

厚生労働科学研究研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用促進研究事業

自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の開発に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 沖田 極

平成15(2003)年3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の開発に関する研究 ----- 1

沖田 極

## II. 分担研究報告

自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の開発に関する研究 ----- 6

仁科 博史

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 8

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 9

## 研究要旨

研究要旨：幹細胞を用いた細胞療法は、新たな臓器再生法として期待できる。我々は組織幹細胞のうち、細胞源としての得やすさより、骨髄に存在し、肝、胆管、膵臓、小腸細胞へと分化する幹細胞を使った再生療法を開発するため以下の研究を行った。本研究の最終目標は『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法（細胞療法）』の臨床開発であるが、本年度は、その基盤研究として、我々が開発した骨髄細胞からの肝細胞への分化・増殖の GFP (Green fluorescent protein) transgenic mice を用いた in vivo 評価モデルを用いて解析を行った。まず予後、肝機能の改善であるが、骨髄細胞を投与した群において、非投与群に比べ有意差をもって血清アルブミン値が改善を認め、また生存率も骨髄細胞投与群で有意に改善を認めた。また骨髄細胞から肝細胞への分化過程において、肝の線維化の改善が有意に認められた。これらの結果は『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法（細胞療法）』は臨床応用可能な次世代の肝臓再生療法であるとともに、さらに肝硬変症の改善効果も発揮する可能性が示唆する。さらに効率のいい肝臓再生療法を開発するために、骨髄細胞から肝細胞への分化転換を制御する遺伝子グループについて DNA-chip を用いて解析した。その結果、骨髄細胞投与後 1 日目において既に HOX, HLH 型転写因子などが動いていた。また増殖因子について検討した結果、各種の増殖因子のうち FGF が最も骨髄細胞から肝細胞への分化に関与すると考えられた。またマウス胎児肝を用いて開発した Liv8 抗体は胎児肝の血球系細胞を認識することが明らかになり、さらにマウス成人骨髄中に Liv8 抗体陽性細胞が 30% 存在することが明らかになった。骨髄細胞を Liv8 陽性、陰性細胞群にわけ障害肝に移植した結果、Liv8 抗体陰性細胞群投与群において高率に肝細胞への分化転換が確認でき、この結果より骨髄中の Liv8 陰性細胞群が再生療法に有用な細胞群と考えられた。

分担研究氏名・所属機関及び所属機関における職名

坂井田 功（山口大学医学部消化器病態内科学講師）  
山崎 隆弘（山口大学医学部附属病院第一内科）  
寺井 崇二（山口大学医学部消化器病態内科学助手）

### A. 研究目的

C型肝炎の蔓延とともに近年肝炎が増加している。それとともに肝不全（肝硬変、肝癌、劇症肝炎）患者が増加している。現在肝不全患者に対しては日本においては生体肝移植が行われているが、手術侵襲の問題、ドナーの問題などまだまだ障害が多い。また今後高齢者を対象とした医療を行うには、より侵襲の少ない移植にかわる次世代の再生医療技術の開発が急務である。最近になり、人剖検例において骨髄中に存在する細胞が肝細胞へ分化転換したことが報告された。肝臓は胎児期において2次造血の場であるなど、その骨髄細胞から肝細胞への分化の可塑性は存在すると考えられる。我々は我々はその機序を解明し、さらに実際に人の治療に応用するために、新たに骨髄細胞から肝細胞への分化転換についてその分化転換の機序を解明するために、in vivo model を用い骨髄細胞から肝細胞への分化転換について評価した。またその骨髄細胞の肝細胞への分化に伴う、肝臓再生について評価した。またさらに効率のよい再生療法を開発するため、骨髄細胞から肝細胞への分化転換に影響を与える遺伝子群について評価した。一方新たに作成した胎児肝特異抗体を用いて骨髄中に存在する肝幹細胞分画について評価した。これらの研究は、今後我々が開発を目指す『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』の臨床開発、治験において重要な情報になると考え本研究を行った。

