

201125014A

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23年度 総括研究報告書

研究代表者 坂井田 功

平成24（2012）年 3月

目 次

I. 総括報告書	1
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	
坂井田 功	
II. 分担研究年度終了報告書	6
1. 肝再生・修復（抗線維化）のメカニズムの解明に関する研究	
宮島 篤	
2. 質量顕微鏡法による再生肝リン脂質動態の網羅的解析	
仁科 博史	
3. NASH の病態形成におけるマクロファージの病態生理的意義	
小川 佳宏	
4. ABMi療法の有効性を向上させるための骨髄細胞と肝幹細胞の相互作用の基礎的検討	
斉藤 貴史	
5. 骨髄細胞中の HBV DNA・HCV RNA の定量	
梅村 武司	
6. 皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞の肝硬変に対する効果の研究	
大河内仁志	
7. 脂肪組織由来間質細胞による慢性肝疾患に対する再生療法に関する研究	
酒井 佳夫	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	31
IV. 研究成果の刊行物・別刷	36

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）
総括研究報告書

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

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)〕』を実施してきた。この 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と考ええる。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機関における職名）

宮島 篤（東京大学 分子細胞生物学研究所 発生・再生研究分野 教授）

河田 純男（山形大学医学部 消化器病態制御内科 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）

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）

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）

斉藤 貴史（山形大学医学部 消化器病態制御内科 准教授）

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）

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）

梅村 武司（信州大学医学部 消化器内科 講師）

高見 太郎（山口大学医学部附属病院 検査部 助教）

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、平成 15 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)〕』を実施してきた。平成 21 年 12 月までに、山口大学では 19 症例に対し実施したが、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。さらに国際共同研究として韓国 Yonsei 大学で第 1 例目が平成 18 年 11 月に実施され、現在までに 9 症例に実施され、その有効性の再現性が確認された。このように現在まで合計 34 症例に実施してきており、この ABMi療法をいち早く肝硬変症患者に提供することが急務であると考ええる。一方、肝臓は、肝細胞のみならず、胆管

細胞、星細胞、内皮細胞や Kupffer 細胞から構成され、肝硬変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、下記の項目の達成を目指した。

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

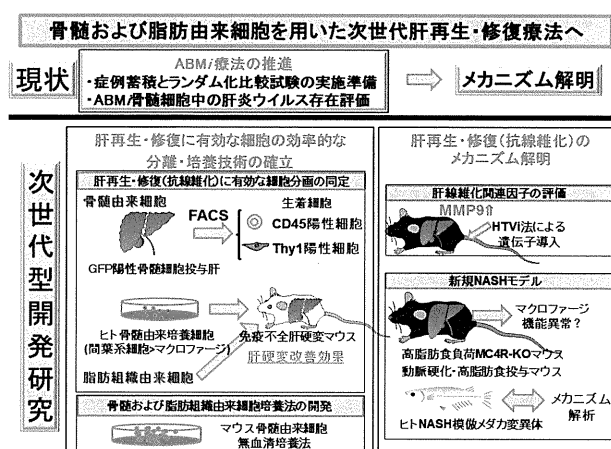
- ・分離肝臓構成細胞と骨髄および脂肪由来細胞との相互作用の解析
- ・投与骨髄および脂肪由来細胞の抗肝線維化メカニズムの解明
細胞外マトリクスの産生・分解に関与する酵素、その制御因子、細胞外シグナル分子とその受容体、転写因子を解析する。

3. ABMi 療法臨床研究の推進

ABMi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。
以上の目標を達成できれば、世界的に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と考える。

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既に報告した(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、四塩化炭素障害で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。また細胞外マトリックス関連酵素、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) の実施・多施設共同臨床研究の準備

ABMi 療法の技術移転を行った山形大学及び韓国 Yonsei (延世) 大学でも安全性・有効性があらためて確認された。また、国立国際医療研究センターでは、HIV 合併 C 型肝硬変症に対する ABMi 療法を平成 22 年 12 月に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の承認を受け、平成 23 年 3 月より開始し、現在までに 2 例に実施した。

また、「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性に関する研究」というランダム化比較試験の研究計画に関して、ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会等の承認を受けた。

・ヒト骨髄由来肝再生・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

ヒト骨髄由来培養細胞を免疫不全肝硬変マウスに投与しその肝線維化抑制効果をシリウスレッド染色で評価したところ、肝線維化は有意に抑制されていた。またその投与細胞を FACS 解析したところ、間葉系マーカー陽性細胞とマクロファージ系マーカー陽性細胞であった。

・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において High density 法により無血清培地培養が可能となった。また、肝硬変マウス骨髄細胞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)と共同研究推進を行っている。

・Image Mass spectrometer による解析

肝再生に関与する脂質について Massspectrometer を用いて解析した。

・非アルコール性脂肪肝炎モデルの作成

新たに MCR4KO マウスを用いてマウスの新しい NASH モデルを作成した。本モデルの確立により今後は NASH 病態に対する骨髄細胞投与の改善効果を検討する。

・脂肪組織由来間質細胞の肝硬変への効果の検討

マウス皮下脂肪組織より間質細胞を分離、培養した、脂肪組織由来間質細胞を、C57BL/6 マウスに経脾経門脈投与し、肝、肺、脾、腎組織における細胞の分布、生着日数を検討したところ、投与後 2 週間で肝臓に生着することが確認できた。

D. 考 察

山形大学・韓国延世大学でそれぞれ ABMi 療法の肝硬変症に対する有効性を示す論文を発表されたことで他施設での ABMi 療法の有効性を証明することができた。また、国立国際医療研究センターで、HIV 合併 C 型肝硬変症に対する ABMi 療法を平成 22 年 12 月に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の承認を受け、平成 23 年 3 月より開始し、現在までに 2 例に実施した。さらに、「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性に関する研究」という多施設共同で実施予定のランダム化比較試験の研究計画に関して、ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会等の承認を受けており、今後は高度医療への申請を行っていく。

基礎研究では 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。さらに間葉系マーカー陽性細胞が高濃度に含まれているヒト骨髄由来培養細胞を免疫不全肝硬変マウスに投与することで肝線維化を抑制することを確認することができた。

E. 結 論

免疫不全肝硬変マウスへのヒト骨髄由来培養細胞投与による肝線維化抑制効果を確認した。その細胞群には、間葉系マーカー陽性細胞が高濃度に含まれていた。今後は、「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変

患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性に関する研究」の推進と、ヒト骨髄間葉系マーカー陽性細胞を用いた肝硬変治療法の開発を行っていく。またさらに、非アルコール性脂肪肝炎モデル等様々な場合における骨髄細胞の動態・治療効果も検討する。

研究発表

1.論文発表

1: Yamasaki T, Terai S, and Sakaida I. Deferoxamine for advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 365(6):576-578,2011.

