59. NASH 肝再生機能不全の解明と統合的治療の開発

島田　光生

徳島大学 大学院医歯薬学研究部 消化器・移植外科学

Key words：非アルコール性脂肪肝炎，肝再生，脂肪由来幹細胞，3D 培養

緒　言

近年、メタボリック症候群（肥満や 2 型糖尿病、高脂血症など）により、成人の 10～20%が脂肪肝（NAFL）に罹患し、さらに肝細胞壊死や炎症性変化を伴う非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）が一定の割合（NAFL の 10～20%）で発症し、肝硬変・肝癌にまで進行することが社会問題となっている。また、FOLFOX/FOLFILI をはじめとする大腸癌肝転移に対する新規抗癌治療も、NAFLD・NASH 発症の要因となる。肝蔵外科における NASH の問題点は、1. 悪性腫瘍に対する肝切除後再生不全、2. マージナルグラフトとしての生体部分肝移植後グラフト不全、などがあげられる。NASH は肝癌のリスクファクターであるとともに、NASH による肝予備能低下が従来正常肝では可能であった根治的肝切除を不可能とし、治癒切除率低下や合併症増加を引き起こす［1，2］。また生体部分肝移植に頼らざるを得ない本邦では、ドナー不足による NASH 肝移植（Marginal/Risky graft）による移植後グラフト機能不全が懸念され、我々も、マージナル部分肝グラフトが、黄疸の遷延を特徴とする過小グラフト症候群を発症することを報告してきた［3］。これらのことから肝臓外科における NASH 肝再生不全に対する統合的治療戦略確立は喫緊の課題となっている。

肝再生制御因子に対し、我々は activin（TGF-β supergene family）の肝細胞増殖抑制効果や、その結合蛋白で肝細胞増殖因子である follistatin をはじめとする肝再生制御の研究を多数行ってきた［4～7］。しかしながら大量肝切除後肝不全や、生体肝移植ドナー不足など、肝再生研究を取り巻く現況を抜本的に打開するには至らず、その対策として、絶対的再生肝細胞不足の克服に対する新たな細胞資源として脂肪由来幹細胞：adipose tissue-derived mesenchymal stem cell（ADSC）を用いた細胞移植治療研究に移行している［8～10］。本研究では NASH における再生不全制御を目指した統合的治療開発のため、NASH 肝癌モデル・NASH 肝再生不全モデルの作製と 3D 培養システムを用いた肝細胞保護効果・ADSC による細胞移植治療の可能性について検討した。

方　法

1. NASH 肝発癌モデルの作製と NASH・腸管マイクロバイオーム制御に関する検討

肝線維化～肝硬変～肝発癌に至る発癌機構には、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の関与が注目されており、さまざまな NASH 発癌モデルが検討されている。NASH 発癌機構には脂肪毒性（酸化ストレス）、ER-stress、autophagy、adaptive immunity や腸管マイクロバイオームなど、様々な要因の関与が推察されているが、未だ十分に検討されていない。本検討では、NASH 肝発癌モデルにおける発癌機構の解明・制御のため、TSOD（Tsumura-Suzuki Obese Diabetic Mice）マウスを用いて検討した。本モデルは肥満と 2 型糖尿病を持つ近交系マウスで、High fat diet ではなく、通常飼料投与することにより、週齢 24 週で NASH、週齢約 48 週で 100%に肝腫瘍を発生する。この TSOD マウスに Compound X を混餌投与し、NASH 進展・肝発癌抑制効果を検討するとともに腸内マイクロバイオームについても解析した。

2. NASH 肝再生障害に関する検討

NASH 肝再生不全研究に関して、NASH モデル作製とともに、血液・病理学的評価や肝切除後肝再生に対する影響について検討した。本研究で作製した NASH マウスモデルは、徳島大学独自のマウス NASH 作製プロトコールである（プロトコールの詳細は非公開）。対象は NC57BL/B6 マウスを、1）Control 群（通常食・10 週投与）、2）NAFL 群（高脂肪食・10 週投与）、3）NASH 群（高脂肪高コレステロール＋コール酸食・16 週投与）の 3 群に分け、肝切除術時体重・肝病理学的評価とともに肝切除術後 ALT 値の推移・肝再生比率について解析した。

