

200933038A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

骨髄および脂肪由来細胞を用いた
次世代型肝臓再生・修復(抗線維化)療法の開発研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 坂井田 功

平成22(2010)年3月

目 次

I. 総合研究報告

骨髄および脂肪由来細胞を用いた次世代型肝臓再生・ 1

修復（抗線維化）療法の開発研究

坂井田 功

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 25

III. 研究成果の刊行物・別刷 31

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総合研究報告書

骨髄および脂肪由来細胞を用いた次世代型肝臓再生・修復（抗線維化）療法の開発に関する研究

研究代表者 坂井田 功 山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学 教授

研究要旨：

生体肝移植に代わる次世代の肝再生療法の開発は、肝炎が進んだ肝硬変症患者の救命ために早急に行う必要がある。そこで平成 15 年 11 月より、山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学、山口大学医学部附属病院再生細胞療法センターにて、適応基準を満たす非代償性肝硬変患者に対して、Phase I 臨床研究『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法〔自己骨髄細胞の投与療法、Autologous Bone Marrow Cell Infusion therapy(ABMi療法)〕』を推進してきた。この日本で開発された ABMi 療法をいち早く多くの肝硬変症患者に提供することは急務である。一方、肝臓は、肝細胞のみならず、胆管細胞、星細胞、血管内皮細胞や Kupffer 細胞から構成されている。そこで効率的に肝硬変症を再生・修復させるためには、患者に投与した自己骨髄ないし脂肪細胞との複雑な細胞間相互作用を解明する必要がある。この目的達成のために新たに All Japan の研究開発チームを組織し、基礎研究で明らかになった肝線維化改善(抗線維化)と肝再生・修復に有効な骨髄細胞・脂肪細胞分画の細胞を応用し、今までの基礎研究から臨床応用への実績を踏まえて、独自の骨髄および脂肪由来細胞の分離培養技術を基盤にした肝硬変症に対する有効分画細胞を用いた次世代型肝臓再生・修復(抗線維化)療法を開発する。

(分担研究者・所属機関および所属期間における職名)

宮島 篤 (東京大学 分子細胞生物学研究所 機能形成分野 教授)

仁科 博史 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所 発生再生生物学分野 教授)

寺井 崇二 (山口大学大学院医学系研究科 消化器病態内科 准教授)

河田 純男 (山形大学医学部 消化器病態制御内科 教授)

斉藤 貴史 (山形大学医学部 消化器病態制御内科 准教授)

梅村 武司 (信州大学医学部 消化器内科 助教)

大河内 仁志 (国立国際医療センター研究所 細胞組織再生医学研究部 部長)

酒井 佳夫 (金沢大学大学院医薬保健研究域 医学系 血液情報統御学 准教授)

(研究協力者・所属機関および所属期間における職名)

小川 佳宏 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子代謝医学分野 教授)

A.研究目的

生体肝移植に代わる次世代の肝再生療法の開発は、肝炎が進んだ末期肝硬変症患者の救命のために早急に行う必要がある。山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学、山口大学医学部附属病院再生細胞療法センターにて、2003 年 11 月より、適応基準を満たす非代償性肝硬変患者に対して、Phase I 臨床研究『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法〔自己骨髄細胞の投与療法、Autologous Bone Marrow Cell infusion therapy(ABMi療法)〕』を推進してきた。平成 21 年 12 月までに山口大学では 19 症例施行したが、重篤な副作用の発生はなく、肝機能・肝線維化が改善する結果を得ている(StemCells 2006)。平成 17 年度からは多施設研究を実施し、山形大学でも 6 症例実施した。さらに平成 18 年 11 月には国際共同研究として韓国 Yonsei 大学で第 1 例目を実施され、現在までに 9 症例に施行され、その有効性が再現された。現在まで 34 症例に施行しているが、この日本で開発された ABMi 療法をいち早く肝硬変症患者に提供することは急務である。一方、肝臓は、肝細胞のみならず、胆管細胞、星細胞、内皮細胞

胞やクッパー細胞から構成され、肝硬変症状態から肝線維化を改善し再生修復させるためには、患者に投与する自己骨髄由来ないしは脂肪由来細胞との複雑な細胞間相互作用を解明することが必要である。そこでこの目的達成のため、新たに他大学・他施設との研究開発チームを組織し基礎研究を開始した。今回の研究の目的は、我々独自の骨髄および脂肪由来細胞の分離培養技術を基盤として、肝硬変症に対する有効分画細胞を用いた次世代型肝臓再生・修復（抗線維化）療法の開発とし、下記の項目を達成する。

1. 肝再生・修復（抗線維化）に有用な骨髄および脂肪由来細胞分画の分離培養法の開発

- ・骨髄細胞および脂肪細胞中の肝再生・修復に有効な細胞分画の同定
- ・有効な細胞分画の培養法の開発
ヒト応用のため GMP グレードに準拠した細胞培養培地による培養方法を開発する。
- ・有効な細胞分画の安全性評価試験

有効な細胞分画を SCID マウスへ投与しその安全性を検証する。

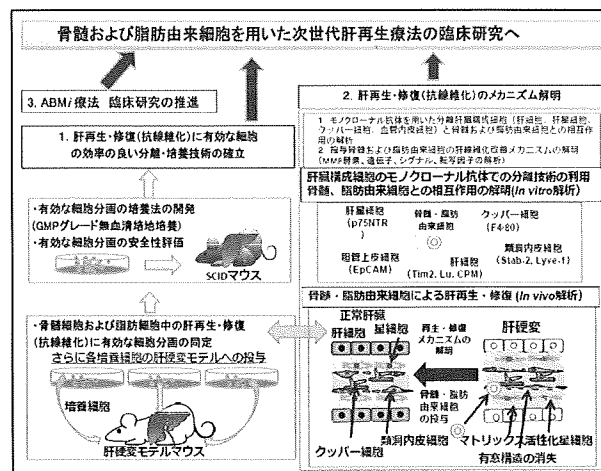
2. 肝再生・修復（抗線維化）のメカニズム解明

- ・分離肝臓構成細胞と骨髄および脂肪由来細胞との相互作用の解析
- ・投与骨髄および脂肪由来細胞の抗肝線維化メカニズムの解明
細胞外マトリクスの産生・分解に関与する酵素、その制御因子、細胞外シグナル分子とその受容体、転写因子を解析する。

3. ABM_i 療法臨床研究の推進

ABM_i 療法を推進し、さらに次世代治療開発のための臨床試験プロトコール作成準備を行う。

以上の目標を推進すれば、世界的もトップレベルの研究成果と臨床応用への展開が可能となる。



B. 研究方法

我々は低侵襲治療法を開発するために、骨髄および脂肪由来細胞の分離培養法、さらには脂肪幹細胞の培養法を開発してきた。それをさらに発展させ、再度検証することで、Sorting や FACS 等の解析を駆使して、下記の解析・開発を行う。

- ・肝再生・修復に有用な骨髄および脂肪由来細胞分画の分離培養法の開発
- ・骨髄細胞および脂肪細胞中の肝再生・修復に有効な細胞分画の同定
- ・有効な細胞分画の培養法の開発