2: Terai S, Sakaida I. Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 18:23-25,2011.

3: Saito T, Okumoto K, Haga H, Nishise Y, Ishii R, Sato C, Watanabe H, Okada A, Ikeda M, Togashi H, Ishikawa T, Terai S, Sakaida I, Kawata S. Potential Therapeutic Application of Intravenous Autologous Bone Marrow Infusion in Patients with Alcoholic Liver Cirrhosis. *Stem Cells Dev.* 20(9):1503-1510,2011.

4: Iwamoto T, Terai S, Mizunaga Y, Yamamoto N, Omori K, Uchida K, Yamasaki T, Fujii Y, Nishina H, and Sakaida I. Splenectomy enhances the anti-fibrotic effect of bone marrow cell infusion and improves liver function in cirrhotic mice and patients. *J. Gastroenterol.* 47(3):300-312, 2012.

5: Takami T, Terai S, Sakaida I. Novel Findings for the Development of Drug Therapy for Various Liver Diseases:Current State and Future Prospects for Our Liver Regeneration Therapy Using Autologous Bone Marrow Cells for Decompensated Liver Cirrhosis Patients. *J Pharmacol Sci.* 115:274-278,2011

6: Oishi T, Terai S, Iwamoto T, Takami T, Yamamoto N, Sakaida I. Splenectomy reduces fibrosis and preneoplastic lesions with increased triglycerides and essential fatty acids in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Hepatol Res.* 41(5):463-474,2011.

7: Maeda M, Takami T, Terai S, Sakaida I. Autologous bone marrow cell infusions suppress tumor initiation in hepatocarcinogenic mice with liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 27 Suppl 2:104-111, 2011.

8: Hisanaga T, Terai S, Iwamoto T, Takami T, Yamamoto N, Murata T, Matsuyama T, Nishina H, Sakaida I. TNFR1-mediated signaling is important to induce the improvement of liver fibrosis by bone marrow cell infusion. *Cell Tissue Res.* 346(1), 79-88, 2011.

9: Kuwashiro S, Terai S, Oishi T, Fujisawa K, Matsumoto T, Nishina H, Sakaida I. Segawa M, Sakaida I. Telmisartan improves nonalcoholic steatohepatitis in medaka (*Oryzias latipes*) by reducing macrophage infiltration and fat accumulation. *Cell Tissue Res.* 344:125-134,2011

10: Takami T, Terai S, Sakaida I. Stem cell therapy in chronic liver disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 28(3), 203-8, 2012.

11: 寺井 崇二、坂井田 功 自己骨髄細胞投与による肝再生医療 日本再生医療学会雑誌 10(4), 431-435, 2011.

2.学会発表

(The seminar at Edinburgh University Regenerative Center 平成 23 年 3 月)

ABMi therapy for liver cirrhosis patient

(日本再生医療学会総会 平成 23 年 3 月 ポスター)

マウス肝硬変発癌モデルにおける自己骨髄細胞投与の影響評価

(日本再生医療学会総会 平成 23 年 3 月 ポスター)

マウス骨髄由来無血清培養細胞投与による肝線維化・肝機能改善効果

(日本再生医療学会総会 平成 23 年 3 月 ポスター)

ヒト骨髄由来培養細胞投与による肝線維化・肝機能改善

(抗加齢学会シンポジウム 平成 23 年 5 月 招待講演)

肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法(ABMi 療法)の現状と今後の展開

(日本肝臓学会総会 平成23年6月 ワークショップ)
骨髄細胞投与による肝硬変合併肝細胞がんに対する
新たな抗線維化・抗腫瘍療法開発への基礎研究

(日本肝臓学会総会 平成23年6月 口演)
肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与は肝発がんを抑制する

(日本肝臓学会総会 平成23年6月 口演)
肝線維化修復時における二種類の骨髄由来細胞の動態と特徴

(日本肝臓学会総会 平成23年6月 ポスター)
ヒト骨髄由来培養細胞投与による肝線維化・肝機能改善

(JDDW 平成23年10月 ワークショップ)
骨髄細胞頻回投与による肝細胞がん合併肝硬変症に対する修復再生・抗腫瘍療法開発のための基礎研究

(AASLD 平成23年11月 口演)
Thermosensitive organic/inorganic nanocomposite gels-cultured bone marrow derived cells improved liver fibrosis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis mice

(AASLD 平成23年11月 ポスター)
Two kind of bone marrow cells phagocyte damaged hepatocyte and repair fibrosis in cirrhosis mice
(AASLD 平成23年11月 ポスター)

Improvement of liver fibrosis and liver function by infusion of cultured cells derived from human bone marrow-Basic research directed toward development of human bone marrow derived cultured cell infusion therapy-

(AASLD 平成23年11月 ポスター)
Frequent bone marrow cell infusion promotes liver regeneration and suppresses tumor-initiation in hepatocarcinogenic mouse with liver cirrhosis

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得

特許 4752058(平成23年6月3日)

「肝再生骨髄細胞画分」

ABMi療法の開発に伴い取得した特許である。

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（肝炎等克服緊急対策研究事業）
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

研究要旨:

【目的】 肝線維化あるいはその改善に関わる細胞種および因子の解析

【方法】 肝障害により発現が誘導される遺伝子は線維化の進行あるいはその改善に関与することが期待される。すでにそうした遺伝子を複数同定しているため、本年度は、可溶性因子に着目して解析を行った。また、肝線維化の進行および改善には肝臓に存在するマクロファージ系細胞が重要な機能を担うことが指摘されているが、肝マクロファージの性状には不明な点が多いので、この細胞集団の性状解析を行った。

【成績】 先行研究により選択した線維化への関与が期待される可溶性分子、Nephronectin (Npnt)、Semaphorin (Sema)の肝障害時における発現解析を行った。両分子とも肝炎に伴って発現が増大する。Npnt を肝臓で発現させると、granuloma 様の細胞クラスターが多数出現し、肝炎が増悪化した。集簇する細胞は主に CD4 陽性の T 細胞系細胞であった。マクロファージの解析から肝臓在住マクロファージは複数のサブセットに分かれることが示された。

【考察】 Npnt は肝炎で発現が増大し、それを肝臓に発現すると肝炎を増悪化することから、肝炎治療の標的となる可能性が考えられる。従来、肝臓マクロファージはクッパー細胞とひとくくりで呼ばれていたが、実際には複数の異なる細胞集団であることが示されたので、どの細胞が肝線維化に関わるかを明らかにすることで新たな治療戦略につながることを期待される。