3. 3D 培養システムによる単離肝細胞保護・ADSC の肝細胞様細胞（HLC）分化に関する研究

NASH 肝再生不全制御の統合的治療法のひとつとして、我々は肝細胞移植治療に着目しているが、Cell source 不足が依然問題である。この問題解決のため、3D 培養システムを用いた単離肝細胞保護効果の検証、ADSC を Cell source とした肝細胞様細胞 HLC の分化誘導研究を行っている。

3D 培養システムにおける肝細胞保護効果を確認するために、マウス単離肝細胞を使用した。雄性 8 週齢 C57BL/6J マウスの下大静脈からエチレングリコール四酢酸（0.05 M）・コラゲナーゼ（0.5 mg/mL）にて灌流した後、肝臓を摘出し、ダイジェスティブソリューション（0.06 mg/mL collagenase Ⅰ）を加えた滅菌ディッシュ上で、肝被膜を取り除き、肝細胞を震盪・浮遊・遠心（50 g、3 min at 4°C×2）させた後、10%ウシ胎児血清・ダルベッコ改変イーグル培地を加えた Ⅰ 型コラーゲンコートディッシュで単離肝細胞培養した。2D culture では肝細胞培養継続（1×10^{5}個）し、3D 培養システムは RCP piece（FUJI FILM）に 1×10^{5}個播種培養し、肝細胞生存率やアルブミン産生能について評価した。

種々の幹細胞からの HLC 分化誘導実験に関して、これまで機能面で肝機能を上回り、すべての肝機能を網羅する幹細胞由来肝細胞様細胞はいまだに作製できていない。我々は分化誘導プロトコール改変や 3D 培養システムを用いた効率的な ADSC からの HLC 分化誘導法の確立を目指し、通常の HLC 分化プロトコールに GSK3 inhibitor を用いた独自の 3 step 分化プロトコールに、3D 培養システムを導入した（図 1）。

3 step プロトコールは以下の通りとした。

Day1～2：serum-free DMEM/F-12 medium、Day3：DMEM/F-12 containing 2 μM GSK3 inhibitors（Chir99021）、albumin fraction Ⅴ 0.5 mg/mL、Day4～5：DMEM/F-12 containing ITS 1%・albumin fraction Ⅴ 0.5 mg/mL、Day6～10：MEM/NEAA containing 1% ITS・albumin fraction Ⅴ 0.5 mg/mL・BMP2 20 ng/ml・FGF4 30 ng/ml、Day11～15：MEM/NEAA containing 1% ITS・albumin fraction Ⅴ 0.5 mg/mL・HGF 20 ng/ml、Day16～21：MEM/NEAA containing 1% ITS・albumin fraction Ⅴ 0.5 mg/mL・HGF 20 ng/ml・OSM10 ng/ml・Dexamethasone 10^{-6}M。

ADSC は human adipose derived stem cells（invitrogen®）用い、3D 培養システムには RCP piece（FUJI FILM）を採用した。評価項目は Day6：SOX17/CXCR4 mRNA、Day11：AFP mRNA、Day21：薬剤代謝能（Cytochrome P450 活性：CYP3A4）、Day21：アンモニア代謝能、Day0～21：アルブミン産生能とした。

