

- 13) Yoko Nagai<sup>1</sup>, Yoichi Asaoka<sup>1</sup>, Misako Namae, Kota Saito, Haruka Momose, Hiroshi Mitani, Makoto Furutani-Seiki, Toshiaki Katada and Hiroshi Nishina (2010) The LIM protein Ajuba is required for ciliogenesis and left-right axis determination in medaka. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 887-893.
- 14) G. Gregory Neely, Keiji Kuba, Anthony Cammarato, Kazuya Isobe, Sabine Amann, Liyong Zhang, Mitsushige Murata, Lisa Elmén, Vajjayanti Gupta, Suchir Arora, Rinku Sarangi, Debasis Dan, Susumu Fujisawa, Takako Usami, Cui-ping Xia, Alex C. Keene, Nakissa N. Alayari, Hiroyuki Yamakawa, Ulrich Elling, Christian Berger, Maria Novatchkova, Rubina Kogelgruber, Keiichi Fukuda, Hiroshi Nishina, Mitsuaki Isobe, J. Andrew Pospisilik, Yumiko Imai, Arne Pfeufer, Andrew A. Hicks, Peter P. Pramstaller, Sai Subramaniam, Akinori Kimura, Karen Ocorr, Rolf Bodmer, Josef M. Penninger (2010) A Global In Vivo Drosophila RNAi Screen Identifies NOT3 as a Conserved Regulator of Heart Function. *Cell* 141, 142-153. Cover of the issue
- 15) Shigeomi Shimizu, Akimitsu Konishi, Yuya Nishida, Takeshi Mizuta, Hiroshi Nishina, Akitsugu Yamamoto, and Yoshihide Tsujimoto (2010) Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death. *Oncogene* 29, 2070-2082.
- 16) Ryuichi Mashima, Kazuho Honda, Yi Yang, Yohei Morita, Akane Inoue, Sumimasa Arimura, Hiroshi Nishina, Hideo Ema, Hiromitsu Nakauchi, Brian Seed, Hideaki Oda, and Yuji Yamanashi (2010) Mice lacking Dok-1, Dok-2, and Dok-3 succumb to aggressive histiocytic sarcoma. *Laboratory Investigation* 90, 1357-1364.
- 17) Tanaka, Hideyuki Hara, Hiroshi Nishina, Kentaro Hanada, Kenichi Hagiwara, Tomohiko Maehama (2010) An improved method for cell-to-cell transmission of infectious prion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397, 505-508.
- 18) Yoichi Asaoka and Hiroshi Nishina (2010) [review] Diverse Physiological Functions of MKK4 and MKK7 during Early Embryogenesis. *J. Biochem.* 148: 393-401.
- 19) Yoshimi Uchida, Jun Hirayama, Hiroshi Nishina (2010) [review] A common origin: signaling similarities in the regulation of the circadian clock and DNA damage responses. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 535-544. Cover of the issue
- 20) Shuhei Tanemura, Tokiwa Yamasaki, Toshiaki Katada and Hiroshi Nishina (2010) [review] Utility and limitations of SP600125, an inhibitor of stress-responsive c-Jun N-terminal kinase. *Curr. Enzym. Inhib.* 6, 26-33.
- 21) 仁科博史：分子細胞生物学 第6版 (Lodish et al.) (翻訳分担) 東京化学同人 (2010)
- 22) 仁科博史：生物学事典、東京化学同人 (執筆分担) (2010)
- 23) 仁科博史：小型魚類メダカを用いた肝形成および肝疾患研究：肝細胞研究会ホームページ：研究交流 (<http://hepato.umin.jp/kouryu/kouryu12.html>) (2010)
- 24) 平山順、内田好海、宮村憲央、沢登健治、仁科博史：概日リズムによる生理機能の制御機構；自律神経 47, 297-300 (2010)
- 25) 中村貴、早坂孝宏、井上菜穂子、仁科博史、瀬藤光利：「メタボロームの分布可視化法について」メタボロミクス：その解析技術と臨床・創薬応用研究の最前線、メディカルドゥ、遺伝子医学MOOK 16, 131-135 (2010)
- 26) 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□□
- 27) 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.□□
- 28) Tadashi Yokoi, Yuko Seko, Tae Yokoi, Hatsune Makino, Shin Hatou, Masakazu Yamada, Tooru Kiyono, Akihiro Umezawa, Hiroshi Nishina, Noriyuki Azuma (2012) Establishment of Functioning Human Corneal Endothelial Cell Line with High Growth Potential. *PLoS ONE* accepted□□
- 29) Ken Okada, Akihito 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.□□
- 30) Tokiwa Yamasaki, Hiroshi Kawasaki and Hiroshi Nishina (2012) Diverse roles of JNK and MKK pathways in the brain. *J. Signal Trans.* in press
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) Tomomi Osaki, Yoshimi Uchida, Jun Hirayama, and Hiroshi Nishina (2011) Diphenyleneiodonium chloride, an inhibitor of NADPH oxidase, suppresses light-dependent induction of clock and DNA repair genes in zebrafish. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1343-1347.
- 34) 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.□□
- 35) 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.□□
- 36) 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.□□
- 37) 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

- Hiroshi Nishina; Physiological roles of Hippo signaling pathway using Medaka, *Oryzias Latipes*. [RASSF First International Symposium, Banff, Canada, February, 2009]
- 仁科博史; モデル生物を用いた「細胞の生と死」を制御するシグナル伝達系の解析 [埼玉大学セミナー; 2009年2月/浦和]
- 仁科博史; 小型魚類を用いた SAPK/JNK シグナル系の解析 [生理学研究所セミナー; 2009年2月/岡崎]
- 濱弘太郎、中永景太、田中将之、浅岡 洋一、仁科博史、青木淳賢; リゾホスファチジン酸産生酵素オートタキシンの血管形成過程における役割 [第15回小型魚類研究会; 2009年9月/名古屋]
- 仁科博史; メダカ扁平胚 *hirame* 変異体の単離と解析 [理化学研究所 CDB; 2009年10月/神戸]
- 仁科博史/畑裕世話人シンポジウム; 細胞死・細胞増殖制御を司る新しいシグナル伝達系 Hippo pathway  
仁科博史、古谷-清木誠; 扁平胚の表現型を示す YAP メダカ変異体の単離と解析 [第82回日本生