共同研究者

田中稔、伊藤暢、菊地暁子、榎本豊

A.研究目的

肝障害からの修復再生のメカニズムを明らかにするために、肝障害に応じて発現が誘導される遺伝子の解析を行ってきた。その中で、本年度は分泌タンパク質に注目し、それらの発現解析を行うとともに、cDNA を Hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法により肝臓で発現させ、肝線維化/障害に対する作用を検証する。

肝マクロファージが肝線維化に深く関与することは以前から指摘されているが、肝マクロファージの実体は十分に解明されていない。そこで、本研究ではまずこの細胞集団の詳細な解析と肝障害による動態を解析する。

B.研究方法

Hydrodynamic tail vein injection (HTVi) 法は、プラスミド DNA を含む大量の溶液(マウス体重の10%)を尾静脈からごく短時間で注入することで肝細胞に特異的に遺伝子導入する方法であり、適当な発現ベクターを使うことで目的遺伝子の発現を数週間にわたり維持させることのできる方法である。本研究では、肝細胞で高発現する pLIVE 発現ベクターを用いた。肝障害は ConA 投与による急性肝炎モデルと 3, 5-Diethoxycarbonyl-1, 4-Dihydrocollidine (DDC) 食餌による慢性肝炎モデルにより誘導して、当該遺伝子の機能評価を行った。

Sema3e の機能解析にはそのノックアウトマウ

スの肝障害において評価した。

肝マクロファージの解析は肝臓を灌流して得た非実質細胞分画を各種の細胞膜タンパク質に対する抗体を使った FACS により発現解析を行った。

C. 研究結果

Npnt の発現と機能解析

我々は肝障害の増悪・軽減に関わる因子を網羅的に探索するため、正常肝と慢性障害肝の遺伝子発現アレイ解析を行い、慢性肝障害時に発現が上昇する遺伝子の一つとして、ネフロネクチン(Npnt)を同定した。Npnt は後腎の発生や立毛筋の付着位置決定に重要であることが知られている細胞外マトリクスタンパク質であり、主に integrin $\alpha 8$ と相互作用する。Npnt は肝炎増悪化因子として知られるオステオポンチンと同様に RGD motif を有するが、Npnt の肝臓における機能は明らかとなっていない。

本研究では、Npnt の発現を正常肝、ConA による急性肝炎モデル、および DDC 食餌による慢性肝炎モデルにて解析を行った。Npnt は正常肝の門脈や中心静脈域に弱く発現するが、ConA や DDC による肝炎により発現が上昇し、とりわけ炎症性の foci に発現が認められた。さらに、この Npnt 産生細胞は間葉系細胞であることが示唆された。

次に、Npnt を HTVi 法により肝臓で過剰発現させた。その結果、Granuloma 様の細胞クラスターの形成が肝実質内に多数認められた。また、免疫染色による検討で集簇している細胞は主に CD4 陽性の T 細胞系細胞であることが確認された。さらに、

Npnt を過剰発現させたマウスでは、ConA による急性肝炎が増悪化した。以上の結果から、Npnt は肝臓における免疫系の制御に関わる因子であることが強く示唆された。

Sema3e の発現と機能解析

Sema3e は神経軸索の伸長や血管形成に関与する Semaphorin family の分子である。肝炎における Sema3e の発現を定量 PCR にて検討した結果、ConA による肝炎で発現が上昇し、症状の悪化との相関が認められた。肝炎により Sema3e は肝細胞で発現し、その受容体である Plexin D1 は肝類洞内皮細胞と星細胞で発現していた。さらに、CC14 投与による肝線維化モデルにおいては、Sema3e のノックアウトマウスで線維化の抑制傾向が認められた。現在、これについてはさらに解析を進めている。以上の結果から Sema3 は肝炎/肝線維化において機能している可能性が強く示唆された。

肝マクロファージの解析

肝在住マクロファージはクッパー細胞とも呼ばれて肝炎/線維化においては主要な役割を果たしていると考えられている。しかし、クッパー細胞の実体は十分理解されていない。そこで、細胞膜抗原の発現を指標に肝非実質細胞を分画した。従来、肝臓中の F4/80 陽性細胞がクッパー細胞であると考えられているが、F4/80 細胞集団はヘテロな集団であり、CD11b や FSC などによりさらに少なくとも3つの亜集団に分けられることが明らかとなった。したがって、肝線維化に関わる肝マクロファージの解析においては、単に F4/80 の発現のみならず、他の細胞膜抗原などの発現も指標にした細胞集団の解析が必要である。

D. 考 察

肝障害で誘導される分子のうち、Npnt の過剰発現で主に NKT 細胞の集簇を伴う肝障害の増悪作用がみとめられた。Npnt には RGD 配列があり、integrin との相互作用が知られているので、肝障害において Npnt と integrin がどのような関係にあり、何を介して NKT 細胞の集簇を促進するのか明らかにすることで肝障害のメカニズムの一端が明らかになるものと思われる。

一方、Sema3e のノックアウトマウスでは肝線維化が抑制される傾向がみられたことから、線維化への関与が示唆された。Sema3e は肝細胞が発現し、受容体は類洞内皮細胞や星細胞に発現することから、それら細胞間の相互作用の解明が待たれる。

従来、肝臓に存在する F4/80 陽性がクッパー細胞であると考えられているが、本研究から F4/80 陽性細胞集団が少なくとも 3 つの亜集団からなることが明らかになった。したがって、クッパー細胞を再定義する必要があるとともに、どの細胞が肝線維化の進行あるいは改善に関与するのか明らかにする必要がある。

E. 結 論

肝炎において発現誘導される分子のうちで Npnt と Sema3e について解析を行い、肝炎／線維化への関与が示唆された。一方、肝臓中のマクロファージの解析から、肝臓中のマクロファージの多様性が認められた。したがって今後、どのマクロファージ集団が線維化の進行あるいは抑制に関与するのか明らかにすることで新たな治療法の開発につながることを期待される。

研究発表

1.論文発表

Tanaka M., Itoh T., Tanimizu N. and Miyajima A. Liver stem/progenitor cells: Their characteristics and regulatory mechanisms. *J. Biochem.* 149, 231-239, 2011.

Itoh T., Tanaka M., and Miyajima A. Liver stem cells. *Regenerative Medicine from protocol to patient* (Springer 327 Ed. G. Steinhoff) p327-349. 2011.

Miyaoka Y., Kato H., Ebato K., Saito S., Miyata N., Imamura T., and Miyajima A. Retention in the Golgi apparatus and expression on the cell surface of Cfr/Esl-1/Glg-1/MG-160 are regulated by two distinct mechanisms. *Biochemical Journal.* 44, 33-41, 2011.

Tanaka M. and Miyajima A. Identification and isolation of adult liver stem/progenitor cells. *Methods in Molecular Biology* (Ed. Ochiya T., Humana Press) 826, 25-32, 2012.

