

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

「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 (ABM)]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。今回、末梢血単核球(PBMCs)中のHBV DNAとHCV RNAの定量系を確立した。さらにABM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】

信州大学附属病院通院中のB型肝炎患者6名、C型肝炎患者23名のPBMCsを用いてreal-time PCR法を行った。さらに、山口大学・山形大学附属病院においてABM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】

Real-time PCR法ではHBV DNAとHCV RNAともに1.7～5 log copies/10⁶PBMCsの定量域で測定可能であった。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

今回、血清・末梢血単核球(PBMCs)中のHBV DNAとHCV RNAの定量系を確立し、さらにABM療法の際に採取・保存された骨髄細胞を用い、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 (ABM)]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。

B.研究方法

信州大学医学部附属病院に通院中のB型肝炎患者6名、C型肝炎患者23名のPBMCsからそれぞれDNAとRNAを抽出してreal-time PCRを用いて定量を行った。さらに、山口大学医学部附属病院、山形大学医学部附属病院でABM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 と HCV RNA をそれぞれ定量した。

C. 研究結果

患者 PBMCs 中の肝炎ウイルスの定量: B 型および C 型肝炎患者から PBMCs を採取し、核酸を抽出した。ウイルス核酸の検出および定量は real-time PCR 法で行い、HBV DNA と HCV RNA ともに $1.7 \sim 5 \log \text{copies}/10^6 \text{PBMCs}$ の範囲で測定可能であった。

ABM i 療法で採取された骨髄細胞中の肝炎ウイルスの定量: 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 $1.8 \log \text{copies}/\text{mL}$ 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

今回の検討では、測定対象となる検体が細胞からの抽出液であり、特殊であったことから自前の real time 測定系を用いて HBV DNA と HCV RNA の測定を行った。検体量が少ないにもかかわらず、検出感度は市販の測定系と遜色ないこと、さらに、定量性や特異性にも優れていることはこれまでに報告しており、本検討の目的と合致していた。

15 例の ABM i 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 $1.7 \sim 5 \log \text{copies}/10^6 \text{PBMCs}$ 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

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

2. Yoneda S, Umemura T, Katsuyama Y, Kamijo A, Joshita S, Komatsu M, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Ota M, Tanaka E. Association of serum cytokine levels with treatment response to pegylated interferon and ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *J Infect Dis* in press

2. 学会発表

1) Yoneda S, Umemura T, Katsuyama Y, Kamijo A, Joshita S, Komatsu M, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Ota M, Tanaka E. Association of serum cytokine levels with treatment response to pegylated interferon and ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients. The 7th APASL Single Topic Conference Makuhari, Japan, December 17, 2010

- 2) 梅村武司、米田傑、松本晶博 C型慢性肝炎の PEG-IFN/RBV 併用療法におけるサイトカイン・ケモカイン測定の意義 第14回日本肝臓学会大会 横浜 平成22年10月14日
- 3) 梅村武司、清澤研道、田中榮司 de novo B型肝炎における HBV 遺伝子型および遺伝子変異と予後との関連 第46回日本肝臓学会総会 2009年5月27日 山形
- 4) Umemura T, Kiyosawa K, Tanaka E, and the Japan de novo hepatitis group. Clinical and virological features of patients with fulminant hepatic failure due to hepatitis B virus reactivation from HBsAg-negative status. EASL 2010, Vienna, Austria, 2010.4.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得

今回の研究内容についてはなし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

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

「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を投与し、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、移植細胞数、移植回数、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。

【成績】

マウスの肝硬変モデルに対して、皮下脂肪由来の間葉系細胞を静脈注射、経門脈、経脾臓、肝臓への直接注入を行った。培養せずに細胞を移植した場合には一部効果が見られたが、培養した細胞には明らかに肝硬変を改善する所見は得られなかった。静脈注射よりも脾臓を経由した方が肝臓に多くの細胞を集積できた。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。従来の肝臓細胞を分化誘導する方法にアクチビンを加えることによって、約2週間で脂肪由来の細胞を肝臓の細胞に分化できた。

【考案】

細胞を静脈注射すると大部分が肺にトラップされてしまう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。脾臓からの投与により肝臓に到達する細胞数は静脈注射よりも多かったことより、ヒトでは固有肝動脈からの細胞投与が有効ではないかと思われた。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できたと考えられる。

