

201320010A

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

肝硬変に対する細胞治療法の
臨床的確立とそのメカニズムの解明

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 坂井田 功

平成26(2014)年3月

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）
総括研究報告書

「肝硬変に対する細胞治療法の臨床的確立とそのメカニズムの解明」

研究代表者氏名：坂井田 功

所属機関：山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学 職名：教授

研究要旨：

<臨床研究>我々はC型・B型肝炎ウイルス、アルコールに起因する「肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法(ABMi療法)」を世界に先駆け開発し、欧文報告してきた。今までの知見よりこの治療法の本質は、肝線維化改善と肝臓組織幹細胞活性化による肝機能改善効果をもたらす抗線維化・再生修復療法と考えられ、その安全性・有効性は、国内外の追試でも確認報告された。さらに2011年12月6日に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の承認を得た「C型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対するABMi療法」の「ランダム化比較試験」は2013年6月1日付で「先進医療B」として承認され、諸手続の後同年10月22日よりリクルートを開始した。現在、多施設で実施できる体制の構築を進めており、本研究でさらにエビデンスレベルの高い有効性を明らかにする。また、「B型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対するABMi療法」の準備を行い実施していく。

<基礎研究>この治療法の作用機序は、これまでの基礎研究により、骨髄細胞中の間葉系細胞の作用だけでなく、マクロファージ系細胞の抗線維化作用の可能性も示唆された。そこで、マクロファージの抗線維化メカニズムの解明や、脂肪肝炎モデルマウスの解析を推進する。また、細胞ソースとしての脂肪組織由来間葉系細胞の可能性も継続追求する。

分担研究者（所属機関・職名）

柳瀬 幹雄（独立行政法人国立国際医療研究センター病院・医長）

寺井 崇二（山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学・准教授）

上野 義之（山形大学医学部消化器内科学・教授）

酒井 佳夫（金沢大学医薬保健研究域・准教授）

宮島 篤（東京大学分子細胞生物学研究所・教授）

梅村 武司（信州大学医学部附属病院消化器内科・准教授）

仁科 博史（東京医科歯科大学難治疾患研究所・教授）

高見 太郎（山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学・講師）

小川 佳宏（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・教授）

疋田 隼人（大阪大学大学院医学系研究科樹状細胞制御治療学・消化器内科学・特任助教）

稲垣 豊（東海大学医学部再生医療科学・教授）

大河内仁志（独立行政法人国立国際医療研究センター細胞組織再生医学研究部・部長）

A. 研究目的

肝硬変患者に対する肝臓再生療法として、患者自身から自己骨髄細胞液を400mL採取

して洗浄後に骨髄単核球分画を分離濃縮し、同じ患者に末梢静脈から再投与する方法

「自己骨髄細胞投与療法 (ABMi 療法: Autologous Bone Marrow cell infusion therapy)」を世界に先駆けて開発し、その臨床的安全性・有効性を報告した (Stem Cells. 2006;24:2292-8)。さらに ABMi 療法の技術移転を行った山形大学及び韓国延世大学でも同様の安全性・有効性が改めて確認、報告された (Cell Transplant. 2010;19:1237-46, Stem Cells Dev. 2011;20:1503-10)。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、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の承認後の 2011 年 3 月より開始し、現在までに 4 例実施している。この ABMi 療法では、骨髄単核球分画の細胞が肝硬変症の線維を溶解し、肝組織幹細胞などを活性化することで肝機能が修復・改善すると考えられている (特許第 4752058 号「肝再生用骨髄細胞画分」、登録日:平成 23 年 6 月 3 日)。このように ABMi 療法は臨床的に安全性が確認され、有効性が証明されているが、保険適応されるには質の高いエビデンスを明らかにする必要がある。そこでまず、「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する ABMi 療法のランダム化比較試験」を計画した。本計画はすでに「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」への承認申請を行い、2011 年 12 月 6 日にその承認を得ている。この後、先進医療 B への申請を行い、2013 年 6 月 1 日付で承認を得ており、諸手続の後同年 10 月 22 日よりリクルートを開始した。本ランダム化比較試験を山口大学で先行開始し、他施設 (国立国際医療研究センター及び山形

大学) でもヒト幹指針への申請・承認を得た後に、先進医療 B としての施設追加を行い、この承認後に同様に実施する。また基礎研究では、肝線維化マウスモデルや脂肪肝炎 (NASH) モデルマウスの解析から、骨髄または脂肪組織由来細胞の抗線維化メカニズムや NASH 病態を解明し、これらモデルマウスへの ABMi 療法の治療効果を検討することで、B 型肝炎ウイルスや非アルコール性脂肪肝炎に起因する肝硬変症への ABMi 療法の適応拡大を目指す。さらに間葉系細胞だけでなくマクロファージ系細胞の肝硬変に対する治療効果がマウス基礎研究から示唆されたため、培養マクロファージ系細胞投与による新規肝臓再生修復療法の開発のための基礎研究を行う。

B. 研究方法

(1) 「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

「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」のランダム化比較試験を先進医療 B として山口大で実施するため、承認申請する。

(2) 多施設共同研究のため、国立国際医療研究センターおよび山形大学内への支援

ランダム化比較試験は、山口大で先行実施するが、その後、国立国際医療研究センターや山形大を含む多施設で実施する予定である。そのため、これら実施予定施設の学内倫理委員会の整備や幹細胞研究申請準備、先進医療 B 申請準備を行う。

(3) MMP9 発現解析のための

MMP9-LacZ/DeRed Tg マウス作出

骨髄由来細胞による肝線維化改善メカニズムを解明するため、MMP9 発現に注目し、MMP9 プロモーター下に標識蛋白 LacZ/DeRed を発現する遺伝子改変マウスを作出し、その発現動態を解析する。