### B. 研究方法

GFP トランスジェニックマウスより全骨髄細胞を採取する。次に同種同系の C57BL/6 のマウスに対して、尾静脈より骨髄細胞を、 $1 \times 10^5$  個ずつ投与する。投与するマウスは、肝障害モデル群 (CC14 0.5 ml/kg, 週2回4週間投与し肝硬変状態にしたマウス) と正常モデル群とし、1週間ごとに GFP 陽性細胞の存在の有無を肝臓を摘出し検討した。同時にマウス胎児肝を抗原として、胎児肝を含むパラフィン切片の染色を指標にモノクローナル抗体のスクリーニングを行った。スクリーニングについては代表的なシグナル分子を欠損するノックアウトマウスを遺伝子の相同組換えを利用して作出した。その結果作成した肝芽細胞を特異的に認識する Liv2 抗体、胎児期の血球細胞を認識する Liv8 抗体を用いて骨髄細胞から肝細胞への分化転換の制御機構、また骨髄中に存在する肝幹細胞について MACS を用いて解析した。さらに骨髄細胞から肝細胞への分化転換の制御機構を明らかにするため DNA-Chip および各種増殖因子に対する Growth factor を用いて解析した。さらに骨髄細胞移植に伴う、肝臓再生能、肝臓の線維化の改善度、生存率について解析した。

### （倫理面への配慮）

山口大学動物委員会の承認の下、実験動物取り扱いプロトコールに従い実験は行われた。また実際の自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法は、ドナー細胞として自己骨髄細胞を使用する。また分離した骨髄細胞には分離後遺伝子操作、サイトカイン等は加えない。このため自己血輸血とほぼ同様の安全性で行えると考えられる。すでに我々は自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法について、山口大学医学部生命倫理委員会に安全性と有用性を申請し治験の認可を受けている。

## C. 研究結果

### 1. 骨髄細胞からの肝細胞への分化・増殖の評価モデルの開発 (骨髄細胞の投与による肝臓再生、また肝臓線維化改善)

Green Fluorescent Protein (GFP)トランスジェニックマウスより骨髄細胞を分離し、四塩化炭素の投与により持続肝障害を誘導した同種同系のマウスに尾静脈より投与し、骨髄細胞の肝細胞への分化を評価するモデルである。この持続肝障害時に、骨髄細胞の肝細胞への、肝臓の4分の1を占めるまで投与した骨髄細胞の分化が確認できた。また骨髄細胞の投与により血清アルブミン値の改善、肝線維化の改善を確認した。

### 2. 骨髄細胞から肝細胞への分化を制御する遺伝子群の解析

DNA-Chip を用いた解析で骨髄細胞投与1日後では、肝発生に関与する Helix-Loop-Helix 型転写因子である Paraxis や形態形成に関与する HOX 遺伝子の発現増加と眼の形成に関与する EYA 群の発現低下などが認められ、免疫染色による検討でも HOX 遺伝子や Paraxis の発現が認められた。骨髄細胞投与1週間後では、c-kit、FGF6、HNF3A などの肝発生に関与する遺伝子群が2倍から7倍程度に増加しており、また転写因子群として MyoD、MYF6 などの Helix-Loop-Helix 型転写因子群の発現が変動していた。また細胞の遊走に関与する分子として matrix metalloprotease(MMP)の変動が認められた。これらの結果は骨髄細胞の肝細胞への分化過程は、最初は基本的な発生に関与する遺伝子群が変動し次に肝細胞の分化に関与する遺伝子群が変動すると考えられた。また我々が同定し以前より解析していた HEM も変動していた。また骨髄細胞から肝細胞への分化過程に関与する増殖因子群としては FGF が最も関与すると考えられた。

### 3. 骨髄中の肝幹細胞の解析

Liv8 抗体は骨髄中の血球幹細胞を認識する。Liv8 陽性、陰性細胞の移植では、陰性群において高率に肝細胞への分化転換が確認でき、この結果より骨髄中の Liv8 陰性細胞群が再生療法に有用な細胞群と考えられた。

