

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21～23年度 総合報告書

研究代表者 坂井田 功

平成24（2012）年 3月

目 次

I. 総合報告書	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. 分担研究報告書	7
1. 肝再生・修復（抗線維化）のメカニズムの解明	
宮島 篤	
2. マウスやメダカを用いた肝病態モデルの開発と質量顕微鏡による解析	
仁科 博史	
3. ABMi療法の有用性に関する研究：アルコール性肝硬変に対する臨床応用と骨髄細胞の基礎的検討	
斉藤 貴史	
4. 骨髄細胞中の HBV DNA・HCV RNA の定量	
梅村 武司	
5. 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	
6. 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	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	49
III. 研究成果の刊行物・別刷	55

平成 21～23 年度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

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

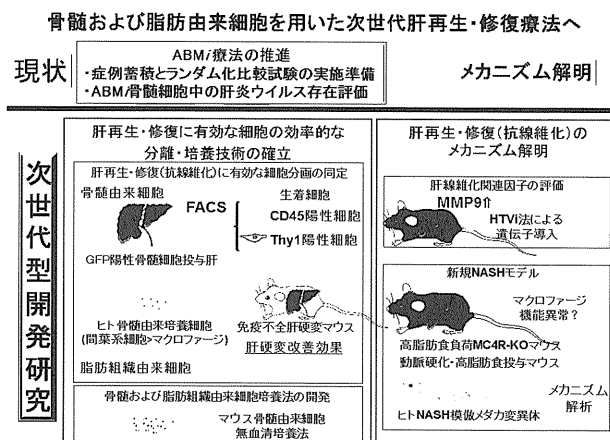
- 分離肝臓構成細胞と骨髄および脂肪由来細胞との相互作用の解析
- 投与骨髄および脂肪由来細胞の抗肝線維化メカニズムの解明
細胞外マトリクスの産生・分解に関与する酵素、その制御因子、細胞外シグナル分子とその受容体、転写因子を解析する。

3. 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

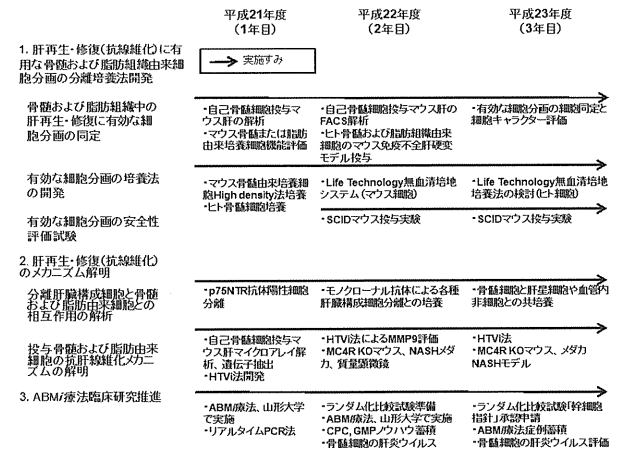
これにより臨床応用のための GMP グレードに準拠した細胞培養培地による培養方法を開発する。

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

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型肝炎に対する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: Terai S, Sakaida I, Currents Status and Prospects of Autologous Bone Marrow Cell Infusion Therapy for Liver Cirrhosis Patients. Bulletin Yamaguchi. 56(1-2), 1-3, 2009.
- 2: Segawa M, Sakaida I, Diagnosis and treatment of portal hypertension. Hepatology Research. 39, 1039-1043, 2009
- 3: Tanaka Y, Sakaida I, Mizokami M, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Nat Genet. 2009 Oct; 41(10):1105-1109.
- 4: Kiyotoki S, Nishikawa J, Sakaida I, et al. Use of the light-emitting diode-illuminated endoscope for upper gastrointestinal endoscopy. Endoscopy. 2009; 41 Suppl 2:E173-174.
- 5: Ryoza S, Iwamoto S, Sakaida I, et al. ERCP using double-balloon endoscopes in patients with Roux-en-Y anastomosis. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2009; 16(5):613-617.
- 6: Kusakabe A, Sakaida I, Mizokami M, et al. Case-control study for the identification of virological factors associated

with fulminant hepatitis B. Hepatol Res. 2009 Jul; 39(7):648-656.

7: 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):733-741.

8: Terai S. Fish model leads to new findings in liver disease. Hepatology Research. 40, 111-113, 2010.