Tsukahara Y., Tanaka M. and Miyajima A. TROP2 expressed in the trunk of the ureteric duct regulates branching morphogenesis during kidney development. *PLoS One* 6, e28607, 2011.

2.学会発表

Tohru Itoh, Hinako Takase, and Atsushi Miyajima. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *The 9th Stem Cell Research Symposium* (Izumi Garden Gallery, Tokyo 2011.5.13)

高瀬 比菜子、伊藤 暢、宮島 篤.成体肝幹

／前駆細胞反応を制御するニッチシグナルの同定と機能解析.第 23 回高遠シンポジウム (高遠さくらホテル 2011.8.25)

Cellular basis of liver regeneration

Yuichiro Miyaoka, Tohru Itoh, Hinako Takase, Minoru Tanaka and Atsushi Miyajima. *Liver Down Under 2011:Liver Development, Disease & Regeneration* (University of Western Australia, Perth, Australia 2011.12.2)

Tohru Itoh, Hinako Takase, and Atsushi Miyajima. Critical role of FGF7 in regulating stem/progenitor cell response and regeneration in damaged livers. *Liver Down Under 2011:Liver Development, Disease & Regeneration* (University of Western Australia, Perth, Australia 2011.12.2)

Mechanisms of stem/progenitor cell-dependent and -independent liver regeneration

Tohru Itoh, Hinako Takase, Yuichiro Miyaoka, Minoru Tanaka and Atsushi Miyajima
第 34 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜 2011.12.13)

Itoh T., Takase H., Miyajima A. Conserved role of FGF7 in regulating stem/progenitor cell response in diseased mouse livers. 第 34 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜 2011.12.13)

藤井 清太郎、高瀬 比菜子、伊藤 暢、宮島 篤.マウス成体肝幹／前駆細胞制御における Notch シグナルの機能解析. 第 34 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜 2011.12.13)

Kaneko K., Itoh T., Takase H., Miyajima A.FGF7 is required for the bile duct formation in compensatory liver regeneration. 第 34 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜

2011.12.13)

Ebato k., Miyaoka Y., Kato H., Miyajima A. Hypertrophy and proliferation of hepatocytes in liver regeneration. 第 34 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜 2011.12.13)

稲垣 冬樹、田中 稔、稲垣 奈都子、國土 典宏、宮島 篤. ネフロネクチンの肝障害時の病態形成への関与. 第 34 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜 2011.12.16)

西條 栄子. Inhibition of Stabilin-2 elevates the circulating hyaluronic acid level and prevents tumor metastasis. 第 34 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜 2011.12.14)

加藤 英徳、宮岡 佑一郎、宮島 篤. Y-box binding protein-1 induces proliferation of hepatocytes via transcriptional regulation in vivo. 第 34 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜 2011.12.16)

Tomoki Yagai, Minoru Tanaka, Atsushi Miyajima. A possible role of Semaphorin in liver inflammation. 第 34 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜 2011.12.14)

千賀 一徳、Keith E. Mostov、三高 俊広、宮島 篤、谷水 直樹. Grainyhead-like 2 regulates epithelial barrier function and morphogenesis of biliary epithelial cells through upregulation of Rab25. 第 34 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜 2011.12.16)

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（肝炎等克服緊急対策研究事業）
研究分担報告書

「質量顕微鏡法による再生肝リン脂質動態の網羅的解析」

研究分担者氏名：仁科 博史 所属機関：東京医科歯科大学 職名：教授

研究要旨：

【目的】肝患者から採取可能な微量サンプルを用いた新たな検査法の開発と、線維化改善（抗線維化）と肝再生・修復時に変化する低分子マーカーの同定が求められている。そこで我々は、次世代ライスサイエンス技術として注目されている「質量顕微鏡法」を用いた、マウス再生肝におけるリン脂質動態の網羅的解析を目的に実験を行った。

【方法】マウス70%部分切除を行い、1〜2日後に誘導される脂肪肝から切片を調製し、質量顕微鏡を用いて、分子量1000以下の低分子を網羅的に解析し、このうちリン脂質については可視化の処理を行った。

【成績】従来の分析方法である薄層クロマトグラフィー（TLC）では単一バンドとしてしか捉えることができなかったトリグリセリド（TG）が質量分析の結果、多種類から構成されていることが明らかとなった。また、TLC では変化を検出できなかった多種類のリン脂質（PC）がダイナミックに増減していること、いくつかのリン脂質は肝臓小葉構造に沿って濃度勾配（zonation）で存在することも明らかにすることができた。

【考案】質量顕微鏡は、肝臓由来の微量切片から、低分子量の脂質を位置情報を保ちながら網羅的に解析可能な検査法であることが判明した。また、肝臓には多種類の TG や PC が存在し、固有の挙動を示すことから、それぞれが固有の生理機能を有している可能性が示唆された。この特性を検討することで、様々な肝病態に対応する分子マーカーとなることが期待される。

共同研究者

平山 順（東京医科歯科大学・准教授）
浅岡 洋一（東京医科歯科大学・助教）
宮村 憲央（東京医科歯科大学・大学院生）
堅田 利明（東京大学・教授）
瀬藤 光利（浜松医科大学・教授）

坂井田 功（山口大学・教授）
寺井 崇二（山口大学・准教授）

A. 研究目的

肝患者から採取可能な微量サンプルを用いた新たな検査法の開発と、線維化改善（抗線維化）と肝再生・修復時に変化する低分子マーカーの同定が求められている。そこで我々は、次世代ライスサイエンス技術として注目されている「質量顕微鏡法」を用いた、マウス再生肝におけるリン脂質動態の網羅的解析を目的に実験を行った。

B. 研究方法

マウス70%部分切除を行い、1〜2日後に誘導される脂肪肝から切片を調製し、マトリックスを塗

布した後、質量顕微鏡を用いて、分子量1000以下の低分子を網羅的に解析した。このうち TG と PC については可視化の処理を行い、位置情報を含んだ定量解析を行った。

C. 研究結果

従来の分析方法である薄層クロマトグラフィー（TLC）では単一バンドとしてしか捉えることができなかったトリグリセリド（TG）が質量分析の結果、多種類から構成されていることが明らかとなった。また、TLC では変化を検出できなかった多種類のリン脂質（PC）がダイナミックに増減していること、いくつかのリン脂質は肝臓小葉構造に沿って濃

度勾配(zonation)で存在することも明らかにすることができた。

D. 考 察

質量顕微鏡は、肝臓由来の微量切片から、低分子量の脂質を位置情報を保ちながら網羅的に解析可能な検査法であることが判明した。また、肝臓には多種類の TG や PC が存在し、固有の挙動を示すことから、それぞれが固有の生理機能を有している可能性が示唆された。この特性を検討することで、様々な肝病態に対応する分子マーカーとなることが期待される。