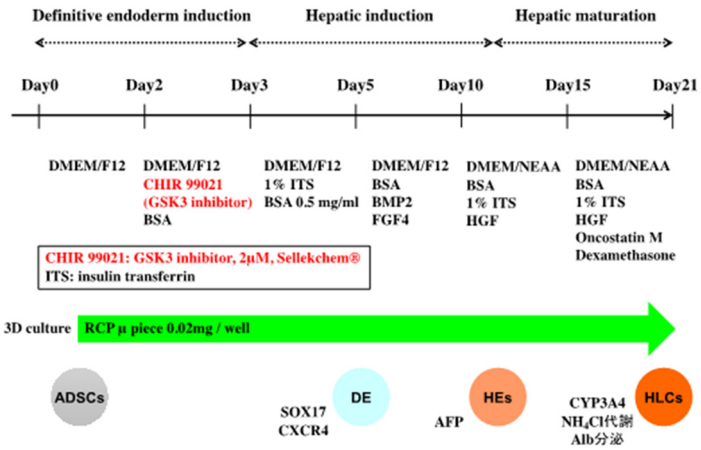

図 1. 徳島大学 HLC 分化プロトコール

GSK3 inhibitor を用いた 3 step プロトコールに 3D 培養システムを導入

結果および考察

1. NASH 肝発癌モデルの作製と NASH・腸管マイクロバイオーム制御に関する検討

NASH 肝発癌において、通常では個体差はみられるものの肝細胞 ballooning、脂肪変性・炎症性細胞浸潤が認められ、NASH 進行が確認されたが、Compound X 投与により、それらの NASH に認められる所見が解消されていた（図 2）。また肝内炎症性サイトカイン IL-6 は IL-1β は Compound X 投与により有意に減少しており、肝星細胞活性化マーカーの αSMA も有意に減少しており、NASH 進展が抑制された（図 2）。

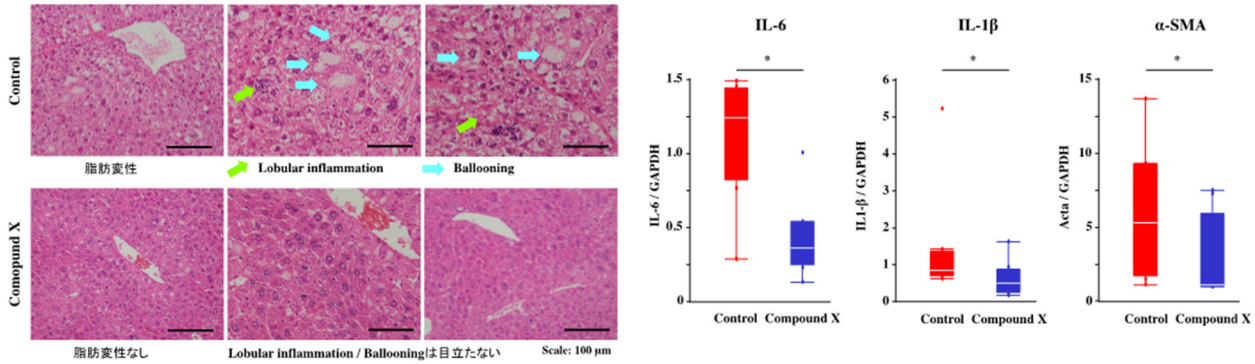

図 2. 週齢 24 週における Compound X の NASH 発症抑制効果

左図：肝病理組織評価（H.E.染色・Azan 染色）。

右図：肝内炎症性サイトカイン発現（RT-PCR）（* : $p < 0.05$、Mann-Whitney U test）。

さらに、週齢 48 週の肝発癌に関しても、腫瘍個数は同等であったが、腫瘍径は著明に抑制していた（図 3）。さらに通常、NASH においては肝細胞癌が確認されたが、Compound X 投与群では、肝細胞腺腫様腫瘍であった。

腸内マイクロバイオームの検討では、Compound X 投与は、門・属ともにドラスティックな変化を誘導しなかったが、様々な細菌属の変化を来しており、特に Firmicutes Blautia、Firmicutes Ruminococcus は Compound X 投与により誘導され、Firmicutes Dorea や Firmicutes Erysipelotrichaceae は抑制されていることが確認された（図 3）。