C. 研究結果

(1) 「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

ABMi 療法をより早く多くの肝硬変症患者に提供するためには、質の高いエビデンスを創出することが不可欠である。そこで研究代表者坂井田の統括のもと、「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」のランダム化比較試験を山口大で実施する（その後、国立国際医療研究センターや山形大を含む多施設で実施する）。なお対象は、「90 日以上離れた 2 点において Child-Pugh スコアが 7 点（Child-Pugh B）以上の C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変の状態で現行の内科的な治療法では改善が見込めない症例」で、全 34 例（ABMi 群 17 例、標準的治療群 17 例）であり、ABMi 群は細胞投与後（標準的治療群は登録後）24 週の Child-Pugh スコアが 1 点以上改善する割合を主要評価項目としている。なお平成 25 年度からは、先端医療振興財団の西村勉が新規分担研究者となりデータ管理等を行う。このランダム化比較試験は、2013 年 6 月 1 日付での先進医療 B の承認を得ており、諸手続の後、10 月 22 日よりリクルートを開始したところである。

(2) 多施設共同研究のため、国立国際医療研究センターおよび山形大学内への支援

国立国際医療研究センターでは当該施設の倫理委員会の承認を受け、厚生労働省でのヒト幹倫理審査中である。さらに山形大でも学内倫理委員会の承認を受け、厚生労働省でのヒト幹倫理審査申請を行う。

(3) MMP9 発現解析のための

MMP9-LacZ/DeRed Tg マウス作出

これまでのマウス GFP/CCl₄ モデル研究で、投与骨髄細胞が MMP9 を発現し肝線維化を抑制することを確認している。GFP/CCl₄ モデルの MMP9 発現細胞を同定し MMP9 発現メカニズムを解明するため、MMP9 プロモーター下に標識蛋白 LacZ/DeRed を発現する遺伝子改変マウスを作出した。

D. 考 察

平成 26 年度からは、研究代表者坂井田の統括のもと、山口大で先行して「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」を先進医療 B として開始する。その後は、国立国際医療研究センターや山形大を含む多施設で実施していく。これらの実施により、質の高いエビデンスを創出し、ABMi 療法の普及に努めていく。その一方、基礎研究では、骨髄由来細胞や脂肪組織由来細胞による肝線維化改善メカニズムの解明を進める。

E. 結 論

平成 26 年度から「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」のランダム化比較試験を山口大で先進医療 B として先行して実施する。また、マウス基礎研究では MMP9 発現メカニズムの解析等を継続する。

研究発表

1. 論文発表

1. Tanimoto H, Terai S, Takami T, Murata Y, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Improvement of liver fibrosis by infusion of cultured cells derived from human bone marrow. *Cell Tissue Res.* 2013;354(3):717-28.

2. Quintanilha LF, Takami T, Hirose Y, Fujisawa K, Murata Y, Yamamoto N, Goldenberg RC, Terai S, Sakaida I. Canine mesenchymal stem cells show antioxidant properties against thioacetamide-induced liver injury in vitro and in vivo. *Hepatol Res.* 2013 Jul 25. [Epub ahead of print]

3. Terai S, Takami T, Yamamoto N, Fujisawa K, Ishikawa T, Urata Y, Tanimoto H, Iwamoto T, Mizunaga Y, Matsuda T, Oono T, Marumoto M, Burganova G, Quintanilha LF, Hidaka I, Marumoto Y, Saeki I, Uchida K, Yamasaki Y, Tani K, Taura Y, Fujii Y, Nishina H, Okita K, and Sakaida I. Status and Prospects of Liver Cirrhosis Treatment by Using Bone Marrow-Derived Cells and Mesenchymal Cells. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014 [Epub ahead of print]

4. 高見太郎, 寺井崇二, 坂井田 功 肝臓の再生療法, *Annual Review 消化器* 2014, 中外医学社, p187-193.

2. 学会発表

1. Terai S, Takami T, Sakaida I. Development of new cell therapy using bone marrow derived cell for liver

cirrhosis patients. The 16th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference Agenda. 2013 Jun. Bethesda, MD, USA.

2. Terai S, Sakaida I. Development of New Cell Therapy for Liver Cirrhosis. The 23rd Conference of APASL. 2013 Jun. Singapore.

3. Takami T, Terai S, Sakaida I. The development of a less-invasive liver regeneration therapy using cultured bone marrow derived cells for cirrhotic patients. 2nd International Conference on Gastroenterology & Urology. 2013 Jun. Northbrook, IL, USA.

4. Takami T, Terai S, Quintanilha LF, Tanimoto H, Murata Y, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Basic studies using human and canine bone marrow derived mesenchymal stem cells for the development of a less invasive liver. 11th Annual meeting of ISSCR. 2013 Jun. Boston, MA, USA.

5. Takami T, Terai S, Quintanilha LF, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Basic studies for a less invasive liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells with stabilization of redox homeostasis. The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells (20th JSRH). 2013 Sep. Osaka, Japan.

6. Terai S, Takami T, Sakaida I. The development of a less-invasive liver regeneration therapy using cultured bone marrow derived cells for cirrhotic

patient. JDDW2013. 2013 Oct. Kobe, Japan.

7. Takami T, Terai S, Quintanilha LF, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Basic studies for a less invasive liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells with stabilization of redox homeostasis. The liver meeting 2013, AASLD. 2013 Nov. Washington D.C., USA.

8. Takami T, Terai S, Sakaida I. Liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells with stabilization of redox homeostasis. Choshu International Liver Symposium 2014. 2014 Jan. Ube, Yamaguchi, Japan.

9. 高見太郎、寺井崇二、村田泰彦、坂井田功. ヒト骨髄由来および脂肪組織由来間葉系幹細胞における組織因子および IL-8 の発現検討. 第 49 回日本肝臓学会総会. 2013 年 6 月. 京王プラザホテル, 東京.

