

## B. 研究方法

BMC は 8 週齢雄 Sprague-Dawley rat から分離した。肝幹細胞株は、Hepatic stem-like cell (HSLC) を用いた。HSLC は成体雄 Sprague-Dawley rat の肝臓より樹立した肝上皮幹細胞株であり、肝細胞や胆管上皮細胞に分化する多分化能を有している (Nagai H et al. BBRC 293: 1420-5, 2002、秋田大学杉山俊博教授より御供与)。BMC と HSLC の 2 種類の細胞を一つの培養皿の中で、混ざらないように混合培養することで、BMC と HSLC の相互作用を検討した。即ち、2 種類の細胞の共培養のために、pore size  $0.4\mu\text{m}$  の半透膜で仕切られた培養皿 (Transwell, Corning Coaster, Cambridge) で 3 日間共培養を行った。コントロールは混合培養しない単独培養の細胞とした。我々が用いた共培養系を図 1 に示す。下段に培養した細胞を回収後、遺伝子発現変動、肝様細胞への増殖と分化を、それぞれ DNA マイクロアレイ (GeneChip. Rat Genome 230 2.0 Array, Affymetrix, Takara), WST-1 assay (Takara Bio-chemicals Co.), RT-PCR による albumin, AFP, Tryptophan-2, 3-dioxygenase, HNF-1 $\alpha$  の発現、により検討した。

## C. 研究結果

### 1. 共培養された BMC および HSLC の細胞増殖能

WST-1 assay にて解析した、BMC および HSLC の細胞増殖能について、図 2 および図 3 に示す。BMC と HSLC は、いずれも共培養において、細胞増殖の亢進が認められた。

### 2. 共培養された BMC および HSLC の肝様細胞への分化

RT-PCR にて解析した、BMC および HSLC の肝様細胞分化能について、図 4 および図 5 に示す。BMC と HSLC は、いずれも共培養下においてのみ、肝特異遺伝子である albumin, Tryptophan-2, 3-dioxygenase, HNF-1 $\alpha$  の発現が認められた。

### 3. 共培養された BMC および HSLC における主な発現増強遺伝子

DNA マイクロアレイによる解析により、BMC および HSLC の多くの遺伝子で、共培養により発現の増強が確認された。増殖因子系に着目すると、BMC では HSLC との共培養により fibroblast growth factor 2 (FGF2) の発現が特に増強し、HSLC では BMC との共培養により、insulin-like growth factor 2 (IGF2) の発現が特に増強していた。

## D. 考 察

今回、我々が用いた 2 種類の細胞共培養系では、pore size  $0.4\mu\text{m}$  の半透膜で仕切られた培養皿が用いられているが、この膜では細胞の移動や直接の細胞間の接触はない。即ち、この共培養システムでは、幹細胞の肝様細胞への分化・増殖研究で問題視される cell fusion の問題をクリアした状態で、液性因子の作用のみで細胞の変化を検討することができ、相互作用を研究するには有効なシステムであると思われる。

BMC および HSLC とともに、共培養により、細胞増殖能は亢進し肝様細胞への分化が進むことが明らかとなった。いかなる液性因子が、これらに関与しているのかを見る目的で、DNA マイクロアレイを行ったところ、共培養により、各々の細胞で、多くの増殖因子系液性因子の遺伝子発現増強が確認された。この中で、HSLC との共培養により BMC で遺伝子発現増

強が見られた FGF2 については、FGF2 を HSLC に添加して培養すると HSLC の肝様細胞への分化が生ずることを確認している (Haga H, et al., Cells Tissue Res 2011)。

ABMi 療法にて肝で活性化される BMC が、高度障害肝で発現する肝幹細胞との間に液性因子を介して、肝再生を相互に刺激している可能性がある。BMC 側ならびに肝幹細胞側から相互間の刺激により分泌増強される液性因子を見だし、それらの役割を解明することで、将来的にそれらの液性因子が ABMi 療法へ応用され、より有効な ABMi 療法の発展に繋がる可能性が期待される。

## E. 結 論

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。

## 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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 bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis. Stem Cells Dev 2011; 20: 1503-1510
- 2) Haga H, Saito T, Okumoto K, Ugajin S, Sato C, Ishii R, Nishise Y, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S: Enhanced expression of fibroblast growth factor 2 in bone marrow cells and its potential role

in the differentiation of hepatic epithelial stem-like cells into hepatocyte lineage. Cell Tissue Res 2011; 343: 371-378

- 3) Soga T, Sugimoto M, Honma M, Mori M, Igarashi K, Kashikura K, Ikeda S, Hirayama A, Yamamoto T, Yoshida H, Otsuka M, Tsuji S, Yatomi Y, Sakuragawa T, Watanabe H, Nihei K, Saito T, Kawata S, Suzuki H, Tomita M, Suematsu M: Serum metabolomics reveals  $\gamma$ -glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease. J Hepatol 2011; 55: 896-905

