

厚生労働科学研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

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 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 沖田 極

平成 16 (2004) 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 ----- 7

仁科 博史

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 9

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 10

研究要旨

我々は『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』の臨床開発を進めるため、5年前より基礎研究を始め、既に Green Fluorescent Protein (GFP) トランスジェニックマウスを用い骨髄細胞からの肝細胞への分化増殖の in vivo 評価モデルを世界に先駆け開発した (GFP/CC14 モデル)。このモデルにおいては、持続的な四塩化炭素 (CC14) 投与による肝障害時に、骨髄細胞から肝細胞への分化・増殖が確認され、骨髄細胞投与後、肝臓内の骨髄細胞は最大 25% まで増加し、肝細胞索構造を構築した (特願 2001-271240 号、特公 2003-70377, J. Biochem. 134:551-558, 2003)。このモデルでは、骨髄細胞投与により、血清アルブミン値の回復、生存率も有意に骨髄細胞の非投与群に比べ有意差を持って改善していた。また肝線維化も有意に改善していた。これらのことは自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法は臨床応用可能な次世代の再生療法になりえると考えられた。一方肝発生を分子レベルで解析することを目的として、胎児肝特異的な分子マーカーを単離する目的で、胎生期 11.5 日 (E11.5) のマウス肝を抗原にして複数のモノクローナル抗体を作製した。抗 Liv2 と命名した抗体は、マウス発生期に出現する肝幹細胞である肝芽細胞を特異的に認識する。これを用いて肝形成不全となる SEK1, MKK7, c-Jun ノックアウトマウスや血液幹細胞を欠損する AML1 ノックアウトマウスの解析を行い、1) 初期肝は造血とは独立して形成されること、2) SEK1, MKK7→SAPK/JNK→c-Jun シグナル系が肝芽細胞の自己複製と生存維持に必須の役割を果たしていること、3) 肝芽細胞の増殖には肝細胞増殖因子 (HGF) 以外の因子が必須であることを見出した (Dev. Biol. 250, 332-347, 2002)。また抗 Liv8 抗体は、大動脈・生殖隆起・中腎 (AGM) 領域の血管内皮細胞や胎児肝領域に流入する血液幹細胞に加え、成体骨髄中の細胞も認識することから、胎児肝における二次 (成体型) 造血や成体の造血の場である骨髄を解析する有用なツールになることが期待された。骨髄中の 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 (BBRC 313:1110-1118, 2004)。以上の基礎研究をベースに 2001 年 12 月に、『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』の臨床研究について、山口大学医学部生命倫理委員会に、安全性・有用性を申請し臨床研究の認可を受けた。すでに NHK 等の報道機関において報道されたが、平成 15 年 11 月 14 日に 69 歳男性に対して国内最初の『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』の Phase I 臨床研究を開始した。平成 16 年 3 月 31 日現在のところ合計 4 症例に対し臨床研究を行っている。今後は Phase I 臨床研究を安全性について十二分に検討しながら臨床研究を推進し、基礎研究を両輪としたトランスレーショナルリサーチをさらに推進していく。

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助手)
寺井 崇二 (山口大学医学部消化器病態内科学助手)

骨髄細胞から肝細胞への分化転換について評価した。またトランスレーショナル研究の一環として、基礎研究を基盤にし、臨床研究『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』の Phase I 臨床研究の行うべく準備を行い今年度より開始した。

A. 研究目的

C型肝炎の蔓延とともに近年肝炎患者が増加している。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。ま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、GFP/CC14 model を用い骨

B. 研究方法

※骨髄細胞の肝細胞への分化に関与する遺伝子群の解析
効率的な骨髄細胞の肝細胞への分化制御機構を解析するために、すでに開発した GFP/CC14 モデルの解析を通じて、骨髄由来幹細胞の肝細胞への分化過程に関与する遺伝子群を同定する。DNA chip を用いた Micro array により遺伝子発現のプロファイリングを行い、さらに統計学的理論の一つである Self Organization Map (SOM) 解析を用い遺伝子群を抽出する。また Subtractive PCR の手法を用いて、GFP/CC14 model で発現し Control で認められない遺伝子、あるいはその逆の遺伝子を検索し、骨髄細胞から肝細胞への分化に重要な特徴的な遺伝子群の同定を目指した。
※骨髄細胞の肝細胞への分化に関与する細胞外マトリックスの解析と肝線維化改善効果に対する解析