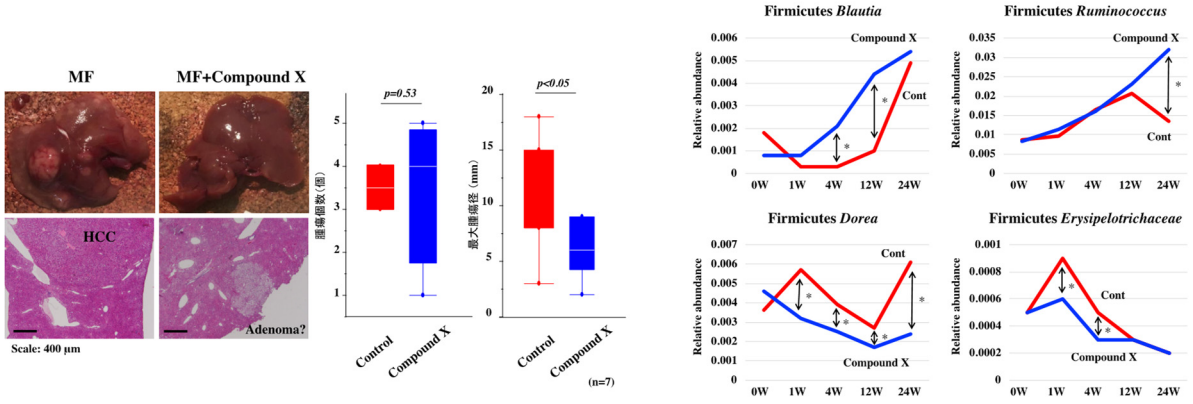

図 3. Compound X の肝発癌抑制と腸管マイクロバイオーム制御効果

左図：週齢 48 週における腫瘍個数・径の比較（* : $p < 0.05$、Mann-Whitney U test）。

右図：腸管マイクロバイオームの推移（* : $p < 0.05$、One way ANOVA）。

本検討では、NASH 肝発癌モデルに対し、Compound X を投与することで、NASH 進展～肝発癌を制御することができた。特に肝内炎症性サイトカインを抑制するとともに、腸管マイクロバイオームに関しても、炎症を抑制し、エピジェネティック遺伝子制御の一翼を担うヒストン脱水素酵素（HDAC）を抑制することが知られている短鎖脂肪酸産生菌である Firmicutes Blautia、Firmicutes Ruminococcus が誘導されていた。また NASH との関連が報告されている Firmicutes Dorea や炎症・発癌と関連が示唆される Firmicutes Erysipelotrichaceae が抑制されていたことは、NASH における肝炎症・発癌制御に関する新たな知見になりうると考えられた。現在、腸管メタボロームに関しても解析する予定としている。

2. NASH 肝再生障害に関する検討

各群の体重はそれぞれ、Control 群 28.8±1.1 g、NAFL 群 45.1±1.4 g、NASH 群 40.2±3.0 g で、NAFL 群が有意に高く、NASH 群では NAFL 群より有意な体重減少が認められた。また ALT は Control 群 24.3±3.3 IU/L、NAFL 群 30.7±6.4 IU/L、NASH 群 104.5±16.2 IU/L で NASH 群が有意に高値で、肝障害・線維化が予想された。