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、CO₂ 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、上清及び沈まなかった細胞を吸引した。

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 μ m 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。

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、細胞移植をしなかっ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 : 100 万個、150 万個、200 万個、300 万個
- 2) 移植回数 : 単回投与、毎週 1 回計 4 回
- 3) 移植経路 : 経尾静脈、脾臓内、経門脈、肝臓直接注入
- 4) 移植前に HGF (100ng/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。

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。

ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞からの肝細胞の分化誘導

まずP5からP10のヒト培養間葉系幹細胞を 20ng/mLのActivinAと 20 ng/mLのFGF4を加えたDMEMで3日間培養し、5 mg/mL transferrin, 10⁻⁶ mol/L, hydrocortisone-21- hemisuccinate, 0.5 mg/mL bovine serum albumin, 2 mmol/Lascorbic acid, 20 ng/mL epidermal growth factor, 5 mg/mL insulin, 50 mg/mL gentamicinを含む基礎培地に150 ng/mL のhepatocyte growth factor(HGF), 100 ng/mLの FGF1, 25 ng/mLの FGF4, 30 ng/mL のoncostatinM (OsM), 2x10⁻⁵ mol/Lのdexamethasone (Dex), 1 x insulin-transferrin-selenium (ITS), 0.05 mmol/L の nicotinamide, 0.1% DMSOを添加して10日間培養した。

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

培養しないで肝硬変モデルマウスに移植

脂肪組織から細胞を採取して、培養しないで細胞を移植した群では総ビリルビン値は対照群 (PBS) に比べて有意に低下がみられたが、AST, ALT, Alb, LDH, ALP には有意差がみら

れなかった。肝臓組織の組織染色標本を作製し、線維化の割合を Sirius red 染色にて比較したところ、細胞移植群で一部に線維化の改善が認められた。

培養した細胞を肝硬変モデルマウスに移植

脂肪由来の間葉系幹細胞を培養して、肝硬変モデルに尾静脈から投与する実験を行った。培養細胞は細胞のサイズが大きくなるため、50万個の細胞移植でも移植直後にマウスが死亡した。ヘパリンを同時投与することで150万個の培養した細胞を移植することができた。それ以上の細胞数を投与すると死亡率が上昇した。移植後4週間の採血並びに組織の検討を行ったが、対照群と比較して有意な差は得られていない。

投与経路の検討としてマウスを開腹し、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。脾臓内に細胞を注入すると静脈注射した場合よりも肝臓に多くの細胞が到達し、肺にはほとんど認められないことが判明した。

培養したヒト細胞を肝硬変モデルマウスに移植

SCID マウスにヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞 (P5-10) を150万個、尾静脈より移植した群では有意にALPの低下がみられた。AST, ALT, Alb, T-Bil, LDH には有意差がみられなかった。シリウスレッドによる線維組

織の染色面積を比較したが、細胞移植群において有意な線維化の改善を示す所見は得られていない。

肝細胞の短期間分化誘導法の開発

脂肪由来の細胞から肝細胞を分化誘導する従来の方法にアクチビンを新たに加えることによって、内胚葉系への分化が促進されることが転写因子の解析から示唆された。培養3日後より培養細胞の形態変化が認められ、実際にアルブミンの遺伝子発現を確認した。約2週間で脂肪由来の細胞からアルブミンを産生する肝臓の細胞に分化できることを見いだした。

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

培養をしていない細胞による移植実験では脂肪由来の細胞を移植した群において血液生化学的に一部改善が認められ、組織学的にわずかに抗線維化作用を認めたが、必ずしも満足できるレベルに達しているとはいえない。また培養した細胞では150万個を静脈注射するのが限界で、それ以上の投与は困難であった。移植直後には細胞は肺の毛細血管内存在していたが、7日後の肺にはほとんど移植細胞を検出できなかった。移植経路の検討ではマウスでは固有肝動脈からの投与は技術的に

不可能であり、門脈や直接肝臓への注入も行ったが、やはり技術的な問題が生じて、明らかな効果は認められなかった。細胞を静脈注射した場合には、細胞が肝臓の炎症部位に集積しやすいのではないかと考えたが、骨髄由来の細胞に比べて、脂肪組織由来の細胞はホーミング能力が低い可能性が示唆された。サイトカイン刺激によるホーミング能力の向上を期待したが、まだ改善の余地が多く残されている。