10. 高見太郎、寺井崇二、村田泰彦、廣瀬恵一、藤澤浩一、山本直樹、坂井田功. 肝再生修復療法としての培養ヒト骨髄間葉系細胞投与療法のメカニズム解析. 第 49 回日本肝臓学会総会. 2013 年 6 月. 京王プラザホテル, 東京.

11. 高見太郎、寺井崇二、坂井田功. 自己骨髄細胞による肝臓再生療法の取り組み. 第40回日本肝臓学会西部会. 2013年12月. 長良川国際会議場, 岐阜.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 2. 実用新案登録 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

「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の検討」

研究分担者氏名：柳瀬 幹雄

所属機関：独立行政法人国立国際医療研究センター病院 消化器内科 職名：医長

研究要旨：

【目的】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の検討を目的とする。

【方法】主研究機関（山口大学）との共同研究として行う。肝硬変を有する20歳から75歳の肝硬変患者のうち、現行の内科的な治療法では改善が見込めないC型肝炎ウイルスに起因する肝硬変症に限定した症例に対し、本研究への参加に同意が得られ、除外基準のいずれにも該当しない症例をランダムに、細胞投与群、標準的治療群に割り付ける。細胞投与群は、入院のうえ治療前評価と全身麻酔下での自己骨髄細胞採取・投与を行う。治療効果の判定は臨床所見、血液所見ならびに画像所見により行う。標準的治療群では、登録から24週間まで標準的治療を実施する。

【成績】当研究について院内倫理委員会承認後、厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会に申請を提出、疑義に対する回答中である。また自己骨髄細胞採取時の細胞調製室につき、その稼働に向けた調整を進めた。対象となりうる患者においては定期受診の際に肝機能評価を主とした経過観察を進めている。

【考案】自己骨髄細胞投与療法開始に向けた手続きならびに体制整備を進め、次年度の実施を予定している。

A.研究目的

線維化の進展した慢性肝疾患に対する根本的治療法はいまだ確立されていない。肝移植にあづかる患者は一部に限られ、その侵襲性や医療経済的な問題は大きい。再生医療の一環として今回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を検討する多施設共同研究の一施設として、当該研究費を用い取り組む。

B.研究方法

肝硬変を有する20歳から75歳の肝硬変患者のうち、現行の内科的な治療法では改善が見込めないC型肝炎ウイルスに起因する。

肝硬変症に限定した症例で、本研究への参加に同意が得られ、除外基準のいずれにも該当しない症例を登録する。登録された症例をランダムに、細胞投与群、標準的治療群に割り付ける。細胞投与群は、入院のうえ治療前評価と全身麻酔下での自己骨髄細胞採取・投与を行う。術後1週間は原則として入院下で厳重な観察を行い、以後定期的

に経過を追跡する。規定された時期以外でも担当医が必要と認めた場合は調査を行う。治療効果の判定は臨床所見、血液所見ならびに画像所見により行う。標準的治療群では、登録から24週後まで標準的治療を実施する。細胞投与治療を実施した場合には、投与後24週時までの安全性を確認する。

C. 研究結果

当研究について院内倫理委員会承認後、厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会に申請を提出、疑義に対する回答中である。また当研究を先進医療Bとして実施すべく院内関係部会との調整を進めている。

また自己骨髄細胞採取時の細胞調製室につき、その稼働に向けた調整を進めた。院内肝疾患患者リストを整備し、研究開始に際する該当患者さんへの案内が遅滞なく行われるよう準備を行った。対象となりうる患者においては定期受診の際に肝機能評価を主とした経過観察を進めている。

D. 考 察

自己骨髄細胞投与療法開始に向けた手続きならびに体制整備を進め、次年度の実施を予定している。

E. 結 論

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開始に向けた体制整備を行った。

研究発表

1.論文発表

本研究に関する発表はなし。

2.学会発表

本研究に関する発表はなし。

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。

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

「C型肝硬変に対するABMi療法の有用性：
肝再生に寄与するEpiregulinの役割の検討」

研究分担者：上野 義之

所属機関：山形大学医学部 消化器内科学 職名：教授

研究要旨：

【目的】当科ではアルコール性肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与(Autologous Bone Marrow Cells Infusion: ABMi)療法の有用性を報告してきた。また、ABMi療法の基礎研究として、in vitroにおいて、骨髄細胞の肝幹細胞の分化・増殖に寄与する液性因子の検討を行い、EGFファミリーに属する増殖因子Epiregulinに着目した。Epiregulinの肝再生における役割は不明な点が多い。本研究の目的は、肝再生におけるEpiregulinの役割を明らかにすることである。

【方法】臨床検体を用いて、様々な病態下の肝疾患患者の血清Epiregulin値を測定した。また、C57BL/6マウスに3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC)含有飼料を与え肝前駆細胞を誘導し、肝でのEpiregulin発現を評価した。In vitroではRecombinant epiregulin投与下の肝前駆細胞増殖能について検討した。さらにマウス肝でEpiregulinを過剰発現させ、肝再生に与える影響について組織学的に検討した。

【成績】血清Epiregulin値は、急性肝不全患者において、他の肝疾患患者に比し有意に上昇していた。また、DDC障害マウス肝においてEpiregulinは肝前駆細胞からなる偽胆管周囲に発現していた。Recombinant epiregulinは、濃度依存的に肝前駆細胞の増殖能を促進した。Epiregulin過剰発現マウス肝では、Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)陽性細胞が有意に増加し、さらに門脈周囲にCK19陽性肝前駆細胞増生を確認した。

【考案】Epiregulinは高度肝障害時に、肝前駆細胞からなる偽胆管周囲から発現していた。Epiregulinは肝前駆細胞出現を誘導、肝細胞DNA合成能を促進させることで肝再生に寄与している可能性がある。また、急性肝不全患者ではEpiregulinが上昇しており、高度肝障害時肝再生のバイオマーカーとなる可能性がある。