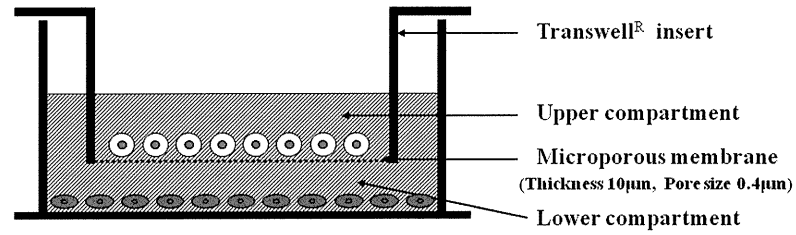
### 2. 学会発表

- 1) 芳賀弘明 斎藤貴史 奥本和夫 佐々木弥生 佐藤智佳子 石井里佳 西瀬雄子 渡辺久剛 斉藤孝治 富樫 整 河田純男: アルコール性肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法の安全性、有用性の検討. 第 10 回日本再生医療学会総会, 東京: 2011 年 3 月
- 2) 芳賀弘明 斎藤貴史 奥本和夫 富田恭子 佐藤智佳子 石井里佳 西瀬雄子<sup>1)</sup> 渡辺久剛 富樫 整 河田純男: アルコール性肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法の長期予後の検討. 第 47 回日本肝臓学会総会, 東京: 2011 年 6 月

## 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
- なし。

図 1 BMC と HSLC の共培養系



Culture Condition	Upper compartment	Lower compartment
a	Co-culture cells	Cells for assay
b	—	Cells for assay

図 2 HSLC 共培養下での BMC 増殖能の検討

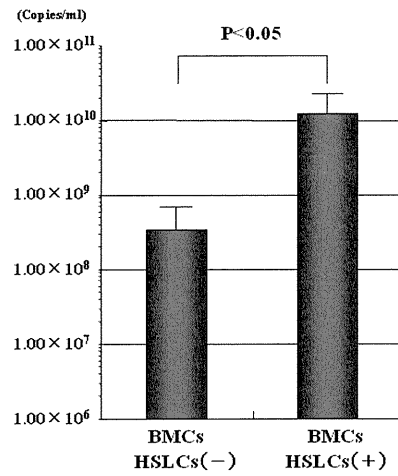


図 3 BMC 共培養下での HSLC 増殖能の検討

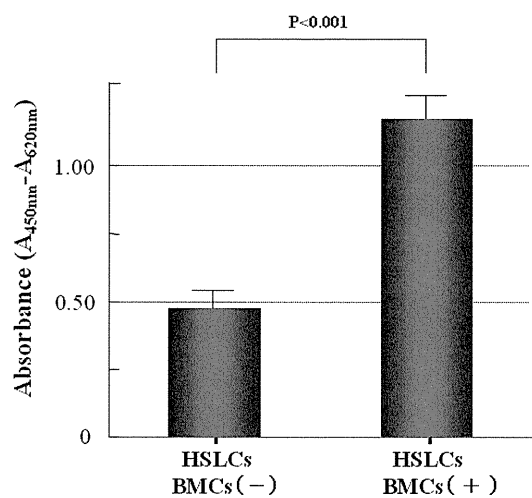


図 4 HSLC 共培養下での BMC の肝様細胞への分化の検討

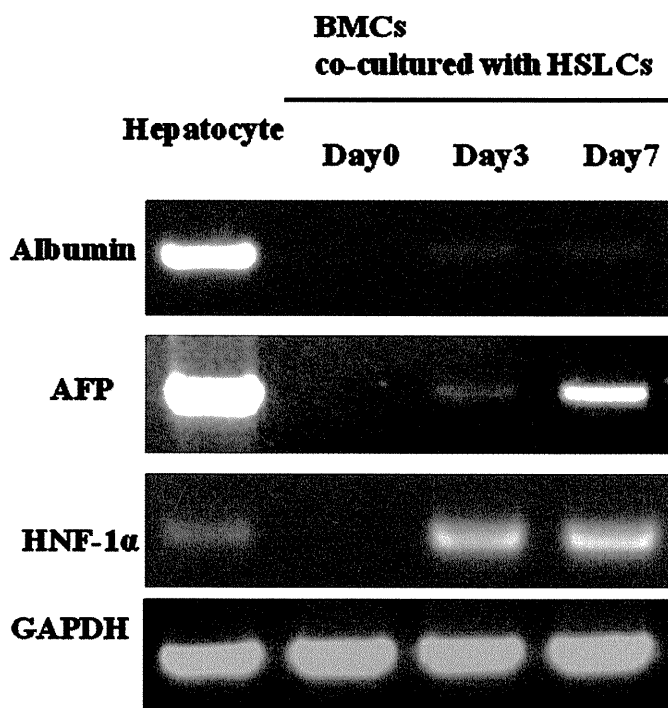
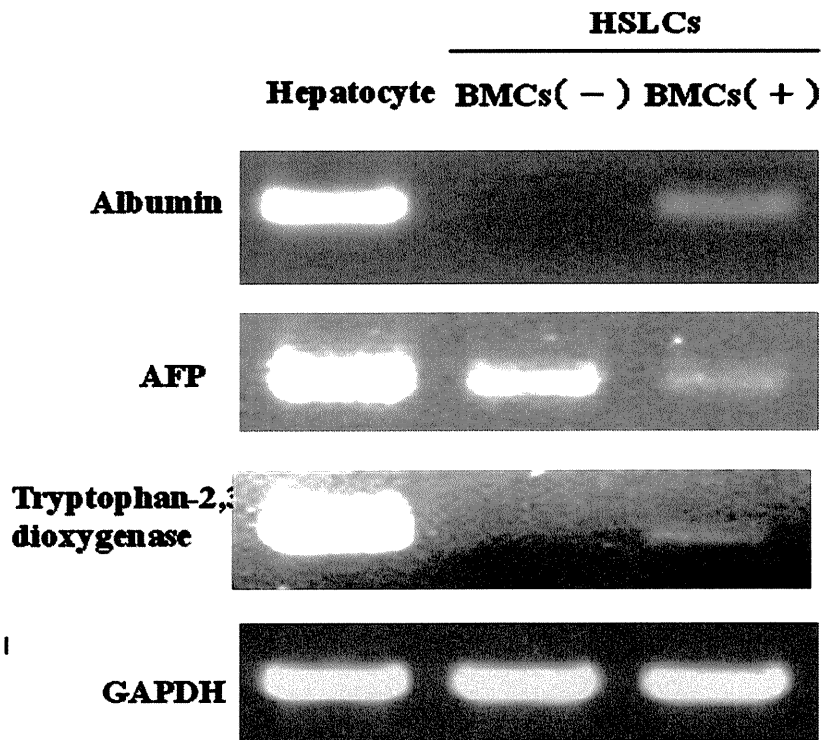