- 化学会大会；2009年10月／神戸]
7. Yoichi Asaoka and Hiroshi Nishina; Negative Regulation of Wnt11 Expression by Jnk Signaling during Convergent Extension [9<sup>th</sup> International meeting on ZEBRAFISH DEVELOPMENT AND GENETICS, Wisconsin, USA, June, 2010]
8. Yoichi Asaoka and Hiroshi Nishina; Liver biology and disease: lessons from mutant fish [The Joint Symposium of the 5<sup>th</sup> International Symposium of Institute Network and the International Symposium Commemorating Inauguration of Kanazawa University Cancer Research Institute, Kanazawa, June, 2010]
9. Hiroshi Nishina; The LIM protein Ajuba is required for ciliogenesis and left-right axis determination in medaka [FASEB Summer Research Conferences 2010, Aspen, USA, August, 2010]
10. Hiroshi Nishina; Regulation of ES cell differentiation [Lectures on Organogenesis and Regeneration in Fayoum University, Fayoum, Egypt, October, 2010]
11. Hiroshi Nishina; Generation and Regeneration of liver [Fayoum University International Symposium on Stem Cells, Fayoum, Egypt, October, 2010]
- Yoko Nagai et al.; The LIM protein Ajuba is required for ciliogenesis and left-right axis determination in medaka [The 16<sup>th</sup> Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Tokyo, Japan, December, 2010]
12. Yoshimi Uchida et al.; The death domain-associated protein DAXX interacts with the core clock component BMAL1 and modulates circadian transcription [The 16<sup>th</sup> Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Tokyo, Japan, December, 2010]
13. 仁科博史；細胞死調節因子 Daxx による分子時計制御 [細胞死研究会；2010年1月／京都]
14. 仁科博史；私のキャリアパス [東大医科研 GCOE キャリアパス支援セミナー；2010年2月／東京]
15. 仁科博史；小型魚類を用いたトランスポートソーム下流シグナル伝達系の解析 [膜輸送公開シンポジウム；2010年3月／大阪]
16. 宮村憲央他；細胞死調節因子 Daxx による概日リズムの分子機構 [日本薬学会第130年会；2010年3月／岡山]
17. 長井陽子他；LIM ファミリータンパク質 Ajuba は初期発生過程の繊毛形成に関与する [日本薬学会第130年会；2010年3月／岡山]
18. 内田好海他；ストレス応答キナーゼ JNK による時計蛋白質 PER2 の安定性制御 [日本薬学会第130年会；2010年3月／岡山]
19. 仁科博史；肝細胞の増殖を制御するシグナル伝達の解析 [第12回日本肝臓医生物学研究会；2010年4月／静岡]
20. 仁科博史；マウスやメダカを用いた MAP キナーゼシグナル伝達系の生理機能の解析 [東京女子医大セミナー；2010年5月／東京]
21. 仁科博史；小型魚類メダカを用いた肝臓研究 [第7回日本胎盤臨床研究会；2010年5月／東京]
22. 仁科博史；小型魚類メダカを用いた肝臓研究：肝形成と肝疾患 [大学院生命情報教育部公開シンポジウム；2010年6月／東京]
23. 内田好海他；JNK シグナル伝達系による分子時計制御機構の解明 [日本分子生物学会第10回春期シンポジウム；2010年6月／東京]
24. 仁科博史；小型魚類メダカを用いた肝臓左右性決定機構の解明 [第17回肝細胞研究会；2010年6月／秋田]
25. 山崎世和、仁科博史；ストレス応答性キナーゼ MKK7 欠損マウスにおける脳形成異常 [第9回生命科学研究会；2010年6月／筑波]

26. 平山順、仁科博史；細胞死制御因子 DAXX による分子時計制御 [第 9 回生命科学研究会；2010 年 6 月／筑波]
27. 浅岡洋一、仁科博史；ストレス応答性 JNK シグナル伝達系のゼブラフィッシュ初期胚における役割 [第 16 回小型魚類研究会；2010 年 9 月／埼玉]
28. 長井陽子他；LIM ファミリータンパク質 Ajuba は初期発生過程の繊毛形成に関与する [第 16 回小型魚類研究会；2010 年 9 月／埼玉]
29. 宮村憲央、仁科博史；プロトオンコジーン YAP による肝細胞増殖誘導法の開発 [第 13 回日本肝臓医学生物学研究会；2010 年 10 月／札幌]
30. 大谷智実他；ゼブラフィッシュ培養細胞を用いた概日リズムの光同調機構の解析 [第 9 回ファーマバイオフォーラム；2010 年 10 月／京都]
31. 尾崎友美他；DNA 損傷応答における概日リズムの役割 [第 9 回ファーマバイオフォーラム；2010 年 10 月／京都]
32. 下村忠範他；ストレス応答性 JNK シグナル経路による概日リズム制御因子 PER2 の機能制御 [第 9 回ファーマバイオフォーラム；2010 年 10 月／京都]
33. 仁科博史；マウスやメダカを用いた肝形成機構の解明 [北里大学セミナー；2010 年 10 月／東京]
34. 仁科博史；小型魚類メダカを用いた肝形研究 [第 22 回分子糖尿病研究会；2010 年 12 月／東京]
35. 仁科博史／高橋良輔世話人ワークショップ；小型魚類メダカやゼブラフィッシュを用いた疾患研究 [BMB2010；2010 年 12 月／神戸]
36. 山崎世和他；ストレス応答性キナーゼ MKK7 欠損マウスにおける脳形成異常 [BMB2010；2010 年 12 月／神戸]
37. 仁科博史；小型魚類ゼブラフィッシュおよびメダカを用いた器官形成機構の解明 [徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部セミナー；2010 年 12 月／徳島]
38. 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]
39. 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]
40. 畠星治、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]
41. 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]
42. 畠星治、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]
43. 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]
44. 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]
45. 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]
46. 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]
47. 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 回日本生化学会大会シンポジウム；2011 年 9 月／京都]
48. 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]

49. 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]
50. 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]
51. 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]
52. Jun Hirayama and Hiroshi Nishina;  
Light-dependent regulation of zebrafish circadian  
transcription [Spin Chemistry Meeting 2011,  
Noordwijk, Netherlands, May 2011]
53. Hiroshi Nishina; RASSF7 functions as an  
anti-apoptotic regulator of JNK signaling by  
inhibiting phosphorylated MKK7 activity [2nd  
RASSF Symposium, Oxford, UK, July 2011]
54. 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]
55. 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

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

「 NASH モデルマウス解析 」

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）はしばしばメタボリックシンドロームに合併し、高率に肝硬変・肝癌に進展する病態として注目されているが、ヒト NASH の臨床病態を再現できる動物モデルが存在しないことが問題となっている。我々は、摂食調節に重要なメラノコルチン 4 型受容体（MC4R）を欠損するマウスが新しい NASH モデルになることを検証した。また、NASH の病態形成において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重要であると考えられるが、その詳細は不明な点が多い。そこで、我々が確立した新規 NASH モデルを用いて、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】