9: Yamasaki T, Hamabe S, Saeki I, Harima Y, Yamaguchi Y, Uchida K, Terai S, Sakaida I. A novel transcatheter arterial infusion chemotherapy using iodized oil and degradable starch microspheres for hepatocellular carcinoma: a prospective randomized trial. J Gastroenterol. 2011 Mar;46(3):359-366.

10: Harima Y, Yamasaki T, Hamabe S, Saeki I, Okita K, Terai S, Sakaida I. Effect of a late evening snack using branched-chain amino acid-enriched nutrients in patients undergoing hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma. Hepatol Res. 2010 Jun;40(6):574-584.

11: Kim JK, Park YN, Kim JS, Park MS, Paik YH, Seok JY, Chung YE, Kim HO, Kim KS, Ahn SH, Kim do Y, Kim MJ, Lee KS, Chon CY, Kim SJ, Terai S, Sakaida I, Han KH. Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. Cell Transplant. 2010;19(10):1237-1246.

12: Okita K, Sakaida I, Okada M, Kaneko A, Chayama K, Kato M, Sata M, Yoshihara H, Ono N, Murawaki Y. A multicenter, open-label, dose-ranging study to exploratively evaluate the efficacy, safety, and dose-response of tolvaptan in patients with decompensated liver cirrhosis. J Gastroenterol. 2010 Sep;45(9):979-987.

13: Matsumoto T, Terai S, Oishi T, Kuwashiro S, Fujisawa K, Yamamoto N, Fujita Y, Hamamoto Y, Furutani-Seiki M, Nishina H, Sakaida I. Medaka as a model for human nonalcoholic steatohepatitis. Dis Model Mech. 2010 Jul-Aug;3(7-8):431-440.

- 14:** Takami T, Sakaida I. Iron regulation by hepatocytes and free radicals. *J Clin Biochem Nutr.* 48(2), 103-106, 2011.
- 15:** Iizuka N, Oka M, Sakaida I, Moribe T, Miura T, Kimura N, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Uchida K, Terai S, Yamashita S, Okita K, Sakata K, Karino Y, Toyota J, Ando E, Ide T, Sata M, Tsunedomi R, Tsutsui M, Iida M, Tokuhisa Y, Sakamoto K, Tamesa T, Fujita Y, Hamamoto Y. Efficient detection of hepatocellular carcinoma by a hybrid blood test of epigenetic and classical protein markers. *Clin Chim Acta.* 412, 152-158, 2011.
- 16:** Yamasaki T, Terai S, and Sakaida I. Deferoxamine for advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 365 (6):576-578,2011.
- 17:** Terai S, Sakaida I. Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 18:23-25,2011.
- 18:** 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.
- 19:** 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
- 20:** 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.
- 21:** 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.
- 22:** 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.
- 23:** Kuwashiro S, Terai S, Oishi T, Fujisawa K, Matsumoto T, Nishina H, 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
- 24:** Takami T, Terai S, Sakaida I. Stem cell therapy in chronic liver disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 28(3), 203-8, 2012.
- 25:** 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
 (日本再生医療学会総会 平成 21 年 3 月 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 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 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 一般)
 骨髄中の肝幹細胞の動態と微細構造解析-GFP/CC14 モデル
 (JDDW 平成 21 年 10 月 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 ポスター)
 ABMI therapy combined with splenectomy is an effective for liver cirrhosis.
 (AASLD 平成 21 年 11 月 ポスター)
 The electronmicroscopical analysis for cell lineage of bone marrow cell differentiation in cirrhosis mice.
 (日本再生医療学会総会 平成 22 年 3 月 一般)
 骨髄由来肝幹細胞の肝硬変修復時における様々な動態と微細構造解析
 (日本再生医療学会総会 平成 22 年 3 月 一般)
 無血清培地によるマウス骨髄由来ディッシュ接着細胞 ex vivo 培養法

(日本再生医療学会総会 平成 22 年 3 月 一般)
骨髄細胞投与による肝修復機構における TNF α シグナルの
検討

(日本肝臓学会総会 平成 22 年 5 月 シンポジウム)
骨髄由来 Liver Repair 細胞を用いた肝臓再生修復療法の現
状と今後の課題

(日本肝臓学会総会 平成 22 年 5 月 ワークショップ)脾臓摘
出術は、肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法の効果を
増強する

(JDDW 平成 22 年 10 月 パネルディスカッション)
骨髄由来 Liver Repair (LR)細胞を用いた肝臓再生修復療法
の開発について

(AASLD 平成 22 年 11 月 ポスター)
Autologous bone marrow cell infusions suppress tumor-
initiation and do not promote tumor-proliferation during
N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in carbon
tetrachloride-treated liver cirrhosis mice.