図 5 BMC 共培養下での HSLC の肝様細胞への分化の検討



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

「 骨髄細胞中の HBV DNA・HCV RNA の定量 」

研究分担者氏名：梅村武司 所属機関：信州大学医学部消化器内科 職名：講師

**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再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)の感染が原因であり、実際に採取された骨髄細胞中にこれら肝炎ウイルスの感染が認められるのかを明らかにすることは重要である。昨年度は末梢血単核球(PBMCs)中のHBV DNAとHCV RNAの定量系を確立した。本年度はABMi療法の際に採取・保存された骨髄細胞にHBV DNAまたはHCV RNAが検出されるか検討し、検出される場合はその定量を行う事を目的とした。

【方法】

山口大学・山形大学附属病院においてABMi療法を施行された15名の患者(HBs抗原陽性・HCV抗体陽性:1名、HBs抗原陰性・HCV抗体陽性:9名、HBs抗原陰性・HCV抗体陰性:5名)から採取され、保存された骨髄細胞を用いてHBV DNAとHCV RNAをそれぞれ定量した。

【成績】

骨髄細胞中のウイルス量についての検討は、1名のHBs抗原陽性者ではHBV DNA量が1.8 log copies/mLと陽性で、HBs抗原陰性・HCV抗体陽性者、HBs抗原陰性・HCV抗体陰性者は全てHBV DNAとHCV RNAともに検出感度以下であった。

【考案】

B型肝炎患者の骨髄細胞中にはHBV DNAが検出されたがその量は極めて低値であった。C型肝炎患者ではHCV RNAは検出感度以下であり、存在しないか、存在したとしてもごく少量である可能性が示唆された。

共同研究者

田中榮司 信州大学医学部内科学第二・教授

骨髄細胞を用い、HBV DNAとHCV RNAの存在を確認した。

**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これを再注入する治療であり、施行後に肝機能予備能の改善が認められる。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)またはC型肝炎ウイルス(HCV)の感染が原因である。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これらの肝炎ウイルスが感染しているのかは重要な問題である。しかし、これまで十分な検討はなされていない。

昨年度までに末梢血単核球(PBMCs)中のHBV DNAとHCV RNAの定量系を確立しており、本年度はABMi療法の際に採取・保存された骨

**B.研究方法**

山口大学医学部附属病院、山形大学医学部附属病院でABMi療法を施行された計15名の患者(HBs抗原陽性・HCV抗体陽性:1名、HBs抗原陰性・HCV抗体陽性:9名、HBs抗原陰性・HCV抗体陰性:5名)から採取され、保存された骨髄細胞を用いてHBV DNA・HCV RNAをそれぞれ定量した。

**C. 研究結果**

HBs抗原陽性であった1例では、骨髄細胞中にHBV DNAが検出され、その量は1.8 log copies/mLであった。この他の14例、すなわち、

HBs 抗原陰性・HCV 抗体陽性の 9 例と HBs 抗原陰性・HCV 抗体陰性の 5 例は、全例で HBV DNA と HCV RNA がともに検出感度以下であった。

#### D. 考 察

15 例の ABM/療法施行患者の保存骨髄細胞を用いて HBV DNA と HCV RNA の測定を行ったが、HBs 抗原陽性の 1 例では HBV DNA が骨髄細胞中に検出された。実際の定量範囲は 1.7~5 log copies/10<sup>6</sup>PBMCs であるので高感度の測定系を用いても検出感度ぎりぎりの量であった。C 型肝炎患者においても、骨髄細胞中の HCV RNA はいずれの検体でも検出感度以下であり、存在しないか、存在してもごく少量と考えられた。