E. 結 論

肝硬変モデルマウスに対して培養していない新鮮な脂肪由来の細胞はある程度の効果が期待できるが、培養した細胞の場合は肝臓へのホーミングを高める工夫が必要になると思われる。

研究発表

1.論文発表

1. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol.* 24:70-7. 2009
2. Konno M, Hamazaki TS, Fukuda S, Tokuhara M, Uchiyama H, Okazawa H, Asashima M, Okochi H. Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture. **Biochem Biophys Res Commun.** 400:461-5, 2010
3. 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. Tokuhara M, Fukuda S, Konno M, Hamazaki TS, Okochi H. Omentum as a potential source of cell therapy for acute liver damage. Seventh annual meeting of IFATS, Oct15, Daegu, Korea 2009
2. 大河内仁志 教育講演 1 2 皮膚の再生医療：現状と展望 皮膚の幹細胞と再生医療 第109回日本皮膚科学会総会、4月、大阪、2010
3. 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。)

- 1.特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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

「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。本研究では、脂肪組織由来間質細胞による肝硬変に対する治療効果についての基礎的検討を行うことを目的とした。

【方法】脂肪組織由来間質細胞は、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、獲得した。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GFP陽性細胞の分布、生着日数を免疫染色にて検討した。肝硬変マウスモデルとしC57Bl/6 マウスに高脂肪動脈硬化食を投与し非アルコール性脂肪肝炎モデルを作成した。同モデルによる肝硬変状態に、経脾的に脂肪組織由来間質細胞を投与し、治療効果を検討した。

【成績】C57Bl/6 マウスに経脾経門脈投与したGFP発現脂肪組織由来間質細胞は、主に肝への分布集積を認め、一部肺への集積も認めた。経時的に生着を評価したところ、14日間生着が認められた。C57Bl/6 マウスに24週間高脂肪動脈硬化食を投与した場合、普通食投与マウスと比較して、肝実質細胞のAFP発現に差は認めなかったが、アルブミンの発現低下を認めた。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 1×10^5 個のGFPマウス脂肪組織由来間質細胞を経脾的に投与したところ、脂肪組織由来間質細胞投与後1週間において、AFP、アルブミン産生は、脂肪組織由来間質細胞によって、亢進傾向を認め、2週間においては、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】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、経脾的な脂肪組織由来間質細胞投与による治療効果が示唆された。今後、機序の解明を行う必要がある。

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。本研究では、肝硬変マウスモデルの確立、脂肪組織由来間質細胞の生体投与についての基礎的検討を行い、さらに、脂肪組織由来間質細胞による肝硬変に対する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。C57Bl/6 マウスに対して、Pentobarbital 麻酔下開腹のもと、 1×10^7 個あるいは 1×10^5 個のGFP発現脂肪組織由来間質細胞を経脾経門脈投与し、肝、肺、脾、腎への分布、また、肝内生着についての経時的評価を、免疫染色にて行った。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。投与24週間におけるマウスの脂肪組織を採取、肝実質細胞を分離、RNAを抽出し、リアルタイム定量PCRにて、 α -フェトプロテイン、アルブミンの産生を評価した。治療効果の検討として、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 1×10^5 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、 α -SMA 染色にて、星細胞の活性化状態を評価した。

C. 研究結果

C57Bl/6 マウスへ 1×10^7 個の GFP 発現脂肪組織由来間質細胞を経脾経門脈投与し、30 分後に肺、肝、脾、腎を摘出し、免疫染色にて GFP 陽性細胞の分布を検討したところ、投与部位の脾の他は、肝に主に集積し、肺にも分布を認めた。腎への集積は認められなかった。 1×10^5 個の GFP 発現脂肪組織由来間質細胞を経脾経門脈投与し、3 日後(n=2)、7 日後(n=3)、14 日後(n=2)まで肝組織における GFP 陽性細胞の有無を検討したところ、14 日まで肝内に GFP 陽性細胞が確認された。24 週間高脂肪動脈硬化食を投与した C57Bl/6 マウスの肝実質細胞は、普通食を投与したマウスの肝実質細胞と比較して、 α -フェトプロテインは同程度であったが、アルブミンの産生は、減弱していた。治療効果の検討においては、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、脂肪組織由来間質細胞によって、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、 α -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