(AASLD 平成 22 年 11 月 ポスター)
Disruption of Maf accelerates liver fibrosis and cell
proliferation in CCl₄ induced cirrhosis mice

(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

平成21年度～23年度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」

研究分担者氏名：宮島 篤

所属機関：東京大学

職名：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、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同定を行う。

【方法】 自己骨髄細胞の投与により肝硬変が改善するが、骨髄細胞の作用を明らかにするために、投与後に肝臓に生着する細胞の解析をFACS等により解析する。肝線維化の進行あるいは改善に関与する細胞種および因子の同定を行う。肝障害時に誘導される分泌タンパク質を肝臓にて一過性に発現させて、肝線維化に対する機能を解析する。

【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。線維化への関与が期待される分子をhydrodynamic tail vein injection法によりマウス生体の肝細胞に発現させ、線維化に対する効果を検討した。MMP9には線維化改善作用が認められたが、肝障害で発現が誘導されるchitinase3-like 1, Chitinase3-like 3, IGFBP3, EpCAM, renin-angiotensin systemには線維化を促進および抑制する効果は認められなかった。NephronectinはNKT細胞の集簇を促進し肝障害を悪化させる作用が認められた。

【考案】 肝臓に生着して線維化の改善に寄与する細胞として血球系と間葉系細胞が示唆された。肝障害時に発現が誘導される因子で、MMP9には線維化改善作用、Npntには増悪化作用が示された。HTVi法は肝障害関連因子の機能をin vivoで評価する有効で簡便な方法である。

共同研究者

田中稔、伊藤暢、齋藤滋、菊地暁子

A.研究目的

現在 350 万人いるといわれるウイルス肝炎・肝硬変、それに伴う肝不全患者の増加に対する治療法として、肝移植しかない状況である。また HIV 合併 HCV 患者は、より早期に肝硬変へ進行する。しかしながら多くの肝硬変症患者に対して実際に肝移植を実施することは困難であり、生体肝移植に代わる次世代の肝再生療法の開発は急務である。山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学の研究グループは、自家骨髄細胞を肝硬変患者に投与することにより肝線維化が改善する画期的な治療法を開発している。しかしながら、この治療法の最大の難点は患者から400 ml 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が開発が望まれる。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、肝線維化および肝再生・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を行うとともに、肝線維化の進行あるいは改善に関与する因子の探索を行う。

B.研究方法

細胞の分離

骨髄あるいは肝臓の構成細胞に発現する細

胞膜抗原に対するモノクローナル抗体と磁気ビーズまたは蛍光抗体を使ったセルソーターにより細胞を分離して、解析に供した。

骨髓細胞の投与により肝臓に生着する細胞の解析

CC14の連続投与により肝硬変を誘導したマウスへ GFP 陽性の骨髓細胞を投与した後に、コラゲナーゼ灌流により肝臓構成細胞を分散し、各種細胞表面に発現する抗原に対する蛍光抗体により細胞を標識して FACS にて解析した。

抗線維化作用に関わる因子の解析

線維化が進行した肝臓および正常肝臓の各構成細胞種の性状や遺伝子発現の比較を行うことは、抗線維化作用に関わる因子を明らかにするうえで重要である。線維化肝臓と正常肝臓から EpCAM 抗体を用いて細胞を調製し、マイクロアレイ解析により変動遺伝子を複数同定した。

遺伝子導入法

遺伝子発現解析により得られた因子のうち、線維化改善に寄与する可能性のある因子の機能を評価するため、肝臓で簡便に候補遺伝子を発現させる hydrodynamic tail vein injection 法 (HTVi 法) を立ち上げて用いた。

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カ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。

肝星細胞の分離法の確立

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、線維化に関わる TypeI および TypeIII コラーゲンの発現を調べた結果、正常肝の星細胞に比べて線維化肝から調製した星細胞では著しく増大していることが確認された。よって、この手法はこれまで困難であった線維化肝からの星細胞の調製や生体内での星細胞の動態解析に有用な技術となることが期待される。

生体マウスへの遺伝子導入系

肝線維化の進行あるいは改善に関わる因子の探索には、それらの機能を *in vivo* で簡便に評価する実験系が必要である。そこで、生体マウス個体の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 日目までは発現