共同研究者

富田恭子 山形大学医学部消化器内科学 大学院

奥本和夫 山形大学医学部消化器内科学 助教

齋藤貴史 山形大学医学部消化器内科学 准教授

A.研究目的

当科では禁酒をなし得たアルコール性肝硬変患者に対し、自己骨髄細胞投与(Autologous Bone Marrow Cells Infusion: ABMi)療法を行い、肝機能検査値の改善を報告してきた(Stem Cells Dev 2011; 20: 1503-1510)。また、ABMi療法の有用性に資するメカニズムを明らかにする目的で、基礎研究として、骨髄単核球細胞と肝前駆細胞を共培養することにより、肝前駆細胞が肝細胞に分化誘導されることを報告し、骨髄単核球細胞から肝前駆細胞への作用因子の一つとしてFibroblast growth factor (FGF) 2の関与を示した(Cell Tissue Res. 2011; 343: 371-378)。この研

究においては、肝前駆細胞共培養下の骨髄細胞の遺伝子発現動態を、非共培養下の骨髄細胞を対照としてDNAマイクロアレイ解析を行ったが、多数の増殖因子関連遺伝子の変動を認め、中でもFGF2に次いで約7倍の遺伝子発現増加を示したのがEpiregulinであった。そこで、私達は骨髄細胞の肝前駆細胞への作用因子の新たな候補としてEpiregulinに注目し、同分子の肝再生への関与について検討を行った。本研究により、ABMi療法の有用性に寄与するメカニズムの一端が明らかとなることが期待される。

B. 研究方法

1) 各種肝疾患患者の血清 Epiregulin 値の検討
急性肝不全、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、健康者について、各患者の血清を用いて、ELISA 法により血清 Epiregulin 値を測定した。

2) 肝障害モデルを用いた検討

C57BL/6 マウスに 3,5 - diethoxycarbonyl-1,4 - dihydrocollidine (DDC)を含む飼料を与え肝前駆細胞を誘導し、血清 Epiregulin 値および肝における Epiregulin 発現を組織学的に検討した。

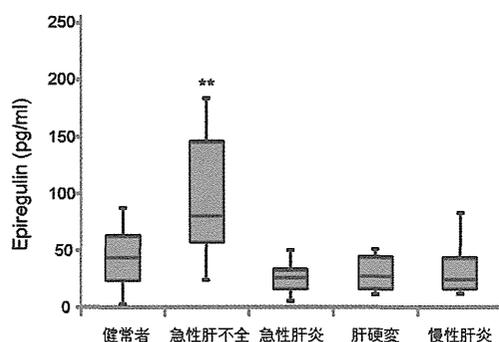
3) 肝前駆細胞株を用いた Epiregulin の細胞増殖能に与える検討

In vitro において、Recombinant epiregulin 投与下の EpCAM 陽性肝前駆細胞株の増殖能について、WST-1 assay を用いて検討した。

4) Epiregulin 過剰発現モデルを用いた検討
in vivo における Epiregulin の肝再生への関与を評価する目的で、Hydrodynamic Tail Vein injection (HTVi) 法を用いて、マウス肝で Epiregulin を過剰発現させ、肝での DNA 合成能および肝前駆細胞発現について検討した。

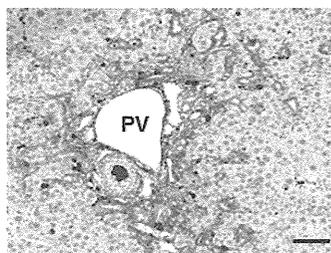
C. 研究結果

1) 急性肝不全性患者において、血清 Epiregulin 値はその他の肝疾患患者ならびに健康コントロールと比較して有意に上昇していた。

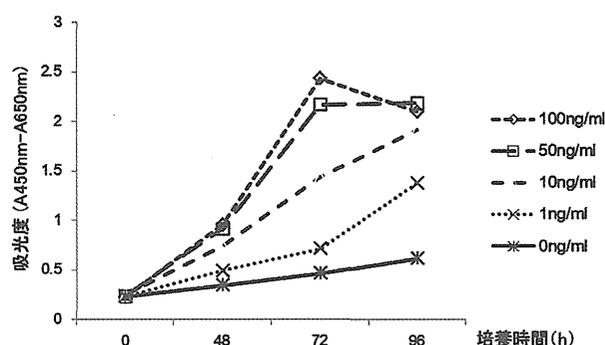


** p < 0.01

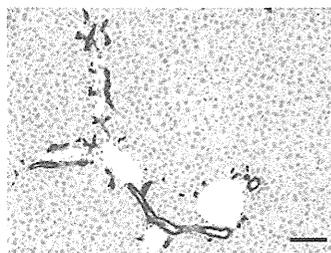
2) DDC マウス障害肝において Epiregulin は門脈域の肝前駆細胞からなる偽胆管周囲に発現を認めた。DDC マウス肝 Epiregulin 免疫染色を下段に示す。



DDC マウス血清 Epiregulin 値も DDC 食開始後徐々に増加した。さらに in vitro においては、Recombinant Epiregulin は、用量依存的に肝前駆細胞株の増殖能を促進していた。



3) HTVi 法による Epiregulin 遺伝子強発現下では、Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) 陽性細胞は遺伝子導入後有意に増加しており、さらに遺伝子導入後、門脈周囲に CK19 陽性肝前駆細胞増生を確認した。Epiregulin 強制発現マウス肝における CK19 免疫染色を下段に示す。