骨髄細胞の投与により、肝線維化の改善が認められたことより、この機序についてさらに解析する。実際にMMP 9の発現が増加していたことよりさらに In situ zymography を行い肝線維化改善について評価した。

※胎児肝特異抗体の認識する抗原分子の同定

既に作製済みの10種類以上の胎児肝を認識するモノクローナル抗体のうち、肝芽細胞を特異的に認識する抗 Liv2 抗体と血液幹細胞を含む細胞を認識する抗 Liv8 抗体が認識する抗原分子の遺伝子クローニングを、胎生期 11.5 日の胎児肝から調製したタンパク質発現型の cDNA ライブラリーより行う。肝芽細胞特異抗体のスクリーニングは引き続き行う。特に Liv8 抗体の抗原については、骨髄中の肝幹細胞の同定に使用できる抗体になりえるかを評価した。

※骨髄細胞の肝細胞への分化に関与する炎症性シグナル、免疫因子の解析

我々の検討では骨髄細胞の肝細胞への分化は、持続炎症存在下にて起こっている。この因子の解析のため、我々は TNF-alpha Type1 receptor KO mice, TB 細胞の存在しない Rag2 KO mice に対して移植実験を行う。

※肝芽細胞増殖因子の同定

肝形成不全ノックアウトマウスの解析から明らかになった未同定な肝芽細胞増殖因子を、新たに確立した肝芽細胞培養法を用いて同定する。この解析は将来、骨髄細胞の肝細胞への分化を効率的に誘導する因子の発見を目指した。

※肝芽細胞の分離・培養法の確立

抗 Liv2 抗体が既に大量に調製されているので、肝芽細胞の同定は容易になった。共存する血球細胞を TER119 等の抗体を用いて除去することを検討中であり、活力のある細胞を短時間で高純度で分離する。また、定量的なアッセイが可能なベレット培養法を用いて、この分離された肝芽細胞を初代培養する。各種の阻害剤を用いて細胞増殖や分化に関わるシグナル伝達経路を生化学的に解析した。

臨床研究

今回の臨床研究では、この非代償性肝硬変症を対象患者として行った。実際には自己骨髄細胞を 400ml 分離し、末梢静脈より投与する。濃縮器 cell プロセッサ、サイトメイトを使用し骨髄細胞を濃縮し、患者の静脈より投与する、毎週血液検査を施行し、肝不全の発生についてモニターしていく。また画像的にも腹部エコー検査等にて、肝再生の促進の有無について評価する。また短期間の副作用の出現について注意するとともに、1ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月ごとの肝機能に対する改善について評価していく。基本的には Phase I の臨床研究であり安全性について十分注意する。また可能であれば、患者の同意の上、エコー下肝生検を行い肝臓の状態について、組織学的検討していく。また c-kit, CD34, HHM, Liv2, AFP 染色抗体を用い免疫染色を行い、実際に骨髄細胞が肝細胞に分化しているかを、また肝線維化の改善の有無については、

AZAN 染色, シリウスレッド染色, alpha-smooth actin, MMP, TIMP 等の免疫染色・特殊染色にて等で評価していく。

(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。すでに我々は自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の臨床研究について、山口大学医学部生命倫理委員会にプロトコールを申請し臨床研究の承認を受けている。また臨床研究に参加希望の患者さんに対しては、基本的には Phase I の安全性試験であるということ十分に本人、患者家族に説明の上インフォームドコンセントを取得のちに行うこととした。

C. 研究結果

*国内初の自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の Phase I 臨床研究の開始 (平成 15 年 11 月 14 日)