これにより臨床応用のための GMP グレードに準拠した細胞培養培地による培養方法を開発する。

また有効な細胞分画の安全性評価試験のために SCID マウスへそれらの細胞を投与しその安全性を検証する。

一方、自己骨髄細胞を肝硬変症マウスに投与することによる肝硬変の肝線維化改善についても世界で初めて報告した(JB 2003, Hepatology 2004)。そこで、有効な細胞分画の骨髄および脂肪由来細胞を四塩化炭素障害にて誘導した肝硬変マウスに投与することにより、肝臓の線維化改善・修復メカニズムを解明する。また細胞外マトリクス関連酵素、その制御因子、細胞外シグナル分子と受容体や転写因子を解析する。

既に肝臓構成細胞の細胞膜抗原に対する多数のモノクローナル抗体を我々は作製しており、細胞膜抗原の発現を指標に肝臓構成細胞を分離・精製する方法を開発している。本研究では、肝線維化の発症・進行過程に

おける肝臓構成細胞をそれぞれ分離してその性状の変動および細胞相互間の作用を解析する。

C. 研究結果

- ・肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法 (ABMi 法) の先進医療への申請
- ・山形大学医学部と ABMi 療法を共同臨床研究として実施
- ・マウス骨髄由来肝再生・修復細胞の培養法の開発、四塩化炭素誘導肝硬変症に対する細胞機能評価の実施
マウス骨髄由来細胞の培養はこれまで困難であり増殖因子や血清含有培地が用いられてきたが、High density 法により無血清培地培養が可能となった。また、肝硬変マウス投与実験により抗線維化作用を有することが明らかとなった。
- ・ヒト細胞用 GMP グレード無血清培地開発を開始
ヒト細胞用 GMP グレード無血清培地についてアメリカ Life Technologies 社(アメリカ Frederick)でミーティングを行い、今後の共同研究推進を決定した。

D. 考 察

High density 法による無血清培地培養を使用したマウス骨髄細胞の培養を成功させ、肝硬変マウス投与実験により抗線維化作用を示せたことで研究の最初の第一歩を踏み出した。今後 Life Technologies 社の完全無血清培地システムを使って、骨髄由来肝臓再生・修復細胞の無血清培養法を確立する。さらには同様にヒト骨髄由来細胞の培養法の確立を進める。ABMi 療法について現在申請中である先進医療の認可を取得する。

E. 結 論

High density 法による無血清培地培養を使用してマウス骨髄細胞の培養を成功させ、肝硬変マウス投与実験により抗線維化作用を確認できた。

研究発表

1. 論文発表

- 1: Terai S, Sakaida I., Currents Status and Prospects of Autologous Bone Marrow Cell Infusion Therapy for Liver Cirrhosis Patients. Bulletein Yamaguchi. 2009. in press.
- 2: Terai S. Fish model leads to new findings in liver disease. Hepatology Research. 2009. in press.
- 3: Segawa M, Sakaida I., Diagnosis and treatment of portal hypertension. Hepatology Research. 39, 1039-1043, 2009
- 4: Tanaka Y, Sakaida I., Mizokami M, 他 26 名 Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Nat Genet. 2009 Oct; 41(10):1105-9.
- 5: Kiyotoki S, Nishikawa J, Sakaida I, 他 4 名 Use of the light-emitting diode-illuminated endoscope for upper gastrointestinal endoscopy. Endoscopy. 2009; 41 Suppl 2:E173-4.
- 6: Ryozaawa S, Iwamoto S, Sakaida I, 他 3 名 ERCP using double-balloon endoscopes in patients with Roux-en-Y anastomosis. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2009; 16(5):613-7.
- 7: Kusakabe A, Sakaida I., Mizokami M, 他 20 名 Case-control study for the identification of virological factors associated with fulminant hepatitis B. Hepatol Res. 2009 Jul; 39(7):648-56.
- 8: Korenaga K, Korenaga M, Furukawa M, Yamasaki T, Sakaida I. Usefulness of Sonazoid contrast-enhanced ultrasonography for hepatocellular carcinoma: comparison with pathological diagnosis and superparamagnetic iron oxide magnetic resonance images. J Gastroenterol. 2009; 44(7):733-41.

2.学会発表

(日本再生医療学会総会 平成 21 年 3 月 5 日 一般)
脾臓摘出による ABMI 療法の肝線維化、肝再生効果に
対する臨床、基礎的検討

(日本再生医療学会総会 平成 21 年 3 月 5 日 一般)
骨髄中の肝幹細胞の動態と微細構造解析

(日本肝臓学会総会 平成 21 年 6 月 5 日 一般) 脾臓
摘出術併用骨髄細胞投与による肝硬変の改善の検討

(日本肝臓学会総会 平成 21 年 6 月 6 日 一般)
骨髄中の肝幹細胞の動態と微細構造解析-GFP/CCI4
モデル

(JDDW 平成 21 年 10 月 14 日 ワークショップ)
硬変肝における HHM(Maid)による TGF-beta シグナル
の制御の可能性について

(AASLD 平成 21 年 11 月 3 日 ポスター)
ABMI therapy combined with splenectomy is an effective
for liver cirrhosis.

(AASLD 平成 21 年 11 月 4 日 ポスター)
The electronmicroscopical analysis for cell lineage of
bone marrow cell differentiation in cirrhosis mice.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得
特記事項なし

2. 実用新案登録
特記事項なし

3. その他
特記事項なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

「肝再生・修復(抗線維化)のメカニズムの解明」に関する研究

研究分担者 宮島 篤 東京大学分子細胞生物学研究所 教授

研究要旨:

【目的】肝硬変の低侵襲性治療法の開発を究極的な目標として、自己骨髄細胞の移植による肝線維症の改善メカニズムの解析を行う。

【方法】肝線維化の改善に寄与する細胞を同定するために、骨髄細胞を移植後に肝臓に生着する細胞種を同定する。肝星細胞の線維化およびその改善の過程での性状変化を解析するために、星細胞の分離法を確立する。また、線維化に関与することが期待される分子の機能を解析するために生体肝臓への遺伝子導入法を確立する。

【成績】線維化誘導マウスに骨髄細胞を移植して、肝臓に生着した細胞を FACS により解析した結果、各種の血球とともに骨髄由来の非血球細胞の生着が認められた。また、肝星細胞を p75NTR の発現を指標に MACS で分離後にさらに FACS を用いることで正常肝臓のみならず線維化肝臓から星細胞を純化することができた。さらに、線維化関連分子の機能解析のために HTVi 法を検討し、導入遺伝子の発現を2週間程度維持することに成功した。

【考案】肝臓に生着した非血球細胞は移植直後には少数であるが、移植数週間後には増加する可能性もあり、今後は長期にわたり生着細胞種の解析を行う必要がある。肝星細胞の分離法が確立されたので、今後は肝線維化の過程および改善過程での遺伝子発現の変動を解析することで、線維化改善因子候補を探索して HTVi 法による in vivo での機能解析を行うことが可能となった。