D. 考 察

肝硬変患者に対する ABMi 療法の肝機能検査値の改善に関わるメカニズムについては、骨髄細胞の線維化改善、肝細胞への分化、などの観点から基礎的検討がなされている。私たちは、骨髄細胞の肝幹細胞への分化・増殖に与える影響について着目し検討を行っている。なかでも、FGF2は、その代表的因子であるが、FGF2とともに肝幹細胞への関与が示唆される Epiregulin の役割については、不明な点が多かった。今回の検討では、Epiregulin が高度肝障害時に、門脈域の肝前駆細胞で構成された偽胆管周囲に発現していることが明らかとなった。さらに、Epiregulin 強制発現モデルの検討から、Epiregulin が肝前駆細胞出現自体を誘導し、肝細胞の DNA 合成能を促進させることで肝再生に寄与している可能性が示唆された。Epiregulin は、DDC 肝障害モデル、さらには急性肝不全患者において上昇していることを考え合わせると、肝前駆細胞を伴うような高度な肝障害において重要な肝再生に関わる因子と考えられ、肝再生の有用なバイオマーカーとなる可能性があるものと思われた。

E. 結 論

Epiregulin は、肝前駆細胞を伴うような高度な肝障害において重要な肝再生因子の一つと考えられ、肝再生時の有用なバイオマーカーとなる可能性があるものと思われた。

研究発表

1.論文発表

1. Saito T, Tomita K, Haga H, Okumoto K, Ueno Y: Bone marrow cell-based regenerative therapy for liver cirrhosis. World J Methodol 2013; 3: 65-69

2. Saito T, Ueno Y: Transmission of hepatitis C virus: Self-limiting hepatitis or chronic hepatitis? World J Gastroenterol 2013; 19: 6957-6961
3. Wada Y, Sato C, Tomita K, Ishii-Aso R, Haga H, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Saito T, Ueno Y: Possible autoimmune hepatitis induced after chronic active Epstein-Barr virus infection. Clin J Gastroenterol 2014; 7: 58-61

2.学会発表

1. Tomita K, Haga H, Mizuno K, Katsumi T, Sato C, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Saito T, Ueno Y: Epiregulin Promotes the Emergence and Proliferation of Adult Liver Progenitor Cells. AASLD, Washington; November 2013
2. Tomita K, Haga H, Mizuno K, Katsumi T, Sato C, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Saito T, Ueno Y: The Role of Epiregulin During Liver Regeneration: the Possibible Function of Promoting the Emergence and Proliferation of Liver Progenitor Cells. 第 20 回肝細胞研究会, 大阪; 2013 年 9 月
3. Tomita K, Haga H, Katsumi T, Sato C, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Saito T, Ueno Y: Clinical Manifestations of Liver Dysfunction in Patients with Anorexia Nervosa. IDD forum, Hong Kong; June 2013
4. 富田恭子, 芳賀弘明, 勝見智大, 佐藤智佳子, 石井里佳, 奥本和夫, 西瀬雄子, 渡辺久剛, 斎藤貴史, 上野義之:肝

再生におけるエピレグリンの役割と機能解析，第 49 回肝臓学会総会，東京；
2013 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 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

「肝硬変に対する細胞治療法の臨床的確立とそ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 分子細胞生物学研究所 職名：教授

研究要旨：

【目的】肝線維化あるいはその改善に関わる骨髄中の細胞種および因子の解析

【方法】骨髄中で存在比率の高い単球、好中球に着目し、それらの細胞群を単離して、遺伝子発現解析を行う。さらに、四塩化炭素を頻回投与して肝線維化を誘導したマウスへの細胞投与実験を行い、線維化の改善効果の有無を解析する。さらに、治療効果を高めるために、単球や好中球に対してサイトカイン刺激を行い、線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現変化を解析する。

【成績】遺伝子発現解析の結果、線維を溶解すると考えられる MMP-8, 9, 13 の発現量は、単球より好中球の方が高いことが明らかとなった。一方で炎症抑制性サイトカインである IL-10 の発現量は好中球より単球で高いことがわかった。四塩化炭素を頻回投与して肝線維化を誘導したマウスへ、単球及び好中球をそれぞれ投与した結果、肝臓全体における線維の元となるコラーゲン産生が単球投与群で有意に低下することが明らかになった。一方で好中球投与群では大きな変化は得られなかった。さらに、単球をサイトカインで刺激すると、MMP-13 の発現量が増えることがわかった。

【考案】本実験により、骨髄投与療法による治療効果には単球が寄与している可能性が示された。今後は投与する細胞数や、その回数、またサイトカイン等で刺激した単球の投与実験を行うなどして、治療効果の改善方法を検討していきたい。

共同研究者
榎本豊、田中稔、伊藤暢

A. 研究目的

ABM_i 法による肝硬変の治療効果を示す細胞種の候補としては、骨髄球系細胞が示唆されている。しかし、骨髄球系細胞は非常にヘテロな細胞集団であり、どの細胞種が肝硬変治療効果を示すかは特定されていない。今後 ABM_i 法による治療効果を高めたり、その治療メカニズムを明らかにしたりする上で、細胞種の特定は不可欠である。

そこでまず、フローサイトメーターにより、マウスの骨髄中に多く存在する細胞種を特定する。そして、各細胞種で線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現量の比較検討を行う。次に、実際に四塩化炭素を頻回投与して

肝線維化を誘導したマウスへ、各細胞種を投与し、治療効果の検討を行う。また、各細胞種をサイトカインで刺激することで、線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現変化を解析し、治療効果を高められるかどうかの検討を行う。

B. 研究方法

骨髄中に多く存在する細胞種を特定するため、フローサイトメーターを用いてマウスの骨髄中の細胞種の比率を解析した。次に各細胞種の mRNA から cDNA を作製し、線維を溶解すると考えられる MMP-8, 9, 13 の発現量、及び、炎症抑制性サイトカインである IL-10 の発現量を定量的 PCR により解析した。

