

より誘導されるマウスの肝線維化や、高脂肪・高コレステロール食投与により誘導されるマウスの肝線維化、さらには慢性肝炎・肝硬変患者で認められるヒトの肝線維化でも同様に関与しているか検討した。

次に、肝細胞特異的にCTGFを欠損するマウス(*Alb-Cre CTGF^{flx/flx}*)、もしくはpolyI:C誘導性に肝細胞及び肝非実質細胞でCTGFを欠損するマウス(*MX1-Cre CTGF^{flx/flx}*)を作成した。これらのマウスにBDLを施行して、肝組織中のCTGFおよび線維化関連遺伝子発現、線維化の程度を検討した。

(倫理面への配慮)

臨床検体を用いた実験は、インフォームドコンセントを得た上で行った。

組み替え遺伝子を用いた実験は、大阪大学遺伝子組み換え安全委員会の承認のもとで行った。また、すべての動物実験は、大阪大学医学部動物実験委員会承認のもとで、愛護的に行った。

C. 研究成果

肝線維化を認める肝細胞特異的なP53活性化マウスとコントロールマウスの肝組織を用いて、マイクロアレイ発現解析を行った結果、P53活性化マウスでCTGFの著明な発現亢進を認めた。このCTGFは、BDL施行により誘導される肝線維化を伴ったマウス肝組織でも著明な上昇を認め、高脂肪・高コレステロール食投与により誘導される肝線維化をと伴ったマウスでも上昇を認めた。さらに臨床検体を用いた検討で、慢性肝炎・肝硬変患者の肝組織では線維化の程度に比例してCTGFの発現増強を認めた。

次に肝線維化における、CTGFの役割を検討するために、肝細胞特異的にCTGFを欠損

するマウス、polyI:C誘導性に肝細胞及び肝非実質細胞でCTGFを欠損するマウスを作成した。肝細胞特異的CTGF欠損マウスにBDLを施行したところ、コントロールマウスと同程度に肝臓中のCTGFの遺伝子発現の上昇を認めた。一方、polyI:C誘導性に肝細胞及び肝非実質細胞でCTGFを欠損するマウスにおいては、BDLによるCTGFの上昇はコントロールマウスと比較し有意に抑制された。また、polyI:C誘導性CTGF欠損マウスにおいて、BDL後に認められる肝臓中のコラーゲンの遺伝子発現上昇がコントロールマウスと比較し著明に抑制された。シリウスレッド染色により評価される肝線維化の程度も有意に改善された。

D. 考察 E. 結論

今回の結果より、肝線維化の進展にはCTGFの産生が深く関わっていると考えられた。肝細胞特異的CTGF欠損マウスでは線維化刺激後もCTGFの産生は抑制されなかった一方で、肝細胞及び肝非実質細胞でCTGFを欠損するマウスでは線維化刺激後のCTGF産生が著明に抑制されたことから、線維化刺激後のCTGF産生細胞は主に非実質細胞であることが示唆された。さらに、肝細胞及び肝非実質細胞でCTGFを欠損するマウスにおいては線維化が軽度であったことより、CTGFが肝線維化を増悪させることが示唆された。今後CTGFの治療標的としてとしての可能性が期待できる。

研究発表

1. 論文発表

1. Hikita H, Kodama T, Shimizu S, Li W, Shigekawa M, Tanaka S, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Morii E, Hayashi N, Takehara T. (2012) Bak

deficiency inhibits liver carcinogenesis: a causal link between apoptosis and carcinogenesis. *J Hepatol.* 57: 92-100.

2. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Fujita N, Yoshimori T, Hayashi N. (2012) Inhibition of autophagy potentiates the anti-tumor effect of the multi-kinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 131: 548-557.

2. 学会発表

1. Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Tanaka, Yoshinobu Saito, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Wei Li, Takuya Miyagi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. (2012) Oxidative stresses play a major role in cancer development in apoptosis-prone liver. **第 71 回日本癌学会学術総会.** 札幌, 9 月 19 - 21 日. (oral presentation)
2. 疋田隼人, 巽智秀, 竹原徹郎. (2012) 肝細胞障害が誘導する酸化ストレスと肝発癌. **第 54 回日本消化器病学会総会.** 神戸, 10 月 10 - 12 日. (oral presentation)
3. 小玉尚宏, 疋田隼人, 竹原徹郎. (2012) 血小板減少は肝線維化の増悪因子である. **第 54 回日本消化器病学会総会.** 神戸, 10 月 10 - 12 日. (oral presentation)
4. Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Tanaka, Yoshinobu Saito, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Wei Li, Takuya Miyagi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. (2012)

Oxidative stresses play a major role in cancer development in apoptosis-prone liver. **The 63rd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease.** Boston, USA, November 8 - 12. (oral presentation)

5. Takahiro Kodama, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Hinako Tsunematsu, Kumiko Nishio, Takatoshi Nawa, Minoru Shigekawa, Satoshi Shimizu, Wei Li, Takuya Miyagi, Atsushi Hosui, Tomohide Tatsumi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara. (2012) Bid and Bim are essential regulators involving the intrinsic pathway of apoptosis in hepatocytes in the absence of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. **The 63rd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease.** Boston, USA, November 8 - 12. (oral presentation)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

「質量顕微鏡法による再生肝リン脂質動態の網羅的解析」

研究分担者氏名：仁科 博史

所属機関：東京医科歯科大学 難治疾患研究所 職名：教授

研究要旨：

【目的】肝患者から採取可能な微量サンプルを用いた新たな検査法の開発と、線維化改善(抗線維化)と肝再生・修復時に変化する低分子マーカーの同定が求められている。次世代ライスサイエンス技術として注目されている「質量顕微鏡法」を用いて、モデル生物再生肝および病態肝におけるリン脂質動態の網羅的解析を目的に研究を遂行する。

【方法】マウス70%部分切除を行い、1-2日後に誘導される脂肪肝から切片を調製し、質量顕微鏡を用いて、分子量1000以下の低分子を網羅的に解析し、このうちリン脂質については可視化の処理を行った。また、短時間でヒト肝病態を発症する新規動物モデルの開発を行った。

【成績】従来の分析方法である薄層クロマトグラフィー(TLC)では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)で存在することもマウス再生肝で明らかにすることができた。また、肝細胞がんを効率よく発症するマウスモデルの作出に成功した。

【考案】質量顕微鏡は、肝臓由来の微量切片から、低分子量の脂質を位置情報を保ちながら網羅的に解析可能な検査法であることが判明した。また、新たに開発した肝細胞がんモデルを取り入れることで、肝病態とリン脂質動態との関連を解明できる環境が整った。様々な肝病態に対応する分子マーカーの同定が期待される。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