共同研究者

田中稔、伊藤暢、齋藤滋

A.研究目的

骨髄細胞を肝硬変患者に移植することにより肝線維化が改善するが、この治療法の最大の難点は患者から400mlの骨髄液を採取する必要がある点である。そのために本治療法の適用には厳しい制限があり、より低侵襲性の治療法の開発が望まれる。骨髄細胞中の肝線維化に有効な細胞集団を特定し、それを体外で増幅することができれば、少量の骨髄採取で治療が可能となり、より多くの患者に本治療法の適応が可能となる。また、本治療法による肝再生・修復のメカニズムが明らかになれば、新たな治療薬の開発にもつながる。そこで、本研究

では、マウスモデルにより骨髄細胞投与後の肝臓に生着した細胞の解析、線維化の中心となる星細胞の動態解析を通じて抗線維化作用に関わる因子の同定を目指す。

B.研究方法

CCl₄ の連続投与により肝線維化を誘導したマウスに、GFPを発現する同系統マウスの骨髄細胞を移植した後、コラゲナーゼ灌流法により肝臓構成細胞を分取し、フローサイトメリーにより GFP 陽性細胞を解析した。

線維化を誘導した肝臓、それを骨髄細胞移植により改善した肝臓、および正常肝から肝構

成細胞を分離して、それぞれの遺伝子発現を解析することにより、肝線維化改善に關与する因子の同定を目指す。

肝線維化の改善に關与する候補因子として MMP9 などが挙げられている。それらの機能を解析するために、肝細胞に一過性に遺伝子発現を誘導する hydrodynamic tail vein injection (HTVi) 法を用いて、候補遺伝子を導入して線維化に対する作用を解析する。

C. 研究結果

肝に生着した骨髓細胞の解析

既報に基づき GFP 陽性骨髓細胞 10^5 個をマウスに移植して、2週間後に肝臓細胞をコラーゲン灌流により回収し FACS により解析した。その結果、肝非実質細胞中に GFP 陽性細胞を認めたが、細胞数が少なく、十分な解析が困難であった。そこで、 10^7 細胞を移植して2日目に肝臓から回収した GFP 陽性細胞の細胞種を解析した結果、多数の CD45 陽性の血球に加えて、Thy1 陽性細胞、p75NTR 陽性細胞 (肝星細胞/間葉系幹細胞に発現) などが検出された。今後は、移植後日を追って生着細胞を解析して線維化改善に關連する細胞種を同定する予定である。

線維化肝からの星細胞分離

肝星細胞は肝障害に伴い大量の細胞外マトリクスを産生することから、肝線維化の中心的な細胞とみなされている。したがって、線維化における肝星細胞の性状解析は線維化改善因子を探索する上できわめて重要な課題である。星細胞はビタミン A 貯蔵細胞として知られており、星細胞の分離はもっぱら比重の違いにより行なわれている。しかし、線維化に伴い星細胞はビタミン A を失うため、線維化肝から

の星細胞分離法の開発が必要である。我々は星細胞に発現する p75NTR に対するモノクローナル抗体を作製して肝星細胞の分離法を確立した。すなわち、正常肝と線維化肝の非実質細胞画分から p75NTR 抗体を結合した磁気ビーズを使って細胞を分離した後、さらに FACS Vantage により p75NTR 陽性細胞を純化した。この細胞集団では、線維化により Type I および Type III コラーゲンの発現が正常肝の星細胞に比べて著しく増大していた。今後は、この細胞を使って遺伝子発現解析を行う予定である。

HTVi 法による遺伝子導入系の確立

上記の星細胞の解析等から、肝線維化の改善効果が期待される候補遺伝子の同定が見込まれる。それらの機能解析を簡便に行うために、マウス個体レベルにおいて肝細胞で一過性に遺伝子発現が可能な HTVi 法の導入を行った。CMV promoter 制御下で LacZ を発現するベクターを導入したところ、導入後 3 日目までに発現が急速に低下した。一方、Albumin promoter を使うと発現は 2 週間目以降でも維持されることが認められた。そこで、このシステムを使って、TIMP や MMP など肝線維化の促進あるいは改善に關与する可能性のある可溶性分子を正常マウスおよび肝線維化モデルマウスの肝臓で発現させることにより、機能解析を開始した。

D. 考 察

骨髓細胞の移植後に肝臓に生着する骨髓由来の細胞種として種々の血球成分が認められたことは当然予想されたことであるが、同時に間葉系幹細胞や星細胞のマーカー分子を発現する非血球細胞種の生着も認められた。

非血球成分は移植直後には少数であるが、移植数週間後には増加する可能性もあり、今後は長期にわたり生着細胞種の解析を行う必要がある。

正常および線維化肝臓から細胞膜抗原の発現を指標に肝星細胞の分離が可能となったので、今後は線維化の過程および骨髄移植による線維化改善過程における星細胞および移植 GFP 陽性細胞の遺伝子発現の変動を解析することで、肝線維化あるいはその改善に関与する因子の同定につながる事が期待される。また、HTVi 法による遺伝子発現系が確立されたので、それら因子の肝線維化における機能をこの方法により解析することが可能となった。

E. 結 論

骨髄移植により肝臓に生着する細胞種を解析し、血球成分に加えて星細胞、間葉系幹細胞細胞など非血球系細胞が認められた。

正常および線維化肝臓から抗 p75NTR 抗体を使って MACS および FACS により純化分離するシステムが確立された。

HTVi 法により遺伝子を肝細胞で発現するシステムが確立された。

研究発表

1.論文発表

Chen Y-R., Sekine K., Nakamura, K., Yanai, H. Tanaka M., and Miyajima A. YB-1 downregulates expression of carbamoyl phosphate synthetase 1 by suppressing C/EBP α function, leading to hyperammonemia. *Gastroenterology* 137, 330-340, 2009.

Itoh T., Kamiya Y., Okabe M., Tanaka, M., and

Miyajima A. Inducible expression of Wnt genes during adult hepatic stem/progenitor cell response. *FEBS Letters* 583, 777-781, 2009.

Okabe M., Tsukahara Y., Tanaka M., Suzuki K., Saito S., Kamiya Y., Tsujimura T., Nakamura K., and Miyajima A. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM⁺ cells of normal and injured mouse livers. *Development* 136, 1951-1960, 2009.

Tanimizu N., Miyajima A., and Mostov K. Liver Progenitor Cells Fold Up a Cell Monolayer into a Double-layered Structure during Tubular Morphogenesis. *Mol. Biol. Cell.* 20, 2486-2494, 2009.

Tanaka M., Okabe M., Suzuki K., Kamiya Y., Tsukahara Y., Saito S., and Miyajima A. Mouse hepatoblasts at distinct developmental stages are characterized by expression of EpCAM and DLK1: drastic change of EpCAM expression during liver development. *Mech. Dev.* 126, 665-676, 2009.