## D. 考察

今回我々の作成したモデル、また抗体を使った解析により、骨髄細胞投与により肝不全状態の機能が代償され、また有意差を持って肝機能が改善された。また生存率も有意差を持って改善した。一方で正常群においては骨髄細胞の肝臓への定着、肝細胞への分化は認めず、骨髄細胞を用いた肝臓再生には、持続炎症などの刺激が極めて重要と考えられた。この結果は肝芽細胞の増殖に SEK1 や MKK7 をなどの炎症性のシグナル伝達系が必須であることに一致する。これらの結果より、自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法においては、肝障害が持続的に続く非代償性肝硬変症の状態が適応症になると考えられた。またその分化転換の評価には、今回我々が開発した Liv2 抗体などが極めて有用と考えられた。また骨髄中に肝幹細胞群を認識する抗体であるが、Liv8 抗体などは、肝細胞に分化しない細胞群を分離する上においては極めて有用な抗体と考えられた。

## E. 結論

自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法は、非代償性肝硬変症などの炎症が続き肝不全状態が続く患者に対して適応があると考えられた。次年度は、臨床応用を念頭にすでに準備を進め、臨床応用を行っていくとともに、さらに今年度の研究を進めるとともに肝臓発生、再生のシステムの比較検討を行い、さらに効果のよい治療法の開発をめざす。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

寺井崇二、山本直樹、大森薫、坂井田功、仁科博史、沖田極「GFP/CC14 モデル：骨髄細胞から肝細胞への分化評価モデルの開発」日本再生医療学会(京都、4月18.19日、2002年) <口頭発表>

山本直樹、寺井崇二、大森薫、坂井田功、仁科博史、沖田極「骨髄細胞から肝細胞への分化過程における Liv 抗体陽性細胞の解析」日本再生医療学会(京都、4月18.19日、2002年) <口頭発表>

大森薫、寺井崇二、山本直樹、坂井田功、仁科博史、沖田極「骨髄細胞から肝細胞への分化制御に関する遺伝子群の検索」日本再生医療学会(京都、4月18.19日、2002年) <口頭発表>

寺井崇二、山本直樹、沖田極「骨髄細胞を用いた肝臓再生療法開発の基礎的検討」第88回日本消化器病学会総会 workshop：消化器の再生医療の現状(旭川、4月26日、2002年)

大森薫、木村輝昭、川口浩太郎、高見太郎、岡本真理子、寺井崇二、坂井田功、山口大学肝移植研究会、沖田極「生体部分肝移植で救命し得たB型劇症肝炎急性型の成人例」第86回日本内科学会中国地方会(2002年6月8日)

高見太郎、寺井崇二、山崎隆弘、坂井田功、沖田極「肝発癌に関与する転写制御分子 HEM の機能解析」第38回日本肝臓学会総会(2002.6 大阪) <口頭発表>

大森薫、寺井崇二、山崎隆弘、坂井田功、沖田極「骨髄細胞から肝細胞への分化制御に関する遺伝子群の解析」第38回日本肝臓学会総会(2002.6 大阪) <口頭発表>

山本直樹、寺井崇二、大森薫、坂井田功、仁科博史、沖田極「新規マウスモノクローナル抗体 Liv 抗体群および Maid 抗体を用いた肝幹細胞同定への試み」第38回日本肝臓学会総会(2002.6 大阪) <口頭発表>

高見太郎、寺井崇二、大森薫、山本直樹、山崎隆弘、坂井田功、沖田極「肝幹細胞の発生分化と肝発癌に関与する HLH 型転写制御分子 Human Homologue of Maid (HEM)」第61回日本癌学会総会(2002.10 東京) <口頭発表>

大森薫、木村輝昭、川口浩太郎、高見太郎、土屋昌子、山本直樹、岡本真理子、寺井崇二、坂井田功、山口大学肝移植研究会、沖田極「山口大学医学部付属病院における生体肝移植の現状」第19回中・四国肝臓病研究会(2002年9月21日)