マウス70%部分切除を行い、1-2日後に誘導される脂肪肝から切片を調製し、マトリックスを塗布した後、質量顕微鏡を用いて、分子量1000以下の低分子を網羅的に解析した。このうちTGとPCについては可視化の処理を行い、位置情報を含んだ定量解析を行った。PC

も同様に解析した。病態肝を扱うために短時間で効率よく肝病態を発症する新規モデルの開発を行った。

C. 研究結果

従来の分析方法である薄層クロマトグラフィー(TLC)では単一バンドとしてしか捉えることができなかったトリグリセリド(TG)が質量分析の結果、多種類から構成されていることが明らかとなった。また、TLCでは変化を検出できなかった多種類のリン脂質(PC)がダイナミックに増減していること、いくつかのリン脂質は肝臓小葉構造に沿って濃度勾配(zonation)で存在することも明らかにすることができた。また、ほぼ100%の確率で肝細胞がんを発症する新規モデルの作出に成功した。

D. 考 察

質量顕微鏡は、肝臓由来の微量切片から、低分子量の脂質を位置情報を保ちながら網羅的に解析可能な検査法であることが判明した。また、肝臓には多種類の TG や PC が存在し、固有の挙動を示すことから、それぞれが固有の生理機能を有している可能性が示唆された。この特性を検討することで、様々な肝病態に対応する分子マーカーとなることが期待される。また、新規モデルは効率よく肝細胞がんを発症することから、質量顕微鏡を用いた解析対象としてうまく機能すると考えられる。

E. 結 論

質量顕微鏡は、低分子量の脂質を位置情報を保ちながら網羅的に解析できる有効な解析方法であることが判明した。また、肝臓には多種類の TG や PC が存在し、固有の挙動を示すことから、様々な肝臓の状況に対応する分子マーカーの単離が期待される。新たに開発されたモデルを併用し、肝病態と相関する低分子の同定が期待される。

研究発表

1.論文発表

1. Shoji Hata, Jun Hirayama, Hiroaki Kajihō, Kentaro Nakagawa, Yutaka Hata, Toshiaki Katada, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina (2012) A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to SN2 alkylating agents. *J. Biol. Chem.* 287, 22089-22098.
2. 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.* 287, 8318-8326.
3. 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.
4. Miki Nishio, Koichi Hamada, Kohichi Kawahara, Masato Sasaki, Fumihito Noguchi, Shuhei Chiba, Kensaku Mizuno, Satoshi O. Suzuki, Youyi Dong, Masaaki Tokuda, Takumi Morikawa, Hiroki Hikasa, Jonathan Eggenschwiler, Norikazu Yabuta, Hiroshi Nojima, Kentaro Nakagawa, Yutaka Hata, Hiroshi Nishina, Koshi Mimori, Masaki Mori, Takehiko Sasaki, Tak W. Mak, Toru Nakano, Satoshi Itami, and Akira Suzuki (2012) Cancer Susceptibility and embryonic lethality in Mob1A/1B double mutant mice. *J. Clin. Invest.* 122(12):4505-4518.
5. Tadashi Yokoi, Yuko Seko, Tae Yokoi, Hatsune Makino, Shin Hatou, Masakazu Yamada, Tohru Kiyono, Akihiro Umezawa, Hiroshi Nishina, Noriyuki Azuma (2012) Establishment of Functioning Human Corneal Endothelial Cell Line with High Growth Potential. *PLoS ONE* 7(1):e29677
6. Ken Okada, Akihide Kamiya, Keiichi Ito, Ayaka Yanagida, Hidenori Ito, Hiroki Kondou, Hiroshi Nishina and Hiromitsu Nakauchi

- (2012) Prospective isolation and characterization of bipotent progenitor cells in early mouse liver development. *Stem Cells and Development* 21, 1124-1133.
7. Shoji Hata and Hiroshi Nishina (2012) [Letters to the Editor] Reply to Sun et al.: Targeting YAP acetylation in cancer. *J. Biol. Chem.* 287, 35443.
 8. Tokiwa Yamasaki, Hiroshi Kawasaki and Hiroshi Nishina (2012) [review] Diverse roles of JNK and MKK pathways in the brain. *J. Signal Trans.* 2012: 459265.
 9. Hiroshi Nishina (2012) [commentary] hDlk-1: A cell surface marker common to normal hepatic stem/progenitor cells and carcinomas. *J. Biochem.* 152, 121-123.
- 2.学会発表
1. Hiroshi Nishina; A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to S_N2 alkylating agents [2012 FASEB Science Research Conference, Aspen, USA, July 2012]
 2. Tokiwa Yamasaki and Hiroshi Nishina; Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex [Neuroscience 2012, SfN's 42nd annual meeting, New Orleans, USA, Oct 2012]
 3. Shoji Hata and Hiroshi Nishina; A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to S_N2 alkylating agents [International Symposium on GENETIC AND EPIGENETIC CONTROL OF CELL FATE, Kyoto, Japan, November 2012]
 4. Hiroshi Nishina; Liver Formation and Disease: Lessons from Fish and Mouse [4th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Taipei, Taiwan, November 2012]
国内学会発表
 1. 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]
 2. 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]
 3. 仁科博史 ;モデル生物を用いた器官形成機構の解明[山口大学医学部セミナー;2012 年 1 月/宇部]
 4. 岩月麻美子他 ; 神経組織特異的 Mkk7 欠損マウスの解析[第 132 回日本薬学会 ; 2012 年 3 月/札幌]
 5. 畠星治、仁科博史 ; がん遺伝子産物 YAP の新規翻訳後修飾アセチル化の同定 [第 16 回日本肝臓医生物学研究会 ; 2012 年 3 月/熱海]
 6. 宮村憲央、仁科博史 ; がん遺伝子 YAP による肝細胞がんの発症機構の解明 [第 16 回日本肝臓医生物学研究会 ; 2012 年 3 月/熱海]
 7. 仁科博史 ; 質量顕微鏡法[第 55 回日本腎臓学会学術総会;2012 年 6 月/横浜]
 8. 畠星治他 ; がん遺伝子産物 YAP の新規翻訳後修飾アセチル化の同定 [第 19 回肝細胞研究会 ; 2012 年 6 月/札幌]
 9. 宮村憲央他 ; がん遺伝子産物 YAP による細胞競合および肝がん誘導系の確立 [第 19 回肝細胞研究会 ; 2012 年 6 月/札幌]