Hirose Y., Itoh T., and Miyajima A. Hedgehog signal activation coordinates proliferation and differentiation of fetal liver progenitor cells. *Exp. Cell Res.* 315, 2648-2657, 2009

Miyaoka Y., Tanaka M., Imamura T., Takada S. and Miyajima A. A novel regulatory mechanism for FGF18 signaling involving cysteine-rich FGF receptor (Cfr) and Delta-like protein (Dlk). *Development* 137, 159-167, 2010.

Onitsuka I., Tanaka M., and Miyajima A. Characterization and functional analyses of

hepatic mesothelial cells in mouse liver development. *Gastroenterology* in press
田中稔 宮島篤. 肝前駆細胞から肝細胞、胆管上皮細胞への分化. *肝胆膵* 59 (4): 525-535, 2009
宮島篤. 肝臓の発生分化機構. *最新医学* 64巻、1426-1455, 2009.

2.学会発表

1. Shumpei Yamauchi, Hiroaki Ito and Atsushi Miyajima. Identification of a novel IκB family member and its role in innate immune responses. THE 96th Annual Meeting of The American Association of Immunologists (Seattle, Washington 5. 8-12 2009)
2. Atsushi Miyajima. Recent successes and future prospects of Stem Cells as Therapeutic Tools: Development of therapeutic antibody for hepatocellular carcinoma. 12th Asia-Pacific International Molecular Biology Network (A-IMBN) Conference (Penang, Malaysia 2009. 10. 27-28)
3. Atsushi Miyajima. Development of therapeutic antibody for hepatocellular carcinoma which targets a cell surface molecule on liver stem cells. 第68回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜 2009. 10. 1-3)
4. 宮岡 佑一郎、田中 稔、高田 慎治、宮島 篤. Delta-like protein (Dlk) の結合分子同定による機能解析. 第16回肝細胞研究会 (山形テルサ 2009. 6. 26-27)
5. 陳 彦榮、関根 圭輔、中村 康司、柳内 浩之、田中 稔、宮島 篤. Y-box protein 1

- によるアンモニア代謝制御機構. 第16回肝細胞研究会 (山形テルサ 2009. 6. 26-27)
6. 廣瀬 恵一. ヘッジホッグシグナルによる胎児肝臓細胞の増殖・分化制御. 第16回肝細胞研究会 (山形テルサ 2009. 6. 26-27)
 7. 千賀 一徳、谷水 直樹、宮島 篤. 胆管の機能発現に関わる遺伝子の探索. 第16回肝細胞研究会 (山形テルサ 2009. 6. 26-27)
 8. 宮島 篤. 細胞膜抗原を指標とした肝幹細胞の分離と発生・分化の解析. 第28回分子病理学研究会 (スペースアルファ神戸 2009. 7. 18-19)
 10. 田中 稔. 肝発生過程における細胞間相互作用による増殖・分化の制御. 第82回日本生化学会大会 (神戸ポートアイランド 2009. 10. 21-24)
 11. 鬼塚 和泉. 肝中皮細胞の分化と肝発生における役割. 第82回日本生化学会大会 (神戸ポートアイランド 2009. 10. 21-24)
 12. 高瀬 比菜子. FGFシグナルによるマウスの成体肝幹/前駆細胞の制御. 第82回日本生化学会大会 (神戸ポートアイランド 2009. 10. 21-24)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

「肝疾患モデル動物の作出と質量顕微鏡を用いた分子マーカーの探索」に関する研究

研究分担者 仁科 博史 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授

研究要旨：【目的】

骨髄細胞および脂肪細胞を用いた療法の有効性を評価可能な「肝疾患モデル動物の作出」と、「質量顕微鏡を用いた分子マーカーの探索」を目的とする。肝疾患モデル動物として、各種肝疾患の原因と考えられている非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)を模倣するメダカおよびマウスモデルの作出を行う。また、質量顕微鏡を用いて肝臓内の低分子の挙動を検討するために、再生肝のトリグリセリド(TG)の挙動を検討する。

【方法】

変異原処理によって、肝臓形成および肝臓機能に障害をもつメダカを大規模にスクリーニングし、遺伝的に脂肪肝を発症しやすいメダカ変異体を単離した(仁科担当)。また、4型メラノコルチン受容体を欠損マウスに高脂肪食負荷を与えた(小川担当)。マウスの肝切除実験を行い、TG分子量に相当する低分子の発現を、質量顕微鏡によって測定し、可視化した(仁科)。

【成績】

kendama と命名したメダカ変異体は孵化後60日ぐらいから脂肪の蓄積が観察され、80日後には顕著な脂肪肝を形成した。また、4型メラノコルチン受容体欠損マウスもヒト NASH 様病態を示した。マウスの再生時には TG が上昇することが知られていたが、詳細な解析から様々な側鎖を有する TG のほぼすべてが上昇することが示された。

共同研究者

小川 佳宏(東京医科歯科大学難治疾患研究所・教授)

A.研究目的

骨髄細胞および脂肪細胞を用いた療法の有効性が臨床で示されつつあるが、詳細な分子メカニズムについては不明な点が多い。分子メカニズムの解明のためにはヒト肝疾患を模倣するモデル動物の利用が必須である。そこで各種肝疾患の原因と考えられる脂肪肝およびNASHを発症するモデル動物の作出を考えた。また、詳細に病態を評価するためには、従来の肝障害マーカーに加えて新規分子マーカーが必要である。それ故、「肝疾患モデル動物の作出」と、「質量顕微鏡を用いた分子マーカーの探索」を目的とする。

B.研究方法

変異原 ENU 処理によって、肝臓形成および肝臓機能に障害をもつメダカを大規模にスクリーニングし、肝臓形成不全および肝臓機能不全メダカを複数単離した。このうち中から遺伝的に脂肪肝を発症しやすいメダカ変異体の単離を試みた(仁科担当)。また、4型メラノコルチン受容体を欠損マウスに高脂肪食負荷を与えてNASH様症状を呈するか検討した(小川担当)。

マウスの肝切除実験を行い、分子量1000以下の低分子の質量分析を行った。このうちTGの分子量に相当するピークの可視化を行った。(仁科)。

研究結果

kendama と命名したメダカ変異体は孵化後60日ぐらいから脂肪の蓄積が観察され、80日後には顕著な脂肪肝を形成した。また、4型メラノコルチン受容体欠損マウスもヒト NASH 様病態を示した。マウスの再生時には TG が上昇することが薄層クロマトグラフィーを用いた解析から知られていたが、質量分析によってもそれが確認された。興味深いことに、様々な側鎖を有するTGのほぼすべてが上昇することが示された。