#### E. 結 論

B 型肝炎患者の骨髄細胞中には HBV DNA が極少量存在することが示された。C 型肝炎患者の肝細胞中には HCV RNA は存在しないか、存在しているとしても極少量である可能性が示唆された。ただし、少数例での検討であり、今後、症例を増やして検討をすることが必要である。さらに、骨髄細胞中から検出された HBV DNA については塩基配列を決定し、その特徴を明らかにすることが今後の検討課題である。

#### 研究発表

##### 1.論文発表

なし

##### 2.学会発表

なし

#### 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（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
研究分担報告書

「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」

研究分担者氏名： 大河内仁志 所属機関： 国立国際医療研究センター研究所  
細胞組織再生医学研究部 職名： 部長

**研究要旨：**

**【目的】**

皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞の投与による肝硬変に対する効果の検討

**【方法】**

マウスに四塩化炭素を週2回8週間にわたって反復投与し、肝硬変モデルを作成した。薬剤投与開始4週間後にマウス皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞の投与し、その4週間後に採血ならびに肝臓組織を採取して、血液生化学検査と組織学的検査を行った。その際、移植経路等を検討した。SCIDマウスに肝硬変を作製して、ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞を移植した。高脂肪食を6ヶ月間与えてNASHのモデルを作成した。

**【成績】**

マウスの皮下脂肪由来の培養間葉系細胞を静脈注射、経門脈、肝臓への直接注入を行ったが、明らかに肝硬変を改善する所見は得られなかった。間葉系幹細胞の細胞シートも作成したが、シートの強度が弱かった。四塩化炭素を使わず、高脂肪食を長期間投与することによってNASHのモデルが作成できることを組織学的に確認した。

**【考案】**

細胞を静脈注射すると大部分が肺にトラップされ、肝臓に到達しにくのではないかと考えたが、移植後7日目には肺にほとんど移植細胞は検出されなかった。培養細胞においては炎症部へのホーミング能力が骨髄由来の間葉系細胞よりも弱い可能性が示唆された。門脈や肝臓への直接注入も試みたが、注入時のダメージが無視できず、ヒトに比べて血管や臓器の大きさが小さいことによる影響が考えられた。高脂肪食によるNASHモデルの作成に成功し、病態としてはヒトに近いものがあったと考えられる。

**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、肝硬変症患者の救命のために喫緊の課題である。肝硬変患者に対する自己骨髄細胞を用いた細胞移植療法の効果が報告されており、特に骨髄細胞の抗線維化作用が注目されている。骨髄には造血幹細胞以外に多能性をもつ間葉系幹細胞の存在が知られている。一方脂肪組織にも骨髄と同様に多分化能をもつ間葉系幹細胞が存在するので、肝硬変の治療に使えるのではないかと考えた。これまでに我々は脂肪由来の間葉系幹細胞はマウスの急性肝炎モデルに投与をすると効果があることを確認している。そこで今回はマウスの肝硬変モデルを作成

して、脂肪由来の間葉系幹細胞を移植した場合の効果を検討することを目的とした。

**B.研究方法**

**脂肪組織由来の間葉系幹細胞の分離**

マウス (C57BL/6Njcl, ♀ 10 週齢) の鼠径部の脂肪塊を摘出して phosphate buffered saline (PBS) で洗浄して、control medium [Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, low-glucose; GIBCO) + 10% fetal calf serum (FCS; GIBCO) + 1% penicillin-streptomycin (SIGMA)] の入った dish に移した後、メスで 2-3 mm まで細かく刻み、CO<sub>2</sub> incubator 内で 1 時間培養した。脂肪塊を遠心 (1,300 rpm, 6 min, room temperature) し、液体を吸引し、0.12 % type1



collagenase (Wako) を加え、37 °Cで振盪 (30 min) し、細胞を解離した。解離した細胞に control medium を加え、遠心 (1300 rpm, 6 min, room temperature) し、上清及び沈まなかつた細胞を吸引した。

ヒトの脂肪組織からも同様に細胞を分離したが、術前に書面による同意の得られた患者からの検体を用いた。

### 細胞培養

細胞を control medium で resuspend し、40 µm filter を通した後、 $1 \times 10^6$  / 10 cm dish に播種した。培地交換は 2 日に 1 回行い、1 週間後にトリプシン処理して再播種した。細胞を Passage 5 まで培養を続けた後、control medium + 10 % dimethyl sulphoxide (DMSO) (SIGMA) 内に移し液体窒素中で凍結保存するか、または実験に使用した。

一部の細胞を温度感受性培養皿 (セルシード社) に播種して、間葉系細胞シートの形成を行った。

### 肝硬変モデルマウスの作製と移植実験

C57/BL6 マウスに四塩化炭素を週 2 回 8 週間にわたって反復投与し、肝硬変モデルを作成した。薬剤投与開始 4 週間後に同系マウスより皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞を移植した。その 4 週間後に採血ならびに肝臓組織を採取して、血液生化学検査 (AST, ALT, Alb, T-Bil, LDH, ALP) と組織学的検査を行い、細胞移植をしなかつた群と比較検討した。移植条件では以下の検討を行った。

- 1) 1 回の移植細胞数 : 150 万個
- 2) 移植経路 : 経尾静脈、経門脈、肝臓直接注入

SCID マウスに肝硬変を作製して、ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞を移植して、効果を検討した。移植前に HGF100ng/ml, FGF2 100ng/ml, FGF4 100ng/ml+Activin 100ng/ml などのサイトカイン処理をしてから移植した。