10. 内田好海他；ストレス応答性キナーゼ MKK7 による概日リズム制御機構の解明 [第 11 回生命科学研究会；2012 年 6 月／秋田]
11. 浅岡洋一；ストレス応答性 MAP キナーゼ 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の解明 [第 34 回日本比較生理生化学会；2012 年 7 月／葉山] 第 21 回吉田奨励賞受賞講演
12. 山崎世和他；細胞の生死を制御するストレス応答性 MKK7 の神経系における生理的役割の解明 [第 21 回日本 Cell Death 学会；2012 年 7 月／名古屋]
13. 仁科博史；マウスとメダカから学ぶ肝形成と肝疾患 [秋田大学医学部セミナー；2012 年 8 月／秋田]
14. 有馬誉恵他；神経細胞特異的欠損マウスを用いた概日リズム制御機構におけるストレス応答性キナーゼ MKK7 の機能解析 [第 11 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォラム；2012 年 9 月／福岡]
15. 内田好海他；ストレス応答性 MKK7-JNK シグナル経路による分子時計制御 [第 11 回ファーマバイオフィォラム 2012；2012 年 9 月／福岡]
16. 平山順他；ストレス応答性リン酸化酵素による概日リズム制御 [第 19 回日本時間生物学会学術大会；2012 年 9 月／札幌]
17. 山崎世和他；JNK signaling is required for the maintenance of motor performance in old-age animals [第 35 回日本神経科学大会；2012 年 9 月／名古屋]
18. 平山順他；Light-dependent UV-tolerance in zebrafish early embryo [第 18 回小型魚類研究会；2012 年 9 月／京都]
19. 浅岡洋一他；Analysis of the Hippo signaling pathway regulating neuronal differentiation in the retina. [第 18 回小型魚類研究会；2012 年 9 月／京都]
20. 宮村憲央、仁科博史；がん遺伝子 YAP による肝細胞癌発症機構の解明 [第 17 回日本肝臓医生物学研究会；2012 年 10 月／旭川]
21. 千葉恭敬、仁科博史；がん遺伝子 YAP 誘導性肝細胞がんのゲノム解析 [第 17 回日本肝臓医生物学研究会；2012 年 10 月／旭川]
22. 斎藤光介、仁科博史；YAP パラログ TAZ の肝がん誘導能の検討 [第 17 回日本肝臓医生物学研究会；2012 年 10 月／旭川]
23. 浅岡洋一、仁科博史；器官サイズ制御因子 YAP の網膜分化における機能解析 [第 5 回 RRM；2012 年 12 月／東京]
24. 仁科博史；がん遺伝子 yap 依存的異常肝細胞の排除と肝細胞がんの発症 [第 35 回日本分子生物学会年会；2012 年 12 月／福岡]
25. 平山順他；ストレス応答性キナーゼによる概日リズム制御 [第 35 回日本分子生物学会年会；2012 年 12 月／福岡]
26. 畠星治他；がん遺伝子産物 YAP アセチル化サイクルの同定 [第 85 回日本生化学会大会；2012 年 12 月／福岡]
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
1. 特許取得
ナシ
2. 実用新案登録
ナシ
3. その他
ナシ

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

「NASH の病態形成におけるマクロファージの病態生理的意義」

研究分担者氏名：小川 佳宏 所属機関：東京医科歯科大学 職名：教授
研究協力者氏名：菅波 孝祥 所属機関：東京医科歯科大学 職名：特任教授
研究協力者氏名：伊藤 美智子 所属機関：東京医科歯科大学 職名：特任助教

研究要旨：

【目的】

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

MC4R 欠損マウスを用いて、NASH の病態形成過程におけるマクロファージの機能的変化を FACS にて解析した。組織学的に脂肪蓄積のみが認められる負荷 4 週から、炎症性 M1 マクロファージの増加と抗炎症性 M2 マクロファージの減少が認められた。肥満脂肪組織では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) が知られているが、肝線維化を発症した負荷 20 週の肝臓では、肝細胞をマクロファージが取り囲む CLS 様構造 (hCLS: hepatic CLS) が多数確認された。hCLS は単純性脂肪肝では認められず、hCLS 数と肝線維化面積が正に相関することを見出した。

【考案】

NASH 発症過程のごく早期からマクロファージの機能に変化が起きていることが明らかとなり、マクロファージの局在・性質の変化が NASH の病態形成に關与していることが示唆された。

A. 研究目的

非アルコール性肝疾患 (NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease) はメタボリックシンドロームの肝臓における表現型と捉えられ、特に非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH: non-alcoholic steatohepatitis) はときに肝硬変や肝細胞癌に進展する重症型と考えられる。比較的肥満度の低い本邦においても NAFLD の有病率は約 30%、NASH の有病率も約 1% にのぼると想定される。今後、NASH を原因とする肝硬変・肝癌の増加が予測されることから、その病態理解と予防あるいは早期の治療が喫緊の課題である。メタボリックシンドロームの基盤病態として慢性炎症が注目されており、NASH の病態形成においても常在性・浸潤性マクロファージの活性化が重

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

B. 研究方法

1. FACS によるマクロファージの極性解析

肝非実質細胞分画の調整

麻酔下にマウスの腹部を切開し、門脈からリン酸緩衝液 15ml を灌流する。肝臓を切離し、肝分散用バッファー (Hanks' Balanced Salt Solution (Ca, Mg (+)) / type IV collagenase 1mg/ml / DNaseI 50ng/ml) 5ml を加え、GentleMACS (Miltenyi 社) にて細胞を分散した。30% Percoll に懸濁して 1800rpm, 4°C, 15min 遠心し、沈殿した細胞を肝非実質細胞分画として使用した。

FACS 解析: 1×10^6 個の細胞を $50 \mu\text{l}$ の FACS バッファーに懸濁し、Fc block 後に CD45-Pacific blue, CD11b-FITC, F4/80-APC/Cy7, CD11c-APC, CD206-APC 抗体を各 $0.5 \mu\text{l}$ ずつ加え、氷上で 10min 反応させた。細胞をバッファーで洗浄し、死細胞除去のため 7-AAD を加えて FACS 解析に供した。

2. hCLS と肝線維化の関連

高脂肪食負荷 20 週の肝切片を用いて、Sirius red 染色および F4/80 免疫染色を行った。画像解析ソフト Winroof (Mitani Co.) を用いて Sirius red 陽性面積および F4/80 陽性面積を測定する。hCLS 数は目視にて測定し、単位 mm^2 当りに換算した。

C. 研究結果

1. FACS によるマクロファージの極性解析

MC4R 欠損マウスが単純性脂肪肝を発症する負荷 4 週の段階でマクロファージの極性を FACS にて解析した。死細胞は 7-AAD にて除外し、CD45⁺, CD11b⁺, F4/80⁺細胞をマクロファージ分画として炎症性 M1 マーカーとして CD11c、抗炎症性 M2 マーカーとして CD206 陽性細胞の比率を検討した。野生型