既に平成 13 年 12 月に、『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』の臨床治験について、山口大学医学部生命倫理委員会に、安全性・有用性を申請し臨床研究の認可を受けた。平成 14 年よりは実際に臨床研究を行うための細胞療法部関連の設備、器具を整え、臨床研究の準備を行ってきた。平成 15 年 11 月 14 日、国内第 1 例目の自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の第 1 相試験を開始した。非代償性肝硬変症の 69 歳の男性に対し全身麻酔下にて自己骨髄細胞を 400ml 採取、洗浄後有核細胞を 4×10^9 個を末梢血管から投与し肝臓の再生の誘導の有無について評価した。術中特に大きな合併症もなく、術後血液検査にて骨髄細胞の肝再生に与える影響について評価した。その結果血清アルブミン値は、術前 2.5g/dl であったものが最大 3.2 g/dl まで改善、また腹水も減少し、利尿剤の投与量の減量に成功した。さらに肝の線維化改善効果も含め、第 1 例目の経過を慎重に観察するとともに、平成 16 年 3 月 31 日現在、合計 4 症例に対して臨床研究を推進し、同様の経過観察を行っている。今後安全性について十分に評価しながら臨床研究を推進する。

*骨髄細胞からの肝細胞への分化・増殖の評価モデル (GFP/CC14 モデルの開発)

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は分化が確認できた。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 (特願 2001-271240 号、特公 2003-70377, J. Biochem. 134:551-558, 2003)。

*骨髄細胞の肝細胞への分化に伴う肝線維化の改善

GFP/CC14model において骨髄細胞の肝細胞への分化とともに、シリウスレッド染色で評価した肝線維化が改善していた。この結果は骨髄細胞の投与による肝再生に伴う肝線維化改善というあらたな可能性を示した (Hepatology revised)。

*胎児肝特異的モノクローナル抗体の作成

胎児肝特異的な分子マーカーを単離する目的で、胎生期 11.5 日 (E11.5) のマウス肝を抗原にして複数のモノクローナル抗体を作製してきた。抗 Liv2 と命名した抗体は、マウス肝芽細胞を特異的に認識する。 (Dev. Biol. 250, 332-347, 2002)。抗 Liv8 抗体は、大動脈・生殖隆起・中腎 (AGM) 領域の血管内皮細胞や胎児肝領域に流入する血液幹細胞に加え、成体骨髄中の細胞も認識する。また骨髄中の Liv8 抗体陰性分画は肝幹細胞の分画を含む可能性が明らかになった (BBRC313:1110-1118, 2004)

D. 考察

1. 基礎研究について

骨髄中に肝幹細胞の同定、また分化転換の目的のため、骨髄細胞から肝細胞への in vivo 分化評価モデル (GFP/CC14 MODEL) を開発しさらに詳細に解析した。このモデルの解析は、骨髄細胞から肝細胞への分化制御機構の解析において有用なモデルと考えられる。このモデルについてはアメリカ肝臓病学会誌 Hepatology 39(4), 2004:1143-1146 において大きく取り上げられ今後、骨髄細胞を用いた肝臓再生研究についての可能性についてあらためて議論を提起した。また我々が作成した胎児肝モノクローナル抗体 Liv8 抗体を用いて、我々が開発した GFP/CC14 モデルを使って解析することで、骨髄に存在する肝幹細胞は主に Liv8 陰性分画に存在することがほぼ明らかになった。現在この Liv8 抗体の認識する抗原の同定を目指した研究を行っている。この抗原が決定できれば、人骨髄細胞より肝幹細胞分離法の開発につながると考えられる。さらに実際に骨髄細胞投与群において、生存率また肝線維化の改善を認めた。これらの結果は、非代償性肝硬変症などに対する線維化改善療法としての『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』の臨床応用への可能性を強く示唆した。またこのモデルの解析は、骨髄細胞を用いた肝線維化制御という重要な問題の解明に役立つ。

2. 臨床研究『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』

基礎研究を基盤にし、実際の臨床研究への準備を行ってきた。十分に準備、実際の臨床の現場でのシュミレーションを行った上、平成 15 年 11 月 14 日より自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の Phase I 臨床研究を開始した。現在 4 症例を経験した。現時点においては、安全性評価の Phase I 研究であるが、現在までの検討で被験者の肝機能は改善傾向を認めており、現在生体肝移植以外に根本的な治療法のない、末期肝硬変、肝不全患者に対する、移植に代わる再生療法の一つになる可能性がある。今後症