経脾経門脈投与したマウス脂肪組織由来間質細胞は、主に肝組織に集積し 14 日間生着することが確認された。非アルコール性脂肪肝炎により

生じる肝硬変マウスモデルは、ヒト非アルコール性脂肪肝炎に類似した病理像を呈し、前臨床モデルに適していると考えられる。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た。これらより、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

本研究課題に関する発表なし

2.学会発表

本研究課題に関する発表なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1.特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

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
梅村武司、 田中榮司	B型急性肝炎 いわゆる de novo肝炎	林紀夫, 他3名	Annual Review 2009 消化器	中外医学 社	東京	2009	129-135

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
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
Segawa M, Sakaida I	Diagnosis and Treatment of portal hypertension.	Hepatology Research.	39	1039-1043	2009
Tanaka Y, Sakaida I, Mizokami M. 他24名	Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C.	Nature Genet.	41(10)	1105-1109	2009
Kiyotoki S, Nishikawa J, Sakaida I, 他4名	Use of the light-emitting diode-illuminated endoscope for upper gastrointestinal endoscopy.	Endoscopy	41	E173-174	2009
Ryozawa S, Iwamoto S, Sakaida I, 他3名	ERCP using double-balloon endoscopes in patient with Roux-en-Y anastomosis.	J Hepatobiliary Pancreat Surg	16(5)	613-617	2009
Kusakabe A, Sakaida I, Mizokami M, 他20名	Case-control study for the identification of virological factors associated with fulminant hepatitis B.	Hepatology Research.	39(7)	648-656	2009

Korenaga K, Korenaga M, Furukawa M, Yamasaki T, <u>Sakaida I.</u>	Usefulness of Sonazoid contrast-enhanced ultrasonography for hepatocellular carcinoma: comparison with pathological diagnosis and superparamagnetic iron oxide magnetic resonance images.	J Gastroenterol.	44(7)	733-741	2009
Terai S	Fish model leads to new findings in liver disease.	Hepatology Research.	40	111-113	2010
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	肝胆臓	59	525-535	2009
宮島篤	肝臓の発生分化機構	最新医学	64	1426-1455	2009
Chen Y-R, Sekine K, Nakamura K, Yanai H, Tanaka M, and Miyajima A.	YB-1 downregulates expression of carbamoyl phosphate synthetase 1 by suppressing C/EBPA function, leading to hyperammonemia.	Gastroenterology	137	330-340	2009
Itoh T, Kamiya Y, Okabe M, Tanaka M, and Miyajima A.	Inducible expression of Wnt genes during adult hepatic stem/progenitor cell response.	FEBS Letters	583	777-781	2009
Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, Suzuki K, Saito S, Kamiya Y, Tsujimura T, Nakamura K, and Miyajima A.	Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse livers.	Development	136	1951-1960	2009
Tanimizu N, Miyajima A, and Mostov K.	Liver Progenitor Cells Fold Up a Cell Monolayer into a Double-layered Structure during Tubular Morphogenesis.	Mol. Biol. Cell.	20	2486-2494	2009

Tanaka M, Okabe M, Suzuki K, Kamiya Y, Tsukahara Y, Saito S, and Miyajima A.	Mouse hepatoblasts at distinct developmental stages are characterized by expression of EpCAM and DLK1: drastic change of EpCAM expression during liver development.	Mech. Dev.	126	665-676	2009
Hirose Y, Itoh T, and Miyajima A.	Hedgehog signal activation coordinates proliferation and differentiation of fetal liver progenitor cells.	Exp. Cell Res.	315	2648-2657	2009
Miyaoka Y, Tanaka M, Imamura T, Takada S and Miyajima A.	A novel regulatory mechanism for FGF18 signaling involving cysteine-rich FGF receptor (Cfr) and Delta-like protein (Dlk).	Development	137	159-167	2010
Onitsuka I, Tanaka M, and Miyajima A	Characterization and functional analyses of hepatic mesothelial cells in mouse liver development.	Gastroenterology	138	1525-1535	2010
Ohata S, Nawa M, Kasama T, Yamasaki T, Sawanobori K, Hata S, Nakamura T, Asaoka Y, Watanabe T, Okamoto H, Hara T, Terai S, Sakaida I, Katada T, Nishina H	Hematopoiesis-dependent expression of CD44 in murine hepatic progenitor cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	379	817-823	2009
Nakamura T, Nishina H	Liver development: lessons from knockout mice and mutant fish.	Hepatol. Res.	39	633-644	2009