E. 結 論

質量顕微鏡は、低分子量の脂質を位置情報を保ちながら網羅的に解析できる有望な解析方法であることが判明した。また、肝臓には多種類の TG や PC が存在し、固有の挙動を示すことから、それぞれが固有の生理機能を有している可能性が示唆された。また、この特性から、様々な肝臓の状況に対応する分子マーカーの単離が期待された。今回同定された PC 分子種がヒトの病態と関連するかの検討が期待される。

研究発表

1.論文発表

1. Yoshimi Uchida, Tomomi Osaki, Tokiwa Yamasaki, Tadanori Shimomura, Shoji Hata, Kazumasa Horikawa, Shigenobu Shibata, Takeshi Todo, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina (2012) Involvement of the Stress Kinase Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 7 in the Regulation of the Mammalian Circadian Clock. *J. Biol. Chem.* in press□□
2. Yoshimi Uchida, Tadanori Shimomura, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina (2012) Light, reactive oxygen species, and magnetic fields activate ERK/MAPK signaling pathway in cultured zebrafish cells. *Appl. Magn. Reson.* 42, 69-77.□□
3. Tadashi Yokoi, Yuko Seko, Tae Yokoi,

- Hatsune Makino, Shin Hatou, Masakazu Yamada, Tohru Kiyono, Akihiro Umezawa, Hiroshi Nishina, Noriyuki Azuma (2012) Establishment of Functioning Human Corneal Endothelial Cell Line with High Growth Potential. *PLoS ONE* accepted□□
4. Ken Okada, Akihide Kamiya, Keiichi Ito, Ayaka Yanagida, Hidenori Ito, Hiroki Kondou, Hiroshi Nishina and Hiromitsu Nakauchi (2012) Prospective isolation and characterization of bi-potent progenitor cells in early mouse liver development. *Stem Cells and Development.* in press.□□
5. Yuko Mizunaga, Shuji Terai, Naoki Yamamoto, Koichi Uchida, Takahiro Yamasaki, Hiroshi Nishina, Yusuke Fujita, Koh Shinoda, Yoshihiki Hamamoto and Isao Sakaida (2012) Granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-1b are important cytokine in repair of the cirrhotic liver after bone marrow cell infusion-comparison of humans and mice. *Cell Transplantation* in press□□
6. Takuya Iwamoto, Shuji Terai, Yuko Mizunaga, Naoki Yamamoto, Kaoru Omori, Koichi Uchida, Takahiro Yamasaki, Yasuhiko Fujii, Hiroshi Nishina, and Isao Sakaida (2012) Splenectomy enhances the anti-fibrotic effect of bone marrow cell infusion and improves liver function in cirrhotic mice and patients *J. Gastroenterol.* in press□□
7. Tokiwa Yamasaki, Hiroshi Kawasaki and Hiroshi Nishina (2012) Diverse roles of JNK and MKK pathways in the brain. *J. Signal Trans.* in press
8. Tokiwa Yamasaki, Hiroshi Kawasaki, Satoko Arakawa, Kimiko Shimizu, Shigeomi Shimizu, Orly Reiner, Hideyuki Okano, Sachiko Nishina, Noriyuki Azuma, Josef M. Penninger, Toshiaki Katada and Hiroshi Nishina (2011) Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 31, 16872-16883.
9. □□Norio Miyamura, Takashi Nakamura, Naoko Goto-Inoue, Nobuhiro Zaima, Takahiro Hayasaka, Tokiwa Yamasaki, Shuji Terai, Isao Sakaida, Mitsutoshi Setou and Hiroshi Nishina (2011) Imaging mass spectrometry reveals characteristic changes in triglyceride and phospholipid species in regenerating mouse liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408, 120-125.

10. Tomomi Osaki, Yoshimi Uchida, Jun Hirayama, and Hiroshi Nishina (2011) Diphenyleiodonium chloride, an inhibitor of NADPH oxidase, suppresses light-dependent induction of clock and DNA repair genes in zebrafish. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1343-1347.
11. □□Shinya Takahashi, Arisa Ebihara, Hiroaki Kajihō, Kenji Kontani, Hiroshi Nishina, and Toshiaki Katada (2011) RASSF7 negatively regulates pro-apoptotic JNK signaling by inhibiting the activity of phosphorylated-MKK7. *Cell Death Differ.* 18, 645-655.□□
12. Shinya Takahashi, Kyoko Sakurai, Arisa Ebihara, Hiroaki Kajihō, Kota Saito, Kenji Kontani, Hiroshi Nishina, and Toshiaki Katada (2011) RhoA activation participates in rearrangement of processing bodies and release of nucleated AU-rich mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 39, 3446-3457.□□
13. Hiroshi Yukiura, Kotaro Hama, Keita Nakanaga, Masayuki Tanaka, Yoichi Asaoka, Shinichi Okudaira, Naoaki Arima, Asuka Inoue, Takafumi Hashimoto, Hiroyuki Arai, Atsuo Kawahara, Hiroshi Nishina, and Junken Aoki (2011) Autotaxin regulates vascular development via multiple lysophosphatidic acid (LPA) receptors in zebrafish. *J. Biol. Chem.* 286, 43972-43983.□□
14. Takuro Hisanaga, Shuji Terai, Takuya Iwamoto, Taro Takami, Naoki Yamamoto, Tomoaki Murata, Toshifumi Matsuyama, Hiroshi Nishina, Isao Sakaida (2011) TNFR1 mediated signaling is important to induce the improvement of liver fibrosis by bone marrow cell infusion. *Cell Tissue Res.* 346, 79-88.□□
15. Shinya Kuwashiro, Shuji Terai, Toshiyuki Oishi, Fujisawa Koichi, Toshihiko Matsumoto, Hiroshi Nishina, Isao Sakaida (2011) Telmisartan improved nonalcoholic steatohepatitis in medaka (*Oryzias latipes*) by reducing macrophage infiltration and fat accumulation. *Cell Tissue Res.* 344, 125-134.□□
16. Yijun Bao, Kentaro Nakagawa, Zeyu Yang, Mitsunobu Ikeda, Kanchanamala Withanage, Mari Ishigami-Yuasa, Yukiko Okuno, Shoji Hata, Hiroshi Nishina, and Yutaka Hata (2011) A cell-based assay to screen stimulators of the Hippo pathway reveals the inhibitory effect of dobutamine on the