例を重ね Phase I で有効性が確認されたならば、さらに多施設の臨床研究を行い、次世代の再生療法の開発を目指す。

3. トランスレーショナル研究の推進

今後は基礎研究も、臨床研究と併せ行っていく、再生医療のための基盤技術の開発を進める。また基礎研究を通じて骨髄細胞から肝細胞への分化制御機構の解析を通じてさらに膵臓、小腸再生療法への応用可能な技術の開発の可能性もある。また発生期の肝幹細胞である肝芽細胞に関わるツールや知見は、成体に存在する肝幹細胞の同定・分離や培養法の開発に有効であり、今後期待される再生療法の開発に活用可能と考えられる。

E. 結論

我々は基礎研究を基盤とし、Phase I 臨床研究を推進している。

今後は基礎、臨床研究を基盤とした『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』を推進し、次世代に有効な治療法とするべく研究を推進していく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

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の開発への戦略」第 2 回日本再生医療学会 (神戸、3 月) <シンポ 11: 幹細胞の可塑性を問う>

寺井崇二、坂井田功、仁科博史、沖田極「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 2 回日本再生医療学会 (神戸、3 月) <workshop: 組織幹細胞を用いた消化腺上皮の分化転換と再生医療への応用>

石川剛、寺井崇二、青山浩司、大森薫、山本直樹、坂井田功、仁科博史、沖田極「骨髄細胞の肝細胞への分化・増殖メカニズムと増殖因子の関連性」第 2 回日本再生医療学会総会 (神戸、3 月) <一般演題・口演>

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の臨床開発のために基礎的検討」第 89 回日本消化器病学会総会 (埼玉、4 月) <シンポジウム: 消化器疾患における再生医療の展望>

弘中孝治、山崎隆弘、沖田極「進行肝細胞癌に対する low dose FP (5-FU+CDDP) の Biochemical modulator (leucovorin, isovorin) 併用による動注化学療法の有効性」第 89 回日本消化器病学会総会 (埼玉、4 月) <パネルディスカッション: 肝細胞癌の治療: EBM に基づいた体系の確立>

山崎隆弘、黒川典枝、沖田極「肝細胞癌に対する経皮的ラジオ波凝固療法」の当科における工夫」第65回日本消化器内視鏡学会総会(福岡、5月)〈パネルディスカッション:肝細胞癌局所治療:腹腔鏡か、経皮的か〉

寺井崇二、坂井田功、仁科博史、沖田極
骨髄由来、胆管由来の肝幹細胞の発生分化に関する検討
第39回日本肝臓学会総会(福岡、5月)〈シンポジウム:肝幹細胞研究のアップデート〉

高見太郎、寺井崇二、横山雄一郎、田島邦彦、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「HHMは肝発癌の初期に誘導され増殖を促進する」第39回日本肝臓学会総会(福岡、5月)〈口頭発表〉

石川剛、寺井崇二、青山浩司、大森薫、山本直樹、坂井田功、沖田極「FGFは骨髄細胞の肝細胞への分化・増殖を促進する。」第39回日本肝臓学会総会(福岡、5月)〈一般演題・口演〉

大森薫、寺井崇二、松本しのぶ、石川剛、青山浩司、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に関与する遺伝子群についての解析」第39回日本肝臓学会総会(福岡、5月)〈一般演題・口演〉

青山浩司、坂井田功、石川剛、田島邦彦、横山雄一郎、大森薫、川口浩太郎、高見太郎、土屋昌子、山本直樹、寺井崇二、沖田極「骨髄細胞移植による肝繊維化治療の検討」第39回日本肝臓学会総会(福岡、5月)〈一般演題・口演〉

大森薫、寺井崇二、松本しのぶ、石川剛、青山浩司、坂井田功、仁科博史、沖田極「骨髄細胞から肝細胞への分化に関与する遺伝子群についての解析」肝細胞研究会(7月)