が確認されたが、発現はその後急速に低下した。一方、Albumin promoter を使うと、発現は2週間目以降でも維持された。そこで、このシステムを使って、肝線維化の促進あるいは改善に関与する可能性のある可溶性分子を正常マウスおよび肝障害モデルマウスの肝臓で発現させることにより、機能解析を行った。

HTVi 法による肝線維化関連因子の探索

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) やメタロプロテアーゼ阻害因子 (TIMP) など、肝線維化の促進あるいは改善に関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マウスの肝臓で発現させたところ、MMP 9 の発現により肝線維化の改善が認められた。一方、TIMP1 の発現による線維化の促進は認められなかった。3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidine (DDC) 投与による肝障害時に誘導された分泌タンパク質の一つとして、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オステオポンチンと同様に RGD motif を有するが、主に integrin $\alpha 8$ と相互作用する。しかしながら、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、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を用いて Npnt の発現解析を行った。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 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ところ、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 は神経軸索の伸長や血管形成に関与する Semaphorin family の分子であり、DDC により発現が上昇する分子である。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。また、肝炎により Sema3 は foci 周囲の肝細胞で発現し、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。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示唆された。

一方、DDC により発現が誘導される可溶性分子として同定された chinase3-like 1, chinase3-like 3, IGFBP3 あるいは細胞膜タンパク質 EpCAM をそれぞれ HTVi 法により発現させて評価したところ、肝線維化に対しては促進、改善いずれの作用も認められなかった。

レニン-アンジオテンシン系 (Renin-Angiotensin System; RAS) は血圧調節や電解質バランスの維持に重要なホルモン系である。肝臓で産生される Angiotensin (Ang) 前駆体タンパク質 (Angiotensinogen; Agt) が血中でレニンおよび Ang 変換酵素による酵素変換を受けて Ang II になり、これが主要な effector として血管や腎臓に作用する。Ang

IIの受容体 (AgtR) には、AgtR I a、AgtR I b、AgtR II の 3 種類が存在する。AgtR I a を介したシグナルは線維化に対して促進的に働くことが以前より良く知られている。一方で、AgtR I b や AgtR II が線維化に対して抑制的に働くことが、それぞれの分子のノックアウトマウスを用いた研究から明らかにされた。さらに最近、Ang II の誘導体である Ang1-7 が MasR を介して線維化抑制作用を及ぼすということも明らかにされた。このように個別のリガンド／受容体の組み合わせについての線維化への作用が解析されてきたが、RAS というシステム全体の活性が及ぼす作用、すなわち、その活性化が線維化に対して促進的であるか、抑制的であるかは、依然として不明であった。そこで、全ての Ang 分子の前駆体である Agt を欠損する KO マウスに CC14 を連続投与して線維化を評価したところ、野生型との有意差が認められなかった。すなわち、RAS は線維化に対しては中立であるが、活性化される受容体のバランスが線維化を促進するか抑制するかを決めている可能性が示唆された。

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。

肝障害モデルマウスの線維化

Tak1 は TNF α 受容体などからのシグナルを NF- κ B に伝える分子であり、これを肝細胞で欠損したマウスでは肝細胞の細胞死が起こり、出生後数週間で線維化が誘導され、さらに数ヶ月で肝癌へと移行することが報告されている。我々はこのシステムを今後の肝線維化の研究に使うことを念頭に評価した。Alfp-Cre で肝細胞特異的に Tak1 遺伝子を欠損させると、生後4週ですでに肝臓における線維の蓄積が認められ、生後8週までに顕著に進行した。したがって、このマウスは肝線維化を評価するよいモデルとなることが期待される。

DDC の投与により、投与開始後8週目までに線維化が誘導されたが、CC14 モデルや Tak1 欠損モデルに比べて線維化の程度は低く、進行も緩慢であった。また、胆管結紮による障害でも肝線維化の顕著な誘導が認められたが、術後3週目頃までに死に至るケースが多く、種々の遺伝子や細胞種の肝線維化に対する作用を経過的に観察する系としては制約が大きいと考えられた。

D. 考 察

骨髄細胞の投与により肝硬変が改善するが、それに関与する細胞種は不明であった。本研究では、線維化を誘導したマウスに骨髄細胞を投与して、肝臓に生着する細胞は主に血球系細胞と間葉系細胞であることが示された。この結果と一致し、山口大グループは骨髄間葉系細胞に肝線維化の改善作用があることを認めている。また、Forbes のグループはマクロファージの一部に肝線維化改善作用があることを報告している。今後