寺井崇二、山本直樹、大森薫、坂井田功、渡辺智美、

大畑慎也、堅田利明、仁科博史、沖田極「骨髓細胞を用いた肝臓再生療法の開発を目指して-GFP/CC14 モデルの開発と解析および骨髓細胞中の幹細胞の同定法」第61回日本癌学会総会(東京国際フォーラム、10月1日から3日)再生医療ポスター

寺井崇二「骨髓細胞を用いた肝臓再生療法の開発」シンポジウム:抗体細胞療法の新展開 第18回日本 Drug Delivery System学会(札幌、6月21,22日、2002年)

寺井崇二、山本直樹、大森薫、内田耕一、坂井田功、大畑慎也、渡辺智美、仁科博史、沖田極「骨髓由来幹細胞を用いた肝再生医学」workshop:肝再生医学に最適な細胞源を考える 第9回肝細胞研究会(秋田、7月12、13日、2002年)

Shuji Terai, Naoki Yamamoto, Kaoru Omori, Koji Miyamoto, Isao Sakaida, Tomomi Watanabe, Shinya Ohata, Hiroshi Nishina, Toshiaki Katada, Snorri S. Thorgeirsson, Kiwamu Okita  
GFP/CC14 model; An new in vivo model for monitoring the differentiation of bone marrow cell into hepatocytes.  
2002 FASEB Summer Research Conference" Mechanism of liver growth, differentiation and molecular pathogenesis of hepatic disease. (July 27-August1, 2002, Snowmass, Colorado, USA). <Invited Speaker.>

Tarou Takami, Shuji Terai, Kotarou Kawaguchi, Haruko Tanimoto, Masako Tsuchiya, Kaoru Omori, Kouichi Uchida, Takahiro Yamasaki, Fumie Kurokawa, Isao Sakaida, Hiroshi Nishina, Snorri S. Thorgeirsson, Kiwamu Okita  
HHM: A dominant inhibitory HLH protein which regulates hepatic stem cell activation and liver carcinogenesis.  
2002 FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES (2002.8 Colorado, USA) <示説発表>

Kaoru Omori, Shuji Terai, Naoki Yamamoto, Koji Miyamoto, Isao Sakaida, Tomomi Watanabe, Shinya Ohata, Hiroshi Nishina, Toshiaki Katada, Snorri S. Thorgeirsson, Kiwamu Okita  
Gene expression profiles during the differentiation of bone marrow cell into hepatocyte in GFP/CC14 model.  
2002 FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES(2002.8 Colorado, USA) <示説発表>

Naoki Yamamoto, Shuji Terai, Kaoru Omori, Koji Miyamoto, Isao Sakaida, Tomomi Watanabe, Shinya Ohata, Hiroshi Nishina, Toshiaki Katada, Snorri S. Thorgeirsson, Kiwamu Okita  
Characterization of bone marrow cells using new monoclonal antibody, Liv8.  
2002 FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES(2002.8 Colorado, USA) <示説発表>

高見太郎、寺井崇二、川口浩太郎、大森薫、山本直樹、瀬川誠、内田耕一、菅野幸三、坂井田功、沖田極「肝臓の発

生分化と肝発癌に関与する HLH 型転写制御分子, Human Homologue of Maid(HHM)」第5回肝発癌とその制御研究会(2002.8 東京) <一般演題>

高見太郎、寺井崇二、横山雄一郎、田島邦彦、谷本浩子、山本直樹、内田耕一、木村輝昭、山崎隆弘、黒川典枝、坂井田功、沖田極「肝幹細胞の発生分化と肝発癌に関与する HLH 型転写制御分子 Human Homologue of Maid (HHM)」第66回オンコロジーセミナー(2002.12 宇部) <一般演題>

寺井崇二「自己骨髓細胞を用いた肝臓再生療法の開発への戦略」第2回GIリサーチフォーラム(講演)(仙台、9月6日)

寺井崇二、山本直樹、沖田極「骨髓細胞を用いた肝臓再生療法開発のためのストラテジー」第6回日本肝臓学会大会、肝再生医学の現状と展望(横浜、10月25日)