Taro Takami, Shuji Terai, Yuichiro Yokoyama, Kunihiro Tajima, Katunori Harada, Kotaro Kawaguchi, Masako Tsuchiya, Kaoru Omori, Kouichi Uchida, Takahiro Yamasaki, Fumie Kurokawa, Isao Sakaida, Snorri S. Thorgeirsson and Kiwamu Okita「HHM; A dominant inhibitory HLH protein, which regulates hepatic stem cell activation and hepatocarcinogenesis.」94th AACR, American Association for Cancer Research, Annual Meeting 2003(Washington D.C. July)〈Poster presentation〉

Tsuyoshi Ishikawa, Shuji Terai, Kouji Aoyama, Kaoru Omori, Isao Sakaida, Hiroshi Nishina, Kiwamu Okita「Fibroblast growth factors enhance the trans-differentiation and proliferation of bone marrow cells into hepatocytes.」54th Annual Meeting

of the American Association for the Study of Liver Diseases (2003.10 Boston)〈Parallel session, Oral presentation〉

Sakaida I, Uchida K, Terai S, Okita K.「Leptin receptor-deficient zucker (FA/FA) rat retards the development of pig-serum induced liver fibrosis with kupffer cell dysfunction.」54th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (2003.10 Boston)〈Parallel session, Oral presentation〉

Sakaida I, Aoyama K, Yamamoto N, Ishikawa T, Omori K, Terai S, Nishina H, Okita K, Transplantation of「Liv8-negative fraction of bone marrow cell reverse CCl4-induced liver fibrosis.」54th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (2003.10 Boston)〈Parallel session, Oral presentation〉

Sakaida I, Kimura T, Omori K, Terai S, Okita K.「Cytochrome-c is the possible new marker for the patient with acute liver failure.」54th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (2003.10 Boston)〈Poster presentation〉

寺井崇二、高見太郎、山崎隆弘、黒川典枝、坂井田功、沖田極「HHMは肝発癌初期に発現が誘導される」第39回日本肝臓研究会(金沢、6月)〈シンポジウム:肝結節性病変の診断と治療〉

山崎隆弘、木村輝昭、高見太郎、大森薫、川口浩太郎、土屋昌子、山本直樹、寺井崇二、黒川典枝、坂井田功、沖田極「肝細胞癌に対する肝動脈パルーン閉塞下ラジオ波凝固療法」第39回日本肝臓研究会(金沢、6月)〈一般演題・ポスター〉

高見太郎、寺井崇二、横山雄一郎、田島邦彦、内田耕一、木村輝昭、黒川典枝、坂井田功、沖田極「HHM(Human Homologue of Maid)は肝発癌を initiate する HHM, Human Homologue of Maid, initiates liver carcinogenesis.」第62回日本癌学会総会(名古屋、9月)〈口頭発表〉

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戦略
「肝疾患における再生医療—基礎から臨床へ—」
DDW-Japan 2003 (大阪、10月)〈workshop14〉

石川剛、寺井崇二、青山浩司、大森薫、坂井田功、仁科博史、沖田極「FGFは骨髄細胞から肝細胞への分化・増殖を促進する。」第10回肝細胞研究会(東京、7月)〈一般

演題・口演

Naoki Yamamoto, Hitoshi Shirahashi, Andreea Catana, Jian Wu, Mark A Zern, and Kiwamu Okita 「Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Along a Hepatocyte Lineage」 2nd Annual Gene Therapy Symposium in Sonoma 2003 November 21

Sonoma CA

<Poster presentation>

山崎隆弘、黒川典枝、沖田極 「教室における進行肝細胞癌に対する動注化学療法の現状と展望」 第7回日本肝臓学会大会 (大阪、10月) <ワークショップ: 進行肝細胞癌の予後改善をめざして>

Taro Takami, Shuji Terai, Isao Sakaida, Snorri S. Thorgeirsson, Kiwamu Okita 「Hh, Human Homologue of Mafk, regulates cell proliferation and differentiation in hepatocarcinogenesis.」 Thirteenth international symposium of the Hiroshima cancer seminar (2003.10 Hiroshima, Japan)

<Poster presentation>

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の開発への基礎的検討—持続肝障害下の骨髄細胞の肝細胞への分化制御機構の解析—」 第24回日本炎症・再生医学会 (京都、11月)

大森薫、寺井崇二、石川剛、青山浩司、坂井田功、仁科博史、沖田極 「骨髄細胞から肝細胞への分化に関する遺伝子群についての解析」 類洞壁細胞研究会 (12月)

(論文)

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 Jan 10;72(8):943-59

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. 2003 Jun;38(6):762-9.