は、これらの細胞を培養により増幅して肝硬変モデルマウスへの移植により改善効果を検証することで、新たな治療戦略につながることを期待される。

肝障害時に発現が誘導される因子の肝障害／線維化に対する作用を HTVi 法により評価した。MMP9 を肝臓で発現することで線維化の改善が認められた。これは坂井田らの以前の報告とも一致する。一方、Npnt には肝障害増悪作用を認めた。その他の試した因子には若干の作用を認める分子もあったが、強い作用を示す因子はなかった。また、HTVi 法による因子の in vivo での機能解析の有効性が示された。

E. 結 論

肝硬変マウスの肝臓に生着する骨髄細胞には血球系細胞と間葉系細胞であることが示された。肝障害に伴い発現が誘導される分子の機能を HTVi 法を使って評価した結果、MMP9 には線維化改善作用を認めた。一方、Npnt には障害の増悪化作用が認められた。HTVi 法による因子の in vivo での機能解析の有効性が示された。

研究発表

1.論文発表

1. Chen Y-R., Sekine K., Nakamura,K., Yanai,H. Tanaka M., and Miyajima A. YB-1 downregulates expression of carbamoyl phosphate synthetase I by suppressing C/EBP α function, leading to hyperammonemia. *Gastroenterology* 137, 330-340, 2009.
2. 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.
3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. 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

7. 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.

8. Onitsuka I., Tanaka M., and Miyajima A. Characterization and functional analyses of hepatic mesothelial cells in mouse liver development. *Gastroenterology* in press

9. 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.

10. Onitsuka I., Tanaka M., and Miyajima A. Characterization and functional analyses of hepatic mesothelial cells in mouse liver development. *Gastroenterology* 138, 1525-1536, 2010.

11. Yamauchi S., Ito H., and Miyajima A. Ikbh, a

nuclear IκB protein, positively regulates the NF-κB-mediated expression of pro-inflammatory cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 11924-11929, 2010.

12. Yanai H., Nakura K., Hijioaka S., Kamei A., Ikari T., Ishikawa, Y., Shinozaki E., Mizunuma N., Hatake K., and Miyajima A. Dlk-1, a cell surface antigen on hepatic stem/progenitor cells, is expressed in hepatocellular, colon, pancreas and breast carcinomas at a high frequency. *J. Biochem.* 148, 85-92, 2010.

13. Tanaka M., Itoh T., Tanimizu N. and Miyajima A. Liver stem/progenitor cells: Their characteristics and regulatory mechanisms. *J. Biochem.* in press.

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

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

16. 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.

17. 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.

