

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

前年度までに、hCLiPsの不死化株(im-hCLiPc2)を取得し、肝星細胞との共培養実験より、im-hCLiPc2が分泌する液性因子の中に肝星細胞の活性化を著名に抑制する因子が存在することが明らかになったが、これにどの程度hCLiP-EVが影響しているのかを定量的に把握する。さらに肝星細胞の細胞内RNAプロファイルおよびhCLiP-EV中のmiRNAプロファイルを次世代シーケンサーによって網羅的に解析し、hCLiP-EV曝露で生じる変化を網羅的に明確化する。これによりhCLiP-EVに含まれる線維化抑制性miRNAの絞り込みも可能になる。得られた候補miRNAのmimicを肝星細胞へトランスフェクションし、 α SMAの減少等の不活化現象が再現されるmiRNAを同定する。またmiRNA下流のシグナル伝達を検討し、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。

3. 研究の成果

hCLiP-EV曝露による肝星細胞の活性化抑制効果(α SMA発現抑制効果)の機序を解明するため、hCLiP-EVよりRNAを抽出し、そのRNAをトランスフェクション試薬を用いて肝星細胞に導入した場合と、EV曝露をした場合とで、肝星細胞における α SMAの発現変化を比較した。結果、RNAの細胞内導入によってEV曝露と同等の効果が得られ、当該in vitroアッセイ系における機能中心はhCLiP-EV内のRNAであることが示された。そこでhCLiP-EVに内包されるsmall RNAを次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した(smRNA-seq)。hCLiPの不死化を行う前後で、EVに含まれるmiRNAのプロファイルに目立った変化は生じていなかった。興味深いことに、hCLiP-EVには肝細胞特異的miRNA(miR-X)が顕著に多く含有されていた。肝星細胞にmiR-Xの阻害核酸(antimiR-X)を導入した上でhCLiP-EVに曝露させると、EVによる α SMA発現抑制効果が低減された。すなわちmiR-Xは、hCLiP-EVの肝線維化抑制効果を説明する重要なmiRNAであると推察された。

4. 研究の反省・考察

現在、EVの生理活性に注目して治療薬としての臨床応用を目指す取り組みが世界的に活性化しており、本邦では本年1月に医薬品医療機器総合機構(PMDA)で「エクソソームを含む細胞外小胞(EV)を利用した治療用製剤に関する報告書」が公表され、非臨床試験における考え方が示された。EVは、内包される蛋白質とmiRNAなどの核酸が複合的に標的細胞内で作用することで生理活性を発揮すると考えられ、従来の低分子化合物や抗体製剤といった創薬では成し得なかった治療効果に期待が寄せられている(Nature 621:462, 2023)。

線維化改善効果を有する細胞外小胞の研究は、間葉系幹細胞を用いた研究が先行していたが、我々の研究チームでは、障害臓器の修復には当該臓器に存在する細胞由来のEVを用いたほうが高い活性を得やすいものと考えている。実際、研究分担者の落谷らは最近、肺上皮細胞が分泌するEVを特発性肺線維症マウスに経気道投与することによって、その改善効果が得られることを見出し、更にその効果が間葉系幹細胞由来のEVよりも高かったことを報告している(J Extracell Vesicle 10:e12124, 2021)。この仮説は、2023年度での研究進捗で、hCLiP-EVの主要な有効成分が肝細胞特異的に発現するmiRNAであったことが判明したことで、益々強固なものとなった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① **Matsuzaki J[#]**, Kurokawa S, Iwamoto C, Miyaho K, Takamiya A, Ishii C, Hirayama A, Sanada K, Fukuda S, Mimura M, Kishimoto T[#], Saito Y. (**#corresponding author**) Intestinal metabolites predict treatment resistance of patients with depression and anxiety. *Gut Pathog* 16:8 (2024)
- ② Yoshida M*, **Matsuzaki J* (co-first author)[#]**, Fujita K, Tokuda N, Yamaguchi T, Kuroda M, **Ochiya T**, Saito Y, Kimura K. (**#corresponding author**) Plasma extracellular vesicle microRNAs reflecting the therapeutic effect of the CBP/ β -catenin inhibitor PRI-724 in patients with liver cirrhosis. *Sci Rep* 14:6266 (2024)

- ③ Kondo N, Kinouchi T, Natsumeda M, **Matsuzaki J**, Hirata E, Sakurai Y, Okada M, Suzuki M. Profile of miRNAs in small extracellular vesicles released from glioblastoma cells treated by boron neutron capture therapy. *J Neurooncol* 168:91-97 (2024)
- ④ Kurokawa S, Nomura K, Sanada K, Miyaho K, Ishii C, Fukuda S, Iwamoto C, Naraoka M, Yoneda S, Imafuku M, **Matsuzaki J**, Saito Y, Mimura M, Kishimoto T. A comparative study on dietary diversity and gut microbial diversity in children with autism spectrum disorder, attention-deficit hyperactivity disorder, their neurotypical siblings, and non-related neurotypical volunteers: a cross-sectional study. *J Child Psychol Psychiatry* 168:91-97 (2024)
- ⑤ Tsugawa H, Ohki T, Tsubaki S, Tanaka R, **Matsuzaki J**, Suzuki H, Hozumi K. Gas6 ameliorates intestinal mucosal immunosenescence to prevent the translocation of a gut pathobiont, *Klebsiella pneumoniae*, to the liver. *PLoS Pathog* 19:e1011139 (2023)
- ⑥ Yokoi A, Ukai M, Yasui T, Inokuma Y, Hyeon-Deuk K, **Matsuzaki J**, Yoshida K, Kitagawa M, Chattrairat K, Iida M, Shimada T, Manabe Y, Chang IY, Asano-Inami E, Koya Y, Nawa A, Nakamura K, Kiyono T, Kato T, Hirakawa A, Yoshioka Y, **Ochiya T**, Hasegawa T, Baba Y, Yamamoto Y, Kajiyama H. Identifying high-grade serous ovarian carcinoma-specific extracellular vesicles by polyketone-coated nanowires. *Sci Adv* 9:eade6958 (2023)
- ⑦ Katsuda T, Sussman J, Li J, Merrell AJ, Vostrejs W, Secreto A, **Matsuzaki J**, **Ochiya T**, Stanger BZ. Evidence for *in vitro* extensive proliferation of adult hepatocytes and biliary epithelial cells. *Stem Cell Rep* 18:1436-1450 (2023)
- ⑧ Araki Y, Asano N, Yamamoto N, Hayashi K, Takeuchi A, Miwa S, Igarashi K, Higuchi T, Abe K, Taniguchi Y, Yonezawa H, Morinaga S, Asano Y, Yoshida T, Hanayama R, **Matsuzaki J**, **Ochiya T**, Kawai A, Tsuchiya H. A validation study for the utility of serum microRNA as a diagnostic and prognostic marker in high-grade osteosarcoma patients. *Oncol Lett* 25:222 (2023)

(2) 口頭発表

- ① 山口智子, **松崎潤太郎**, 勝田毅, 徳田乃唯, 檀裕治, 木村真規, **落谷孝広**, 齋藤義正. ヒト肝細胞由来肝前駆細胞(hCLiP)由来sEVの肝線維化改善効果の検討. Poster Session. 第10回日本細胞外小胞学会学術集会. 札幌. 2023年10月
- ② **松崎 潤太郎**. 細胞外小胞で創薬はできそうなのか. 第3回反分野的生物医療学会学術集会. 金沢. 2023年9月

(3) 出版物

なし