Matsumoto Y, Oota H, Asaoka Y, Nishina H, Watanabe K, Janusz M Bujnicki S, Oda S, Kawamura S, Mitani H	Medaka: a promising model animal for comparative population genomics.	BMC Research Notes	2	88	2009
Miyamura N, Hirayama J, Sawanobori K, Tamaru T, Asaoka Y, Honda R, Uno H, Yamamoto T, Takamatsu K, Nishina H	CLOCK: BMAL-independent circadian oscillation of zebrafish Cryptochrome 1a gene.	Biol. Pharm. Bull.	32	1183-1187	2009
Hirayama J, Miyamura N, Uchida Y, Asaoka Y, Honda R, Todo T, Sawanobori K, Yamamoto T, Sassone-Corsi P, Nishina H	Common light signaling pathways controlling DNA repair and circadian clock entrainment.	Cell Cycle	8	2794-27801	2009
Tanemura S, Momose H, Shimizu N, Kitagawa D, Seo J, Yamasaki T, Nakagawa K, Kajiho H, Penninger MJ, Katada T, Nishina H	Blockage by SP600125 of Fcε Receptor-induced degranulation and cytokine gene expression in mast cells is mediated through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway.	J. Biochem.	145	345-354	2009
Saito R, Yamasaki T, Nagai Y, Jinzhan Wu, Kajiho H, Yokoi T, Noda E, Nishina S, Niwa H, Azuma N, Katada T, Nishina H	CrxOS Maintains Self-Renewal Capacity of Murine Embryonic Stem Cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	390	1129-1135	2009

Shimizu N, Watanabe H, Kubota J, Jinzhan Wu, Saito R, Yokoi T, Era T, Iwatsubo T, Watanabe T, Nishina S, Azuma N, Katada T, Nishina H	Pax6-5a Promotes Neuronal Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells.	Biol. Pharm. Bull.	32	999-1003	2009
Yokozawa J, Sasaki T, Ohwada K, Sasaki Y, Itoh JI, Saito T, Kawata S	Down-regulation of hepatic stearyl-CoA desaturase 1 expression by angiotensin II receptor blocker in the obese <i>f a/fa</i> Zucker rat: possible role in amelioration of insulin resistance and hepatic steatosis	J Gastroenterol	44(6)	583-591	2009
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	58(8)	1067-1075	2009
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	56(90)	348-351	2009

Nishise S, Takeda Y, Nishise Y, Fujishim 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	13(6)	509-514	2009
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	133(2)	208-217	2009
Umemura T, Ichijo T, Yoshiz awa K, Tanaka E, Kiyosawa K.	Epidemiology of hep atocellular carcinom a in Japan	Journal of Gastroenterolog y	suppl 19	102-107	2009
坪内博仁、熊田博 光、清澤研道、持 田智、坂井田功、 田中榮司、梅村武 司、他26人	免疫抑制・科学療法に より発症するB型肝炎 対策—厚生労働省「難 治性の肝・胆道型疾患 に関する調査研究」班 劇症肝炎分科会および 「肝硬変を含めたウイ ルス肝疾患の治療の標 準化に関する研究」班 合同報告—	肝臓	50	38-42	2009
Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T.	Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure	J Gastroenterol Hepatol	24	70-77	2009

Annual Review 消化器 2009

2009年1月30日 発行

中外医学社

5. B型急性肝炎といわゆる de novo 肝炎

信州大学医学部消化器内科 梅村武司

同 教授 田中榮司

key words acute hepatitis B, hepatitis B virus, reactivation, lamivudine, chemotherapy, resolved infection

動 向

B型急性肝炎は、本邦では母子感染予防や血液製剤におけるスクリーニングの進歩により全体の発症数は減少している。しかし、散発性B型急性肝炎は徐々に増加傾向にあることがわかっている。その特徴について感染経路、B型肝炎の遺伝子型から検討がされている。

一方、最近ではB型肝炎の既感染者（HBs抗原陰性、HBc抗体もしくはHBs抗体陽性）において化学療法中・後にB型肝炎ウイルス（HBV）の再活性化が起り、肝炎を発症するde novo肝炎の報告が増加している。これは、悪性腫瘍の治療法が進歩し、より強力な化学療法が行われるようになったことが一因となっている。De novo肝炎の中には劇症化して死亡する予後不良な症例が含まれている。最近の研究ではde novo肝炎の発症リスクの高い群が明らかになってきた。しかし、de novo肝炎の予防・治療に関するガイドラインはこれまでに世界中で作成されていない。本邦では2008年度に厚生労働省研究班から免疫抑制・化学療法により発症するB型肝炎に対するガイドライン案が作成されており、今後この検討が行われる予定である。