18. 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

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)
13. Hinako Takase, Tohru Itoh, Atsushi Miyajima, FGF7 induces stem/progenitor cell response in the adult mouse liver. 8th Stem Cell Research Symposium 第 8 回幹細胞シンポジウム (淡路夢舞台国際会議場 2010.5.13-15)
14. 伊藤暢, 高瀬比菜子, 宮島篤. 成体肝幹/前駆細胞反応を制御する細胞間シグナルネットワーク. 第 17 回肝細胞研究会 (秋田アトリオン 2010.6.18-19)
15. 宮岡佑一郎, 宮島篤. 肝再生における細胞系譜の追跡. 第 17 回肝細胞研究会 (秋田アトリオン 2010.6.18-19)
16. 田中稔, 宮島篤. 肝臓の発生メカニズム解明へのアプローチ: マーカー分子を用いた肝臓構成細胞の分離・同定と性状解析. 第 17 回肝細胞研究会 (秋田アトリオン 2010.6.18-19)
17. 千賀一徳, 谷水直樹, 三高俊広, 宮島篤. 胆管上皮細胞に特異的な転写因子 Grhl2 の機能解析. 第 17 回肝細胞研究会 (秋田アトリオン 2010.6.18-19)
18. 稲垣冬樹, 田中稔, 寺井崇二, 神谷淑子, 國土典宏, 坂井田功, 宮島篤. 骨髄細胞移植による肝線維化改善に有効な細胞成分の検討. 第 17 回肝細胞研究会 (秋田アトリオン 2010.6.18-19)
19. 高瀬比菜子, 伊藤暢, 宮島篤. FGF シグナルによるマウスオーバル細胞の制御. 第 17 回肝細胞研究会 (秋田アトリオン 2010.6.18-19)
20. Minoru Tanaka, Marika Motomura, Yoshiko Kamiya, and Atsushi Miyajima. Identification of fetal liver cells contributing to hematopoiesis during mouse embryogenesis. 2010 FASEB Summer Research Conferences (Snowmass Village Conference Center 2010.8.15-20)
21. Tohru Itoh, Hinako Takase, and Atsushi Miyajima. Searching for signaling molecules regulating adult liver progenitor cell response using the hydrodynamic tail vein injection-mediated *in vivo* gene transfer technique. 2010 FASEB Summer Research Conferences "Liver Growth, Injury & Metabolism: Basic & Applied Biology" (Snowmass Village Conference Center 2010.8.15-20)
22. Hinako Takase, Tohru Itoh, Atsushi Miyajima. FGF7 induces stem/progenitor cell response in the adult mouse liver. 2010 FASEB Summer Research Conferences "Liver Growth, Injury & Metabolism: Basic & Applied Biology" (Snowmass Village Conference Center 2010.8.15-20)
23. 伊藤暢, 高瀬比菜子, 宮島篤. マウス成体肝臓における幹/前駆細胞反応制御シグナルの解析. IN Cell User's Day 2010 (GEヘルスケア・ジャパン ライフサイエンス新宿本部 2010.8.27)
24. 伊藤暢. 肝障害時に誘導される幹/前駆細胞反応および再生の FGF シグナルによる制御. 第 31 回幹細胞治療研究フォーラム (東京大学医科学研究所 2010.11.18)
25. 宮岡佑一郎, 江波戸一希, 加藤英徳, 宮島篤. Liver Regeneration Consists of Coordinated Proliferation and Hypertrophy of Hepatocytes. 第16回武田科学振興財団生命科学シンポジウム (シエラトン都ホテル東京 2010.12.1)
26. Minoru Tanaka, Marika Motomura, Yoshiko Kamiya, and Atsushi Miyajima. Identification of fetal liver cells contributing to hematopoiesis during mouse embryogenesis. BMB2010/第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (神戸ポートアイランド 2010.12.7-10)
27. 宮岡佑一郎, 齊藤滋, 今村亨, 宮島篤. Fgf 結合分子 Cfr/Glg-1 の細胞内局在制御機構. BMB2010/第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (神戸ポートアイランド 2010.12.7-10)
28. 廣瀬恵一, 西條 (及川) 栄子, 菅野安喜, 陳彦榮,

- 関根圭輔、宮島篤. 肝類洞内皮細胞に発現する Stabilin-2 は血中ヒアルロン酸の主要なクリアランス受容体である. BMB2010/第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会(神戸ポートアイランド 2010.12.7-10)
29. Shumpei Yamauchi, Hiroaki Ito, Ai Omi, Atsushi Miyajima. Identification and characterization of a new IkappaB protein. BMB2010/第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会(神戸ポートアイランド 2010.12.7-10)
30. 千賀一徳、谷水直樹、三高俊広、宮島篤. 胆管上皮細胞に特異的な転写因子 Grhl2 の機能解析. BMB2010/第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会(神戸ポートアイランド 2010.12.7-10)
31. 伊藤暢、高瀬比菜子、宮島篤. Hydrodynamic tail vein injection 法を用いた、マウス成体肝幹/前駆細胞反応の制御シグナルの探索. BMB2010/第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会(神戸ポートアイランド 2010.12.7-10)
32. 高瀬比菜子、伊藤暢、宮島篤. FGF7 regulates stem/progenitor cell response in the adult mouse liver. BMB2010/第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会(神戸ポートアイランド 2010.12.7-10)
33. Tohru Itoh, Hinako Takase, and Atsushi Miyajima. FGF7 is critical for progenitor cell-mediated regeneration in the adult mouse liver. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Stem Cells in Development, Tissue Homeostasis and Disease" (Eldorado Hotel & Spa, Santa Fe, New Mexico, USA 2011.1.31)
34. 宮岡佑一郎、江波戸一希、加藤英徳、宮島篤. 肝再生における肝細胞増殖と肥大. 第10回日本再生医療学会総会(京王プラザホテル(東京都新宿区) 2011.3.1)
35. 伊藤暢、高瀬比菜子、宮島篤. マウス肝障害モデルにおける肝幹/前駆細胞反応の FGF シグナルによる制御. 第10回日本再生医療学会総会(京王プラザホテル(東京都新宿区) 2011.3.2)
36. 齋藤弘樹、竹内真樹、宮島篤. iPS細胞から機能的膵島を形成する培養法の開発. 第10回日本再生医療学会総会(京王プラザホテル(東京都新宿区) 2011.3.2)
37. Yen-Rong Chen, Eiko Saijou, and Atsushi Miyajima. Generation of Factor VIII producing cells from human iPS cells. 第10回日本再生医療学会総会(京王プラザホテル(東京都新宿区) 2011.3.2)
38. 宮島篤. 幹細胞からの *in vitro* における組織構築. 第10回日本再生医療学会総会(京王プラザホテル(東京都新宿区) 2011.3.1)
39. Minoru Tanaka, Tohru Itoh, Hinako Takase, Izumi Onitsuka, Yuko Tsukahara, Yoshikazu Hirose, Yoshiko Kamiya, and Atsushi Miyajima. Liver stem/progenitor cells in normal and pathological conditions. 2010 FASEB Summer Research Conferences "Liver Growth, Injury & Metabolism: Basic & Applied Biology" (Snowmass Village Conference Center, 2010.8.15-20)
40. Minoru Tanaka, Tohru Itoh, Hinako Takase, Izumi Onitsuka, Atsushi Miyajima. Roles of non-parenchymal cells in liver development and regeneration. 15th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid (The Hilton Pasadena Hotel, Pasadena CA, 2010.8.29-9.1)
41. Atsushi Miyajima. Liver stem/progenitor cells in development and regeneration. Tokyo iPS/Stem Cell Symposium 2010 (Yasuda Auditorium, University of Tokyo, 2010. 11.24)
42. 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)