マウスでは M1 マクロファージ数に変化は認めなかったが、M2 マクロファージが減少していた (図 1)。MC4R 欠損マウスでは M2 マクロファージがさらに減少し、M1 マクロファージが有意に増加した ($P < 0.01$, 図 1)。

2. hCLS と肝線維化の関連

肥満脂肪組織では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) が知られているが、肝線維化を発症した負荷 20 週の肝臓では、肝細胞をマクロファージが取り囲む CLS 様構造 (hCLS: hepatic CLS) が多数確認された (図 2A)。単純性脂肪肝を呈する野生型マウスでは hCLS は認められなかった (図 2A)。MC4R 欠損マウスの肝臓において、F4/80 陽性面積と線維化面積の間に相関は認められないが、興味深いことに hCLS 数と線維化面積には正の相関が認められた (図 2B)。

D. 考察

我々は、経時的な組織学的解析によって、MC4R-KO マウスが高脂肪食負荷 4 週で単純性脂肪肝を呈し、負荷 8 週で肝星細胞の活性化、負荷 20 週間で NASH を呈することを確認してきた。本年度は負荷 4 週の段階で検討を行い、すでにマクロファージの極性に変化が認められることを明らかにした。今後、病態が進んだ段階での解析を継続することで、NASH の病態形成とマクロファージの機能的変化の関連が明らかになることが期待される。

また、NASH では hCLS という特徴的な構造が多数認められ、線維化の程度と強く相関することが明らかになった。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hCLS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た。

E. 結 論

組織学的に脂肪蓄積のみが認められる負荷4週から、炎症性M1マクロファージの増加と抗炎症性M2マクロファージの減少が認められた。NASHを発症した負荷20週の肝臓では、肝細胞をマクロファージが取り囲むhCLSが多数認められ、肝線維化面積が正に相関することが明らかとなった。今後、病態の進展に伴うマクロファージの極性変化を明らかにするとともに、hCLSの特徴と機能的意義を検討することで、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た。

研究発表

1. 論文発表

1. Satoh-Asahara N, Shimatsu A, Sasaki Y, Nakaoka H, Himeno A, Tochiya M, Kono S, Takaya T, Ono K, Wada H, Suganami T, Hasegawa K, Ogawa Y. Highly purified eicosapentaenoic acid increases interleukin-10 levels of peripheral blood monocytes in obese patients with dyslipidemia. *Diabetes Care* 2012; 35:2631-2639
2. Watanabe Y, Nakamura T, Ishikawa S, Fujisaka S, Usui I, Tsuneyama K, Ichihara Y, Wada T, Hirata Y, Suganami T, Izaki H, Akira S, Miyake K, Kanayama HO, Shimabukuro M, Sata M, Sasaoka T,

Ogawa Y, Tobe K, Takatsu K, Nagai Y. The Radioprotective 105/MD-1 complex contributes to diet-induced obesity and adipose tissue inflammation. *Diabetes* 2012; 61:1199-1209

2. 学会発表

1. Suganami T, Itoh M, Tanaka M, Kamei Y, Terai S, Sakaida I, Ogawa Y, Melanocortin-4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. 2012 Keystone Symposia, Boston, US, 2012
2. 小川佳宏, メタボリックシンドロームと自然炎症, 第49回日本臨床分子医学会学術集会, 京都, 2012
3. 菅波孝祥, 小川佳宏, 脂肪組織炎症における飽和脂肪酸の意義, 第85回日本内分泌学会学術総会, 名古屋, 2012
4. 菅波孝祥, 小川佳宏, 慢性炎症とインスリン抵抗性, 第55回日本糖尿病学会年次学術集会, 横浜, 2012
5. 菅波孝祥, 小川佳宏, 脂肪組織の慢性炎症と飽和脂肪酸, 第33回日本炎症・再生医学会, 福岡, 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

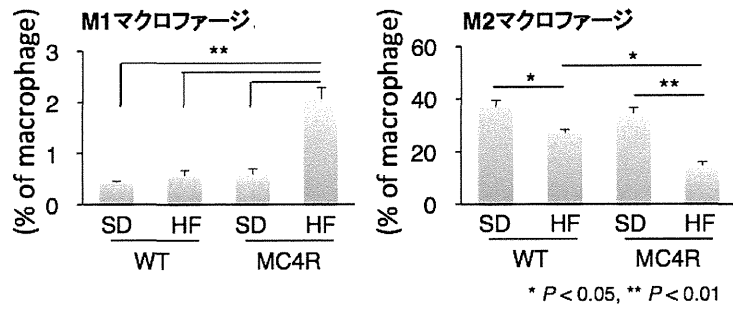


図1. 高脂肪食負荷4週におけるマクロファージの極性

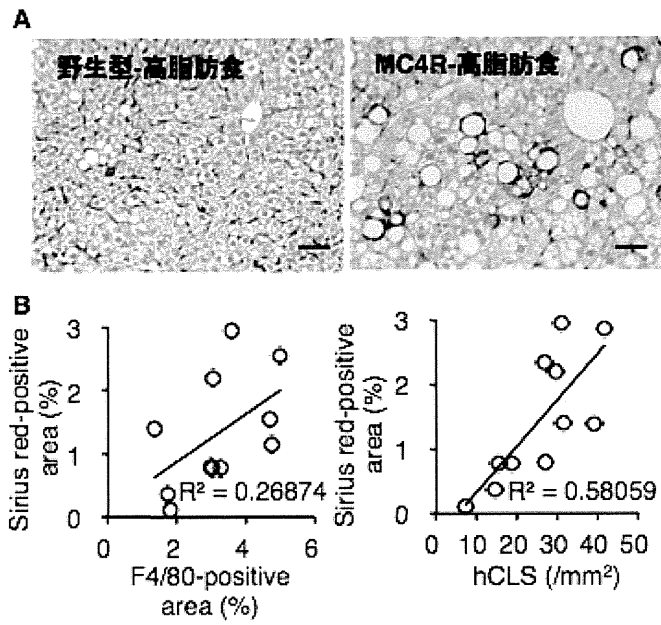


図2. 高脂肪食20週における肝F4/80染色

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）
分担研究報告書

「骨髄造血幹細胞ならびに間葉系幹細胞の肝線維化病態への関わり」

研究分担者氏名： 稲垣 豊

所属機関： 東海大学 分子病態医学 職名： 教授

研究要旨：

【目的】 わが国では、慢性ウイルス性肝炎や非アルコール性脂肪肝の進行に伴う肝硬変や肝細胞癌の発生が高頻度に見られ、その対策が急務となっている。肝硬変症例に対する自家骨髄細胞治療法の確立を目的として、骨髄中に存在する造血幹細胞と間葉系幹細胞の肝線維化病態への関わりについて、基礎的検討を行った。