A. B型急性肝炎

B型急性肝炎はB型肝炎ウイルス（HBV）の初感染によって起こる。母子感染や輸血後肝炎は着実に減少しているが、成人の水平感染による散発性B型急性肝炎の発症率は徐々に増加傾向にある。Sugauchiらによる多施設共同研究では1982年から2005年に発症した本邦485例のB型急性肝炎の感染経路の検討では肝炎発症の45%は性行為が原因とされている¹⁾。同じ患者群でOzasaらが遺伝子型分布の検討を行っている²⁾。本邦のB型急性肝炎では遺伝子型Cを68%と最も多く認め、次いで遺伝子型A: 19%, B: 12%の順である。これは慢性肝炎の遺伝子型の分布とは異なり、Aの割合が高率である。本邦のB型急性肝炎における遺伝子型Aは1996年以降に増加し、若年における割合と慢性化する割合が高いという特徴がある。さらに、遺伝子型Bjに感染していると劇症化率が高いことが判明した。最近では海外でしか報告のなかった遺伝子型HによるB型急性肝炎の報告が本邦でも相次いだ³⁻⁵⁾。それぞれの遺伝子型によって予後や治療効果の違いが異なるため臨床像を把握した対応が必要とされる。

B型急性肝炎における基礎研究でもいくつかの

興味深い報告が発表されている。programmed death 1 (PD-1) は CD28 costimulatory receptor family の 1 つであり、この発現は HBV も含めた慢性ウイルス感染におけるウイルス特異的 CD8⁺T 細胞の反応を低下させることが報告されている。B 型急性肝炎では血液中の HBV 特異的 CD8⁺T 細胞における PD-1 の発現は高値でありウイルス消失とともに減少するが劇症肝不全に進行した症例では発現が持続しており、PD-1 の発現パターンが臨床結果と関連があることが報告された⁶⁾。さらに、ビリルビン代謝に重要な役割を果たす heme oxygenase-1 は肝臓保護作用に加えて HBV 感染において明らかな抗ウイルス作用を示すことが動物モデルで明らかにされた⁷⁾。

インドから B 型急性肝炎患者における lamivudine のコントロール研究が報告された⁸⁾。B 型急性肝炎患者で 3 か月間 lamivudine を内服した群とプラセボ群を比較すると最初の 4 週での HBV DNA の減少は lamivudine 群で有意に認められたが、肝機能の改善、HBs 抗原の消失率は治療群とプラセボ群の間で有意差は認めなかった。症例数が少ないことと遺伝子型の検討などがされておらず本邦では今後の検討が必要である。

B. De novo 肝炎について

最近では、医療の進歩により、より強力な抗腫瘍薬、免疫抑制薬が次々と開発されており、悪性腫瘍、膠原病、移植患者においてこれらの薬剤を使用中・後に B 型肝炎ウイルス (HBV) が再活性化する症例が増加している。一般的に HBV の再活性化は大きく 2 つに分けることができ、HBs 抗原陽性である HBV キャリアの患者群から、もう 1 つは HBs 抗原陰性で HBe 抗体もしくは HBs 抗体が陽性の HBV 既感染者群からの再活性化である。後者の場合を de novo 肝炎と称している。HBV キャリアでは化学療法前の lamivudine 投与