43. 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)

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

45. 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)

46. Tohru Itoh, Hinako Takase, Yuichiro Miyaoka, Minoru Tanaka and Atsushi Miyajima. Mechanisms of stem/progenitor cell-dependent and -independent 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)

47. 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)

48. 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)

49. 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)

50. 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)

51. 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)

52. 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)

53. 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)

54. 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)

55. 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

平成21年度～23年度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

「マウスやメダカを用いた肝病態モデルの開発と質量顕微鏡による解析」

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】薬剤のハイスループット・スクリーニング可能な小型魚類メダカやヒト疾患モデルの実績が豊富なマウスを用いて、ヒト肝病態を模倣する新規モデルの開発を行うこと、さらに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を大きな目標に掲げ、以下の3点を目的にした。1)ヒトNASHを模倣する脂肪肝メダカの作出すること、2)「細胞競合」の概念に基づいた新規マウス肝細胞がんモデルを開発すること、3)次世代ライクサイエンス技術として注目されている質量分析と位置情報可視化を併せ持つ「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行うこと。

【方法】1)変異剤処理によって遺伝的に脂肪肝を発症するメダカのスクリーニングと、高脂肪食摂取によって後天的に脂肪肝を発症するメダカの作出を試みた。2)ショウジョウバエの細胞競合に関与する Hippo シグナル系の破綻をマウス肝臓で起こし、肝細胞がんの発症を検討した。3)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た。

【成績】1)先天的および後天的にもNASH様の脂肪肝を発症するメダカの作出に成功した。2)Hippoシグナル破綻に依存した新規マウス肝細胞がんモデルの開発に成功した。3)従来の分析方法である薄層クロマトグラフィー(TLC)では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PCは肝臓小葉構造に沿って濃度勾配(zonation)で存在することを明らかにすることができた。

【考案】目的通り、有用なモデルの開発に成功したので、薬剤スクリーニングへの応用や肝細胞がん発症の新たな解析が可能となった。また、質量顕微鏡をヒト肝病態に応用することで、新たな分子マーカーの単離が期待される。

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

薬剤のハイスループット・スクリーニング可能な小型魚類メダカやヒト疾患モデルの実績が豊富なマウスを用いて、ヒト肝病態を模倣する新規モデルの開発を行うこと、さらに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を大きな目標に掲げ、以下の3点を目的にした。1)ヒトNASHを模倣する脂肪肝メダカの作出すること、2)「細胞競合」の概念に基づいた新規マウス肝細胞がんモデルを開発すること、3)次世代ライクサイエンス技術として注目されている質量分析と位置情報可視化を併せ持つ「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行うこと。本プロジェクトを支える基盤研究を行う。