考 察

これまでになかったヒト肝疾患を模倣するモデル動物の作出に成功した。また、質量顕微鏡を肝臓に応用するという新たな試みも実現可能であることが示された。今後、

これらモデル動物とツールは、細胞療法に関する研究の基盤になると考えられる。

E. 結論

脂肪肝および NASH 様モデル動物の作出に成功した。また、質量顕微鏡の肝臓組織への応用も可能であることが示された。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Takashi Nakamura and **Hiroshi Nishina** (2009) Liver development: lessons from knockout mice and mutant fish. *Hepatology Research* **39**, 633-644.
- 2) Shinya Ohata, Makiko Nawa, Takeshi Kasama, Tokiwa Yamasaki, Kenji Sawanobori, Shoji Hata, Takashi Nakamura, Yoichi Asaoka, Toshio Watanabe, Hitoshi Okamoto, Takahiko Hara, Shuji Terai, Isao Sakaida, Toshiaki Katada, and **Hiroshi Nishina** (2009) Hematopoiesis-dependent expression of CD44 in murine hepatic progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 817-823.
- 3) Shuhei Tanemura, Haruka Momose, Nao Shimizu, Daiju Kitagawa, Jungwon Seo, Tokiwa Yamasaki, Kentaro Nakagawa, Hiroaki Kajiho, Josef M. Penninger, Toshiaki Katada, and **Hiroshi Nishina*** (2009) Blockage by SP600125 of Fcε Receptor-induced degranulation and cytokine gene expression in mast cells is mediated through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *J. Biochem.* **145**, 345-354. Cover of the issue.
- 4) Nao Shimizu, Hajime Watanabe, Junko Kubota, Jinzhan Wu, Ryota Saito, Tadashi Yokoi, Takumi Era, Takeshi Iwatsubo, Takashi Watanabe, Sachiko Nishina, Noriyuki Azuma*, Toshiaki Katada, and **Hiroshi Nishina*** (2009) Pax6-5a Promotes Neuronal Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 999-1003. Cover of the issue.
- 5) Norio Miyamura, Jun Hirayama, Kenji Sawanobori, Teruya Tamaru, Yoichi Asaoka, Reiko Honda, Takuro Yamamoto, Hatsume Uno, Ken Takamatsu, **Hiroshi**

Nishina (2009) CLOCK:BMAL-independent circadian oscillation of zebrafish Cryptochromel_a gene. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 1183-1187.

- 6) Yoshifumi Matsumoto, Hiroki Oota, Yoichi Asaoka, **Hiroshi Nishina**, Koji Watanabe, Janusz M Bujnicki, Shoji Oda, Shoji Kawamura and Hiroshi Mitani (2009) Medaka: a promising model animal for comparative population genomics. *BMC Research Notes* **2**, 88.
- 7) Jun Hirayama, Norio Miyamura, Yoshimi Uchida, Yoichi Asaoka, Reiko Honda, Kenji Sawanobori, Takeshi Todo, Takuro Yamamoto, Paolo Sassone-Corsi, and **Hiroshi Nishina** (2009) Common light signaling pathways controlling DNA repair and circadian clock entrainment in zebrafish. *Cell Cycle* **8**, 2794-27801.
- 8) Ryota Saito, Tokiwa Yamasaki, Yoko Nagai, Jinzhan Wu, Hiroaki Kajiho, Tadashi Yokoi, Eiichiro Noda, Sachiko Nishina, Hitoshi Niwa, Noriyuki Azuma, Toshiaki Katada, and **Hiroshi Nishina** (2009) CrxOS Maintains Self-Renewal capacity of Murine Embryonic Stem Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 1129-1135.

2. 学会発表

1. Hiroshi Nishina; Physiological roles of Hippo signaling pathway using Medaka, *Oryzias Latipes*. [RASSF First International Symposium, Banff, Canada, February, 2009]
2. 仁科博史; モデル生物を用いた「細胞の生と死」を制御するシグナル伝達系の解析 [埼玉大学セミナー; 2009年2月/浦和]
3. 仁科博史; 小型魚類を用いた SAPK/JNK シグナル系の解析 [生理学研究所セミナー; 2009年2月/岡崎]
4. 濱弘太郎、中永景太、田中将之、浅岡 洋一、仁科博史、青木淳賢; リゾホスファチジン酸産生酵素オートタキシンの血管形成過程における役割 [第15回小型魚類研究会; 2009年9月/名古屋]
5. 仁科博史; メダカ扁平胚 *hirame* 変異体の単離と解析 [理化学研究所 CDB; 2009年10月/神戸]

6. 仁科博史／畑裕世話人シンポジウム；細胞死・細胞増殖
制御を司る新しいシグナル伝達系 Hippo pathway
仁科博史、古谷-清木誠；扁平胚の表現型を示す YAP メ
ダカ変異体の単離と解析 [第 82 回日本生化学会大会；
2009 年 10 月／神戸]

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

ナシ

2. 実用新案登録

ナシ

3. その他

「メダカを用いた肝臓研究の成果」が朝日新聞 NHK で
報道された。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

アルコール性肝硬変に対する ABMi 療法とヒト骨髄細胞の培養 に関する研究

研究分担者：河田純男 山形大学医学部消化器内科学 教授

研究分担者：齋藤貴史 山形大学医学部消化器内科学 准教授

研究要旨：

【目的】 生体肝移植に代わる次世代の肝再生療法の開発は、肝硬変患者の生命予後の改善のために早急に行う必要がある。骨髄幹細胞は肝細胞再生のソースとして期待され、肝再生を目的とした肝硬変患者に対する自己骨髄細胞移植（Autologous Bone Marrow Cells Infusion: ABMi）療法の有用性が報告されている。本研究の目的は、（1）ABMi 療法の安全性と有効性を複数施設で検討すること、（2）アルコール性肝硬変に対する ABMi 療法の肝機能改善効果について検討すること、（3）将来の臨床応用に資するヒト骨髄細胞の培養条件を探索すること、である。

【方法】 肝炎ウイルス慢性持続感染のない、高度に進行したアルコール性肝硬変 6 例を対象とした。山口大学チームより技術サポートを得て、当大学医学部附属病院において、ABMi 療法を施行した。得られたヒト骨髄細胞の初代培養および継代培養に適する条件を検討した。

【成績】 アルコール性肝硬変における ABMi 療法では、骨髄細胞移植後 4 週の短期経過において、血清アルブミン値およびプロトロンビン活性の移植後の有意な改善が認められた。また、長期経過観察が可能であった症例においては、これら肝機能検査値のほか、ヒアルロン酸に代表される肝線維化マーカーの改善が確認された。無血清状態でのヒト骨髄細胞初代培養の確立には現段階では至っていないが、更に改善検討を進めている。

【考案】 ABMi 療法を、高度に進行したアルコール性肝硬変 6 例に対して安全に施行し、良好な肝機能改善効果（血清アルブミン、プロトロンビン活性）と線維化マーカー改善効果（ヒアルロン酸）を確認した。更に長期間観察を行うとともに、禁酒効果との科学的比較検証が今後の課題である。臨床応用を目指し、採取されたヒト骨髄細胞の培養条件の更なる検討を要する。

