

2024年度（第49回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	慶 應 義 塾 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	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	研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①ケミカルダイレクトリプログラミング ②肝線維化 ③細胞外小胞 ④エクソソーム ⑤マイクロRNA ⑥空間トランスクリプトーム ⑦生体イメージング		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
松 崎 潤 太 郎	慶應義塾大学 薬学部	准 教 授	研究代表者 総括

○研究分担者

[illegible]

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 の治験を進めており、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

ア. 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。

イ. 肝内の線維芽細胞である肝星細胞に対して、hCLiP の共培養および hCLiP-EV の曝露が及ぼす影響を解明する。

ウ. hCLiP-EV の内包物の分析から、EV が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。

エ. 空間トランスクリプトーム解析を用いて、hCLiP-EV が影響を及ぼす細胞を in vivo で同定する。

オ. hCLiP および EV の品質を簡便に評価するためのレポーターシステムを構築する。

本研究を通じて、非臨床試験への移行に必要な Proof of Concept を取得し、社会実装を目指す。

2. 研究の計画

in vivoでのEVの薬理試験の成功に伴い、その肝組織を活用することでhCLiP-EVの生理活性を解き明かすことができると考えた。具体的には、1細胞レベルでの高解像度空間トランスクリプトーム解析を実施する。肝組織中の各細胞種における遺伝子発現を、hCLiP-EV投与群と非投与群間で比較することにより、hCLiP-EVが肝組織全体へ与える影響を統合解析する。hCLiP-EVによる肝線維化メカニズムを説明する特徴的な遺伝子群を同定した後、その遺伝子のノックアウトマウス等を用いて因果関係を証明する。

またPMDAとの事前面談を経て、EV治療の実用化に向けた課題として、hCLiPの維持培養過程における継続的な品質評価、およびhCLiP-EV製造後の保存期間を定義するための、経時的な品質評価を如何に実施するか、安定したin vitroでの評価系の構築が必要と考えられた。そこで α SMAの発現量依存的に蛍光が変化する肝星細胞株を樹立し、hCLiPとの共培養やhCLiP-EV曝露下での α SMA発現を、蛍光強度から随時定量できるアッセイ系を構築する。

3. 研究の成果

高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料(CDAHFD)を用いた代謝異常関連脂肪肝炎(MASH)モデルマウス、および胆汁うっ滞性肝線維症モデルマウスであるMdr2欠損マウス、CDAHFDとは別のMASHモデルである高脂肪高コレステロール食(GAN-diet)を摂餌したモデルマウスにhCLiP-EVを経静脈投与したところ、再現性をもって用量依存的な肝線維化改善効果が認められた。

CDAHFDマウスの実験で得られた肝臓組織を用いて空間トランスクリプトーム解析(Visium解析)を実施した。肝星細胞クラスターにおける α SMAの低下に加えて、肝臓内の広い範囲でのCol1a1の発現低下やマクロファージのマーカー遺伝子であるCd68の発現低下が見られており、線維化や炎症細胞浸潤の低下に矛盾しない結果が得られており、hCLiP-EVの作用機序を深掘りするための基盤データが得られた。

EV中に含まれる機能的RNAとして最もよく知られているものはmicroRNA(miRNA)であるが、不死化前と不死化後でhCLiP-EVに内包されるRNAが概ね一致していた。hCLiP-EVよりtotal RNAを抽出し、トランスフェクション試薬を用いてそのtotal RNAを肝星細胞内に導入すると、やはり α SMA遺伝子の低下作用を再現できた。すなわち、hCLiP-EVの肝線維化抑制作用の有効成分はhCLiP-EVに内包されるRNAであると言える。