20 週間の高脂肪食負荷によって、野生型マウスは単純性脂肪肝を呈するのみであったが、MC4R 欠損マウスの肝臓では NASH の診断基準に合致する組織所見が認められた。さらに、1 年間の高脂肪食負荷を行い、MC4R 欠損マウスでは検討をおこなった全個体（5/5）において AFP 陽性の肝細胞癌を発症することを見出した。20 週負荷の肝臓を用いて F4/80 染色を行ったところ、MC4R 欠損マウスではマクロファージが肝細胞を取り囲む像が認められ、野生型マウスと比較してクロドロネートリポソームによるマクロファージの消去効率が減弱していた。

【考案】

MC4R 欠損マウスは 20 週間の高脂肪食負荷により肥満・糖脂質代謝異常とヒト NASH 様の肝病変を呈し、1 年間の負荷によって肝細胞癌への進展することが明らかとなった。また、NASH 発症過程においてマクロファージの分布や機能に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

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、ときに肝硬変や肝癌へ進展する病態として注目されている。NASH の発症機構として、インスリン抵抗性や肝脂肪蓄積などの代謝障害（1st hit）とサイトカインや酸化ストレス、エンドトキシンなどの炎症性変化（2nd hit）の 2 段階より構成される「2 hit 仮説」が提唱されているが、各々の要因と病態形成の因果関係には不明の点が多い。また、NASH には感度・特異度の高いバイオマーカーがなく、確定診断や治療効果の判定には肝生検が

必要であることが臨床上重要な問題である。

従来の NASH 動物モデルは肥満/インスリン抵抗性と肝線維化のすべてを併せ持つものがなく、NASH 研究における大きな障壁であった。我々は、摂食調節に関わるメラノコルチン 4 型受容体（MC4R: melanocortin 4 receptor）欠損マウスが、新たな NASH モデルになる可能性を検討した。

さらに、NASH の病態形成では実質細胞である肝細胞と炎症性細胞・血管内皮細胞・肝星細胞などの間質細胞との相互作用が重要であると考えられる。特に肝臓には多数の常在性マクロファージであるクッパー細胞が存在し、その活性化が病態形成に関与すると言わ

れている。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. MC4R 欠損マウスに対する長期間高脂肪食負荷

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 週間および 1 年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。組織学的解析（HE 染色、Masson Trichrome 染色、Sirius red 染色、 $\alpha$ -fetoprotein (AFP) 免疫染色）と遺伝子発現解析（リアルタイム PCR 法）を施行した。

### 2. 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。

### 3. 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  $\mu$ m のメッシュを通す。10000  $\times$  g, 4 $^{\circ}$ 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. MC4R 欠損マウスに対する長期間高脂肪食負荷

(1)NASH 様病変：20 週間の高脂肪食負荷を行うと、MC4R 欠損マウスではヒト肥満症患者と同様に高インスリン血症、高脂血症、低アディポネクチン・高レプチン血症が認められた。肝組織学的解析では、野生型マウスが単純性脂肪肝を呈するのみであるのに対し、MC4R 欠損マウスでは NASH の臨床診断基準に合致する小葉内炎症細胞浸潤、肝細胞風船様変性、肝細胞周囲性線維化が観察された（図 1）。遺伝子発現解析では、高脂肪食を負荷した MC4R 欠損マウスにおいて炎症性マーカー TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ ）や線維化マーカー（TGF $\beta$ 1: transforming growth factor  $\beta$ 1, COL1A1, collagen  $\alpha$ 1(I)）の発現が著明に亢進していた。

さらに、1 年間の高脂肪食負荷を行うと、野生型マウスの肝臓においても炎症性細胞浸潤、肝細胞風船様変性が散見され、軽度の線維化が認められた。MC4R 欠損マウスではさらに顕著な炎症性細胞浸潤、肝細胞風船様変性が認められ、線維化面積の増加とともに架橋形成に近い所見も認められた。

(2) 肝線維化からの腫瘍発症： MC4R 欠損マウスでは検討をおこなった全個体 ( $n = 5$ ) に腫瘍形成を認め、HE 染色にて圧排性の増殖と被膜形成を認めた（図 2）。腫瘍内部の細胞では核/細胞質比の増大、核の大小不同、脂質蓄積を認め、これらの細胞が不規則な索状構造を取り、正常な脈管構造は消失してい

た。さらに、肝細胞癌マーカーである AFP が陽性であり、高分化型肝細胞癌に一致する所見であった (図 2)。一方、野生型マウスでは同様の变化は認められなかった。

## 2. マクロファージの組織学的解析

野生型マウスでは 20 週間高脂肪食負荷により単純性脂肪肝を呈するが、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、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像が多数認められ (図 3)、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 3)。

## 3. 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、F4/80 遺伝子発現も著明に減少した。また、TNF $\alpha$ 、TGF $\beta$ 1、COL1A1 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

本研究より、MC4R 欠損マウスは 20 週間の高脂肪食負荷により肥満・糖脂質代謝異常とヒト NASH 様の肝病変を呈し、1 年間の負荷

によって肝細胞癌への進展することが明らかとなった (図 4)。従来、食餌性肥満モデルでは線維化発症までに 1 年近い負荷が必要であり、四塩化炭素やメチオニン・コリン欠乏食では肥満を伴わないことが問題であった。また、これらのマウスでは肝癌の発症はなく、肝線維化から癌を発症する肝特異的 PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10) 欠損マウスや MAT1A (methionine adenosyltransferase 1A) 欠損マウスには肥満が認められない。MC4R 欠損マウスはこれらのすべての問題点を克服した NASH モデルであると考えられる (図 5)。

また、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 週間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の変化がこの時期に一致していること、NASH に特徴的と考えられる CLS 様構造が特にリポソーム抵抗性であることは、NASH の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

MC4R 欠損マウスは高脂肪食負荷によって脂肪肝から肝線維化を発症するだけでなく、肝癌への進展を連続的に観察できる有用な系であり、従来の問題点を克服した全く新しいモ