Yamasaki T, Kurokawa F, Takami T, Omori K, Kawaguchi K, Tsuchiya M, Yamamoto N, Okamoto M, Hironaka K, Kimura T, Terai S, Sakaida I, Okita K. Arterial infusion chemotherapy using cisplatin, 5-fluorouracil, and isovorin for patients with advanced hepatocellular carcinoma, pilot study: Is a

high dose of the biochemical modulator effective? Hepatol Res. 2003 Sep;27(1):36-44.

Sakaida I, Jinhua S, Uchida K, Terai S, Okita K. Leptin receptor-deficient Zucker (fa/fa) rat retards the development of pig serum-induced liver fibrosis with Kupffer cell dysfunction. Life Sci. 2003 Sep 26;73(19):2491-501.

Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, Katada T, Miyamoto K, Shinoda K, Nishina H, Okita K

An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes Journal of Biochemistry 2003, 134:551-558

Yamamoto N, Terai S, Ohata S, Watanabe T, Omori K, Shinoda K, Miyamoto K, Katada, Sakaida I, Nishina H, Okita K A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. BBRC 313:1110-1118, 2004

Yokoyama Y, Terai S, Sakaida I, Okita K et al. (6, 7, 10 他7名) Proteomic profiling of proteins decreased in hepatocellular carcinoma from patients infected with hepatitis C virus. Proteomics 2004 inpress

Okamoto M, Sakaida I, Tsuchiya M, Suzuki C, Okita K. Effect of a late evening snack on the blood glucose level and energy metabolism in patients with liver cirrhosis. Hepatol Res Hepatol Res. 2003 ; 27 : 45-50 .

Sakaida I, Hironaka K, Kimura T, Terai S, Yakasaki T, Okita K. Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) increases expression matrix metalloproteinases (MMPs) with reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in rat stellate cell. Life Sci(in p fess)

Yamasaki T, Kurokawa F, Takami T, Omori K, Kawaguchi K, Tsuchiya M, Yamamoto N, Okamoto M, Hironaka K, Kimura T, Terai S, Sakaida I, Okita K. Arterial infusion chemotherapy using Cisplatin, 5-fluorouracil, and isovorin for patients with advanced hepatocellular carcinoma, pilot study: Is a high dose of the biochemical modulator effective? Hepatol Res. 2003 ; 27 ; 36-44.

Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T,

Okita

K. Transplantation of bone marrow cells reverses CCL4-induced liver fibrosis in mice (submitted)

(雑誌)

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
医学の歩み Annual review 消化器 2003 ; 285-288

高見太郎、坂井田功、沖田極
癌細胞のアミノ酸代謝—ことに肝細胞癌を中心に
肝胆膵 ; 47(1)、101-106

高見太郎、寺井崇二、大森薫、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
肝臓の発生分化と肝発癌に關与する
Helix-Loop-helix (HLH) 型転写制御分子 Human Homologue of Maid (HBM) の機能解析
医学と薬学 ; 49(sup)、64-68

寺井崇二、山本直樹、大森薫、坂井田功
骨髓由来幹細胞を用いた肝臓再生療法
肝幹細胞研究の現状 肝胆膵 365-369, 2003

寺井崇二、沖田極
消化器領域の再生医療の展望 Frontiers in Gastroenterology 8(3):234-240

寺井崇二、沖田極
肝臓の再生医療—高齢者社会に対応する次世代に肝臓再生療法開発を目指して—老年消化器病 15(1):17-20, 2003

Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Okita K
Strategy for the development of cell therapy using bone marrow cells to repair damaged liver.
Growth/Differentiation and hepatocyte/HCC (Springer Verlag) 51-56, 2003

寺井崇二、坂井田功、沖田極
肝幹細胞を用いた再生医療 最新医学 58:9:75-81, 2003

沖田極
わが国の肝細胞癌—疫学、発生・病理から予防まで—
外科治療 89(2), 125-131

坂井田功、沖田極
NASH の成因と病態(4) レプチンと NASH 臨床消化器内科 18(9), 1275-1280

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
骨髓細胞の遊走・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
特公 2003-70377