【方法】 Enhanced green fluorescent protein (EGFP)を恒常的に発現するトランスジェニックマウス(EGFP Tg)の骨髄から造血幹細胞もしくは間葉系幹細胞を高頻度に含有する分画を採取し、放射線照射を行った野生型マウスに投与して骨髄を置換した。このレシピエントマウスに四塩化炭素を反復投与して肝線維症を作製し、この際に骨髄から線維肝組織に流入・生着したEGFP陽性細胞の分化動態とMatrix metalloproteinase (MMP)産生を解析した。

【成績】 造血幹細胞移植による骨髄中のEGFPキメラ(置換率)は全例で85%以上、間葉系幹細胞移植では最大で約30%の骨髄置換が得られた。造血幹細胞を移植したレシピエントマウスでは、線維肝に流れ着いた血球系細胞の一部がKupffer細胞や類洞内皮細胞に分化し、MMP-13/-9を産生することで線維化の改善に寄与していた。これに対して、骨髄間葉系幹細胞を移植したレシピエントマウスにおいては、EGFP陽性細胞の末梢血中への動員や線維肝組織への生着は認められなかった。

【考案】 骨髄由来血球系細胞の肝線維化改善への関わりが明らかにされた一方、骨髄間葉系幹細胞の肝線維化病態への関与は否定的であった。これは、間葉系幹細胞によるコラーゲン産生が肝線維化をむしろ悪化させるという懸念を払拭するものであり、難治性肝硬変症患者に対する自家骨髄細胞治療法を確立する上で、重要な知見と考えられた。

A. 研究目的

我が国では、B型ならびにC型肝炎ウイルスの持続感染による慢性肝炎から肝硬変・肝癌への進展が、大きな社会問題ともなっている。加えて近年では、メタボリック症候群の肝病変として、線維化が進展して肝硬変から肝癌を合併する非アルコール性脂肪肝炎への対策が重要となっている。進行した肝硬変に対しては肝移植が唯一の治療法であるが、ドナー数の圧倒的不足により、実施例は今なお限定的である。したがって、肝線維化のメカニズムを解明するとともに、肝移植に代わる新たな治療法を確立することは、臨床的に、また社会的にも重要かつ喫緊の研究テーマである。

近年、肝硬変症例に対する自家骨髄細胞移植が内外の施設で試みられ、一定の効果を

上げている。しかしながら、細胞治療に際してどのような細胞分画を用いるのが最も効果的であるかについては、未だ十分に解明されていない。その一因は、骨髄が多種多様な細胞からなる不均一な細胞集団であり、肝線維化の進展過程において骨髄から線維肝組織に流入・生着した細胞の由来や細胞系譜も不明な点にある。

本研究では、骨髄造血幹細胞ならびに近年新たに分離同定された間葉系幹細胞を、それぞれ緑色蛍光で個別に標識して、肝線維化の進展過程における両幹細胞に由来する細胞の肝組織への生着や分化動態を詳細に解析し、難治性肝硬変症例に対する細胞治療法の臨床的確立に向けての理論的裏付けを与えることを目的とする。

B. 研究方法

(1) 骨髄造血幹細胞および間葉系幹細胞の移植

Enhanced green fluorescent protein (EGFP) を恒常的に発現するトランスジェニックマウス (EGFP Tg) 骨髄から、Fluorescence-activated cell sorter (FACS)を用いてマウスの造血幹細胞である CD34⁻ c-Kit⁺ Sca1⁺ Lin⁻ (34KSL)細胞もしくは間葉系幹細胞を高頻度に含有する CD45⁻ Ter119⁻ PDGFR α ⁺ Sca1⁺ (P α S)細胞分画を採取した。各幹細胞を個別に放射線照射後の野生型マウスに静脈内投与して、骨髄を置換した。対照として、EGFP Tg から採取した全骨髄細胞を、同様に放射線照射後の野生型マウスに移植した。骨髄置換6週間後に、レシピエントマウスにおける末梢血単核球中の EGFP 陽性率(キメリズム)を、FACS を用いて確認した。また、EGFP 陽性の全骨髄細胞もしくは P α S 細胞を移植したレシピエントマウスにおける骨髄 P α S 細胞分画中の EGFP キメリズムを、解剖時に採取した骨髄細胞の FACS 解析により確認した。

(2) 実験的肝線維症の作製

骨髄置換後8週目より、レシピエントマウスに四塩化炭素を3日毎に計30回皮下投与して、実験的肝線維症を作製した。肝線維化の程度を、四塩化炭素の最終投与後から経時的に摘出した肝臓標本の Sirius red 染色により半定量的に評価した。

(3) 線維肝組織へ生着した細胞の局在と分化動態の解析

四塩化炭素最終投与後から経時的に採取した肝組織を用いて、線維肝組織内へ流入・生着した骨髄造血幹細胞あるいは間葉系幹細胞に由来する細胞の局在を、EGFP の共焦点レーザー顕微鏡観察により解析した。また、

両幹細胞に由来する細胞の線維肝組織内における分化動態について、類洞内皮細胞 (Stabilin-2)、星細胞(デスミンおよび α -smooth muscle actin (α SMA))、Kupffer 細胞 (F4/80) に対する特異的抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。さらに、MMP-13 ならびに MMP-9 の産生を、同様に免疫蛍光染色により解析した。

C. 研究結果

(1) 骨髄 34KSL 細胞移植による血球系細胞の置換

骨髄造血幹細胞を移植したレシピエントマウスにおける6週後の末梢血単核球中の EGFP キメリズムは全例で 85%以上、また解剖時における骨髄細胞中の EGFP キメリズムも 90%以上であり、全骨髄細胞を移植した場合と同様に良好であった。

(2) P \cdot S 細胞移植による骨髄間葉系幹細胞の置換

P \cdot S 細胞は、骨髄中の非血球系細胞全体の 1%未満に過ぎない、ごく少数の細胞集団である。EGFP 陽性の全骨髄細胞を移植した場合には、レシピエントマウス骨髄中の P \cdot S 細胞数の増加はなく、EGFP 陽性細胞による置換も 5%以下と低値であった。これに対して、EGFP 陽性の P \cdot S 細胞を移植した場合には、レシピエントマウス骨髄中の非血球系細胞全体に占める P \cdot S 細胞の割合が 11.2%と、通常の 10 倍以上に増加した。また、骨髄中の P \cdot S 細胞分画における EGFP キメリズム(置換率)も、最高で 30%以上にまで増加した。