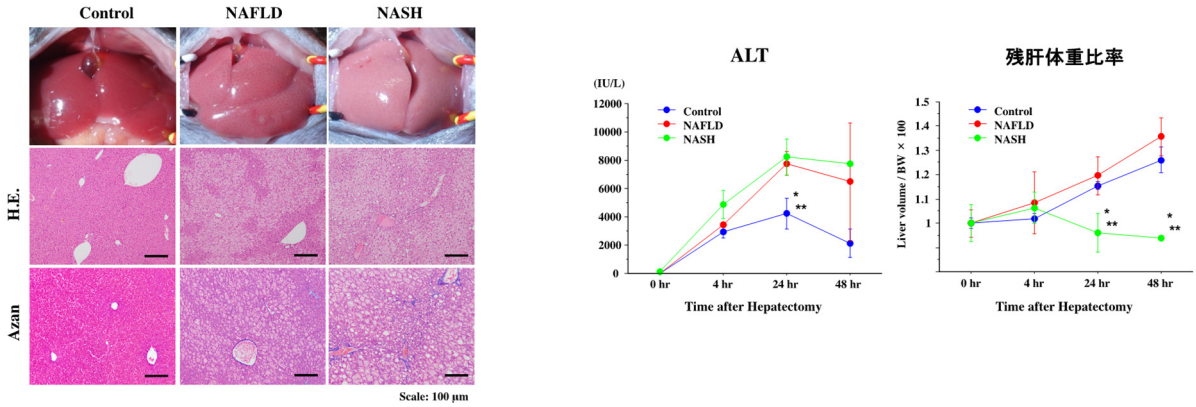

図 4. NASH モデルにおける肝切除術後変化

左図：肝マクロ所見と病理学的所見の比較。

右図：肝切除術後 ALT・残肝再生比率の推移（* : $p < 0.05$ NAFLD vs NASH、

** : $p < 0.05$ Control vs NASH、One way ANOVA）。

実際の肝所見は NAFLD、NASH に進行するにつれて白色の外観を呈し、病理組織学的評価では肝細胞脂肪沈着・Ballooning とともに、肝線維化も NASH 群で進行していた（図 4）。マウス 70%肝切除術施行後の肝障害・肝再生の推移で、ALT 値は NAFLD 群、NASH 群ともに同様に高値を持続した（図 3）。さらに肝切除術後肝再生は NASH 群にのみ認めず（図 4）、肝切除術後 7 日目生存率が 25%（1／5）の致死性モデルとなっていた。

本検討では、肝切除術後肝障害の推移が NAFLD と NASH で同様の推移を示したが、NASH でのみ肝再生を全く認めなかった。一般的に NASH では NAFLD と異なり、肝内酸化ストレス・炎症性サイトカイン産生・小胞体ストレスの他、アディポサイトカイン異常・腸管エンドトキシンによる Multiple hit を受けており、肝臓単体だけでない複合的臓器要因が予想され、腸管マイクロバイオーム・メタボローム解析についても解析中である。さらに、その制御法としての 1. Nrf2 inducer 投与、2. ALPPS 手術（associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy）、3. ADSC から分化誘導した HLC の細胞移植なども今後の検討課題である。

3. 3D 培養システムによる単離肝細胞保護・ADSC の肝細胞様細胞（HLC）分化に関する研究

肝細胞保護効果に関する検討において 3D 培養システムでは培養 48 時間で、平均 3.5 個/well のスフェロイドを形成し（図 4）、PI 染色による肝細胞生存率の評価では、3D 培養システムでは培養 9 日後でも 80%の細胞生存を維持していた。2D culture では培養 3 日以降、徐々に低下し培養 9 日後では、約 50%にまで低下していた（図 5）。培養開始 7、9 日後の培養液中アルブミン濃度も 3D 培養システム群で有意に維持されていた（Day9・3D culture 群 vs 2D culture 群：95.5±14.7 vs 28.7±11.2 ng/ml）（図 5）。

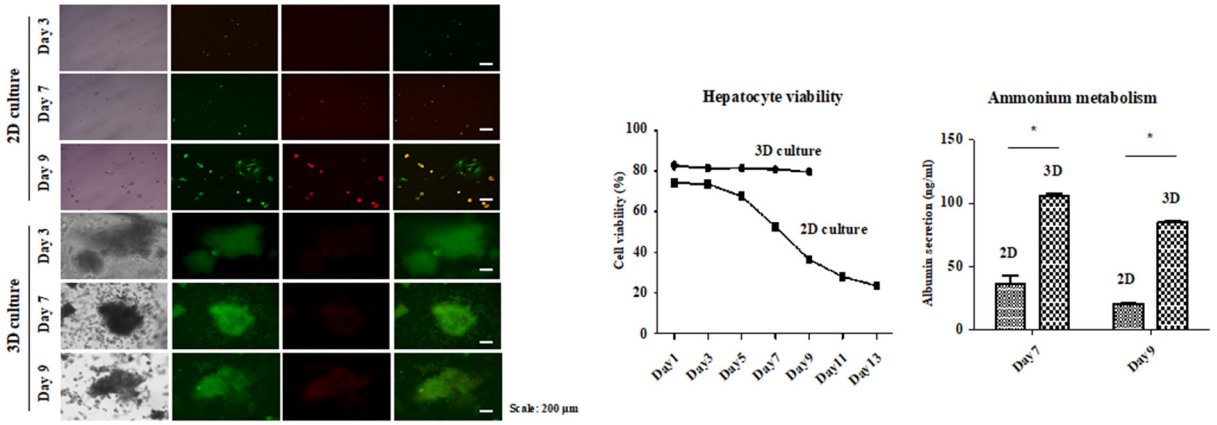

図 5. 3D culture system による単離肝細胞保護効果

左図：単離肝細胞の PI 染色。

右図：単離肝細胞 viability とアルブミン産生能（* : $p < 0.05$、Mann-Whitney U test）。

HLC 分化誘導実験の結果として、2D 培養の細胞形態は、早期には線維芽細胞様で、徐々に配列が変化し上皮細胞様となった。3D 培養システムでは培養早期から cell sphere を形成し、細胞分化が進むにつれて増大した（図 6）。