デルである。本モデルを用いた解析から、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、マクロファージの局在・機能に変化が起きていることが示唆された。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. A. Sato, H. Kawano, T. Notsu, M. Ohta, M. Nakakuki, K. Mizuguchi, M. Itoh, T. Suganami, and Y. Ogawa. Anti-obesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. **Diabetes** 59: 2495-2504, 2010.
2. T. Suganami and Y. Ogawa. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **J. Leukoc. Biol.** 88: 33-39, 2010.
3. N. Satoh, A. Shimatsu, A. Himeno, Y. Sasaki, H. Yamakage, K. Yamada, T. Suganami, and Y. Ogawa. Unbalanced M1/M2 phenotype of peripheral blood monocytes in obese diabetic patients: effect of pioglitazone. **Diabetes Care** 33: e7, 2010.
4. 伊藤美智子、菅波孝祥、小川佳宏 : 「NASH と慢性炎症」 *The Lipid* 21(3)247-251, 2010.
5. 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.
6. M. Itoh, T. Suganami, R. Hachiya, Y. Ogawa. Adipose tissue inflammation as homeostatic inflammation. *Int. J. Inflamm.* 2011: 720926, 2011.
7. 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. M. Itoh, T. Suganami, N. Nakagawa, M. Tanaka, Y. Yamamoto, Y. Kamei, Y. Ogawa: “Melanocortin-4

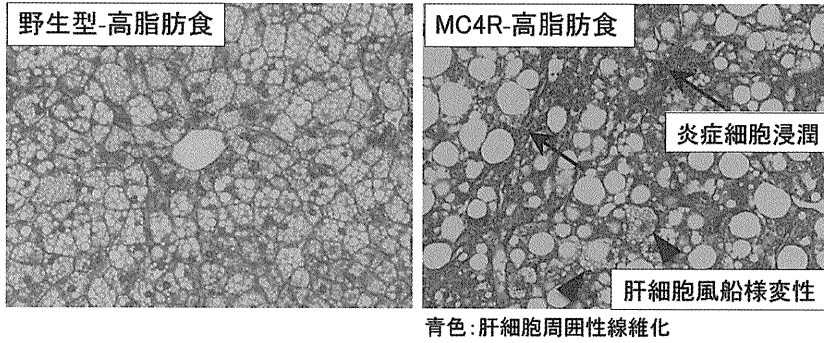
receptor-deficient mice as a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis.” Keystone symposia: Type 2 diabetes, insulin resistance and metabolic dysfunction and obesity. Keystone, Colorado, USA 2011.1.12-17

2. 小川佳宏 : 「肥満と慢性炎症」 : 第 31 回日本肥満学会, 2010.10.1-2, 群馬
3. 伊藤美智子、菅波孝祥、中川信貴、田中都、亀井康富、小川佳宏 : 「新しい NASH モデルとしての MC4R 欠損マウス」 : 日本肥満学会、前橋、2010.10.1-2
4. 小川佳宏 : 「メタボリックシンドロームと慢性炎症」 : 第 93 回日本消化器病学会中国支部例会, 2010.6.12, 山口
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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

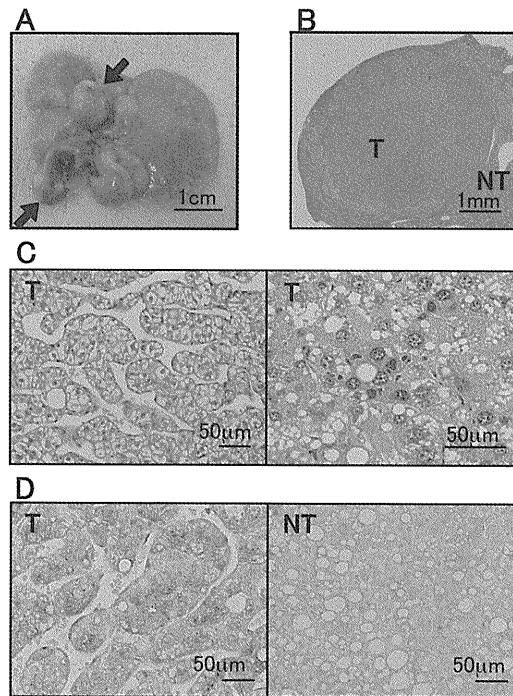
## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

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

Masson Trichrome染色

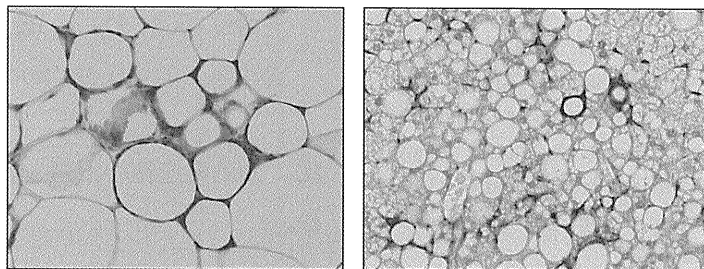


(図1) 高脂肪食20週間後の肝組織像

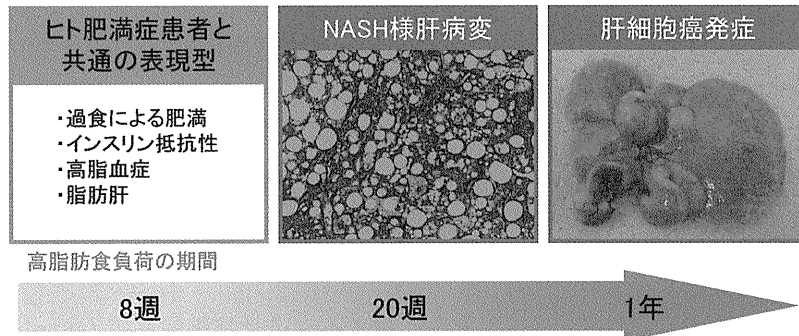


(図2) MC4R欠損マウスにおける肝癌発症

A 肉眼所見 矢印: 腫瘍形成  
 B, C HE染色 D  $\alpha$ -fetoprotein染色  
 T, tumor; NT, non-tumor



肥満脂肪組織における Crown-like structure (CLS) MC4R欠損マウスの肝臓におけるCLS様構造  
 (図3) 肥満脂肪組織とNASH様肝病変におけるF4/80染色



Am J Pathol 179: 2454-2463, 2011

(図4) MC4R欠損マウスを用いた新規NASHモデルの特徴

	負荷期間	体重増加	インスリン抵抗性	脂肪肝	肝線維化	発癌
肥満モデル						
<i>ob/ob</i>		+++	+++	++	—	—
<i>db/db</i>		+++	+++	++	—	—
食餌誘導性	> 1年	++	+	++	+	—
肝線維化モデル						
メチオニン	8-12週	↓	—	+	++	—
・コリン欠乏食						
四塩化炭素	4週	—	—	—	+++	—
肝特異的						
PTEN-KO		—	—	+	+	+
MAT1A-KO		—	—	+	+	+
MC4R-KO	20週	+++	++	+++	++	+