(3) 骨髄造血幹細胞もしくは間葉系幹細胞に由来する細胞の線維肝組織への生着

骨髄 34KSL 細胞を移植したレシピエントマウスにおいては、全骨髄細胞を移植した場合と

同様に門脈域や線維束に沿って多数のEGFP陽性細胞の生着が認められた。これに対して、EGFP陽性のP・S細胞を移植した場合には、レシピエントマウス骨髄中のP・S細胞におけるEGFPのキメリズムが30%以上に増加したにもかかわらず、線維肝組織中にEGFP陽性の細胞は全く認められなかった。

(4) 骨髄造血幹細胞に由来する細胞の線維肝組織における分化動態とMMP-13/9産生

線維肝組織内へ流入・生着した骨髄造血幹細胞に由来する細胞の分化動態を解析したところ、その一部はF4/80陽性のKupffer細胞や、Stabilin-2陽性の類洞内皮細胞に分化していた。しかしながら、EGFPを共発現する・SMA陽性の活性化星細胞(筋線維芽細胞)はごく少数に限られ、EGFPとデスミンとの共発現は認められなかった。また、これらの血球系細胞の一部は、MMP-13やMMP-9を産生していることが、免疫染色により証明された。

D. 考 察

骨髄の中には、全血球系細胞へ分化しうる造血幹細胞と、骨・軟骨・脂肪細胞などに分化する間葉系幹細胞が存在する。造血幹細胞については研究が進み、臨床的にも骨髄移植に用いられている一方、間葉系幹細胞が生体内で果たす役割は依然として不明の点が多い。加えて、骨髄間葉系幹細胞を投与した際には線維肝組織に生着した細胞がコラーゲンを産生することで、線維化をむしろ悪化させることが懸念されており、肝硬変患者に対する自家骨髄細胞療法之功罪については未だ結論が得られていない。

本研究では、近年新たに分離・同定された骨髄間葉系幹細胞(P α S細胞分画)、もしくは造血幹細胞(34KSL細胞分画)をそれぞれ

EGFPで個別に標識し、肝線維化過程における両幹細胞に由来する細胞の肝組織への生着や分化動態を詳細に解析した。その結果、線維肝に流れ着いた造血幹細胞由来の血球系細胞がMMP-13/-9を産生することで線維化の改善に寄与する一方で、間葉系幹細胞の末梢血中への動員や線維肝組織への生着は認められないことを証明した。これらの所見により、少なくとも骨髄内在性の間葉系幹細胞によるコラーゲン産生が肝線維化をむしろ悪化させるという懸念が払拭された。

E. 結 論

実験的肝線維症の進展と改善過程における骨髄造血幹細胞および間葉系幹細胞の関与を検討した。その結果、血球系細胞が線維肝組織に流入・生着してMMP-13/-9を産生することで線維化改善に寄与する一方、間葉系幹細胞の肝組織への生着は認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yutaka Inagaki and Reiichi Higashiyama: Interplay between bone marrow and liver in the pathogenesis of hepatic fibrosis. *Hepatol Res* 2012; 42: 543-548.
2. Isao Okazaki and Yutaka Inagaki: Novel strategies for hepatocellular carcinoma based on MMPs science. *Anti-Cancer Agents Med Chem* 2012; 12: 753-763.
3. 稲垣 豊、中尾祥絵、瀧澤友里、住吉秀明: 肝線維症治療の研究はどこまで進展したか? *肝胆膵* 2012; 65: 253-260.
4. 稲垣 豊: 今なぜ肝線維化研究が注目されているのか. *医学のあゆみ* 2013; 244: 513.
5. 住吉秀明、稲垣 豊: コラーゲン分子種と線

維症形成へのかかわり. 医学のあゆみ 2013; 244: 515-520.

2.学会発表

1. 住吉秀明、瀧澤友里、中尾祥絵、三上健一郎、茂呂 忠、穂積勝人、紙谷聡英、稲垣 豊:細胞系譜特異的Notch/Jagged-1シグナルによる肝線維化と再生の病態形成. 第12回日本再生医療学会総会、横浜、2013年
2. Hanako Yamaoka, Hideaki Sumiyoshi, Sachie Nakao, Kaori Minakawa, Yuri Takizawa, Norihiro Ikoma, Tomotaka Mabuchi, Akira Ozawa, Kiyoshi Higashi, Koichi Saito, and Yutaka Inagaki: A novel small compound antagonizing TGF- β /Smad signal stimulates migration and proliferation of keratinocytes and enhances wound healing. 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Naha, 2012
3. Yutaka Inagaki, Hideaki Sumiyoshi, Hiroshi Fukumitsu, Reiichi Higashiyama, Sachie Nakao, Kaori Minakawa, Yuri Takizawa, Hanako Yamaoka, Tadashi Moro, Isao Okazaki, Koichi Saito, Kiyoshi Higashi: Identification of a novel bone marrow cell-derived factor that suppresses fibrogenesis and accelerates regeneration of murine fibrotic liver. 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2012
4. 瀧澤友里、辺 颯、小山 遼、楊 宇、駒田雅之、福光 寛、中尾祥絵、皆川香織、山岡華児、住吉秀明、稲垣 豊、喜多村直実、田中利明:Hepatocyte growth factor (HGF)による細胞増殖制御機構の解明. 第19回肝細胞研究会、札幌、2012年
5. 稲垣 豊:線維肝の再生における骨髄と肝臓の臓器相関. 第11回日本再生医療学会総

会、シンポジウム5「臓器再生の名脇役達—血管再生と炎症・間質組織の生理学的および病理学的役割—」、横浜、2012年

6. 住吉秀明、福光 寛、東山礼一、中尾祥絵、皆川香織、茂呂 忠、山岡華児、瀧澤友里、東 清史、斎藤幸一、稲垣 豊:骨髄細胞に由来する新たな肝線維化改善・再生促進因子の同定と臨床応用. 第11回日本再生医療学会総会、横浜、2012年
7. 茂呂 忠、東山礼一、住吉秀明、稲垣 豊:胆汁うっ滞型肝線維症におけるコラーゲン産生細胞の起源と初期動態. 第48回肝臓学会総会、ワークショップ21「肝線維化の病態解明と治療への展開」、金沢、2012年
8. 三上健一郎、東山礼一、遠藤 哲、坂本十一、沢田直也、福田眞作、稲垣 豊:Notch/Jagged-1シグナルを介した肝前駆細胞動員と線維化の制御機構. 第48回肝臓学会総会、ワークショップ21「肝線維化の病態解明と治療への展開」、金沢、2012年
9. 福光 寛、東山礼一、住吉秀明、稲垣 豊:骨髄細胞に由来する新たな肝線維化改善・再生促進因子の同定と臨床応用. 第48回肝臓学会総会、ワークショップ15「肝再生、幹細胞研究が臨床医学にもたらす可能性」、金沢、2012年