寺井崇二、坂井田功、沖田極「自己骨髓細胞を用いた再生療法の開発を目指して」シンポジウム11. 消化器領域における再生医療の現状と展望(横浜、10月25日)

坂井田功、寺井崇二、沖田極「骨髓移植による肝線維化治療の試み」シンポジウム5. 肝線維化治療のストラテジー(横浜、10月25日)

大森薫、寺井崇二、坂井田功、沖田極「骨髓細胞から肝細胞への分化制御に関する遺伝子群の検索」DDW-Japan 合同プレナリー(横浜、10月25日)

Sakaida I., Terai S., Yamamoto N., Kawaguchi K., Takami T., Tsuchiya M., Miyamoto K., Uchida K., Okita K. Transplantation of bone marrow cells reverse CC14-induced liver fibrosis. Presidential Plenary AASLD (Nov,2002, Boston, USA).

Omori K., Terai S., Yamamoto N., Kawaguchi K., Takami T., Tsuchiya M., Miyamoto K., Uchida K., Sakaida I., Ohata S., Watanabe T., Nishina H., Snorri S. Thorgeirsson, Okita K. Gene expression profile which regulate the differentiation of bone marrow cell into hepatocyte in GFP/CC14 model. AASLD, Poster Presentation, Experimental Transplantation (Nov,2002, Boston, USA)

Terai S., Yamamoto N., Omori K., Kawaguchi K., Takami T., Tsuchiya M., Miyamoto K., Uchida K., Sakaida I., Ohata S., Watanabe T., Nishina H., Snorri S. Thorgeirsson, Okita K. The strategy for development of cell therapy using bone marrow cell to repair damaged liver. AASLD, Poster Presentation, Experimental Transplantation (Nov,2002, Boston, USA)