四塩化炭素を週 2 回、4 週に渡って投与して肝線維化を誘導したマウスに、単球及び好中球をそれぞれ投与し、肝臓におけるコラーゲン遺伝子の産生量、及び線維化の程度を解析することで、治療効果を評価した。

さらに、単球を *in vitro* で M-CSF (10 ng/ml) 存在下で、IFN- γ (100 ng/ml)、あるいは IL-4 (20 ng/ml) で 24 時間刺激し、M1 様単球、M2 様単球へそれぞれ誘導し、線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現変化を定量的 PCR により解析した。

C. 研究結果

骨髄中の細胞種の特定

マウス骨髄中の細胞種を特定するため、フローサイトメトリー解析を行った結果、CD11b+/Ly-6G+の好中球が約 40%と最も多く存在し、続いて CD11b+/Ly-6C+の単球が約 15%存在することが明らかになった。骨髄中に多く存在するこれらの細胞が、線維化の改善に対して、何らかの機能を持つことが予想され、これらの細胞種に注目することにした。

線維化改善関連遺伝子の発現比較

好中球と単球間で線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子発現を比較解析した。その結果、線維を溶解すると考えられる MMP-8, 9, 13 の発現量は、単球より好中球の方が高いことがわかった。一方で炎症抑制性サイトカインである IL-10 の発現量は好中球より単球で高いことがわかった。このことから、好中球は繊維を溶解することで、単球は炎症を抑制することで線維化の改善に寄与することが予想された。

肝線維化マウスへの好中球、単球投与

四塩化炭素を頻回投与して肝線維化を誘導したマウスに、好中球及び単球をそれぞれ投与し、肝臓におけるコラーゲン遺伝子の産生量、及び線維化の程度を解析した。その結果、好中球投与群ではコラーゲン遺伝子の産生量、及び線維化の程度、共に大きな変化は得られなかった。しかし、単球投与群では、肝臓全体における線維の元となるコラーゲン産生が有意に低下することが明らかになった。

サイトカイン刺激による単球の性質変化

次に単球を *in vitro* で IFN- γ (100 ng/ml)、あるいは IL-4 (20 ng/ml) で 24 時間刺激したところ、MMP-13 の発現量が共に上昇することが明らかになった。また、若干ではあるが、IFN- γ 刺激により IL-10 の発現量も上昇することがわかった。今後、サイトカイン刺激により性質が変化した単球の投与実験を行う予定である。

D. 考 察

肝硬変の治療効果を示す細胞種を特定することは、ABMi 法による治療効果を高めたり、その治療メカニズムを明らかにしたりする上で不可欠である。本研究結果により、骨髄中の単球がとりわけ重要であることを示唆する結果が得られた。単球は好中球と比較して細胞の寿命も長く、近年では炎症の抑制にも働く細胞であると考えられており、治療効果を期待できる細胞種である。

また、単球はサイトカイン刺激により、その性質を大きく変化させる細胞種としても知られている。本研究において、IFN- γ や IL-4 によって、線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子群もそれらの発現量を変化させることが明らかになった。今後どのような性質の単球を投

与することが、最も良い治療効果に繋がるかを
解明していく。さらに、投与する細胞数やその
タイミングなど、様々な条件を検討し、よりよい
治療方法を模索していく。

E. 結 論

本研究により、骨髄中の単球が線維化の改
善に重要であることが示唆された。しかし、そ
の具体的なメカニズムの解明や、どのような方
法がよりよい治療効果を示すかは未だ明らか
になっていない。今後は、上記の点に留意し
て研究を進め、実際のヒトへの治療法の改善
につなげたい。

研究発表

1.論文発表

1. Komori T., Tanaka M., Senba E.,
Miyajima A. and Morikawa Y. Lack of
Oncostatin M receptor b leads to adipose
tissue inflammation and insulin
resistance by switching macrophage
phenotype. *J. Biol. Chem.* 288,
21861-21875, 2013.

2. Miyaoka Y. and Miyajima A. To divide
or not to divide: revisiting liver
regeneration. *Cell Division* 8, 8, 2013.

2.学会発表

1. 松田道隆、田中稔、中内啓光、宮島篤、
オンコスタチン M によるマウス肝線維化促
進機構の解析、第 86 回日本生化学会、横
浜、2013.

2. 西條栄子、松田道隆、榎本豊、田中稔、
宮島篤、肝線維化における肝臓 M2 様マク
ロファージの役割、第 20 回肝細胞研究会。
大阪、2013.

3. Yagai T, Tanaka M and Miyajima A,
Function of Semaphorin 3E in liver
fibrosis and regeneration. 第 20 回肝細
胞研究会。大阪、2013.

4. Miyajima A., Liver stem cells in
development and regeneration, Asia
Pacific Association of Study of Liver
Disease, Singapore, June 8, 2013

5. Omi A, Kiniwa T, Enomoto Y and Miyajima
A. Two subsets of mature mouse NK cells
based on the expression of Ly6C, 第 78
回 日本インターフェロン・サイトカイン学
会/ 第 21 回 マクロファージ分子細胞生物
学国際シンポジウム 合同学術集会, 東京、
2013.

6. Omi A, Kiniwa T, Enomoto Y and Miyajima
A. Expression of Ly6C defines two subsets
of mature mouse NK cells, 15th
International Congress of Immunology,
Milano, 2013.

7. Omi A, Kiniwa T, Enomoto Y, Miyajima
A. Expression of Ly6C defines two subsets
of mature NK cells, 第 42 回 日本免疫学
会学術集会, 幕張、2013.

8. 佐藤郁、田中稔、宮島篤, Role of
Oncostatin M in the bone marrow
microenvironment for hematopoiesis、日
本血液学会、札幌、2013.

9. 松田道隆 田中稔 宮島篤
Mechanism of liver fibrosis induced by
Oncostatin M, 第 20 回 肝細胞研究会, 大
阪、2013.