(図5) 既存のNASHモデルとの比較

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

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

研究分担者：河田純男 山形大学医学部消化器内科学 教授（現・兵庫県立西宮病院 院長）

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: ABMi）療法の有用性が報告されている。本研究の目的は、(1)アルコール性肝硬変に対するABMi療法の有効性を検討すること、(2)将来の臨床応用に資するヒト骨髄細胞の培養条件を探索すること、(3)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】 肝炎ウイルス慢性持続感染のないアルコール性肝硬変6例を対象とし、山口大学チームより技術サポートを得て、当大学医学部附属病院において、ABMi療法を施行した。ABMi療法施行後、禁酒が守られ24週間を経過した5症例について、肝機能改善効果、肝線維化マーカーの経過、等について、ABMi療法施行前後の24週間（計48週間）について検討した。患者背景の合致したアルコール性肝硬変5症例を対照（コントロール）とした。また移植前後に骨髄シンチを行い骨髄の活性化を評価した。得られたヒト骨髄細胞の初代培養および継代培養に適する条件を検討した。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）の共培養系を用いて、肝再生に係る相互作用を検討した。

【成績】 アルコール性肝硬変患者では、ABMi療法後、24週間の経過経過中、血清アルブミン値、総蛋白およびプロトロンビン活性の有意な改善が認められた。これらの肝機能検査値の有意な変動は、ABMi療法前の禁酒期間、対照群では全観察期間を通じて、認められなかった。血清線維化マーカーとして用いた4型コラーゲン7S値は、ABMi療法を施行した5例中4例で、低下が認められた。また治療前後で骨髄シンチを施行しえた4例中3例で、骨髄細胞の活性化が認められた。無血清状態でのヒト骨髄細胞初代培養の確立には現段階では至っていないが、更に改善検討を進めている。モデルで骨髄細胞と肝幹細胞は、FGF2、IGF2などの液性因子を介して肝再生に係る相互作用を有している可能性が示唆された。

【考案】 アルコール性肝硬変に対するABMi療法の臨床的有用性が、今回の症例対照研究により示された。更により効率性と有用性を向上させるための基礎的検討も必要である。

共同研究者

奥本和夫 山形大学医学部消化器内科学 助教

芳賀弘明 山形大学医学部消化器内科学 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。骨髄内にはmultipotent progenitor cellの存在が知られており、我々は、これまでの*in vitro*における研究において、ラット骨髄細胞(BMC)の肝様細胞への分化や増殖が可能であることを示してきた(J Hepatol 2005; 43: 110-116, J Gastroenterol 2006; 41: 62-69)。また、肝障害モデルでは、骨髄

細胞移植による肝再生ならびに線維化改善効果が確認されている。また、肝再生を目的とした肝硬変患者に対する自己骨髄細胞移植（Autologous Bone Marrow Cells Infusion: ABMi）療法が、主にC型肝炎ウイルスによる非代償性肝硬変患者に対して施行され、24週間の術後経過においてChild-Pugh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報告されている(Terai S et al. Stem Cell 2006)。我々は、肝炎ウイルス慢性持続感染のない、アル

アルコール性肝硬変症では、本療法の肝機能改善効果がウイルス性肝疾患よりも期待出来るものと考え、アルコール性肝硬変患者に対する ABMi 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た。ABMi 療法を施行された症例の 24 週間にわたる臨床データを集積し、アルコール性肝硬変に対する ABMi 療法の有効性について検討を行った。また、アルコール性肝障害には禁酒による臨床データの改善も見込まれるため、ABMi 療法による臨床効果を正確に評価する目的で、患者背景の合致したアルコール性肝硬変患者を対照として、症例対照研究を行った。また、本療法の将来的な発展を考えるうえで、少量の BMC を効率よく培養し増殖させる方法を確立することは重要である。そこで、本治療により得られたヒト BMC を用いて、臨床応用を目指し、Good Manufacturing Practice (GMP) グレードの製品を用いたヒト骨髄細胞培養法の確立に関する探索的研究を行った。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 ABMi 療法の発展を目指すうえで重要である。そこで、モデルを用い BMC と肝幹細胞の相互作用について検討した。

## B. 研究方法

### 1. アルコール性肝硬変に対する ABMi 療法

対象は、アルコール性肝硬変患者とし、肝生検にて肝硬変 (F4) が確認され、かつ、総ビリルビン値 3.0 mg/dl 未満、血小板数 50,000/ $\mu$ l 以上、画像検査で肝細胞癌がなく、腹水や脳症がコントロールされ心肺機能良好で全身麻酔が可能な患者、とした。また、ABMi 療法施行前に 6 か月間以上の禁酒を確認できた症例を適格とした。自己骨髄細胞は、全身麻酔下で 400ml の骨髄液を採取し、洗浄後に静脈内投与を行った。平成 22 年度までに 6 例 (男性) に施行した。ABMi 療法施行後の 24 週間の経過観察中に飲酒により脱落した 1 例を除外し、5 例を解析対象

とした。対照 (コントロール) として、年齢、性別、血清アルブミン値、プロトロンビン活性、服薬内容、等の合致するアルコール性肝硬変 5 症例を用いた。

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

### 2. ヒト骨髄細胞の培養

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

### 3. ラット骨髄細胞と肝幹細胞株の肝再生に係る相互作用の検討

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  $\mu$ 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。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. アルコール性肝硬変に対する ABMi 療法

#### (1) 肝機能検査値に及ぼす効果

血清アルブミン値、総蛋白およびプロトロンビン活性について、検討を行った。ABMi 療法施行群 (5 例) では、血清アルブミン値は、移植前 ( $3.3 \pm 0.2$  g/dl) に比し移植 24 週後 ( $3.8 \pm 0.2$  g/dl) ( $P < 0.05$ )、総蛋白は、移植前 ( $6.9 \pm 0.2$  g/dl) に比し移植 24 週後 ( $7.7 \pm 0.1$  g/dl) ( $P < 0.05$ )、プロトロンビン活性は、移植前 ( $76.6 \pm 6.1$  %) に比し移植 24 週後 ( $87.6 \pm 6.0$ %) ( $P < 0.01$ )、にそれぞれ有意な上昇が見られた。一方、対照群では、観察期間中に、これら検査値の有意な変動は認められなかった (図 1)。

#### (2) Child-Pugh スコアに及ぼす効果

Child-Pugh スコアは、移植前 ( $6.8 \pm 1.3$ ) に比し移植 24 週後 ( $5.8 \pm 0.8$ ) に低下が認められた。特に、Child-Pugh スコアが 7 点以上のクラス B に分類された 3 例では全例でスコアの低下が認められた (図 2)。

#### (3) 血清肝線維化マーカーに及ぼす効果

4 型コラーゲン 7 S 値は、5 例中 4 例で低下した。その血清レベルは、移植前 ( $10.0 \pm 3.9$  ng/ml) に比し移植 24 週後 ( $8.1 \pm 2.3$  ng/ml) に低下が認められた (図 3)。