細胞を静脈注射後にどの程度肺に細胞が残存するかを調べるために GFP マウス由来の間葉系幹細胞を使用し、移植後 2 日後と 7 日後の肺の組織を採取して、免疫染色にて移植細胞の局在を検討した。

### NASH モデルの作成

新しい肝硬変モデルとしてココアバターを多く含む高脂肪食 (オリエンタル酵母に特注) の投与を離乳直後のマウスに開始した。1ヶ月ごとに血液生化学的検査と肝臓の組織標本を作成し、NASH モデルを作成した。

### C. 研究結果

これまでの検討から細胞を静注すると多くの細胞が肺に集積し、肝臓へ到達する細胞が十分でないことが判明したので、投与経路の検討を行った。まずマウスを開腹し、直視下に門脈への細胞注入を行った。細胞注入自体は行えたが、その後の止血が難しく、また投与自体で肝臓にダメージを与えることが判明したので、効果判定は困難であると結論付けた。

次にマウスを開腹し、直接肝臓に細胞を注入することも試みた。組織学的に検討すると、確かに注入部に移植細胞は 4 週間後も存在することを確認したが、やはり注入によるダメージの影響を無視できないと考えられた。

細胞を尾静脈から投与した場合に 2 日後までは肺の毛細血管内に移植細胞が存在することを確認できたが、7 日後には移植細胞を肺においてほとんど検出できなかった。

温度感受性培養皿に細胞を播種して、間葉系細胞シートの形成を行い、肝臓への貼付を試みたが、シートが1層では薄いために強度が十分ではなく、うまく肝臓の表面に貼付できなかった。

脂肪由来の間葉系細胞を静脈注射した際に、肝臓へのホーミング能力を高めるために、投与24時間前にHGF, FGF2, FGF4+Activinで細胞を処理してみたが、明らかなホーミングの上昇は認められていない。

#### NASHモデルの作成

マウスに高脂肪食を投与すると1ヶ月目に脂肪肝になった。3-4ヶ月目より、血清ASTやALTが上昇し始め、4-5ヶ月で線維化が見られるようになった。6ヶ月間投与すると著明な肝硬変になることをSirius red染色にて組織学的に確認した。このモデルに対しても細胞移植実験を行った。

#### D. 考察

前年度に引き続き、四塩化炭素による肝硬変モデルを作成し、脂肪組織由来の細胞の移植実験を行い、投与方法をいろいろと変えてみたが、培養細胞では明らかに肝硬変に対して組織学的な改善を認められなかった。昨年度マウスの皮下脂肪由来の細胞で培養していない細胞を投与した場合に、一部に効果が認められたが、ヒトの新鮮な皮下脂肪由来の細胞を移植する実験は実験スケジュールを合わせる事が難しいという技術的な問題もあり、まだ試みていない。間葉系幹細胞による培養細胞シートを作成し、肝臓に貼付すれば何らかの影響を与えることができるのではないかと考えたが、細胞が1層のシートでは力学的に強度が弱く、さらなる工夫を要すると思われた。

金沢大学消化器グループの開発した高脂肪食投与によるNASHモデルを作成した所、6ヶ月後には組織学的に肝硬変を認めた。細胞移植実験の結果を検討中であるが、病態が完成するまでに長期間かかることが問題点として上げられる。

#### E. 結論

脂肪由来の間葉系幹細胞は容易に培養できるが、肝硬変モデルマウスに移植しても、明らかな改善効果を示さないのは肝臓へのホーミングに一因があると思われ、さらなる投与法の検討が必要と考えられた。

#### 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Konno M, Masui S, Hamazaki TS, Okochi H. Intracellular reactivation of transcription factors fused with protein transduction domain. J Biotechnol. 154(4):298-303, 2011

##### 2. 学会発表

1. 大河内仁志 皮膚の幹細胞と再生医療 第4回FBTシンポジウム 1月、東京、2012

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

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

「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」

研究分担者氏名：酒井 佳夫 所属機関： 金沢大学 職名： 准教授

**研究要旨：**

【目的】脂肪組織由来間質細胞は、間葉系幹細胞を含む細胞群であり、骨髄細胞とともに、肝再生療法への細胞治療への応用が期待されている。前年度までに確立した非アルコール性脂肪肝炎による肝硬変マウスモデルを用いて、脂肪組織由来間質細胞の治療効果についての検討を行った。

【方法】GFPトランスジェニックマウス皮下脂肪組織より間質細胞を分離、培養し、脂肪組織由来間質細胞を獲得した。高脂肪動脈硬化食投与後肝硬変が確立した状態において、32週目および34週目に、それぞれ $1 \times 10^5$ 個のGFPマウス脂肪組織由来間質細胞を経脾的に投与し、1週後、2週後において、肝組織を採取、肝実質細胞を分離し、RNAを抽出、リアルタイムPCRにてAFP、アルブミンの発現量を検討した。

【成績】脂肪組織由来間質細胞投与後1週後において、AFP、アルブミン産生は、脂肪組織由来間葉系幹細胞によって、亢進傾向を認め、2週後においては、有意差をもって、発現が亢進していた。また、肝線維化状態に対する改善も確認された。