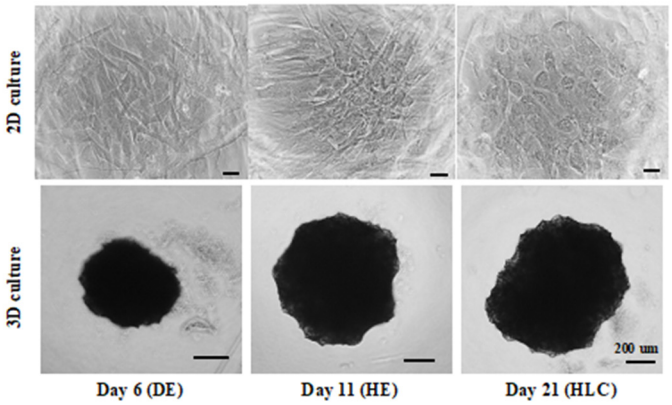

図 6. 2D・3D 培養システムによる ADSC の細胞形態変化

また Day6 において Definitive endoderm のマーカーである SOX17 mRNA、CXCR4mRNA は 3D 培養システム群が有意に高発現であった（図 7）。また Day11 において初期 Hepatocyte、Hepatic endoderm のマーカーである AFP mRNA も 3D 培養システム群が有意に高値であった。Day21 の CYP3A4 活性やアンモニア代謝能も 3D 培養システム群で有意に高かった（図 7）。アルブミンに関しては、Day21 における ALB mRNA は 3D 培養システム群で有意に高値であったが、産生能に関しては差を認めなかった（図 7）。まとめると 3D 培養システムにより、早期により機能性の高い HLC 分化誘導が可能であった。

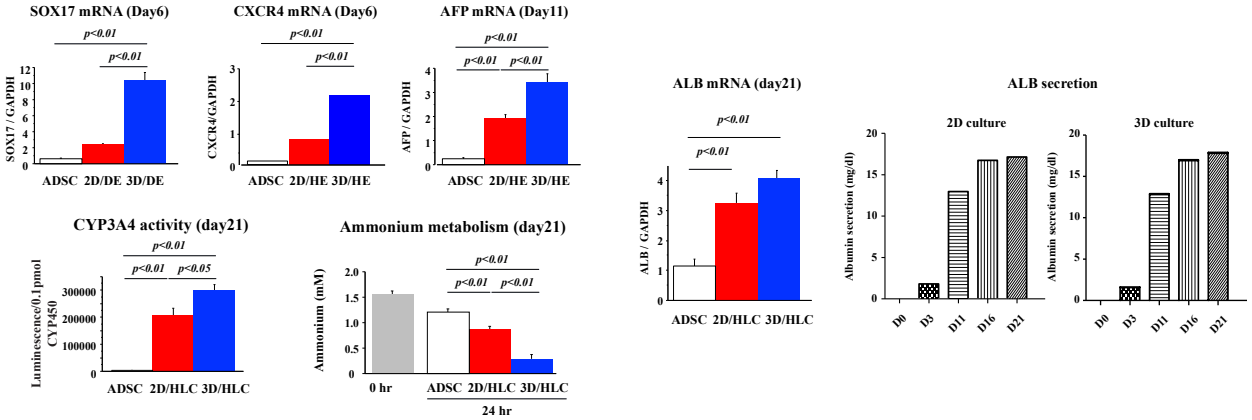

図 7. HLC 分化過程における遺伝子マーカー発現と機能評価

左図：各種遺伝子マーカー発現・CYP3A4 活性・アンモニア代謝能の比較

（* : $p < 0.05$、** : $p < 0.01$、One way ANOVA）。

右図：アルブミン遺伝子発現・産生能の比較（** : $p < 0.01$、One way ANOVA）。

我々は 3D 培養システムの単離肝細胞保存期間延長効果を確認するとともに、GSK3 inhibitors を用いた 3 step プロトコール（21 日間）でヒト ADSC から HLC への分化誘導に成功しているが、本研究では 3D 培養システムを併用することにより、さらに早期に、機能性の高い HLC 分化誘導に成功した。現在さらに、DNA マイクロアレイにより、作製した HLC 遺伝子発現・機能評価を進めている。今後は実際の細胞移植治療を考慮して、胆管細胞様細胞や類洞内皮細胞様細胞への分化誘導研究へも移行するとともに、NASH 肝再生不全モデルに対する *in vivo* 研究を展開していく予定である。

