイドの分化における役割の解明. Japanese Oral Session 「肝がん・胆道がん(2)」 第81回日本癌学会学術総会. 横浜. 2022年9月
- ⑥ 及川 千尋, **松崎 潤太郎**, **落谷 孝広**, 齋藤 義正. 膵がんドライバー遺伝子変異誘導による形質変化の追跡. English Oral Session “Cancer genome/genetics” 第81回日本癌学会学術総会. 横浜. 2022年9月
- ⑦ **松崎 潤太郎**. 血中RNA はどこから来てどこへ行くのか. 第2回反分野的生物医療学会学術集会. 湯布院. 2022年9月

(3) 出版物

- ① **松崎 潤太郎**, **落谷 孝広**. がん早期診断. テクノロジーロードマップ2023-2032 医療・健康・食農編, 日経BP, 2023年3月
- ② 及川 千尋, **松崎 潤太郎**, 加藤 健, **落谷 孝広**. がんの診断・治療に向けた血中循環miRNA, エクソソーム研究の最前線. 実験医学増刊 臨床実装が進む次世代がんバイオマーカー, 羊土社, 2022年6月
- ③ **松崎 潤太郎**, **落谷 孝広** 編. 疾患バイオマーカーとしてのマイクロRNAと診断応用, シーエムシー出版, 2022年6月