#### (4) 移植前後における骨髓シンチの検討

indium-111-chloride (In) を用いた骨髓シンチにて、4 例中 3 例で、治療前に比し移植 1 週間には骨髓活性化が認められた。良好な In 増加を示した一例を図 4 に示す。

## 2. ヒト骨髓細胞の培養

ABMi 療法時に採取されたヒト BMC を用いて、各種培養条件を検討した。無血清培地として GMP グレードの培養培地を用いた初代培養 (a)、さらに GMP グレードの培養皿コーティングを加えた初代培養 (b)、コントロールとして血清培地と増殖因子 (D-MEM+10%FBS+bFGF) を用いた初代培養 (c)、を行った (図 5)。ヒト BMC の初代培養において、GMP グレードの無血清培地では、培養皿コーティングの使用により細胞接着は見られたが、細胞増殖にまでは至らなかった。有血清培地のコントロール培地では、良好な細胞増殖が認められた。コントロール培地で

得られた増殖細胞の継代培養では、これらの細胞は、培養コーティングの有無に関わらず無血清培地の条件下で継代培養が可能であった。

## 3. ラット骨髓細胞と肝幹細胞株の肝再生に係る相互作用の検討

細胞増殖能を WST-1 assay にて解析した結果、BMC と HSLC は、いずれも共培養において、単独培養に比し、細胞増殖の亢進が認められた。肝様細胞への分化を RT-PCR にて解析した結果、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。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

アルコール性肝硬変症例を対象として、ABMi 療法の効果についての検討を行った。本療法の有効性の検討に際しては、禁酒効果との比較も必要であるため、患者背景の合致する対照群を設定して、解析を行った。本臨床研究により、ABMi 後 24 週間にわたり、血清アルブミン値、総蛋白、プロトロンビン活性、等の肝機能改善効果が維持されることが示された。これらの改善は、禁酒のみでは見られないことから、ABMi 療法はアルコール性肝硬変患者の肝機能改善に有用であると思われる。Child-Pugh スコアについて、ABMi 療法を施行した 5 例において、前後のスコアを比較すると、2 例 (いずれもクラス A) が不変、3 例 (いずれもクラス B) が低下していたことから、ABMi 療法は Child-Pugh スコアの改善にも有用であることが示された。肝臓線維化マーカーは、前後において、ABMi 療法 5 例中 4 例に改善が認められた。また骨髓活性化が移植前後において、ABMi 療法 4 例中 3 例に認められた。したがって、ウイルス

持続感染の影響がないアルコール性肝硬変において、ABMi療法は、禁酒が守られた場合には良好な肝機能の持続的改善が得られ、良い適応であることが示された。しかしながら、症例により、その効果の発現程度には差異が見られる。その一因としてABMi療法により投与された自己骨髄細胞が、側副血行路により有効に肝に到達できない可能性が推測される。また、症例間で、肝臓内における接着因子等の発現程度の相違、肝障害の程度の差による増殖因子等の発現程度の相違、等が、ABMi療法の臨床効果に差異を生ずる原因となっている可能性もある。今後、自己骨髄細胞がアルコール性肝硬変患者の肝機能改善に関わる分子メカニズムについて、更に研究を進める必要があるものと思われた。

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

今回、我々が用いた2種類の細胞共培養系では、pore size 0.4 $\mu$ 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

アルコール性肝硬変における症例対照研究により、ABMi療法には、禁酒のみでは得られない、良好な肝機能改善効果（血清アルブミン、総蛋白、プロトロンビン活性）と肝線維化マーカー改善効果（4型コラーゲン7S）があることが示された。ABMi療法の効率性の向上と有効性の改善について、更なる検討を要する。

## 研究発表

### 1.論文発表

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

- Granulocyte and Monocyte Adsorptive Apheresis in Patients with Ulcerative Colitis. *Hepato-gastroenterol* 2009; 56: 348-351
- 4) Nishise S, Takeda Y, Nishise Y, Fujishima S, Orii T, Otake S, Sato T, Sasaki Y, Takeda H, Kawata S: Biological effect of anaphylatoxin C5a on the generation of anti-inflammatory substances in leukocyte adsorption. *Ther Apher Dial* 2009; 13: 509-514
  - 5) Fujishima S, Takeda H, Kawata S, Yamakawa M: The relationship between the expression of the glucocorticoid receptor in biopsied colonic mucosa and the glucocorticoid responsiveness of ulcerative colitis patients. *Clin Immunol* 2009; 133: 208-217
  - 6) Hattori E, Shu HJ, Saito T, Okumoto K, Haga H, Yokozawa J, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S: Expression of the RNA-binding protein Musashi1 in adult liver stem-like cells. *Hepato Res* 2010; 40: 432-437
  - 7) Sanjo M, Saito T, Ishii R, Nishise Y, Haga H, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Fukuda K, Imai Y, El-Shamy A, Deng L, Shoji I, Hotta H, Kawata S: Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2010; 82: 1364-1370
  - 8) Nishise Y, Saito T, Makino N, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Ikeda C, Kubota I, Daimon M, Kato T, Fukao A, Kawata S: Relationship between alcohol consumption and serum adiponectin levels: The Takahata Study - A cross-sectional study of a healthy Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 3828-3835
  - 9) Nishise S, Takeda Y, Fujishima S, Orii T, Sato T, Sasaki Y, Nishise Y, Takeda H, Kawata S: Release of interleukin 1 receptor antagonist by combining a leukocyte adsorption carrier with ulinastatin. *Ther Apher Dial* 2010; 14: 386-391
  - 10) Orii T, Takeda H, Kawata S, Maeda K, Yamakawa M: Differential immunophenotypic analysis of dendritic cell tumours. *J Clin Pathol*. 2010; 63:497-503
  - 11) 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
  - 12) 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
  - 13) 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) Saito T, Okumoto K, Haga H, Kawata S: Growth factors potentially influencing the differentiation and proliferation of hepatic stem cells in acute liver failure: serum levels in patients and functional analyses in vitro. Choshu International Liver Symposium 2009. Ube, February 14, 2009
  - 2) 芳賀弘明、齋藤貴史、奥本和夫、河田純男、他：増殖因子の急性肝疾患における血清動態および肝幹細胞への分化、増殖能の検討。第8回日本再生医療学会総会，東京：2009年3月
  - 3) 河田純男：肝幹細胞・再生・線維化、ハイライトレクチャー。第45回日本肝臓学会総会、神戸：2009年6月
  - 4) 奥本和夫、齋藤貴史、芳賀弘明、河田純男、他：C型肝疾患における血清bFGF濃度と肝癌予後に関する