B.研究方法

1年目は、1)変異剤処理によって遺伝的に脂肪肝を発症するメダカのスクリーニングと、高脂肪食摂取によって後天的に脂肪肝を発症するメダカの作出を試みた。

2～3年目は、2)ショウジョウバエの細胞競合に関与する Hippo シグナル系の破綻をマウス肝臓で起こし、肝細胞がんの発症を検討した。3)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た。

C. 研究結果

1) 変異剤処理によって遺伝的に脂肪肝を発症するメダカのスクリーニングと、高脂肪食摂取によって後天的に脂肪肝を発症するメダカの作出を試み、先天的および後天的にも NASH 様の脂肪肝を発症するメダカの作出に成功した。本研究成果は 2010 年の原著論分に報告した。

2) Hippo シグナル破綻に依存した新規マウス肝細胞がんモデルの開発に成功した。これまでほぼ 100% の頻度で肝細胞がんの発症に成功している(論文準備中)。

3) 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。本研究成果は 2011 年の原著論分に報告した。

D. 考 察

欧米では小型魚類ゼブラフィッシュがヒト疾患モデルとして盛んに用いられているが我が国では遅れている。今回、世界的にもユニークな NASH 様の脂肪肝メダカは我が国の創薬のモデルになることが期待される。また、細胞レベルの品質管理機構である「細胞競合」に基づく新たなマウスモデルはがん幹細胞(cancer stem cell)の概念を相まって肝細胞がんの発症メカニズムの解明に貢献すると期待される。次世代解析技術として期待されている質量顕微鏡は、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解析法であることが判明した。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

「マウスやメダカを用いた肝病態モデルの開発と質量顕微鏡による解析」という当初の目的は達成され、予想以上の研究成果が得られた。自己骨髄細胞を用いた療法の更なる展開に貢献するモデル系であり、解析法である。

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 Sawanoboria, 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 Kajihio, Josef M. Penninger, Toshiaki Katada, and **Hiroshi Nishina*** (2009) Blockage by SP600125 of Fce 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 Cryptochrome1a 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.
- 9) Takahiro Negishi, Yoko Nagai, Yoichi Asaoka, Mami Ohno, Misako Namae, Hiroshi Mitani, Takashi Sasaki, Nobuyoshi Shimizu, Shuji Terai, Isao Sakaida, Hisato Kondoh, Toshiaki Katada, Makoto Furutani-Seiki*, and Hiroshi Nishina* (2010) Retinoic acid signaling positively regulates liver specification by inducing wnt2bb gene expression in medaka. *Hepatology* **51**, 1037-1045. (*Corresponding authors) Press release
- 10) Kentaro Nakagawa¹, Misato Sugahara¹, Tokiwa Yamasaki¹, Hiroaki Kajiho, Shinya Takahashi, Jun Hirayama, Yasuhiro Minami, Yasutaka Ohta, Toshio Watanabe, Yutaka Hata, Toshiaki Katada and Hiroshi Nishina (2010) Filamin Associates with Stress Signaling Kinases MKK7 and MKK4 and Regulates JNK Activation. *Biochem. J.* **427**, 237-245. (¹Contributed equally)
- 11) Jinzhan Wu¹, Junko Kubota¹, Jun Hirayama¹, Yoko Nagai, Sachiko Nishina, Tadashi Yokoi, Yoichi Asaoka, Jungwon Seo, Nao Shimizu, Hiroaki Kajiho, Takashi Watanabe, Noriyuki Azuma, Toshiaki Katada, and Hiroshi Nishina (2010) p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Controls a Switch between Cardiomyocyte and Neuronal Commitment of Murine Embryonic Stem Cells by Activating Myocyte Enhancer Factor 2C-Dependent Bone Morpho genetic Protein 2 Transcription. *Stem Cells and Development* **19**, 1723-1734.
- 12) Jungwon Seo¹, Yoichi Asaoka^{1*}, Yoko Nagai, Jun Hirayama, Tokiwa Yamasaki, Misako Namae, Shinya Ohata, Nao Shimizu, Takahiro Negishi, Daiju Kitagawa, Hisato Kondoh, Makoto Furutani-Seiki, Josef M. Penninger, Toshiaki Katada, and Hiroshi Nishina* (2010) Negative regulation of wnt11 by JNK signaling is required for convergent extension during vertebrate gastrulation. *J. Cell. Biochem.* **110**, 1022-1037.