YAP-dependent gene transcription. *J. Biochem.* 150, 199-208.□

2.学会発表

1. 宮村憲央, 仁科博史; 質量顕微鏡を用いた再生肝における脂質量変化の解析 [日本薬学会第 131 年会; 2011 年 3 月/静岡]
2. 尾崎友美, 仁科博史; ストレス応答性 JNK シグナル経路による分子時計制御機構の解析 [日本薬学会第 131 年会; 2011 年 3 月/静岡]
3. 島星治, 仁科博史; がん原遺伝子産物 YAP の新規翻訳後修飾アセチル化の同定 [日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム; 2011 年 5 月/金沢]
4. 尾崎友美, 仁科博史; ストレス応答性キナーゼ JNK による分子時計制御因子 BMAL1 のリン酸化 [日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム; 2011 年 5 月/金沢]
5. 島星治, 仁科博史; がん原遺伝子産物 YAP の新規翻訳後修飾アセチル化の同定 [第 10 回生命科学研究会; 2011 年 6 月/高崎]
6. 宮村憲央, 仁科博史; 質量顕微鏡を用いたマウス再生肝の脂質の解析 [第 18 回肝細胞研究会; 2011 年 6 月/東京]
7. 仁科博史; 小型魚類を用いた肝臓研究 [第 1 回医学・創薬に向けた小型魚類モデル利用推進ネットワーク; 2010 年 6 月/名古屋]
8. 仁科博史; 細胞の生死を制御するストレス応答性 MAP キナーゼシグナル伝達系 [第 20 回日本 Cell Death 学会学術集会; 2011 年 7 月/東京]
9. 山崎世和, 仁科博史; ストレス応答性キナーゼ MKK7 による軸索伸長制御 [第 34 回日本神経科学大会; 2011 年 9 月/横浜]
10. 仁科博史; RASSF family によるストレス

- 応答性 JNK シグナルの制御 [第 84 回日本生化学大会シンポジウム ; 2011 年 9 月 / 京都]
11. 内田好海, 仁科博史; ストレス応答性キナーゼ MKK7 による分子時計制御機構の解明 [第 18 回日本時間生物学会学術大会 ; 2011 年 11 月 / 名古屋]
12. 仁科博史 / 佐々木洋世話人ワークショップ ; Recent Advances of Hippo and RASSF Signaling Pathways that Regulates Cell Fate [第 34 回日本分子生物学会年会 ; 2011 年 12 月 / 横浜]
13. 仁科博史 ; Liver development , regeneration and disease: lessons from mice and fish [第 9 回心血管幹細胞研究会 ; 2012 年 1 月 / 東京]
14. 仁科博史 ; Liver development , regeneration and disease: lessons from mice and fish [東京大学薬学セミナー ; 2012 年 1 月 / 東京]
15. Jun Hirayama and Hiroshi Nishina; Light-dependent regulation of zebrafish circadian transcription [Spin Chemistry Meeting 2011, Noordwijk, Netherlands, May 2011]
16. Hiroshi Nishina; RASSF7 functions as an anti-apoptotic regulator of JNK signaling by inhibiting phosphorylated MKK7 activity [2nd RASSF Symposium, Oxford, UK, July 2011]
17. Jun Hirayama and Hiroshi Nishina; Identification of novel kinase phosphorylating CRYPTOCHROME 1 to regulate its protein stability [5th Asia and Oceania Conference for Photobiology, Nara, Japan, August 2011]
18. Hiroshi Nishina; Imaging mass spectrometry reveals characteristic changes in triglyceride and phospholipid species in regenerating mouse liver [Liver Down Under 2011, Perth, Australia, Nov-Dec 2011]
- 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
ナシ

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）
研究分担報告書

「 NASH の病態形成におけるマクロファージの病態生理的意義 」

研究分担者氏名： 小川 佳宏 所属機関： 東京医科歯科大学 職名：教授

研究要旨：

【目的】

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) はメタボリックシンドロームの肝臓における表現型と考えられ、実質細胞である肝細胞とマクロファージ、肝星細胞を含む間質細胞との相互作用が病態の発症・進展に関与する。しかしながら、従来、メタボリックシンドロームの病態と NASH 様肝病変を併せ持つ動物モデルが存在しなかったため、その詳細は不明であった。本研究では、我々が独自に確立した NASH モデルであるメラノコルチン 4 型受容体欠損マウス (MC4R-KO) を用いて、NASH の病態形成におけるマクロファージの病態生理的意義を検討した。

【方法・成績】

高脂肪食を負荷した MC4R-KO および野生型マウスの肝組織を用いてマクロファージマーカーである F4/80 の免疫染色を行った。肥満脂肪組織ではマクロファージが細胞死に陥った脂肪細胞を取り囲む、Crown-like structure (CLS) が認められることが知られているが、NASH を発症した MC4R-KO の肝臓では肝細胞をマクロファージが取り囲む CLS 様構造が認められた。一方、単純性脂肪肝を呈する野生型マウスでは同様の所見は認められなかった。クロドロネートリポソーム法を用いてマクロファージを選択的に消去すると、野生型マウスに比較して MC4R-KO ではマクロファージ消去効果が減弱しており、特に CLS 様構造がクロドロネートリポソームに抵抗性であった。

【考案】

NASH の発症に伴ってマクロファージの分布に変化が認められ、さらに機能的な変化が起きている可能性が示唆された。

共同研究者 菅波 孝祥 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野
伊藤 美智子 東京医科歯科大学難治疾患研究所臓器代謝ネットワーク研究部門

A. 研究目的

近年、メタボリックシンドロームの基盤病態として慢性炎症が注目されており、特に肥満の脂肪組織や動脈硬化巣におけるマクロファージの病態生理的意義が精力的に研究されている。非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH: non-alcoholic steatohepatitis) はメタボリックシンドロームの肝臓における表現型と考えられており、脂肪肝を基盤として慢性炎症・線維化を特徴とし、ときに肝硬変や肝細胞癌に進展する病態である。肝臓には常在性マクロファージであるクッパー細胞が多数存在し、その活性化が NASH の病態形成に重要であると考えられるが、従来、肥満に合併する糖

脂質代謝障害を背景とし、肝線維化 (NASH) を経て肝細胞癌を発症する動物モデルが存在しなかったことから、その分子機構には不明な点が多く残されている。我々は、摂食調節に重要なメラノコルチン 4 型受容体 (MC4R) 欠損マウスが、高脂肪食負荷によりヒト肥満症患者と同様の糖脂質代謝障害、脂肪肝を経て、20 週間で NASH 様肝病変を、1 年後には肝細胞癌を発症することを明らかにした (図 1) (*Am. J. Pathol.* 179: 2454-2463, 2011)。本研究では、我々が独自に確立した新規 NASH モデルを用いて、肝線維化発症・進展におけるマクロファージの病態生理的意義を検討した。