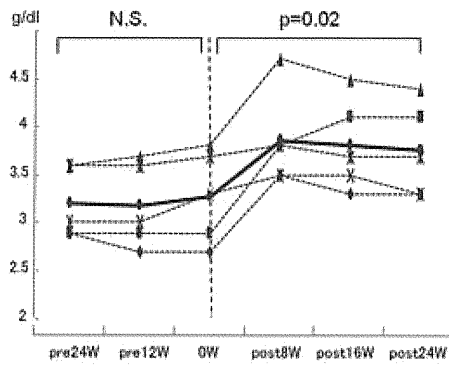
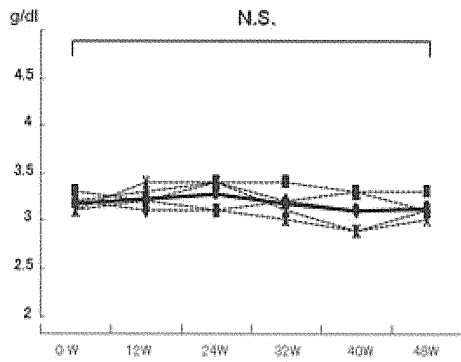
- る検討. 第 45 回日本肝臓学会総会、神戸：2009 年 6 月
- 5) 芳賀弘明、斎藤貴史、奥本和夫、河田純男、他：増殖因子の肝疾患における血清動態およびヒト間葉系幹細胞における分化の検討. 第 45 回日本肝臓学会総会、神戸：2009 年 6 月
- 6) 奥本和夫、斎藤貴史、芳賀弘明、河田純男、他：肝再生を目的とした骨髄細胞移植における増殖因子の検討. 第 16 回肝細胞研究会、山形：2009 年 6 月
- 7) 芳賀弘明、斎藤貴史、奥本和夫、河田純男、他：増殖因子の急性肝疾患での血清動態および肝幹細胞の分化、増殖能の検討. 第 16 回肝細胞研究会、山形：2009 年 6 月
- 8) Okumoto K, Saito T, Haga H, Ishii R, Sanjo M, Ito JI, Nishise Y, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S: The serum level of b-FGF in hepatitis C patients and its prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. 18<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week (UEGW2010), Barcelona, Spain ; October 2010
- 9) 奥本和夫、斎藤貴史、芳賀弘明、河田純男、他：骨髄細胞由来肝様細胞の樹立と移植による肝再生療法についての検討. 第 9 回日本再生医療学会総会、広島；2010 年 3 月
- 10) 奥本和夫、斎藤貴史、芳賀弘明、河田純男、他：肝再生における Stem Cell Factor (SCF) の役割についての検討. 第 46 回日本肝臓学会総会、山形；2010 年 5 月
- 11) 斎藤貴史、奥本和夫、河田純男：アルコール性肝硬変症に対する自己骨髄移植療法の有用性(ワークショップ:肝再生医学—臨床応用を目指した研究の新展開)、第 46 回日本肝臓学会総会、山形、2010 年 5 月
- 12) 芳賀弘明、斎藤貴史、奥本和夫、河田純男、他：F G F 2 の肝再生における役割についての検討. 第 46 回日本肝臓学会総会、山形、2010 年 5 月
- 13) 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 齊藤孝治 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
- 14) 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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

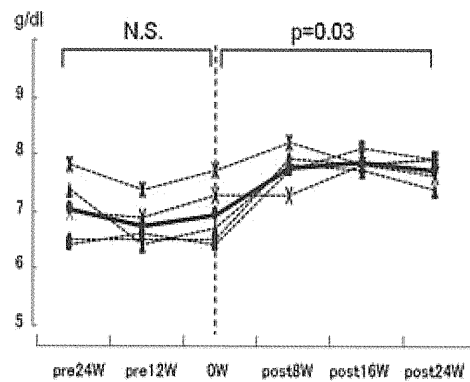
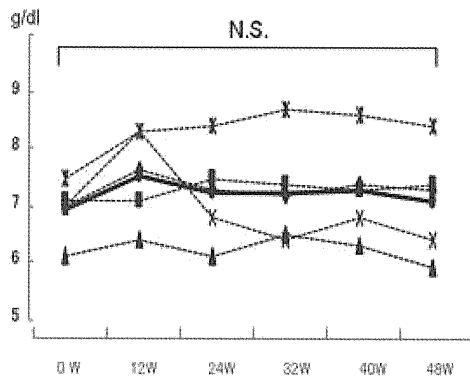
1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

図 1 肝機能検査値の変動

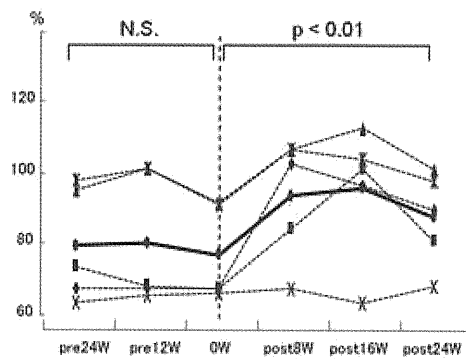
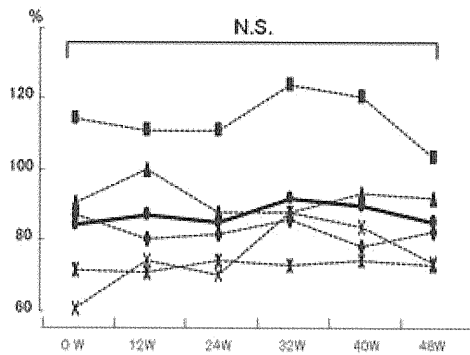
A Serum Albumin



B Total Protein



C Prothrombin Time



Controls

-◆- control 1    -■- control 2    -▲- control 3  
 -×- control 4    -▽- control 5    -●- average

ABMi cases

-◆- case 1    -■- case 2    -▲- case 3  
 -×- case 4    -▽- case 5    -●- average

図 2 Child-Pugh スコアの変化 (ABMi 症例)