- Yamamoto N., Terai S., Omori K., Kawaguchi K., Takami T., Tsuchiya M., Miyamoto K., Uchida K., Sakaida I., Ohata S., Watanabe T., Nishina H., Snorri S. Thorgeirsson, Okita K. Liv8 mAb: A new murine monoclonal antibody separate hepatic stem cell population in bone marrow. AASLD, Poster Presentation, Experimental Transplantation (Nov,2002, Boston, USA)
- Sakaida I., Terai S., Yamamoto, N., Omori K., Kawaguchi K., Tsuchiya M, Uchida K., Okita K. Herbal medicine Inchin-ko-to(TJ-135) prevents liver fibrosis and enzyme-altered lesion in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid defined diet. AASLD, Poster Presentation, (Nov,2002, Boston, USA)
- Tsuchiya M., Sakaida I, Omori K, Kawaguchi K, Yamamoto N, Okamoto M, Uchida K, Terai S, Okita K. Regulation of collagen and matrix metalloproteinase expression by MAP kinase signal pathway in stellate cell. AASLD, Poster Presentation, (Nov,2002, Boston, USA)
- Shuji Terai. The strategy for the development of cell therapy using bone marrow cells to repair damaged liver. Guest Speaker. LEC seminar (NIH, Nov. 5th, 2002, USA)
- Terai, S., Sakaida I., Nishina H., Okita K. The strategy for the development of cell therapy using bone marrow cell to repair damaged liver. Growth/Differentiation of hepatocyte/HCC. 14th Yamaguchi Symposium on liver disease. (Yamaguchi, Dec 7-8, 2002)
- Terai S., Yamamoto N., Omori K., Kawaguchi K., Takami T., Tsuchiya M., Miyamoto K., Uchida K., Sakaida I., Ohata S., Watanabe T., Nishina H., Snorri S. Thorgeirsson, Okita K. The strategy for development of cell therapy using bone marrow cell to repair damaged liver. AASLD, Poster Presentation, Experimental Transplantation (Nov,2002, Boston, USA)
- Shuji Terai. The strategy for the development of cell therapy using bone marrow cells to repair damaged liver. Guest Speaker. LEC seminar (NIH, Nov. 5th, 2002, USA)
- 寺井崇二、山本直樹、大森薫、坂井田功、渡辺智美、大畑慎也、堅田利明、仁科博史、沖田極「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法開発のための戦略」workshop：肝形成の分子メカニズムと医学への応用（横浜、12月13日）
- 大森薫、寺井崇二、坂井田功、沖田極「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法開発のための基礎的検討」第15回肝再生研究会（2002年12月13日）
- 大森薫、寺井崇二、青山浩司、石川剛、山本直樹、坂井田功、仁科博史、沖田極「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の臨床応用のための基礎的解析」
- 10：国際科学振興財団フォーラム・第10回浜名湖シンポジウム（2002年12月22.23日）
- 寺井崇二、坂井田功、仁科博史、沖田極「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法開発への戦略」シンポジウム幹細胞の可塑性を問う 第2回日本再生医療学会総会（神戸、2003年3月11, 12日）
- 寺井崇二、山本直樹、大森薫、石川剛、坂井田功、渡辺智美、大畑慎也、仁科博史、沖田極「骨髄由来幹細胞を用いた肝臓再生療法開発のための基礎的検討」第2回日本再生医療学会総会（神戸、2003年3月11, 12日）workshop：組織幹細胞を用いた消化腺上皮への分化転換と再生医療への展開
- （論文、雑誌等の発表）  
（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）
- Terai S., Yamamoto N., Omori K., Sakaida I., Kiwamu Okita New cell therapy using bone marrow cell to repair damaged liver. *J Gastroenterology* 37(Suppl XIV), 162-163 (2002).
- Shirahashi H, Sakaida I, Terai S, Hironaka K, Kusano N, Okita K. Ubiquitin is a possible new predictive marker for the recurrence of human hepatocellular carcinoma. *Liver* 2002 Oct;22(5):413-8
- Omori K, Terai S, Yamamoto N, Sakaida I, Nishina H, Okita K. Gene expression profile which regulates the differentiation of bone marrow cell into hepatocyte in GFP/CC14 model. *Hepatology* 36, 199A, 2002
- Terai S., Yamamoto N., Omori K., Kawaguchi K., Takami T., Tsuchiya M., Miyamoto K., Uchida K., Sakaida I., Ohata S., Watanabe T., Nishina H., Snorri S. Thorgeirsson, Okita K. The strategy for development of cell therapy using bone marrow cell to repair damaged liver. *Hepatology* 36, 200A, 2002
- Yamamoto N., Terai S., Omori K., Kawaguchi K., Takami T., Tsuchiya M., Miyamoto K., Uchida K., Sakaida I., Ohata S., Watanabe T., Nishina H., Snorri S. Thorgeirsson, Okita K. Liv8 mAb: A new murine monoclonal antibody separate hepatic stem cell population in bone marrow. *Hepatology* 36, 200A, 2002
- Sakaida I., Terai S., Yamamoto N., Kawaguchi K., Takami T., Tsuchiya M., Miyamoto K., Uchida K., Okita K. Transplantation of bone marrow cells reverse CCl4-induced liver fibrosis. *Hepatology* 36, 295A, 2002

Sakaida I., Terai S., Yamamoto, N., Omori K., Kawaguchi K., Tsuchiya M, Uchida K., Okita K. Herbal medicine Inchin-ko-to (TJ-135) prevents liver fibrosis and enzyme-altered lesion in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid defined diet. Hepatology 36, 252 A, 2002

Tsuchiya M., Sakaida I, Omori K, Kawaguchi K, Yamamoto N, Okamoto M, Uchida K, Terai S, Okita K. Regulation of collagen and matrix metalloproteinase expression by MAP kinase signal pathway in stellate cell. Hepatology 36, 262 A, 2002

Terai S. Sakaida I, Okita K et al. Development of new regenerative model: transplanted GFP positive bone marrow cell migrated into damaged area and differentiated into hepatocyte. Hepatology 34:4:235A, 2001