【考案】このことより、非アルコール性脂肪肝炎による肝硬変マウスモデルにおいて、脂肪組織由来間質細胞による治療効果が示唆された。今後、作用機序等についての検討を行う必要がある。

共同研究者

**A.研究目的**

肝硬変患者においては、持続する慢性炎症のために肝不全へと進展し、その根治的治療法は肝移植が唯一である。しかしながら、ドナー不足のため、わが国では生体肝移植が主に行われているが、問題が多い。肝不全への進展を阻止するため、肝再生療法が期待されている。骨髄、脂肪組織は間葉系組織とよばれ、間質細胞には肝細胞への分化能を有する間葉系幹細胞が豊富に存在する。そのため、これらの間質細胞を用いた肝再生療法の可能性が注目されている。本年度研究では、肝硬変マウスモデルを用いて、脂肪組織由来間質細胞の治療効果の基礎的検討を行った。

**B.研究方法**

GFPトランスジェニックマウスの皮下脂肪組織より間質細胞を分離、継代した。非アルコール性脂肪肝炎による肝硬変マウスモデルは、C57Bl/6

マウス(♀、6週)に対して、高脂肪動脈硬化食を投与し作成した。高脂肪動脈硬化食投与後肝硬変が確立した状態において、32週目および34週目に、それぞれ $1 \times 10^5$ 個のGFPマウス脂肪組織由来間質細胞を経脾的に投与し、1週後、2週後において、肝組織を採取、肝実質細胞を分離し、RNAを抽出、リアルタイムPCRにてAFP、アルブミンの発現量を検討した。また、線維化状態をAzan染色にて、また、 $\alpha$ -SMA染色にて、星細胞の活性化状態を評価した。

**C. 研究結果**

脂肪組織由来間質細胞投与1週後において、分離した肝実質細胞のAFP、アルブミン産生は、脂肪組織由来間葉系幹細胞によって、亢進傾向を認め、2週後においては、有意差をもって、発現が亢進していた。また、脂肪組織由来間質細胞投与によって、線維化領域の減少、

$\alpha$ -SMA 染色陽性細胞数減少も認め、肝線維化状態に対する改善効果も示唆された。

#### D. 考 察

本肝硬変マウスモデルは、高脂肪動脈硬化食投与による非アルコール性脂肪肝炎により生じる。高脂肪動脈硬化食投与による脂肪肝炎の病理像は、ヒト非アルコール性脂肪肝炎に類似した病理像を呈する。脂肪組織由来間質細胞の経脾的投与により、肝実質細胞のアルブミン産生の改善、肝線維化状態の改善がみられ、脂肪組織由来間質細胞の肝硬変に対する肝再生修復効果が示唆された。

#### E. 結 論

非アルコール性脂肪肝炎による肝硬変マウスモデルにおいて、脂肪組織由来間質細胞による治療効果の可能性が示唆された。

#### 研究発表

##### 1.論文発表

本年度、本研究課題に関する発表はございません。

##### 2.学会発表

本年度、本研究課題に関する発表はございません。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

##### 1.特許取得

本年度、本研究課題に関する出願・登録はございません。

##### 2. 実用新案登録

本年度、本研究課題に関する出願・登録はございません。

##### 3. その他

特記事項ございません。

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
仁科博史 分担監修と執筆		仁科博史 畑裕	Hippo Pathway 癌・細胞死・ 再生の新たな 鍵を握る器官 サイズ制御シ グナル	秀潤社	東京	2011	941-942,943 -947
仁科博史 分担執筆		金井好克 竹島浩 森泰生 久保義弘	トランスポー トソームの世 界-膜輸送研 究の源流から 未来へ	京都廣川 書店	京都	2011	434-439

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Yamasaki T, Terai S, and Sakaida I.	Deferoxamine for advanced hepatocellular carcinoma	N Engl J Med.	365(6)	576-578	2011
Terai S, Sakaida I	Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients.	J Hepatobiliary Pancreat Sci.	18	23-25	2011
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	300-312	2012

Takami T, Terai S, Sakaida I.	Various Liver Diseases: Novel findings for the development of drug therapy; 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
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
Maeda M, Takami T, Terai S, Sakaida I.	Autologous bone marrow cell infusions suppress tumor initiation in hepatocarcinogenic mice with liver cirrhosis.	Gastroenterol Hepatol.	2	104-111	2011

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
Kuwashiro S, Terai S, Oishi T, Fujisawa K, Matsumoto T, Nishina H, Sakaida I.	Telmisartan improved nonalcoholic steatohepatitis in medaka ( <i>Oryzias latipes</i> ) by reducing macrophage infiltration and fat accumulation.	Cell & Tissue Res.	344	125-134	2011
Takami T, Terai S, Sakaida I	Stem cell therapy in chronic liver disease.	Curr Opin Gastroenterol	(3)	203-208	2012
Tanaka M., Itoh T., Tanimizu N. and Miyajima A.	Liver stem/progenitor cells: Their characteristics and regulatory mechanisms.	<i>J. Biochem.</i>	149	231-239	2011
Itoh T., Tanaka M., and Miyajima, A.	Liver stem cells	<i>Regenerative Medicine from protocol to patient</i> (Springer 327 Ed. G. Steinhoff)		327-349	2011
Miyaoka Y., Kato H., Ebato K., Saito S., Miyata N., Iimamura 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.	<i>Biochemical Journal.</i>	44	33-41	2011
Tanaka M. and Miyajima A.	Identification and isolation of adult liver stem/progenitor cells.	<i>Methods in Molecular Biology</i> (Ed. Ochiya T., Humana Press)	826	25-32	2011