B. 研究方法

1. マクロファージの組織学的解析

8週齢雄性 MC4R 欠損マウスおよび野生型マウスに対して 20 週間の高脂肪食負荷を行い、ad lib 条件下にサンプリングした。MC4R 欠損マウスが NASH 様肝病変を発症していることを HE 染色および Sirius red 染色によって確認し、マクロファージマーカーである F4/80 の免疫染色を行った。

2. マクロファージ消去実験

クロドロネートリポソームの作成：鶏卵由来ホスファチジルコリンとコレステロールを用いてガラスチューブに脂質フィルムを作成し、デシケーターにて一晩乾燥させる。脂質フィルムにクロドロネート溶液を加え、十分ボルテックスをした後に、Extruder (Avanti 社) を用いて 400 μm のメッシュを通す。10000 x g, 4°C, 15min 遠心し、パスツールピペットでリポソームを回収し、PBS に懸濁する。**マウスへの投与：**高脂肪食を 4, 8, 20 週間負荷した MC4R 欠損マウスおよび野生型マウスに対し、クロドロネートリポソームを 0.2ml ずつ静脈内に投与した。初回投与後 4 日目に再度投与、7 日目にサンプリングし、肝臓の組織学的解析と遺伝子発現を検討した。

C. 研究結果

1. マクロファージの組織学的解析

野生型マウスでは 20 週間高脂肪食負荷後に著明な脂肪蓄積を認めるものの、炎症性変化・線維化変化は認められず、単純性脂肪肝の所見であった。F4/80 染色においてもマクロファージの分布は通常食のマウスと明らかな変化は認められなかった。一方、MC4R 欠損マウスは HE 染色において著明な小葉内炎症細胞浸潤、肝細胞風船様変性を認め、Sirius red 染色にて肝細

胞周囲性線維化が認められたことから、NASH の診断基準に合致していると考えられた。F4/80 染色では、肝細胞をマクロファージが取り囲む像が多数認められ(図 2)、肥満脂肪組織において細胞死に陥った脂肪細胞をマクロファージが取り囲む、Crown-like structure (CLS) に類似した所見と考えられた(図 2)。

2. マクロファージ消去実験

(1)野生型マウスに対する効果：野生型マウスに対してクロドロネートリポソームを投与すると、負荷 4, 8, 20 週間のいずれにおいても F4/80 陽性細胞がほぼ完全に消失し(図 3)、F4/80 遺伝子発現も著明に減少した。また、炎症性マーカー TNF α : tumor necrosis factor α) と線維化マーカー (TGF β 1: transforming growth factor β 1, COL1A1, collagen α 1(I)) の発現が低下した。

(2)MC4R 欠損マウスに対する効果：負荷 4 週間の MC4R 欠損マウスでは野生型マウスと同様に F4/80 陽性細胞が消失し、炎症・線維化マーカーの遺伝子発現が低下した。一方、負荷 8 週間および、20 週間では F4/80 陽性細胞の消失効率が悪く、特に CLS 様構造の残存が特徴的であった。遺伝子発現では F4/80 は約 1/2 に減少したが、炎症・線維化マーカーの発現には変化が認められなかった。

D. 考 察

我々は、MC4R 欠損マウスが NASH 様病変を発症する過程を経時的に観察し、負荷 8 週頃から炎症細胞浸潤や肝星細胞の活性化といった、NASH の初期変化が認められることを確認している。クロドロネートリポソームに対する反応性的変化がこの時期に一致していること、特に CLS 様構造を形成するマクロファージが特にリポソーム抵抗性であることは、NASH 発症過程におい

てマクロファージ機能に変化がおこっていることを強く示唆している。肥満脂肪組織において CLS を構成するマクロファージは活性型マクロファージと考えられており、脂肪組織における慢性炎症やインスリン抵抗性に関与することが報告されている。現在のところ MC4R 欠損マウスの肝臓における CLS 様構造の機能的意義は不明であるが、炎症・線維化の中心として NASH の病態形成に関与している可能性が示唆される。

E. 結 論

NASH 様病変を発症した MC4R 欠損マウスの肝臓では、肝細胞をマクロファージが取り囲む特徴的な構造 (CLS 様構造) が認められ、単純性脂肪間である野生型マウスでは同様の所見は認められなかった。また、NASH 病態の進展過程においてクロドロネートリポソームに対する反応性に変化が認められ、特に CLS 様構造を形成するマクロファージがリポソーム抵抗性であった。今後、CLS 様構造の特徴と機能的意義を解明することで、NASH の病態形成におけるマクロファージの病態生理的意義の解明につながると考えられる。

研究発表

1.論文発表

1. M. Itoh, T. Suganami, N. Nakagawa, M. Tanaka, Y. Yamamoto, Y. Kamei, S. Terai, I. Sakaida, Y. Ogawa. Melanocortin-4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Am. J. Pathol.* 179: 2454-2463, 2011.
2. M. Itoh, T. Suganami, R. Hachiya, Y. Ogawa. Adipose tissue inflammation as homeostatic inflammation. *Int. J. Inflamm.* 2011: 720926, 2011.
3. M. Ichioka, T. Suganami, N. Tsuda, I. Shirakawa, Y. Hirata, N. Satoh-Asahara, Y. Shimoda, M. Tanaka,

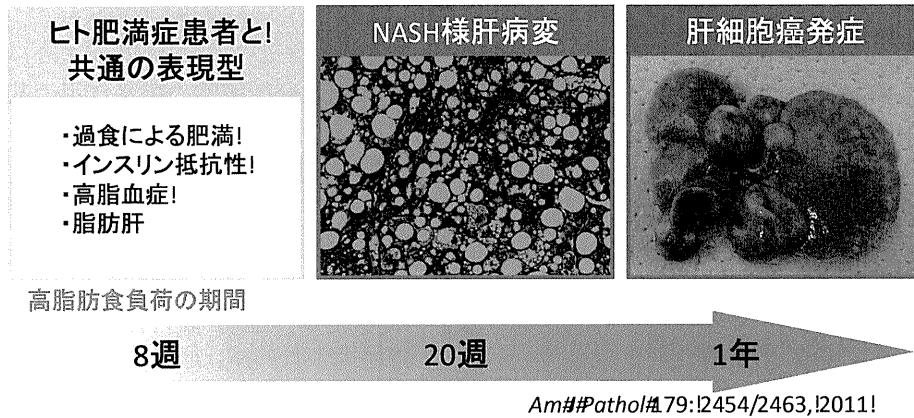
M. Kim-Saijo, Y. Miyamoto, Y. Kamei, M. Sata, Y. Ogawa. Increased expression of macrophage-inducible C-type lectin in adipose tissue of obese mice and humans. *Diabetes.* 60: 819-826, 2011.