Terai S., Thorgeirsson SS  
Human homologue of p53: A dominant inhibitory helix-loop-helix protein associated with liver-specific gene expression. Hepatology;32(2):357-66, 2000

Sakaida I, Tsuchiya M, Kawaguchi K, Kimura T, Terai S, Okita k. Herbal medicine Inchin-ko-to (TJ-135) prevents liver fibrosis and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. J Hepatol (in press)

Sakaida I, Hironaka K, Terai S, Okita K Gadolinium chloride reverses dimethylnitrosamine (DMN)-induced rat liver fibrosis with increased matrix metalloproteinases (MMPs) of Kupffer cells. Life Sci. 2003;72:943-959.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

1) 寺井 崇二, 沖田 極  
骨髄細胞の遊走・分化・増殖評価モデル動物およびその利用法 特許出願 特願2001-271240号

2) 坂井田 功, 沖田 極  
特許出願2002-377803: 肝癌発生、進展抑制剤

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

本研究プロジェクトで作製された抗Liv2抗体とMAPキナーゼ関連分子特異抗体が、2002年7月より（株）生物医学研究所から発売されている。

#### 研究要旨

胎児肝特異的なモノクローナル抗体のスクリーニングとシグナル伝達に関わる分子を欠損するマウスの作出を行い、肝芽細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体 Liv2 と肝形成不全マウス SEK1 および MKK7 ノックアウトマウスを得ることに成功した。また、これらを用いた研究から、肝芽細胞の増殖を定量的に測定すること、増殖に SEK1 や MKK7 を介するシグナル伝達系が必須であることが明らかとなった。

#### A. 研究目的

胎児期に存在する増殖能と分化能を有する肝幹細胞である肝芽細胞を特異的に認識する抗体を得ることと肝芽細胞の増殖に関わる細胞内シグナル伝達系を明らかにすることを目的とする。

#### B. 研究方法

マウス胎児肝を抗原として、胎児肝を含むパラフィン切片の染色を指標にモノクローナル抗体のスクリーニングを行った。また、代表的なシグナル分子を欠損するノックアウトマウスを遺伝子の相同組換えを利用して作出した。

（倫理面への配慮）

東京大学動物委員会の承認の下、実験動物取り扱いプロトコルに従い実験は行われた。

#### C. 研究結果

胎児肝領域を特異的に認識する抗体が複数単離された。このうち抗 Liv2 抗体は肝芽細胞を特異的に認識し、抗 Liv8 抗体は血球起源の細胞を認識することが明らかとなった。更にこれら抗体をツールにして、肝形成不全ノックアウトマウスの解析を行い、肝芽細胞は二次造血とは独立して発生すること、肝芽細胞の増殖には SEK1 や MKK7 などの MAP キナーゼ系の分子が必須の役割を果たしていることが明らかとなった。

#### D. 考察

肝芽細胞特異的抗体や血球起源の細胞を認識するモノクローナル抗体を用いて、発生期の肝幹細胞である肝芽細胞の同定とその分離が可能となり、肝芽細胞の増殖の分子機構が明らかとなった。同様に、再生医療への期待が高まっている骨髄中の肝細胞へ分化誘導可能な細胞の同定や分離、増殖の分子機構の解明に利用できると思われる。

#### E. 結論

発生期の肝幹細胞である肝芽細胞の同定・分離法の開発や増殖・分化の分子機構の解明は、成体に存在する肝幹細胞の同定・分離や増殖・分化誘導法に基づく再生療法の開発に有効である。

#### F. 健康危険情報

特に無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kitagawa, D. et al. Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase by Ultraviolet Is Mediated Through Src-dependent Epidermal Growth Factor Receptor Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* (2002) 277, 366-371

Yamamoto, A. et al. Possible Involvement of I $\kappa$ B Kinase 2 and MKK7 in Osteoclastogenesis Induced by Receptor Activator of Nuclear factor  $\kappa$ B Ligand. *J. Bone Miner. Res.* (2002) 17, 612-621

Watanabe, T. et al. SEK1/MKK4-mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF- $\kappa$ B-induced anti-apoptosis. *Dev. Biol.* (2002) 250, 332-347