共同研究者

奥本和夫 山形大学医学部消化器内科学 助教

芳賀弘明 山形大学医学部消化器内科学 医員

A.研究目的

生体肝移植に代わる次世代の肝再生療法の開発は、肝硬変患者の生命予後の改善のために早急に行う必要がある。骨髄内には multipotent progenitor cell の存在が知られており、私たちは、これまでの *in vitro* における研究において、ラット骨髄細胞の肝様細胞への分化や増殖が可能であることを示してきた（J Hepatol 2005; 43: 110-116, J Gastroenterol 2006; 41: 62-69）。また、肝障害モデルでは、骨髄細胞移植による肝再生ならびに線維化改善効果が確認されている。近年、肝再生を目的とした肝硬変患者に対する自己骨髄細胞移植（Autologous Bone

Marrow Cells Infusion: ABMi）療法が、主に C 型肝炎ウイルスによる非代償性肝硬変患者に対して施行され、24 週間の術後経過において Child-Pugh Score や血清アルブミン値などの肝機能検査値全般の改善が報告されている（Terai S et al. Stem Cell 2006）。私たちは、肝炎ウイルス慢性持続感染のないアルコール性肝硬変症では、本療法の肝機能改善効果がウイルス性肝疾患よりも多く期待出来るものと考え、肝再生を目的とした ABMi 療法をアルコール性肝硬変患者に対し、山口大学チームとともに当大学医学部附属病院で施行した。また、本療法の将来的な発展を考えるうえで、少量の骨髄細胞を効率よく培養

し増殖させる方法を確立することは重要である。そこで、本治療により得られたヒト骨髄細胞を用いて、臨床応用を目指し、Good Manufacturing Practice (GMP) グレードの製品を用いたヒト骨髄細胞培養法の確立に関する探索的研究を開始した。本研究の目的は、(1) ABMi 療法の安全性と有効性を複数施設で検討すること、(2) アルコール性肝硬変に対する同療法の安全性と肝機能改善効果について検討すること、(3) 臨床応用に資するヒト骨髄細胞の培養条件を探索すること、である。

B.研究方法

1. アルコール性肝硬変に対する ABMi 療法

対象は、アルコール性非代償性肝硬変患者とし、肝生検にて肝硬変 (F4) が確認され、かつ、総ビリルビン値 3.0 mg/dl 未満、血小板数 50,000/ μ l 以上、画像検査で肝細胞癌がなく、腹水や脳症がコントロールされ心肺機能良好で全身麻酔が可能な患者、とした。また、ABMi 療法施行前に 6 か月間以上の禁酒を確認できた症例を適格とした。自己骨髄細胞は、全身麻酔下で 400ml の骨髄液を採取し、洗浄後に静脈内投与を行った。平成 21 年度までに 6 例を施行した。全例が男性であり、年齢は 38 歳から 74 歳 (平均年齢 60 歳) であった。ABMi 療法の肝機能および肝臓線維化マーカーの改善に及ぼす効果について検討した。

2. ヒト骨髄細胞の培養

ABMi 療法時に採取された骨髄細胞の一部を培養に用いた。無血清培地とし、培養培地と培養皿コーティング剤は、Invitrogen 社より供給された GMP グレードの製品を用いた。またコントロール培地として、D-MEM+10% FBS + bFGF (3ng/ml) を用いた。

本研究は、山形大学医学部倫理委員会で承認され、本治療法の施行に際し患者から文書で同意を得た。

研究結果

1. アルコール性肝硬変に対する ABMi 療法

(1) 安全性の評価

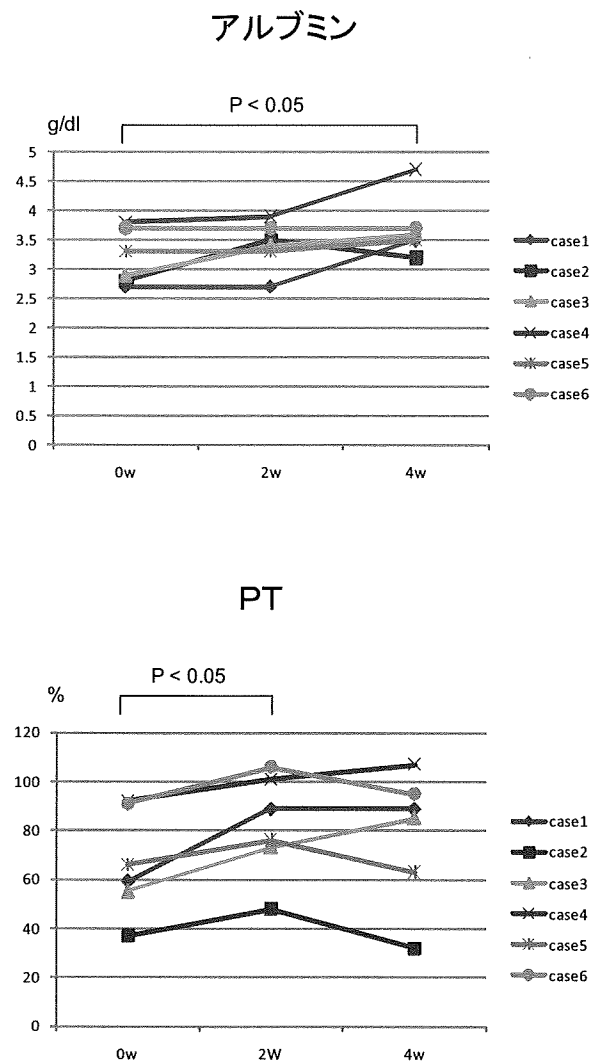
骨髄採取から移植終了まで全過程に要する時間は

6 時間以内に終了した。合併症や副反応は見られなかった。

(2) 肝機能および肝臓線維化マーカー改善に及ぼす効果

血清アルブミン値とプロトロンビン活性について、これまで施行した 6 症例の骨髄細胞移植前と移植後 4 週間における短期改善効果を検討した (図 1)。血清アルブミン値は、移植前 (3.2 ± 0.47 g/dl) に比し移植 4 週間後 (3.7 ± 0.52 g/dl) に有意な上昇が見られた ($P < 0.05$)。また、プロトロンビン活性は、移植前 (66.7 ± 21.5 %) に比し移植 2 週間後 (82.2 ± 21.6 %) に有意な上昇が見られた ($P < 0.01$)。

(図 1)