10. 田中稔、谷貝知樹、宮島篤、肝細胞死
から見た肝障害後の再生および線維化の制
御機構、第 86 回日本生化学会、横浜、2013.

11. Tanaka M., Komori T, Matsuda M, Morikawa Y and Miyajima A., Oncostatin M regulates the cross talk between insulin resistance and liver fibrosis by switching the M1/M2 activation of macrophages. International Symposium on Transcription and Metabolism. 淡路島、2013.

12. 谷貝 知樹、田中 稔、原田 憲一、中沼 安二、稲垣 冬樹、西條 栄子、宮島 篤. 胆管傷害および胆管癌における sterile alpha motif domain containing 5 の発現解析, 第 86 回日本生化学会大会, 横浜、2013.

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

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

「成体肝臓が内包する免疫非依存性異常細胞排除機構の発見とその解明」

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】肝臓内に障害・老化・形質転換した不適切な細胞が生じた場合、これら不適切な細胞を除去し肝臓の恒常性を保つ機構が存在すると考えられるが、その実体は不明である。我々は免疫系とは異なる異常細胞の排除機構が存在することを発見したので、この機構の解析を目的とした。

【方法】肝臓のサイズと肝がん抑制を制御する Hippo シグナル伝達経路とその標的分子 YAP に注目した。ROSA マウスや免疫不全 NOG マウス等の尾静脈から hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法でプラスミド DNA を導入し、活性型 YAP を発現誘導しモザイク状に異常肝細胞を誘導した。肝臓サイズの測定と共に誘導された異常肝細胞の運命を追跡した。

【成績】活性型 YAP を発現する異常肝細胞が、遺伝子導入後3〜7日で排除されることを見出した。免疫不全 NOG マウスでも同様の排除現象が観察されたことから、本現象は免疫非依存的な現象であることが判明した。

【考案】これまで老化した肝細胞が免疫系によって排除されることが報告されていたが、免疫非依存的な異常肝細胞の排除現象の報告はない。本現象は、肝臓が本来持つ恒常性維持機構だと推察される。本機構を高める方法は、新たな肝疾患に対する療法に繋がることが期待される。

A. 研究目的

自己骨髄細胞を用いた療法はその有効性が示されつつあるが、その作用点は複数あると考えられる。肝臓自身が持つ恒常性維持機構を高める作用もその一つであると考えられる。それ故、肝臓内に障害・老化・形質転換した不適切な細胞が生じた場合、これら不適切な細胞を除去し肝臓の恒常性を保つ機構を明らかにすることは重要である。

B. 研究方法

各種のヒトがんに器官サイズを制御する Hippo シグナル伝達経路および標的分子 YAP が関与することが国内外の研究者から報告されている。そこで活性化型 YAP をモザイク状に正常肝臓に導入することで、異常肝細胞を正常肝細胞集団の中に誘導した。モザイク発現を可能にする hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法を用いて、マウスの尾静脈からプラスミド DNA を導入した。野生型 B6 マウスや免疫不全マウス NOG マウス、細胞運命を追跡可能な ROSA マウスを用いて、異常肝細胞の運命を解析した。

ウス、細胞運命を追跡可能な ROSA マウスを用いて、異常肝細胞の運命を解析した。

C. 研究結果

活性型 YAP を発現する異常肝細胞が、免疫系の有無に関わらず、遺伝子導入後7日以内に排除されることを見出した。細胞死による排除ではなく、管腔側への突き出しが原因であった。興味深いことに、抜けた空間を埋めるように代償性増殖も観察された。

D. 考察

本研究で、免疫依存性の異常細胞排除機構に加えて、免疫非依存性の異常細胞排除機構が存在することが明らかになった。本現象は、肝臓が本来持つ恒常性維持機構だと推察される。本機構を高める方法は、新たな肝疾患に対する療法に繋がることを期待される。自己骨髄細胞を用いた療法の有効性の一端はこの機構の能力向上であるかを検討することは今後の重要な課題であると考えられる。

E. 結 論

成体肝臓が内包する免疫非依存性異常細胞排除機構を発見した。正常肝細胞集団の中に異常な肝細胞が生じると作動する恒常性維持機構と考えられる。本機構に関与する分子機構の解明が期待される。

研究発表

1.論文発表

- 1.Asaoka Y, Terai S, Sakaida I, Nishina H. The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dis Model Mech.* 2014; 6: 905-14.
- 2.Oudhoff MJ, Freeman SA, Couzens AL, Antignano F, Kuznetsova E, Min PH, Northrop JP, Lehnertz B, Barsyte-Lovejoy D, Vedadi M, Arrowsmith CH, Nishina H, Gold MR, Rossi FM, Gingras AC, Zaph C. Control of the Hippo pathway by Set7-dependent methylation of Yap. *Dev. Cell* 2013; 26: 188-94.
- 3.Arima N, Uchida Y, Yu R, Nakayama K, Nishina H. Acetylcholine Receptors Regulate Gene Expression that Is Essential for Primitive Streak Formation in Murine Embryoid Bodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 435: 447-53.