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
研究分担報告書

「皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞の肝硬変に対する効果の研究」

研究分担者氏名：大河内 仁志

所属機関：国立国際医療研究センター研究所 細胞組織再生医学研究部 職名：部長

研究要旨：

【目的】

皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞の投与による肝硬変モデルマウスに対する効果の検討

【方法】

マウスに高脂肪食を6か月間投与し、NASH肝硬変モデルを作成した。このモデルにGFPマウス皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞(ASC)を投与し、2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。

【成績】

マウスの皮下脂肪由来と骨髄由来の培養間葉系細胞とを、門脈または脾臓より投与した。投与細胞数の検討により10万個ならば投与可能なことが分かった。培養したASCを10万個門脈から移植するとASTが対照群に比べて有意に低下した。骨髄由来の培養BM-MSCを10万個門脈から移植するとT-Bil, ALTが有意に低下した。細胞移植群は一部シリウスレッド染色にて線維化の面積が減少していた。

【考案】

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ので、門脈や脾臓から細胞を注入して肝臓への細胞供給をふやすことができた。細胞移植群で線維化の改善傾向が認められたが、対照群において線維化の割合には個体間でばらつきがみられたので、さらにサンプル数を増やして、慎重に効果の判定をすべきだと思われた。

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(ASC)の分離

GFPマウス(C57BL/6由来, ♀ 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2-3mm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℃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ものをSVF(stromal vascular fraction)とした。

細胞培養

SVF を control medium で resuspend し、40 μ m filter を通した後、 1×10^6 / 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。

骨髄間葉系細胞(BM-MSC)の分離と培養

GFP マウス (C57BL/6 由来, ♀ 10 週齢) の大腿骨から骨髄液を採取し、10 cm dish に播種した。DMEM + 10% FCS を培地とし、翌日に浮遊細胞を除去した。培地交換は 2 日に 1 回行い、コンフルエントになったらトリプシン処理をして、継代した。

肝硬変モデルマウスの作製と移植実験

C57/BL6 マウスに離乳直後より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)を6ヶ月間にわたって投与し、NASH 肝硬変モデルを作成した。このマウスに同系 GFP マウスより培養 ASC, SVF, 骨髄間葉系幹細胞(BM-MSC)10-100 万個を門脈または脾臓に注入した。その2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:10-100 万個
- 2) 移植経路:経門脈、経脾臓

線維化の程度はシリウスレッド染色を行い、KEYENCE 社の BZ-II 解析アプリケーションを用いて、肝臓の各葉(内側右葉、外側左葉、外側右葉、尾状葉)の総面積に対して赤く陽性に染まる面積

の割合を求めた。各葉の陽性率の平均値をとることによって全体の陽性率を求めた。

C. 研究結果

これまでの検討から細胞を静注すると多くの細胞が肺に集積し、肝臓へ到達する細胞が十分でないことが判明したので、投与経路の検討を行った。まずマウスを開腹し、直視下に盲腸近辺の腸間膜静脈をから門脈への細胞注入を行った。細胞注入自体は行えたが、投与細胞数が10万個をこえると肝臓に大きなダメージを与えることが判明したので、投与細胞数は最大で10万個に設定した。脾臓でも同様な結果が得られ、10万個をこえるとマウスがしばしば死亡した。

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。

NASH モデルへの移植実験

培養した ASC を 10 万個門脈から移植すると2週間後に AST が対照群に比べて有意に低下した(図1、 $p=0.046$)。培養 BM-MSC を 10 万個門脈から移植すると T-Bil, ALT が有意に低下した。SVF を 100 万個門脈から移植しても有意な差は認められなかった。

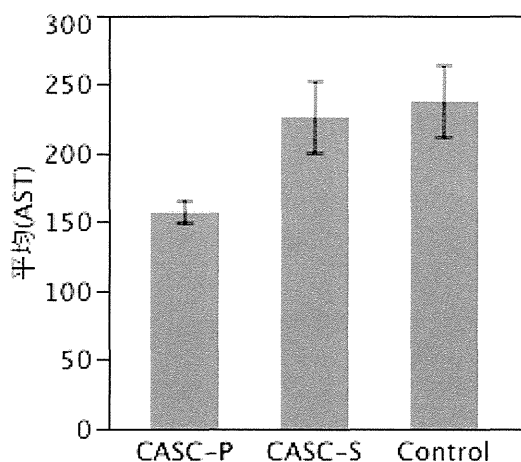


図1:細胞移植による生化学的検討

CASC-P:培養 ASC 門脈投与

CASC-S:培養 ASC 脾臓投与

シリウスレッドの染色による線維化の評価では、門脈投与の ASC で平均の陽性率が 6.29% (n=4)、脾臓投与の ASC で 6.28% (n=4)、対照群で 7.36% (n=4) となった。細胞投与群で線維化の割合が減少しているようにみえるが、対照群において陽性率が 3-11%と個体差によるばらつきが大きくみられた。

D. 考 察

金沢大学消化器グループが開発した高脂肪食投与による NASH モデルを作成した所、6ヶ月後には組織学的に肝硬変を認めた。細胞移植実験を行い、細胞投与群は生化学的にいくつかの改善項目が見られた。線維化の改善についてはシリウスレッド染色で陽性率の平均値をとると、改善がみられる傾向が示唆されたが、個体間のばらつきがかなりあることが判明した。また肝臓のすべての葉について線維化の程度を網羅的に調べて、画像解析したところ、同一個体の各葉によっても線維化の程度は異なることが判明したので、効果判定は慎重にすべきだと思われる。今回の NASH モデルは時間をかけて線維化が進むため、ヒトに

近いモデルだと考えられるが、病態が完成するまでに長期間かかることが問題点として上げられる。また長期間ゆえに個体差も出やすいのではないかと思われた。サンプル数を増やして評価する必要がある。

E. 結 論

脂肪由来の間葉系幹細胞は容易に培養でき、肝硬変モデルマウスに移植すると、線維化が改善する可能性が示された。

研究発表

1.論文発表

なし。

2.学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

「非アルコール性脂肪肝炎モデルを用いた
脂肪組織由来間質細胞の肝再生修復療法の検討」

研究分担者氏名：酒井 佳夫

所属機関：金沢大学 医薬保健研究域 職名：准教授

研究要旨：

【目的】脂肪組織由来間質細胞は、間葉系幹細胞を豊富に含む細胞群であり、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。今回、非アルコール性脂肪肝炎による肝硬変マウスモデルを用いて、脂肪組織由来間質細胞の経脾経門脈による肝再生療法の基礎的実験を行った。

【方法】GFPトランスジェニックマウス皮下脂肪組織より間質細胞を分離、培養し、脂肪組織由来間質細胞を獲得した。高脂肪動脈硬化食を32週以上投与後肝硬変が確立した状態において、 1×10^5 個のGFPマウス脂肪組織由来間質細胞を経脾的に隔週で2回投与した。1週間後、2週間後において、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、肝組織について、DNAマイクロアレイにより遺伝子発現プロファイルの変化を評価した。