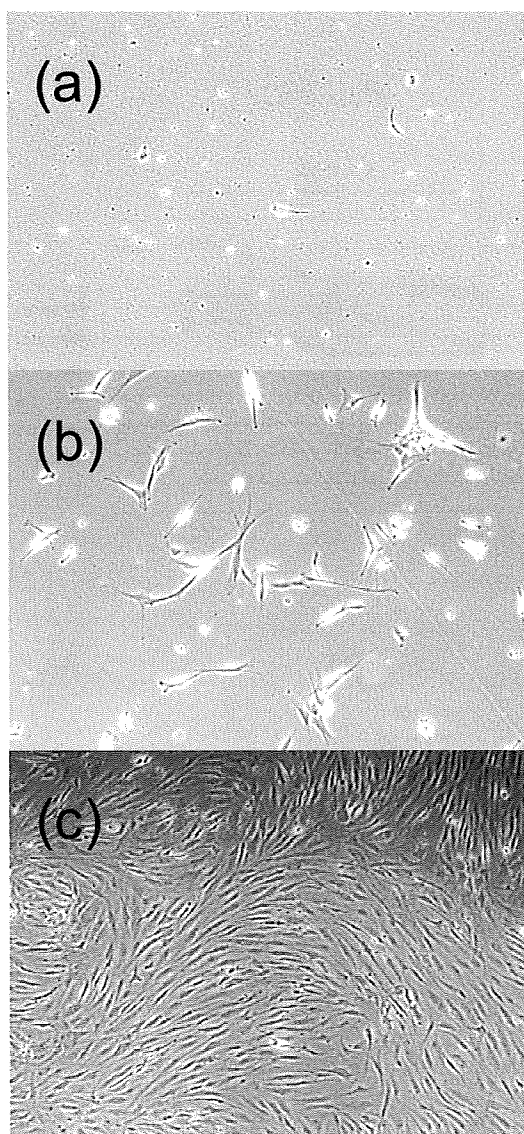
平成 21 年度以前に施行された 3 例については、移植後 24 ヶ月にわたる長期経過を確認している。長期

経過を観察している1例については、血清アルブミン値は移植前 2.9 g/dl から移植後 24 ヶ月で 4.5 g/dl に改善するとともに、ヒアルロン酸は移植前 232 ng/ml から移植後 24 ヶ月で 64 ng/ml へ改善し、良好な肝予備能とともに肝臓線維化マーカーの改善が確認された。高度の脾腫と門脈圧亢進症を認めた1例では、血清アルブミン値とプロトロンビン活性の改善は不良であった。

2. ヒト骨髄細胞の培養

ABMi 療法時に採取されたヒト骨髄細胞を用いて、各種培養条件を検討した (図2)。

(図2)



無血清培地として GMP グレードの培養培地を用いた初代培養 (a)、さらに GMP グレードの培養皿コーティングを加えた初代培養 (b)、コントロールとして血清培地と増殖因子 (D-MEM+10%FBS+bFGF) を用いた初代培養 (c)、を行った。ヒト骨髄細胞の初代培養において、GMP グレードの無血清培地では、培養皿コーティングの使用により細胞接着は見られたが、細胞増殖にまでは至らなかった。有血清培地のコントロール培地では、良好な細胞増殖が認められた。コントロール培地で得られた増殖細胞の継代培養では、これらの細胞は、培養コーティングの有無に関わらず無血清培地の条件下で継代培養が可能であった。

考 察

肝硬変患者に対する ABMi 療法を、実施要件を満たす複数施設で行い、本療法に適格と判定された症例に対し、安全に施行できることを示した。本研究における対象は、高度に進行したアルコール性肝硬変症例であり、同疾患に対する ABMi 療法の効果についての検討は本研究が最初である。現在までに6例に施行し、短期的には先行研究により示された血清アルブミン値やプロトロンビン活性の改善を確認した。また24 ヶ月以上の長期間、経過観察できた例においては、肝臓線維化マーカーの著明な改善が見られる例があることが示された。ウイルス持続感染の影響がないアルコール性肝硬変において、ABMi 療法は、禁酒が守られた場合には良好な肝機能の持続的改善が得られ、良い適応と思われる。今後は、本療法の有効性について、禁酒効果との比較も必要と思われる。

臨床応用を目指し、ヒト骨髄細胞の培養条件に関する検討を行っているが、現時点では、無血清培地で初代培養を成功するには至っていない。自己血清や血小板などの培養培地への添加などが今後試みる価値があるものと思われる。一度、初代培養に成功すれば、無血清培地における継代培養が可能であることが今回の探索研究により示されており、初代培養条件について更なる検討が必要である。また初代

および継代培養細胞において、細胞マーカーの動態を明らかにする必要がある。

E. 結 論

ABMi療法を、高度に進行したアルコール性肝硬変6例に対して安全に施行し、良好な肝機能改善効果（血清アルブミン、プロトロンビン活性）と線維化マーカー改善効果（ヒアルロン酸）を確認した。更に長期間観察を行うとともに、禁酒効果との科学的比較検証が今後の課題である。臨床応用を目指し、少量の採取骨髓細胞の培養条件の更なる検討を要する。

研究発表

1.論文発表

- 1) Yokozawa J, Sasaki T, Ohwada K, Sasaki Y, Ito JI, Saito T, Kawata S: Down-regulation of hepatic stearyl-CoA desaturase 1 expression by angiotensin II receptor blocker in the obese *fa/fa* Zucker rat: possible role in amelioration of insulin resistance and hepatic steatosis. *J Gastroenterol* 2009; 44 : 583-591
- 2) Saito T, Nishise Y, Makino N, Haga H, Ishii R, Okumoto K, Ito JI, Watanabe H, Saito K, Takeda H, Togashi H, Kubota I, Daimon M, Kato T, Kawata S: Impact of metabolic syndrome on elevated serum alanine aminotransferase levels in the Japanese population. *Metabolism* 2009; 58: 1067-1075
- 3) Takeda H, Nishise S, Fukui T, Fujishima S, Orii T, Otake S, Sato T, Sasaki Y, Kawata S: Plasma Level of Granulocyte-Colony Stimulating Factor during Granulocyte and Monocyte Adsorptive Apheresis in Patients with Ulcerative Colitis. *Hepato-gastroenterol* 2009; 56: 348-351
- 4) Nishise S, Takeda Y, Nishise Y, Fujishima S, Orii T, Otake S, Sato T, Sasaki Y, Takeda H,

Kawata S: Biological effect of anaphylatoxin C5a on the generation of anti-inflammatory substances in leukocyte adsorption. *Ther Apher Dial* 2009; 13: 509-514

- 5) Fujishima S, Takeda H, Kawata S, Yamakawa M: The relationship between the expression of the glucocorticoid receptor in biopsied colonic mucosa and the glucocorticoid responsiveness of ulcerative colitis patients. *Clin Immunol* 2009; 133: 208-217

2.学会発表

- 1) Saito T, Okumoto K, Haga H, Kawata S: Growth factors potentially influencing the differentiation and proliferation of hepatic stem cells in acute liver failure: serum levels in patients and functional analyses in vitro. Choshu International Liver Symposium 2009. Ube, February 14, 2009
- 2) 芳賀弘明、齋藤貴史、奥本和夫、河田純男、他：増殖因子の急性肝疾患における血清動態および肝幹細胞への分化、増殖能の検討。第8回日本再生医療学会総会，東京：2009年3月
- 3) 河田純男：肝幹細胞・再生・線維化、ハイライトレクチャー。第45回日本肝臓学会総会、神戸：2009年6月
- 4) 奥本和夫、齋藤貴史、芳賀弘明、河田純男、他：C型肝疾患における血清bFGF濃度と肝癌予後に関する検討。第45回日本肝臓学会総会、神戸：2009年6月
- 5) 芳賀弘明、齋藤貴史、奥本和夫、河田純男、他：増殖因子の肝疾患における血清動態およびヒト間葉系幹細胞における分化の検討。第45回日本肝臓学会総会，神戸：2009年6月
- 6) 奥本和夫、齋藤貴史、芳賀弘明、河田純男、他：肝再生を目的とした骨髓細胞移植における増殖因子の検討。第16回肝細胞研究会，山形：2009年6月