2) 坂井田功、沖田極
特許出願 2002-377803: 肝臓発生、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作製と肝芽細胞の増殖に関与する分子を欠損するマウスの作出を行った。胎児肝領域を特異的に認識するモノクローナル抗体Liv8は糖鎖を含む抗原を認識すること、ストレス応答性MAPキナーゼ系のMKK7ノックアウトマウスでは胎児肝形成不全を伴う胎性致死となることが示された。これら結果から、肝芽細胞の増殖にはSEK1とMKK7を介する2種類のシグナルが必要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。Liv8抗原の全貌はまだ不明であるが、Liv8抗原はレクチンに結合すること、糖鎖を除く処理によって抗原性がうしなわれることから、Liv8抗原は糖鎖修飾を受けていることが明らかとなった。また、SEK1に加えてMKK7ノックアウトマウスでは肝形成不全を呈することから、ストレス応答性MAPキナーゼ系が肝形成に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

再生医療の理論的根拠は発生や再生の基盤研究に基づいている。本研究結果は、発生期の肝幹細胞である肝芽細胞の増殖に関わるシグナル機構の解明であり、再生時における肝細胞へと分化する細胞の増殖機構の理解に繋がると考えられる。また、Liv8抗体は再生医療への期待が高まっている骨髄中の有用な細胞の同定や分離に応用できると考えられる。

E. 結論

抗Liv8抗体による細胞の同定・分離法の開発や肝細胞の増殖・分化の分子機構の解明は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

- 1) Saibil, S.D., et al. (2003) Weak agonist self-peptides promote selection and tuning of virus-specific T cells. *Eur. J. Immunol.* 33, 685-696
 - 2) Kishimoto, H., et al. (2003) Different Properties of SEK1 and MKK7 in Dual Phosphorylation of Stress-induced Activated Protein Kinase SAPK/JNK in Embryonic Stem Cells. *J. Biol. Chem.* 278, 16595-16601
 - 3) Okamura-Oho, Y., et al (2003) Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) protein is phosphorylated by c-Jun NH2-Terminal Kinase. *Human Mol. Genetics*, 12, 1535-1542
 - 4) Momose, H., et al (2003) Dual Phosphorylation of Phosphoinositide 3-Kinase Adaptor Grb2-Associated Binder 2 Is Responsible for Superoxide Formation Synergistically Stimulated by Fc α and Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine Receptors in Differentiated THP-1 Cells. *J. Immunol.*, 171, 4227-4234.
 - 5) Terai, S., et al (2003) An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J. Biochem.*, 134, 551-558.
 - 6) Yamamoto N, Terai S, Ohata S, Watanabe T, Omori K, Shinoda K, Miyamoto K, Katada, Sakaida I, Nishina H, Okita K A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *BBRC* 313:1110-1118, 2004
- [総説・著書、その他]
- 1) 仁科博史、渡辺智美、大畑慎也、浅香聡、堅田利明：初期肝形成時のシグナル伝達機構、胆肝誌 46 巻 3 号：295-302 (2003)。
 - 2) 坪内博仁、井戸章雄、宇都浩文、蓮池悟、森内昭博：肝発生と再生時のHGF、胆肝誌 46 巻 3 号：303-309 (2003)。
 - 3) Nishina H, Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S, Asaka S, Katada T
SAPK/JNK Signaling Participates in Embryonic Hepatoblast Proliferation via a Pathway Different from NF- κ B-Induced Anti-Apoptosis. *Growth/Differentiation and hepatocyte/HCC* (Springer Verlag) 51-56, 2003

4) Nishina, H., et al. (2003) [review] Activation Mechanism and Physiological Roles of Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun NH2-Terminal Kinase in Mammalian Cells. J. Biol. Regul. Homeost. Agents. in press.