hCLiP-EVの構成分子のうち、他の細胞由来のEVとは決定的に異なる分子として、miR-122-5pが挙げられる。miR-122-5pは肝細胞特異的なmiRNAであり、肝臓において抗炎症・抗腫瘍効果を持つ重要なmiRNAである(Nat Commun 9:5321, 2018; J Clin Invest 122:2871, 2012)。肝線維化の進行に伴って、肝内ではmiR-122-5p発現が低下することや、肝星細胞においてmiR-122-5pの発現を上昇させると線維化マーカー遺伝子発現が低下することも知られている(J Hepatol 58:522, 2013)。実際、肝星細胞にmiR-122-5p inhibitorを導入しておく、hCLiP-EV曝露でみられる活性化抑制効果が減弱した。同様に、肝線維化抑制作用が知られているmiR-29a-3pもhCLiP-EVに含まれており、肝星細胞の実験系においてCOL1A1の低下を説明するmiRNAであることを、miR-29a-3p inhibitorを用いて明らかにした。よってhCLiP-EVの機能活性中心としてmiRNAが重要であり、特にmiR-122-5pやmiR-20a-3pが重要な役割を果たしていると考えられた。

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2023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、2024年4月に日本再生医療学会(協力:日本細胞外小胞学会)より「細胞外小胞等の臨床応用に関するガイドス(第1版)」が公開されるなど、実用化への枠組みの策定が進んでいる。

本研究はこの潮流において本邦のパイオニア的研究の一つであり、2026年度からはAMEDより再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム(非臨床PoC取得研究課題)の支援の下で実用化に向けた継続が決定している。当該プログラム採択に至る基板データを得ることができたという点で、極めて有意義な研究であったといえる。

一方、空間トランスクリプトーム解析の結果から、hCLiP-EVの線維化抑制効果は、肝星

細胞への効果のみならず、肝マクロファージ（クッパー細胞）にも発現変化を与えていることが明らかになった。現在、その分子機構解明のためのin vitroアッセイ系の構築も進めている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Tan Y, **Matsuzaki J**, Saito Y, Suzuki H. Environmental factors in gastric carcinogenesis and preventive intervention strategies. *Genes Environ* 47:5 (2025)
- ②Uehara T, **Matsuzaki J**, Yoshida H, Ogawa Y, Miura J, Fujimiya H, Yamamoto Y, Kawauchi J, Takizawa S, Yonemori K, Sakamoto H, Kato K, Ishikawa M, **Ochiya T**. Potential utility of pretreatment serum miRNAs for optimal treatment selection in advanced high-grade serous ovarian cancer. *Jpn J Clin Oncol* 54:917-925 (2024)
- ③Suzuki K, Yokoi A, **Matsuzaki J**, Yoshida K, Yamamoto Y, Kato T, Ishikawa M, **Ochiya T**, Kajiyama H. Circulating serum miRNAs predict response to platinum chemotherapy in high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Med* 13:e70251 (2024)
- ④Tsugawa H, Tsubaki S, Nashimoto S, Tanaka R, **Matsuzaki J**, Hozumi K. Macrophage-depleted young mice are beneficial in vivo models to assess the translocation of Klebsiella pneumonia from the gastrointestinal tract to the liver in the elderly. *Microbes Infect* 105371 (2024)
- ⑤Ando H, Mori H, Takabayashi K, Matsuura N, Masaoka T, **Matsuzaki J**, Saito Y, Kato M, Kosaki K, Kanai T. Upper gastrointestinal triple stenosis in a patient with trisomy 17p syndrome: case report and literature review. *DEN Open* 5:e70043 (2024)

(2) 口頭発表

- ①**Matsuzaki J**, Frontiers of Next-Generation Cancer Testing Technology Using microRNAs. Symposium “Current Status and New Stage in Cancer Liquid Biopsy” 第83回日本癌学会学術総会. 福岡. 2024年9月
- ②**Matsuzaki J**, Checklist for blood sample collection when developing clinical application of blood EV biomarkers. ISEV Workshop:Blood EVs. ソウル. 2024年9月
- ③Yamaguchi T, **Matsuzaki J**, Katsuda T, Tokuda N, Tan Y, Kimura M, **Ochiya T**, Saito Y. Small extracellular vesicles derived from human chemically induced liver progenitors (hCLiPs) improve liver fibrosis via inactivation of hepatic stellate cells. International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) 2024. Melbourne, Australia. 2024年5月

(3) 出版物

なし