Tsukahara Y., Tanaka M. and Miyajima A.	TROP2 expressed in the trunk of the ureteric duct regulates branching morphogenesis during kidney development.	<i>PLoS One</i>	6	e28607	2011
浅岡洋一、仁科博史	メダカとゼブラフィッシュを用いた肝研究	実験医学	29巻 13号	2090-2095	2011
N Miyamura, T Nakamura, N Goto-Inoue, N Zaima b, T Hayasaka, T Yamasaki, Shuji Terai, I Sakaida, M Setou, H Nishina	Imaging mass spectrometry reveals characteristic changes in triglyceride and phospholipid species in regenerating mouse liver	Biotechnol Biophys Res Commun.	408	120-125	2011
<u>M. Itoh, T. Suganami</u> , N. Nakagawa, M. Tanaka, Y. Yamamoto, Y. Kamei, S. Terai, I. Sakaida, <u>Y. Ogawa</u> .	Melanocortin-4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis.	Am. J. Pathol.	179	2454-2463	2011
<u>M. Itoh, T. Suganami</u> , R. Hachiya, <u>Y. Ogawa</u> .	Adipose tissue inflammation as homeostatic inflammation.	Int. J. Inflamm.	2011	1-8	2011
M. Ichioka, <u>T. Suganami</u> , N. Tsuda, I. Shirakawa, Y. Hirata, N. Satoh-Asahara, Y. Shimoda, M. Tanaka, M. Kim-Saijo, Y. Miyamoto, Y. Kamei, M. Sata, <u>Y. Ogawa</u> .	Increased expression of macrophage-inducible C-type lectin in adipose tissue of obese mice and humans.	Diabetes	60	819-826	2011
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 bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis	Stem Cells Dev	20 (9)	1503-1510	2011



Haga H, Saito T, Okumoto K, Ugajin S, Sato C, Ishii R, Nishise Y, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S	Enhanced expression of fibroblast growth factor 2 in bone marrow cells and its potential role in the differentiation of hepatic epithelial stem-like cells into hepatocyte lineage	Cell Tissue Res	343(2)	371-378	2011
Soga T, Sugimoto M, Honma M, Mori M, Igarashi K, Kashikura K, Ikeda S, Hirayama A, Yamamoto T, Yoshida H, Otsuka M, Tsuji S, Yatomi Y, Sakuragawa T, Watanabe H, Nihei K, Saito T, Kawata S, Suzuki H, Tomita M, Suematsu M	Serum metabolomics reveals $\gamma$ -glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease	J Hepatol	55(4)	896-905	2011
Konno M, Masui S, Hamazaki TS, Okochi H	Intracellular reactivation of transcription factors fused with protein transduction domain	J Biotechnol	154	298-303	2011

**Hippo pathway** 癌・細胞死・再生の新たな鍵を握る  
器官サイズ制御シグナル

時代をリードする研究を  
わかりやすく伝えるレビュー誌

# 細胞工学

2011

Vol.30 No.

9



秀潤社 <http://gakken-mesh.jp/>

C E L L T E C H N O L O G Y

特集

# Hippo pathway

## 癌・細胞死・再生の新たな鍵を握る 器官サイズ制御シグナル

● 監修 畑 裕 / 仁科博史

### 【基礎の基礎】

畑 裕

### 【各論】

Hippo pathwayが制御する  
多彩な細胞機能

藤岡洋美, 泉あやか, 榎本和生

細胞増殖・細胞死制御とHippo pathway:  
Latsキナーゼを中心に

飯田紀一, 野島 博

上皮細胞の構造とHippo pathway

田ノ上拓自

マウス初期胚発生における

Hippo pathwayの役割

佐々木 洋, 平手良和

Hippo pathwayによる肝臓のサイズと発癌の制御

島 星治, 宮村憲央, 仁科博史

腎臓・肺形成とHippo pathway

栗原裕基, 三谷明久, 牧田亨介

心臓におけるHippo pathwayの役割

佐渡島純一

ヒト癌症例で見られるHippo pathwayの異常と臨床的意義

関戸好孝

### 【せるてく・あらかると】

Hippo名前の秘密

仁科博史

Hippo pathwayの破綻は万病の元?