文　献

1) Reeta Veteläinen , Arlène van Vliet, Dirk J Gouma, Thomas M van Gulik. Steatosis as a Risk Factor in Liver Surgery. Ann Surg. 2007 Jan;245(1):20-30. PMCID: PMC1867945 DOI: 10.1097/01.sla. 0000225113. 88433.cf

2) de Meijer VE, Kalish BT, Puder M, Ijzermans JN. Systematic Review and Meta-Analysis of Steatosis as a Risk Factor in Major Hepatic Resection. Br J Surg. 2010 Sep;97(9):1331-9. PMID: 20641066 DOI: 10.1002/bjs.7194.

3) Ninomiya M, Shimada M, Terashi T, Ijichi H, Yonemura Y, Harada N, Soejima Y, Suehiro T, Maehara Y. Sustained Spatial Disturbance of Bile Canalicular Networks During Regeneration of the Steatotic Rat Liver. Transplantation. 2004 Feb 15;77(3):373-9. PMID: 14966410 DOI: 10.1097/01.TP. 0000109777.51902.09.

4) Takamura K, Tsuchida K, Miyake H, Tashiro S, Sugino H. Activin and Activin Receptor Expression Changes in Liver Regeneration in Rat. J Surg Res. 2005 Jun 1;126(1):3-11. PMID: 15916968 DOI: 10.1016/j.jss.2005.01.002.

5) Kanamoto M, Shimada M, Morine Y, Yoshizumi T, Imura S, Ikegami T, Mori H, Arakawa Y. Beneficial Effects of Follistatin in Hepatic Ischemia-Reperfusion Injuries in Rats. Dig Dis Sci. 2011 Apr;56(4):1075-81. Epub 2010 Sep 8. PMID: 20824496 DOI: 10.1007/s10620-010-1401-4.

6) Arakawa Y, Shimada M, Utsunomya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Takasu C. Effects of Splenectomy on Hepatic Gene Expression Profiles After Massive Hepatectomy in Rats. J Gastroenterol Hepatol. 2013 Oct;28(10):1669-77. PMID: 23808869 DOI: 10.1111/jgh.12316.

7) Saito Y, Morine Y, Shimada M. Mechanism of Impairment on Liver Regeneration in Elderly Patients: Role of Hepatic Stellate Cell Function. Hepatol Res. 2017 May;47(6):505-513. Epub 2017 Mar 16. PMID: 28186674 DOII: 10.1111/hepr.12872.

8) Utsunomiya T, Shimada M, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Mori H, Hanaoka J, Iwahashi S, Saito Y, Iwaguro H. Human Adipose-Derived Stem Cells: Potential Clinical Applications in Surgery. Surg Today. 2011 Jan;41(1):18-23. Epub 2010 Dec 30. PMID: 21191687 DOI: 10.1007/s00595-010-4415-9.

9) Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Morine Y, Imura S, Mori H, Sugimoto K, Iwahashi S, Asanoma M. The Protective Effect of Adipose-Derived Stem Cells Against Liver Injury by Trophic Molecules. J Surg Res. 2013 Mar;180(1):162-8. Epub 2012 Oct 25. PMID: 23117122 DOI: 10.1016/j.jss.2012.10.009.

10) Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Morine Y, Imura S, Mori H, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S, Takasu C. Homing Effect of Adipose-Derived Stem Cells to the Injured Liver: The Shift of Stromal Cell-Derived Factor 1 Expressions. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2014 Dec;21(12):873-80. Epub 2014 Aug 12.PMID: 25131380 DOI: 10.1002/jhbp.147.