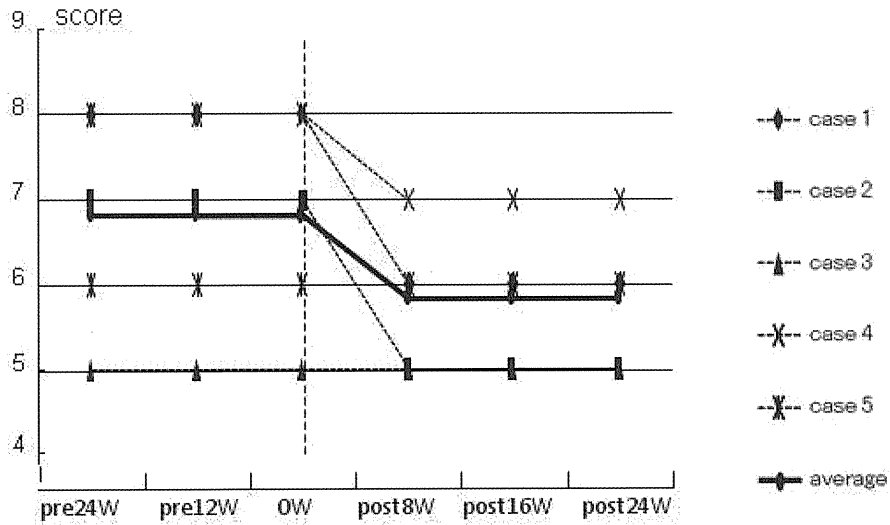


図 3 4型コラーゲン7Sの変化 (ABMi 症例)

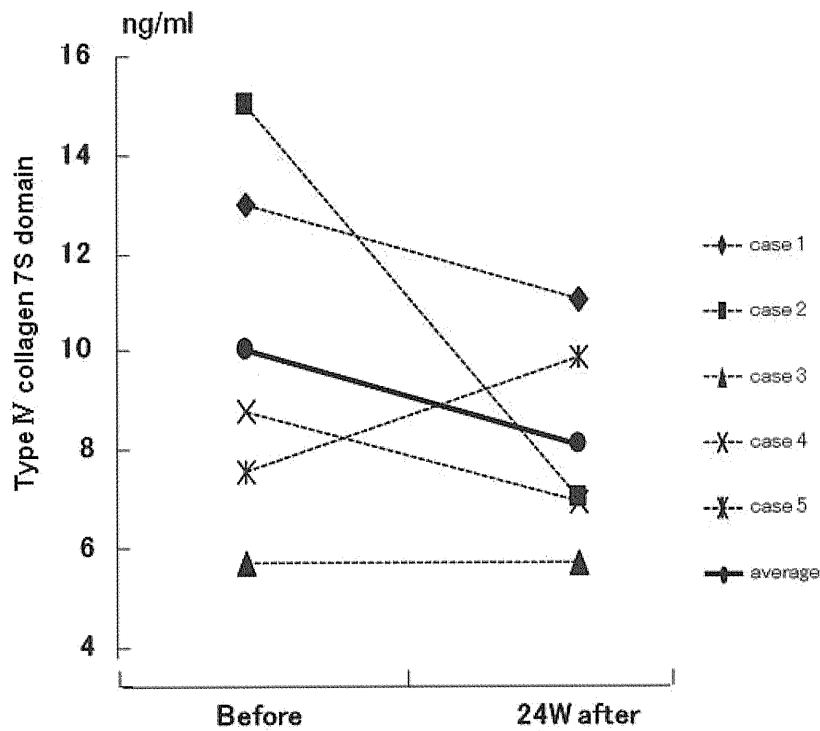


図 4 塩化インジウム ( $^{111}\text{In}$ ) を用いた骨髄シンチグラフィによる骨髄分布の変動

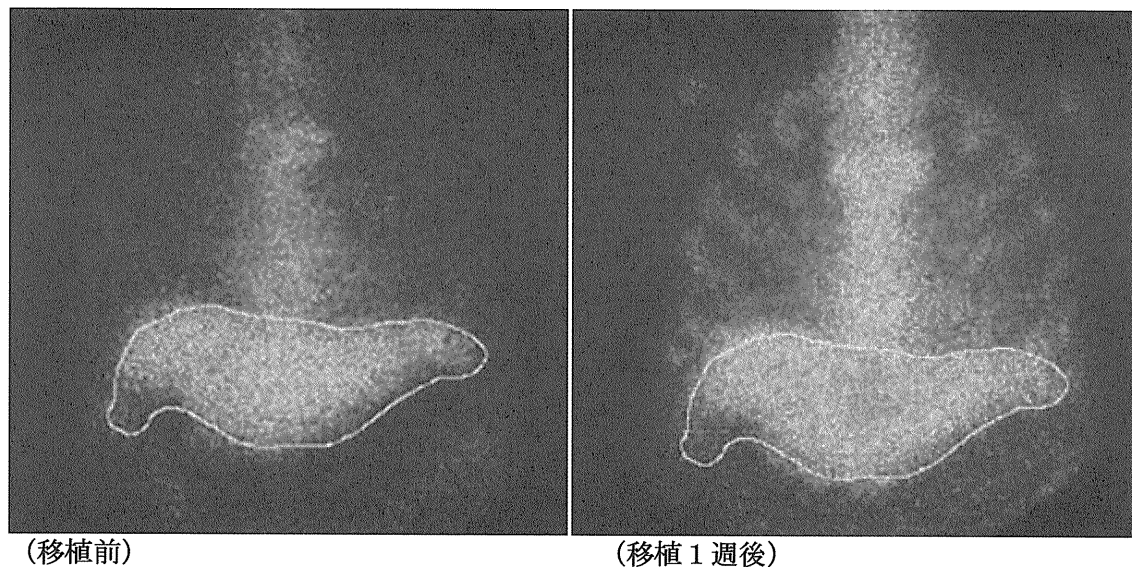
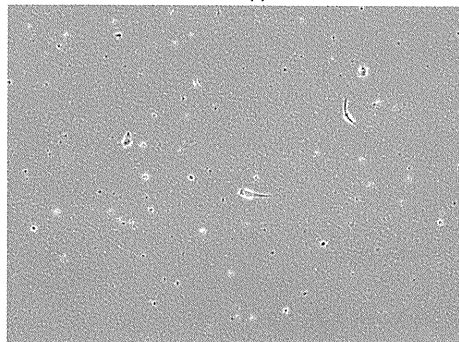
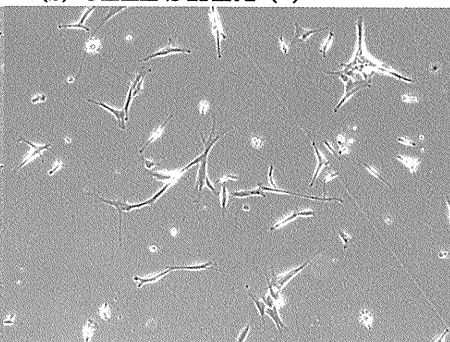


図 5 ヒト骨髄細胞の初代培養

(a) CELL START (-)



(b) CELL START (+)



(c) D-MEM+FBS+bFGF