- 7) 芳賀弘明、齋藤貴史、奥本和夫、河田純男、他：
増殖因子の急性肝疾患での血清動態および肝
幹細胞の分化、増殖能の検討。 第16回肝細胞
研究会，山形：2009年6月

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

骨髄および脂肪由来細胞を用いた次世代型肝臓再生・修復（抗線維化）療法の開発研究に関する研究

研究分担者 梅村武司 信州大学医学部消化器内科 助教

研究要旨：

【目的】肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与[Autologous Bone Marrow Cell Infusion (ABMi)]療法は患者本人の骨髄細胞を採取して注入する治療である。本邦における肝硬変患者の8割以上がB型肝炎ウイルス(HBV)もしくはC型肝炎ウイルス(HCV)が原因である。実際に採取された骨髄細胞中にHBV、HCVの感染、複製が起こっているのか明らかにすることが最終目的である。そこで、本年はin-houseリアルタイムPCRの系を立ち上げ血清・末梢血単核球中のHCV RNAの測定を行うこととした。

【方法】慢性C型肝炎患者（遺伝子型1b 10^6 IU/mL）の血清から採取されたRNAの10倍希釈系列を作成してRT-PCR（リアルタイムPCR）を施行した。さらに、C型慢性肝炎患者23例、非アルコール性脂肪性肝炎3例について末梢血単核球を採取してRNAを抽出してRT-PCRを施行した。GAPDHを内在コントロールとして相対値で表わした。

【成績】リアルタイムPCRは相関係数 $R^2 = 0.99$ 以上であり、血清HCV RNA量は10IU/reactionから 10^6 IU/reactionまで測定可能であった。次に23例のC型慢性肝炎と3例の非アルコール性脂肪性肝炎患者の末梢血単核球からRNAを抽出しリアルタイムPCRを施行し、相対値を示したところHCV RNAは23例で陽性となり、コントロールの非アルコール性脂肪性肝炎は陰性であった。

【考案】In-houseリアルタイムPCR法で血清、末梢血単核球中のHCV RNAは測定可能であった。来年度はABMi療法で採取された骨髄球中のHCV RNA、HBV DNAの測定を行う予定である。

共同研究者

信州大学医学部 法医学 太田正穂 准教授
信州大学医学部附属病院 薬剤部 勝山善彦

A.研究目的

肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与[Autologous Bone Marrow Cell Infusion (ABMi)]療法は患者本人の骨髄細胞を採取して注入する治療であり施行後、肝機能の改善が認められている。本邦における肝硬変患者の8割以上が肝炎ウイルス、特にB型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)が原因である。患者自身の骨髄細胞を注入するとはいえ実際に、骨髄細胞中にHBV、HCVは感染しているのか、複製はされているのか明らかでない点が多い。また、現在のABMi療法は骨髄を採取する際に全身麻酔を行っており、患者への負担もあり、将来的には局所麻酔で少量の骨髄液を採取し、培養を行うことによって骨髄細胞を増殖させて注

入する方法が可能であるか主任研究者らが検討をしている。その際には実際に培養した骨髄細胞中にHBV/HCVの感染があるのか検討が必要になる。

そこで、研究目的としては骨髄細胞におけるHBV/HCVの動態を明らかにすることである。

本年はin-houseリアルタイムPCRの系を立ち上げて血清中、末梢血単核球中のHCV RNAを測定、定量することとした。

B.研究方法

C型肝炎患者（遺伝子型1b、ウイルス量 10^6 IU/mL）から採取された血清からRNAを抽出して、10倍希釈系列を作成してRT-PCR（リアルタイムPCR）を施行

した。プライマー、プローブについては 5'-UTR に設定をした。さらに、C 型慢性肝炎患者 23 例とコントロールとして非アルコール性脂肪性肝炎 3 例について全血から末梢血単核球を採取し、同様にリアルタイム PCR を施行した。内在性コントロールとして GAPDH を用いて検討を加えた。

C. 研究結果

血清から抽出された希釈系列の RNA について RT 施行後、GAPDH と HCV RNA のリアルタイム PCR を施行した。図1に示すように相関係数 R^2 0.99 以上であった。血清 HCV RNA 量は 10IU/reaction から 10^6 IU/reaction まで測定可能であった。

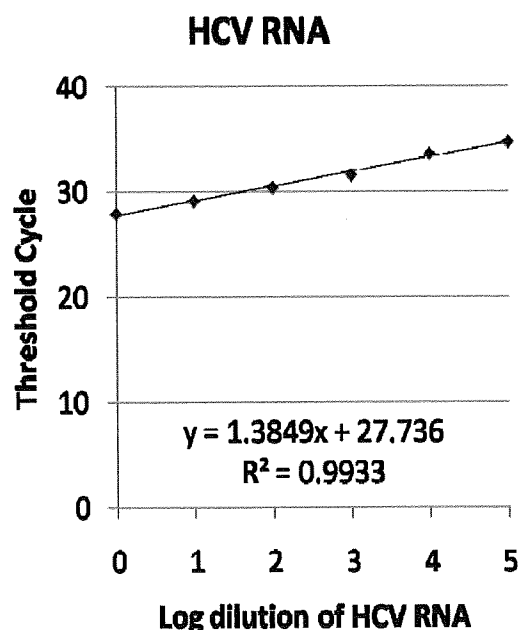


図1 血清 HCV RNA 希釈系列の C_T 値

次に末梢血単核球中から RNA を抽出、RT 施行後 HCV RNA をリアルタイム PCR で測定した。HCV RNA 相対値を GAPDH 相対値で補正した値について最も低値のものを 1.0 とした場合、他の C 型慢性肝炎患者の検体における相対値は 1.1 から 7563 であった。非アルコール性脂肪性肝炎の 3 例は相対値 0 であり、HCV RNA は増幅されなかった。

D. 考察

In-house リアルタイム PCR 法で血清、末梢血単核球中の HCV RNA は測定可能である。特に末梢血単核球から RNA を抽出して HCV RNA を測定できることが明らかとなった。来年度の課題は絶対定量を行うこと、negative-strand HCV を測定できるリアルタイム PCR の系を確立することである。さらに、HBV DNA のリアルタイム PCR を確立して ABMi 療法で採取された骨髓球中の HCV RNA、HBV DNA の測定を行う予定である。

E. 結論

末梢血単核球中の HCV RNA をリアルタイム PCR にて測定することは可能である。来年度は骨髓細胞中における HBV DNA、HCV RNA の動態を明らかにする予定である。

研究発表

1. 論文発表

Umamura T, Ichijo T, Yoshizawa K, Tanaka E, Kiyosawa K. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Japan. *Journal of Gastroenterology* 2009; suppl 19 : 102-107.

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

今回の研究内容についてはなし。

2. 実用新案登録

3. その他