2.学会発表

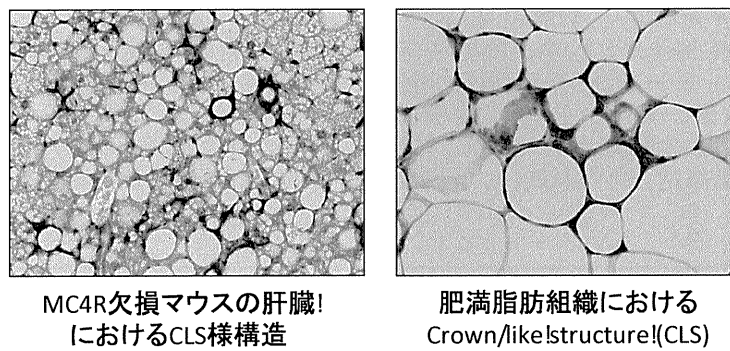
1. 小川佳宏:「Chronic inflammation, a molecular basis underlying the metabolic syndrome」: 第 34 回日本分子生物学会, 2011.12.13-16, 横浜
2. 伊藤美智子, 菅波孝祥, 田中都, 亀井康富, 寺井崇二, 坂井田功, 小川佳宏:「NASH の発症・進展と脂肪組織炎症-新しい NASH モデル・MC4R 欠損マウスを用いて-」第 32 回日本肥満学会, 2011.9.23-24, 淡路
3. 菅波孝祥, 伊藤美智子, 小川佳宏:「メタボリックシンドロームの臓器相関における脂肪組織マクロファージの意義」: 第 84 回日本内分泌学会, 2011.4.21-23, 神戸
4. 伊藤美智子, 菅波孝祥, 中川信貴, 田中都, 亀井康富, 小川佳宏:「MC4R 欠損マウスを用いた新規 NASH モデルの確立」第 84 回日本内分泌学会, 2011.4.21-23, 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

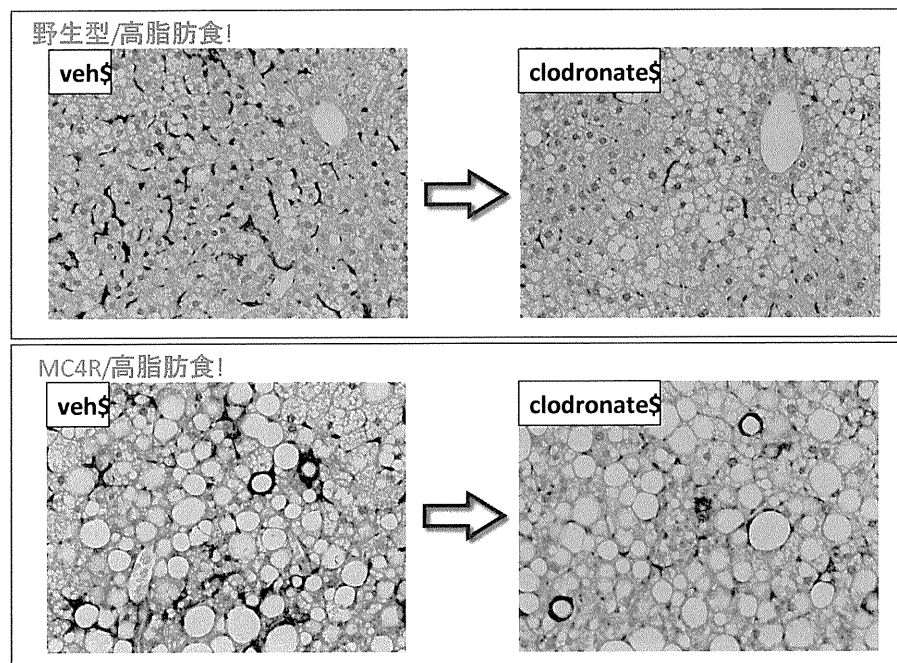
- 1.特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他



(図1) MC4R欠損マウスを用いた新規NASHモデルの特徴



(図2) 肥満脂肪組織とNASH様肝病変におけるF4/80染色



(図3) 高脂肪食20週間におけるclodronate liposomeの効果

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）
研究分担報告書

ABM*i*療法の有効性を向上させるための骨髄細胞と肝幹細胞の相互作用の基礎的検討

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】肝再生を目的として、肝硬変患者に対する自己骨髄細胞移植（Autologous Bone Marrow Cells Infusion: ABM*i*）療法の有用性を報告してきたが、ABM*i*施行後の患者の骨髄では骨髄細胞(BMC)の活性化が明らかとなった。そこで、本研究の目的は、肝再生に係る骨髄細胞と肝幹細胞の相互作用について検討することである。

【方法】ラット骨髄細胞と同系ラットより分離された肝幹細胞株(Hepatic Stem-Like Cell: HSLC)の共培養系を用いた。2種類の細胞が混じらないよう、培養皿を液性因子の交換を可能とするように工夫されたporeを有する膜を用いて2段に分け3日間の培養に供した。コントロールは混合培養しない単独培養の細胞とした。下段に培養した細胞を回収後、遺伝子発現変動、肝様細胞への増殖・分化を、それぞれDNAマイクロアレー、WST-1 assay, RT-PCR, を用いて検討した。

【成績】HSLCを上段に培養しBMCを下段に培養した結果、BMCでは、コントロールに比し、fibroblast growth factor 2 (FGF2)の発現が特に増強し、細胞数は増加し、肝様細胞への分化が確認された。BMCを上段に培養しHSLCを下段に培養した結果、HSLCでは、コントロールに比し、insulin-like growth factor 2 (IGF2)の発現が特に増強し、細胞数は増加し、肝様細胞への分化が確認された。

【考案】骨髄細胞と肝幹細胞は、液性因子を介して肝再生に係る相互作用を有していることが示された。

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 助教

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。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: ABM*i*）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スコアや血清アルブミン値などの肝機能検査値全般の改善が認められている(Terai S et al. Stem Cell 2006)。私たちは、昨年までの本研究班において、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患者に対するABM*i*療法を、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、アルコール性肝硬変に対

するABM*i*療法の有効性について報告した(Saito T, et al. Stem Cells Dev 2011)。この臨床研究において、ABM*i*施行前後の患者骨髄をindium-111-chloridを用いた骨髄シンチにて比較検討した結果、ABM*i*施行後の患者の骨髄では、肝を中心に全身性に骨髄細胞(BMC)の活性化が明らかとなった。肝臓は、障害時に自己肝細胞の自己増殖により修復されるが、重症の肝障害時には肝幹細胞の分化と増殖が必要である。BMCと肝幹細胞の相互作用を検討することにより、相互の肝再生における重要性を明らかにして互いを刺激する液性因子を解明することは、より有効なABM*i*療法の発展を目指すうえで重要である。本研究の目的は、肝再生における、骨髄細胞と肝幹細胞の相互作用について検討することである。