の有効性が報告されているが⁹⁾、de novo 肝炎については病態についても不明なことが多かった。

HBs 抗原陰性・HBe 抗体陽性者は以前までは臨床的に治癒と判断されていた人々で本邦では約 20% 存在するとされている。通常 HBV に感染した後は非特異的な自然免疫に引き続き、ウイルス特異的な免疫反応が起こる。この時は細胞障害性 T 細胞 (CTL) による細胞性免疫が重要な役割を果たしている。細胞性免疫は急性肝炎罹後、年単位で継続するため肝臓内では感染性のあるウイルスの産生が持続するが、CTL の働きのため血液中へのウイルスの放出は極めて少量に抑えられている。これは HBs 抗原陰性で既感染とされる状態である。よって HBV 特異的 CTL が HBV の増殖をコントロールできないような状態になると HBV DNA が急速に増えて、肝炎が再燃する。免疫抑制薬の投与などにより生じる状態が de novo B 型肝炎である。最近悪性リンパ腫の治療に抗 CD20 抗体である rituximab が用いられるようになって de novo 肝炎の発症が高頻度になり一躍注目を浴びることとなった。Rituximab は悪性リンパ腫の治療効果を劇的に改善したが B 細胞の減少が起こるため、様々なウイルスなどの再活性化の報告がなされるようになった。Rituximab の使用によって de novo B 型肝炎が発症した症例が 2001 年に初めて発表された¹⁰⁾。その後は表 1 のように rituximab 使用後に de novo B 型肝炎を発症した症例の報告例は 7 例であり¹¹⁻¹⁵⁾、死亡率も 7 例中 4 例 (57%) と高率であった。

2006 年には香港の Hui らが悪性リンパ腫の治療を行う HBs 抗原陰性者 244 名について前向きコホートで de novo B 型肝炎、劇症肝不全の発症率、危険因子などについて詳細な検討を行った¹⁶⁾。244 例中 8 例 (3.3%) で de novo B 型肝炎を発症しており、そのうち、3 例で劇症肝不全を発症し 1 例が死亡した。De novo B 型肝炎の発症の危険因子は rituximab とステロイドの併用療法であっ

表1 HBs抗原陰性者においてRituximabを含む化学療法後にde novo B型肝炎を発症した症例

No.	年齢/性	疾患	HbC/HBsAb	Peak ALT	治療	予後
1	73/M	FL	-/+	1230	Supportive	HBsAg+
2	80/M	DLC	ND/+	101	Supportive	治癒
3	55/M	DLC	ND/+	84	Supportive	治癒
4	73/M	DLC	-/+	—	Lamivudine	死亡
5	53/M	CLL	+/+	2120	Lamivudine	死亡
6	67/M	NHL	-/+	2240	Lamivudine	死亡
7	59/M	NHL	+/+	359	Lamivudine	死亡

DLC; diffuse large cell lymphoma, FL; follicular lymphoma, CLL; chronic lymphocytic leukemia, NHL; non-Hodgkin's lymphoma.
ND: not detected

た。さらに、de novo B型肝炎を発症した患者は有意に劇症肝不全を引き起こし、唯一の危険因子であった。Huiらはde novo肝炎の患者を詳細に検討した結果臨床経過を図1に示すようにまとめた。化学療法終了後まずHBV DNAの増殖が起これ、それから中央値で10週後にHBs抗原が陽転化する。それから中央値8週後になると初めてALT値が上昇をしてきていわゆる肝炎の再燃状態になる。よって、HBV DNA量の増加を注意深く経過観察し、化学療法開始前の100倍に増加したら核酸アナログの内服を開始したらどうかという提案をしている。一方、LiuらはTaqMan PCR

で毎月HBV DNAを測定するより、核酸アナログを予防的に内服させた方が費用の面で効果的ではないかと反論しているが検証はされていない¹⁷⁾。

実際の臨床の間ではHBs抗原陰性者に対してHBV DNA量を化学療法前・中・後に測定することは保険制度上認められておらず、予防的に核酸アナログ薬を使用することも同様である。本邦ではde novo B型肝炎発症の臨床データがなかったため平成17・18年度の厚生労働省研究班熊田博光班長の指導のもと全国調査を行った¹⁸⁾。平成12～16年の5年間に新たにHBs抗原陽性になった患者についてアンケート調査を行い、最終