【成績】脂肪組織由来間質細胞投与後1週間後において、AFP、アルブミン産生は、脂肪組織由来間葉系幹細胞によって、亢進傾向を認め、2週間後においては、有意差をもって、発現が亢進していた。また、肝線維化状態に対する改善も確認された。肝組織の遺伝子発現プロファイルの解析では、脂肪組織由来間質細胞の投与により発現が減弱した遺伝子は、主に炎症の生物学的プロセスに関連し、亢進した遺伝子は、主に細胞骨格、発生に関連する生物学的プロセスに関連する特徴が示された。

【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対する脂肪組織由来間質細胞投与により、肝組織における抗炎症効果と肝再生効果が認められ、脂肪組織由来間質細胞による肝硬変に対する肝再生治療効果が示唆された。今後、さらなる肝再生効果の機序の解明を進める予定である。

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。骨髄組織とともに、脂肪組織の間質細胞には多分化能とともに抗炎症効果を有する間葉系幹細胞が豊富に存在する。そのため、これらの間質細胞を用いた肝再生療法の可能性が注目されている。本年度の研究では、肝硬変マウスモデルを用いて、脂肪組織由来間質細胞の治療効果とその機序解明の基礎的検討を行った。

B. 研究方法

GFPトランスジェニックマウスの皮下脂肪組織より間質細胞を分離、継代した。非アルコール性脂肪肝炎による肝硬変マウスモデルは、C57Bl/6マウスに対して、高脂肪動脈硬化食を投与し作成した。高脂肪動脈硬化食を32週以上投与後に肝硬変が確立した状態において、32週目あるいは40週目より、隔週で2回、 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週間後、2週間後において、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、肝組織よりRNAを採取、DNAマイクロアレイにより脂肪組織由来間質細胞投与による遺伝子発現プロファイルの変化の特徴を検討した。

C. 研究結果

分離、培養した脂肪組織由来間質細胞の間葉系幹細胞マーカー発現については、90%以上が CD90 陽性、20%強が CD105 陽性であった。32 週間高脂肪動脈硬化食を投与した肝硬変マウスに対し、 1×10^5 個の脂肪組織由来間質細胞を経脾的に隔週で 2 回投与した。投与終了 2 週後の肝組織において、線維化領域の減少、 α -SMA 陽性細胞数が減少した。肝内の CD11b 陽性細胞数、F4/80 陽性細胞数が減少した。肝実質細胞のアルブミン、 α -フェトプロテインの発現は、コントロールと比較して有意に上昇した。40 週間高脂肪動脈硬化食を投与した肝硬変マウスに対する脂肪組織由来間質細胞の投与により発現が亢進した遺伝子は Cytoskeleton、Development に関連し、減弱した遺伝子は、炎症、免疫応答に関連した。

D. 考 察

非アルコール性脂肪肝炎による肝硬変マウスモデルに対する脂肪組織由来間質細胞投与により、肝組織における抗炎症効果と肝再生効果が認められ、脂肪組織由来間質細胞による肝硬変に対する肝再生治療効果が示唆された。

E. 結 論

脂肪組織由来間質細胞投与による肝硬変に対する肝再生効果とその機序の知見が得られた。

研究発表

1.論文発表

1. 酒井佳夫、山下太郎、金子周一 肝癌幹細胞の生物学的特徴と幹細胞標的新規治療法開発の可能性 肝胆膵65巻1号63-71頁、2012年7月

2.学会発表

1. 酒井佳夫、関 晃裕、金子周一. 肝硬変に対する脂肪組織由来間質細胞による肝再生療法開発. JDDW. 神戸. 2012
2. Akihiro Seki, Yoshio Sakai, Takuya Komura, Mami Higashimoto, Haruo Fujinaga, Masao Honda, Takashi Wada, Toshinari Takamura, Takahiro Ochiya, Shuichi Kaneko. Therapeutic effect of adipose derived mesenchymal stem cell to murine NASH liver cirrhosis inactivating Kupffer/Macrophage and helper T cell. AASLD, Boston, 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

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）
分担研究報告書

「ヘパリン添加された血漿・末梢血単核球中の HCV RNA 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：准教授

研究要旨：

【目的】肝硬変症に対する 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。骨髄細胞採取にはPCR阻害物質であるヘパリンが使用されており本研究ではヘパリン添加された検体でのHCV RNA測定法の確立を行った。

【方法】2例のC型慢性肝炎患者から抗凝固剤としてヘパリンNaが使用された採血管で採取され、保存された血漿と末梢血単核球を用いてHCV RNAをそれぞれ定量した。

【成績】通常血漿・末梢血単核球中のHCV RNAは2-6 log copies/mLの範囲で測定可能であるが、ヘパリンNa試験管採血検体では検出感度が3 log copies/mL程度低下していた。抽出する際にヘパリナーゼを加えると検出感度は1-2 log copies/mL改善することが明らかとなった。

【考案】ヘパリン存在下では血漿、末梢血単核球内のHCV RNAの定量はPCRの阻害が起こるためヘパリナーゼを加えて抽出を行うことが必要である。しかし、その測定感度は十分ではなく、改良が必要である。

共同研究者

田中榮司 信州大学医学部内科学第二・教授

討とヘパリン添加された検体を用いた場合の

HCV RNA 測定系を確立することを目的とした。

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ため骨髄細胞中のウイルス肝炎の有無を検討することは重要である。ABM療法で実際に採取された骨髄細胞を用いて、HBV DNAとHCV RNAの存在を確認したところ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、C型肝炎患者の骨髄細胞中には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を証明した。しかし、実際の骨髄細胞採取時にPCRの阻害物質であるヘパリンを使用しているため、ヘパリンが測定系に与える影響の検

B. 研究方法

信州大学医学部附属病院消化器内科で経過観察中のgenotype 1のC型肝炎2症例から抗凝固剤としてクエン酸NaとヘパリンNaがそれぞれ入った試験管を用いて採取され、保存された血漿と末梢血単核球を用いて10倍～10⁴倍希釈してHCV RNAの定量をそれぞれ3回ずつ行った。さらに、同じ検体にヘパリナーゼを加えて抽出を行った場合のHCV RNAについても同様に測定を行った。

C. 研究結果

クエン酸NaとヘパリンNa試験管で採血された血漿中のHCV RNA量の検討結果を表1に示す。クエン酸Naの試験管ではHCV RNAは2-6 log copies/mL測定可能であるがヘパリンNa採血検体では5-6 log copies/mLのみ測定可能で感度