2. 学会発表

1) Hiroshi Nishina, Kentaro Nakagawa, Daiju Kitagawa, Gen Nishitai, and Toshiaki Katada [Poster]: 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, カナダ国, バンフ, 2003年1月

2) Kentaro Nakagawa, Daiju Kitagawa, Tomomi Watanabe, Hiroshi Nishina, and Toshiaki Katada [Poster]: SEK1/MKK4-mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF- κ B-induced anti-apoptosis. 2003 Keystone Symposia, カナダ国, バンフ, 2003年1月

3) Daiju Kitagawa, Kentaro Nakagawa, Hiroshi Nishina, and Toshiaki Katada [Poster]: Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase by Ultraviolet Is Mediated through Src-dependent Epidermal Growth Factor Receptor Phosphorylation: ITS IMPLICATION IN AN ANTI-APOPTOTIC FUNCTION

2003 Keystone Symposia, カナダ国, バンフ, 2003年1月

4) Watanabe T., Nishina H., Katada T., Sasado T., Morinaga C., Suwa H., Niwa K., Hirose Y., Yasuoka A., Yoda H., Deguchi T., Iwanami N., Osakada M, Henrich T., Kondoh H., and Furutani-Seiki [Poster]: Screening for mutations affecting liver organogenesis in Medaka. 3rd European Meeting on Zebrafish and Medaka Development and Genetics, フランス国, パリ, 2003年6月

5) 仁科博史; 肝形成の分子メカニズムと医学への応用: 再生医学と組織工学の連携強化のためのシンポジウム (口頭発表) [東京大学医学部; 2003年1月/東京]

6) 仁科博史、渡辺智美、大畑慎也、浅香聡、斉藤亮太、堅田利明; 初期肝形成のシグナル伝達機構: 第10回 肝細胞研究会 (シンポジウム口頭発表) [東京大学医学部; 2003年7月/東京]

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SEK1および抗MKK7抗体が、(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
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	2004	303-307
Nishina H, Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S, Asaka S, Katada T	SAPK/JNK Signaling Participates in Embryonic Hepatoblast Proliferation via a Pathway Different from NF- κ B-Induced Anti-Apoptosis	Okita K.	Frontier in Hepatology (Growth/Differentiation and hepatocyte/HCC)	Springer Verlag	Tokyo	2003	1-14
Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Okita K	Strategy for the development of cell therapy using bone marrow cells to repair damaged liver.	Okita K.	Frontier in Hepatology (Growth/Differentiation and hepatocyte/HCC)	Springer Verlag	Tokyo	2003	51-56

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
高見太郎、坂井田功、沖田極	癌細胞のアミノ酸代謝—ことに肝細胞癌を中心に	肝胆膵	47(1), 2003	101-106	アークメディア
高見太郎、寺井崇二、大森薫、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	肝臓の発生分化と肝発癌に関与する Helix-Loop-helix (HLH) 型転写制御因子 Human Homologue of Maid (HIM) の機能解析	医学と薬学	49(sup), 2003	64-68	自然科学社
仁科博史、渡辺智美、大畑慎也、浅香聡、堅田利明	初期肝形成時のシグナル伝達機構	肝胆膵	46(3), 2003	295-302	アークメディア
坪内博仁、井戸章雄、宇都浩文、蓮池悟、森内昭博	肝発生と再生時のHGF	肝胆膵	46(3), 2003	303-309	アークメディア
寺井崇二、山本直樹、大森薫、坂井田功	骨髄由来幹細胞を用いた肝臓再生療法	肝胆膵	46(3), 2003	365-369	アークメディア
寺井崇二、沖田極	消化器領域の再生医療の展望	Frontiers in Gastroenterology	8(3), 2003	234-240	メディカルレビュー社
寺井崇二、沖田極	肝臓の再生医療—高齢者社会に対応する次世代に肝臓再生療法開発を目指して—	老年消化器病	15(1), 2003	17-20	医学図書出版
寺井崇二、坂井田功、沖田極	肝幹細胞を用いた再生医療	最新医学	58(9), 2003	75-81	最新医学社
沖田極	わが国の肝細胞癌—疫学、発生・病理から予防まで—	外科治療	89(2), 2003	125-131	永井書店
坂井田功、沖田極	NASHの成因と病態(4) レプチンとNASH	臨床消化器内科	18(9), 2003	1275-1280	日本メディカルセンター

20030693

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