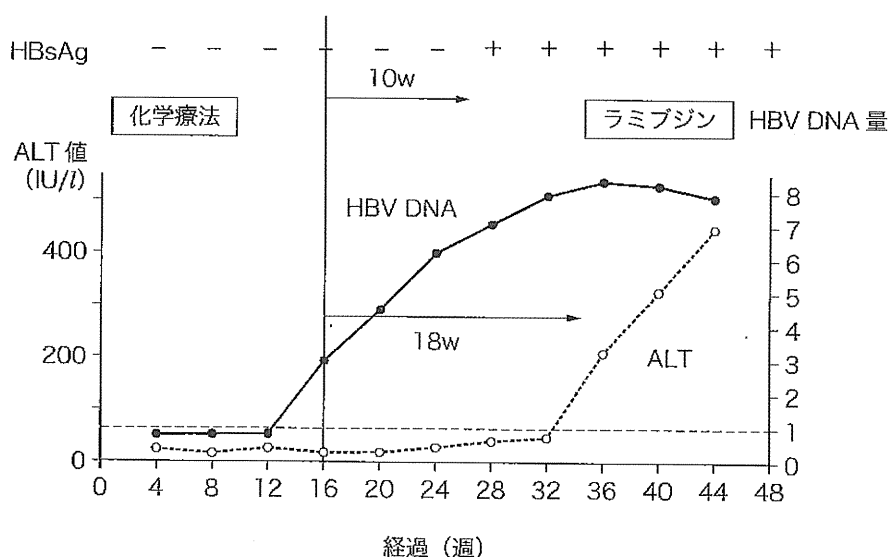


図1 De novo B型肝炎の発症パターン

的には552例について検討を行ったのでそのデータを紹介します¹⁹⁾。552例中96%はB型急性肝炎で、残りの4% (23例) はde novo B型肝炎であった。De novo 肝炎と急性肝炎の臨床像の比較ではde novo肝炎は有意に高齢、ALT値とアルブミン値は低値、HBV DNA量が高値であることが判明した (表2)。遺伝子型はde novo肝炎では遺伝子型Aは1例も認めず、遺伝子型Bの割合が急性肝炎群より高率であった。劇症肝不全となった割合はde novo肝炎では23例中5例

(22%) であり、急性肝炎の529例中45例 (9%) より高率であった (図2)。さらに、劇症肝不全となったde novo肝炎では全例死亡しており (図2)、de novo型肝炎から劇症化すると救命は非常に困難であることが明らかとなった。劇症化した症例は全例de novo肝炎発症後に lamivudineの内服を開始していたが劇症化を抑制することはできなかった。5例と症例数は少ないが、劇症化症例は全例非ホジキンリンパ腫でrituximab投与されており香港の報告と同じである。基礎疾患に悪

表2 De novo B型肝炎と急性B型肝炎の比較

	de novo (n = 23)	急性肝炎 (n = 529)	p value
年齢	63	33	< 0.001
男性	59%	71%	> 0.2
肝機能検査			
ALT (IU/l)	929	2300	< 0.001
T Bil (mg/dl)	10.3	6.4	0.12
Alb (g/dl)	3.2	3.6	< 0.001
PT (%)	65.0	75.0	> 0.2
HBV DNA (log copies/ml)	7.5	5.5	< 0.001
HBV genotype	(n = 19)	(n = 232)	
A	0%	25%	0.003
B	42%	12%	< 0.001
C	58%	63%	> 0.2

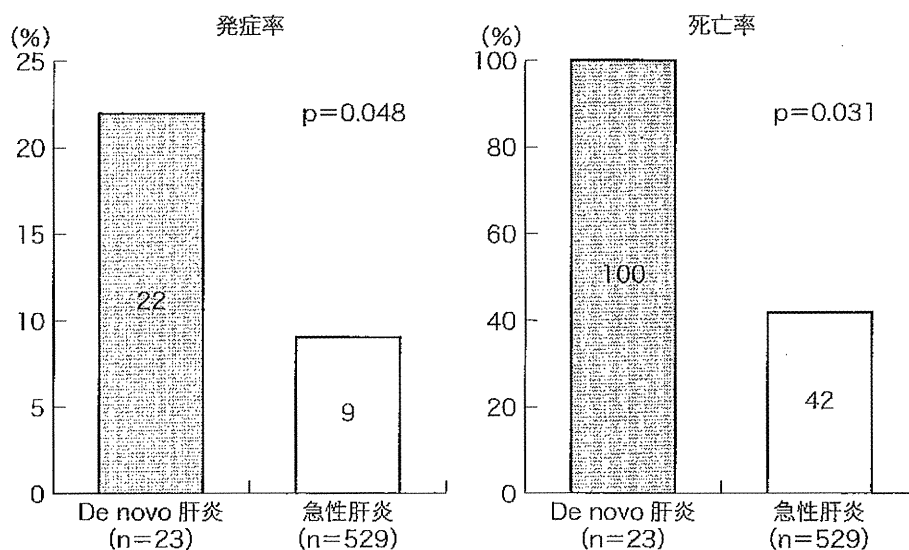


図2 劇症肝不全の患者の発症率と死亡率