畑 裕



### HOT PRESS

ビフィズス菌が産生する酢酸による  
マウス腸管出血性大腸菌感染死の予防

### Special Review

生体膜ダイナミクスにおけるGPIアンカーの機能

せるてく・あらかると

## Hippo 名前の秘密

仁科博史

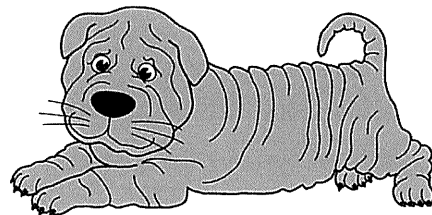
東京医科歯科大学難治疾患研究所 発生再生生物学分野

本特集号の表紙は、カバ (*hippopotamus*, *hippo*) の仕立て屋さんが採寸している様を描いており、臓器サイズを制御する Hippo pathway の一面をうまく表現している。カバさんがしっかり働いてくれるおかげで、体にぴったりサイズの服ができあがる。逆にカバさんが怠けてしまうとぶかぶかサイズの服になってしまう。我々の臓器サイズも hippo によって調整されており、この働きが失われると臓器は大きく膨れ上がり、挙げ句の果てには癌になってしまう。驚くことに、この勤勉なカバさんの存在が明らかになったのはたった数年前のことである。

Hippo pathway を構成する中核因子である Hippo (リン酸化酵素), Salvador (アダプター/足場分子), Warts (リン酸化酵素), Mats (アダプター/足場分子), Yorkie (転写共役因子) は別々に発見された。ワルツ (Warts) は、ショウジョウバエのモザイク解析から新規の癌抑制遺伝子として 1995 年に同定された。優雅な円舞曲のワルツ (waltz) ではない。“こぶ” や “いぼ” を意味する。細胞数が増加して、こぶ状の細胞塊ができたのである。

Salvador は細胞増殖と細胞死を共に制御する遺伝子を単離する過程で取られた変異体であり、死から回避を、ということでスペイン語で救世主を意味する名前が付けられた。じつは同一遺伝子の変異体が別名で単離されており、Shar-pei と命名された。ショウジョウバエ変異体の表現型が、図 1 のような皮膚が幾十にも折り畳まれ、皺皺 (シワシワ) 状の Shar-pei 犬を彷彿させたからである。この変異も細胞数の増加が原因である。2002 年のことであった。そして 2003 年になって、“こぶ” Warts と “シワシワ皮膚” Shar-pei/Salvador を結び付けたのが今回の主役の Hippo である。

カバ (河馬) を辞書やネットで調べてみると「アフリカ産の哺乳動物、体は肥大し巨大、体毛は少なく、胴は丸く、四足は太くて短い、口が大きい、厚皮動物と呼ばれるように皮膚は厚い、日中は水中で過ごし、夜は陸に上がる」などの特徴が記載されている。ショウジョウバエ hippo 変異体を単離し、Salvador や Warts との関係を明らかにした 1 人である Pan 博士から直接いただいたメールには “The enlarged head, which shows multiple folds of cuticles, are like hippopotamus” とある。ショウジョウバエ hippo 変異体の表現型が折り畳まれた表皮で、肥大した皮膚を持つカバに似ているからという理由が名前の由来である。つまりカバさん (Hippo) は、皺皺犬にして救世主の Salvador と “いぼ” Warts をしっかり従えていたのである。水中に潜っていたのか、これまでシグナル伝達研究の表舞台にはなかなか登場しなかった。その後、2005 年になると、Warts の標的分子として Yorkie が見つかった。Yorkie は世界で最小クラスの犬である Yorkshire Terriers に由来する。Yorkie 変異体の頭部や眼はとても小さいからである。仕立て屋カバさんの下にはこれら Shar-pei や Yorkshire Terriers の犬が存在し、異なる動きをしている。



■ 図 1 Shar-pei 犬

変異体の名前は、それを単離した研究者に与えられる特権であり、研究者の思いが込められている。変異体の宝庫であるショウジョウバエにはユニークな名前が多いが、上記のように、Hippo pathway変異体も例外ではない。表現型にちなんだ名前は、想像力をかきたて、ロマンすら感じさせる。名前から色々イメージし、ポーとできるところが嬉しい。一方、生化学的特徴から名付けられる名前は厳密さが特徴であろうか。哺乳動物のHippoに対応するMSTはmammalian ste20-like kinase, Yorkieに対応するYAPはチロシンキナーゼYesに結合することから“yes-associated protein”と命名された。私は生化学が専門であるが、名前に関しては表現型由来の命名に魅力を感じる。

それにしてもなぜこのような重要なシグナル伝達系が2003年まで発見されていなかったのか？細胞数の制御は細胞増殖と細胞死のバランスで決

まるが、各々を制御するシグナル系はそれまでに多数報告されていた背景があるのに、細胞増殖と細胞死両方を同時に制御する特性がユニークだったから遅れたのであろうか？もちろん発見を後押ししたのはショウジョウバエを用いたモザイク解析であり、哺乳動物では困難な実験系を用いて、増殖に差のある細胞の特性を浮き立たせ、hippo遺伝子が臓器サイズ制御遺伝子として同定されたのは間違いないが、それともカバさんに匹敵する重要なシグナル系はまだ隠れており、驚くことはないのでしょうか？

ヒトではこの働き者のカバさんが休んでしまうと癌が発症することが様々な組織で報告されている。カバさんが休んでしまい、本来小柄で愛らしいYorshire Tetterers犬が吠え出すと怖いのだ。いつも体内の臓器を採寸してくれている働き者のカバさんに感謝しようではないか！