Takayanagi, H. et al. Induction and Activation of the Transcription Factor NFATc1 (NFAT2) Integrate RANKL Signaling. *Dev. Cell* (2002) 3, 889-901

仁科 博史、渡辺 智美、大畑 慎也、浅香 聡、堅田 利明 初期肝形成のシグナル伝達機構  
肝胆膵 2003, 295-302

##### 2. 学会発表

H. Nishina, H. Kishimoto, K. Nakagawa, & T. Katada: Different regulation of stress-induced activated protein kinase SAPK/JNK by SEK1 and MKK7 in murine embryonic stem cells. Cell Signaling, Transcription and Translation as Therapeutic Targets, ルクセンブルグ, Luxembourg (2002年1月)

T. Watanabe, H. Nishina, & T. Katada: SEK1/MKK4-mediated SAPK/JNK Signaling Participates in Embryonic Hepatoblast Proliferation via a Pathway Different from NF- $\kappa$ B-induced Anti-apoptosis. 2002 FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES, 米国, コロラド (2002年7月)

仁科 博史、中川 健太郎、西鉢 元、北川 大樹、渡辺 智美、堅田 利明；SEK1 と MKK7 による協調的な SAPK/JNK の活性化機構とその生理的意義（口頭発表）[第25回]



本分子生物学会大会シンポジウム；2002年12月／横浜]

渡辺 智美、大畑 慎也、浅香 聡、仁科 博史、堅田 利明；  
マウス胎児肝細胞特異的モノクローナル抗体の作製とその  
利用（口頭発表）[第25回日本分子生物学会大会シン  
ポジウム；2002年12月／横浜]

Apoptosis, カナダ国、バンフ（2003年2月）H. Nishina,  
K. Nakagawa, D. Kitagawa, G. Nishitai, and T. Katada :  
Cooperative SAPK/JNK Activation by SEK1/MKK4 and MKK7:  
SAPK/JNK Activation Is Not Linked to Stress-induced  
Apoptosis in Embryonic Stem Cells. 2003 Keystone  
Symposia, Molecular Mechanism of Apoptosis.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

本研究プロジェクトで作製された抗Liv2抗体とMAPキナー  
ーゼ関連分子特異抗体が、2002年7月より（株）生物医学  
研究所から発売されている。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Terai S., Thorgeirsson S.S., Okita K.	HIM: a dominant inhibitory Helix Loop Helix protein which associated with liver stem cell and liver development.	Okita K.	Frontier in Hepatology (Growth, Proliferation and Apoptosis in Hepatocyte)	Springer Verlag	Tokyo	2001	1-9
高見太郎、寺井崇二、山崎隆弘、坂井田功、沖田極	肝細胞癌の病態と診断	戸田 剛太郎	消化器 Annual Review	中外医学社	東京	2003	285-288
Terai S., Sakaida I., Yamamoto N., Omori K., Nishina H.	The strategy for development of cell therapy using bone marrow cell to repair damaged liver	Okita K	Frontier in Hepatology Growth, / differentiation and hepatocyte and HCC	Springer Verlag	Tokyo	(in press)	

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版社名
寺井崇二、坂井田功、高見太郎、内田耕一、白橋斉、山本直樹、大森薫、川口浩太郎、宮本康嗣、沖田極	肝発癌に關与する転写制御分子 HIM	第4肝発癌とその制御研究会—湯沢シンポジウム—医学と薬学	47(Suppl.), 2002	4-7	自然科学社
山本直樹、寺井崇二、大森薫、高見太郎、坂井田功、沖田極	骨髓細胞を用いた肝臓再生療法の開発を目指して 再生・増殖・分化と消化器病	第9回浜名湖シンポジウム	2002	22-27	アークメディア
寺井崇二、山本直樹、大森薫、坂井田功、沖田極	骨髓由来幹細胞を用いた肝臓再生療法	肝胆臓	46(3), 2003	365-369	アークメディア

20020832

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
P.8の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。