2.学会発表

1. Hiroshi Nishina ; A novel mouse model of oncogene yap-dependent abnormal hepatocyte disappearance. [The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells, Osaka, September 26-27, 2013]
2. Shoji Hata, Yutaka Hata and Hiroshi Nishina; A novel acetylation cycle of YAP is triggered to S_N2 alkylating agentnts [Keystone Symposia on

The Hippo Tumor Suppressor Network, Monterey USA, May 19-23, 2013]

3. Norio Miyamura and Hiroshi Nishina; A novel mouse model of oncogene yap-dependent abnormal hepatocyte disappearance [Keystone Symposia on The Hippo Tumor Suppressor Network, Monterey USA, May 19-23, 2013]

国内学会発表

1. 仁科博史 ; 異常肝細胞排除現象の発見と機構解明 [第 19 回日本肝臓医生物学研究会 ; 2013 年 11 月 30 日 / 札幌]
2. 仁科博史 ; Roles of Hippo signaling pathway in murine liver [第 86 回日本生化学会大会;2013 年 9 月 11-13 日 / 横浜]
3. 仁科博史 ; 細胞の生死を制御する JNK シグナル伝達系の新規生理機能の解明 [第 22 回日本 Cell Death 学会;2013 年 7 月 19-20 日 / 京都]
4. 仁科博史 ; 肝臓のサイズとがん発症を制御する Hippo シグナル伝達系 [日本生化学会関東支部例会;2013 年 6 月 15 日 / 山梨]
5. 仁科博史 ; ストレス応答性 MKK の生化学・生理機能の解明 [新潟大学医歯学系分子細胞機能学セミナー;2013 年 3 月 4 日 / 新潟]

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 分子内分泌代謝学分野 職名：教授

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・進展に関与する。我々はメラノコルチン 4 型受容体 (MC4R) 欠損マウスを用いて、新規 NASH モデルを確立し、NASH の肝臓において肝細胞をマクロファージが取り囲む特徴的な構造 (hCLS: hepatic Crown-like structure) を見いだした。本研究では NASH の病態形成における hCLS の意義を検討した。

【方法・成績】

MC4R 欠損マウスの肝臓を用いて経時的な解析を行ったところ、線維化形成や α SMA 陽性筋線維芽細胞の出現に先立って hCLS の増加が認められた。また、連続切片を用いた免疫染色では、hCLS の近傍に α SMA 陽性筋線維芽細胞やコラーゲン沈着が認められた。クロドロネートリポソーム法によりマクロファージを消去すると、単純性脂肪肝を呈する野生型マウスではマクロファージが効率的に消失し、炎症・線維化マーカーの発現が低下した。一方、NASH を発症した MC4R 欠損マウスでは hCLS 特異的にマクロファージが残存し、炎症・線維化マーカーの発現には変化がなかった。ヒト NAFLD/NASH においても hCLS を認め、ウイルス性肝炎ではほとんど認められなかった。また、hCLS 数は肝細胞障害の指標である肝細胞風船様変性のスコアと正の相関が認められた。

【考案】

hCLS は NASH の病勢を反映する病理組織マーカーであると考えられ、炎症・線維化の中心として単純性脂肪肝から肝線維化への進展に重要な役割を果たすことが示唆された。

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、その中で非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH: non-alcoholic steatohepatitis) は高率に肝硬変や肝細胞癌に進展する重症型として注目されている。予防的施策や治療法の開発によってウイルス性肝炎に起因する肝硬変・肝癌が減少傾向にあるのに対し、近年の肥満人口の増加を背景として、今後、NASH に起因する肝硬変・肝癌の増加が予測される。しかしながら、単純性脂肪肝から NASH に進展する分子機構には不明な点が多く、確定診断に肝生検が必要なことや、有効な治療法が確

立していないことが臨床的に問題となっている。

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。しかしながら、肥満を背景として NASH から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、その詳細は不明である。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)。昨年度ま

で NASH 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組織像 (hCLS: hepatic crown-like structure) が多数認められ、hCLS 数は肝線維化面積と正の相関を示すことを見いだしている。本年度は、hCLS と線維化の関連をより詳細に検討し、さらにマウスモデルにより得られた知見をヒト NAFLD/NASH 症例においても検証した。

B. 研究方法

1. マウスモデルにおけるマクロファージの分布変化と線維化

経時的に採取した MC4R 欠損マウスの肝臓切片を用いて Sirius red 染色および F4/80 免疫染色を行った。また、線維化変化の評価をするため、タイプ 1 コラーゲン、 α SMA 免疫染色を行った。

2. 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する。脂質フィルムにクロドロネート溶液を加え、Extruder (Avanti 社) を用いて 400 μ m のメッシュを通す。10000 x g, 4°C, 15min 遠心し、パスト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 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。

3. ヒト肝組織の組織学的解析

ヒト NAFLD/NASH および慢性ウイルス性肝炎患者の肝臓を用いて CD68 染色を行い、

一切片あたりの hCLS 数をカウントした。脂肪肝・炎症性変化・風船様変性のスコアは各症例のカルテより抽出した。

C. 研究結果

1. マウスモデルにおけるマクロファージの分布変化と線維化

MC4R 欠損マウスを経時的に解析したところ、高脂肪食負荷 20 週目において肝線維化が顕在化し、負荷 8 週目から α SMA 陽性筋線維芽細胞が認められるが、hCLS はこれらの変化に先立って、負荷 4 週目から徐々に増加していた (図 1)。連続切片を用いた免疫染色により、hCLS の近傍には α SMA 陽性筋線維芽細胞やコラーゲン沈着が認められた (図 2)。

2. マクロファージ消去実験

クロドロネートリポソーム法によりマクロファージを消去すると、野生型マウス (単純性脂肪肝) では効率よくマクロファージが消失し、炎症・線維化マーカーの発現が著明に減少した (図 3)。一方、MC4R 欠損マウス (NASH) では hCLS を構成するマクロファージが特異的に残存し、炎症・線維化マーカーの発現は変化しなかった (図 4)。

3. ヒト肝組織の組織学的解析

ヒト NAFLD/NASH 肝組織においても hCLS が認められたが、ウイルス性肝炎ではほとんど検出されなかった (図 5)。また、hCLS 数は肝細胞障害の指標である肝細胞風船様変性のスコアと正の相関が認められた (図 5)。

D. 考察

肥満の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んで処理をする CLS がよく知られており、肥満脂肪組織における慢性炎症や全身のインスリン抵抗