

性との関連が示唆されている。今回、我々は新規マウスモデルを用いて NASH に特徴的な病理組織像である hCLS を見いだした。脂肪組織 CLS と同様に hCLS は細胞死に陥った肝細胞を処理する像であると考えられ、実際、ヒト NAFLD/NASH 肝組織の検討では肝細胞障害の指標である風船様変性のスコアと正の相関が認められている。肝細胞障害・細胞死は NASH の特徴であり、その処理過程で hCLS が形成され、炎症・線維化の起点となって NASH の病態形成に関与することが示唆される。hCLS の形成機序や機能的変化には不明な点も多いが、hCLS の詳細を明らかにすることで、これまで原因が不明であった NASH の発症機序を解明する重要な手がかりとなり、新規バイオマーカーの探索や新しい治療法の開発に繋がると期待される。

E. 結 論

hCLS は線維化発症に先立って出現し、その周辺には α SMA 陽性筋線芽細胞やコラーゲンの沈着が認められた。クロドロネートリポソームを用いた検討により、hCLS は炎症・線維化促進因子のソースであることが示唆された。ヒト NAFLD/NASH 肝組織においても hCLS が認められ、肝細胞風船様変性のスコアと正の相関を認めた。hCLS の詳細を明らかにすることで NASH の病態理解が深まるものと考えられる。

研究発表

1.論文発表

1. Y. Iwasaki, T. Suganami, R. Hachiya, I. Shirakawa, M. Kim-Saijo, M. Tanaka, M. Hamaguchi, T. Takai-Igarashi, M. Nakai,

Y. Miyamoto, Y. Ogawa. Activating transcription factor 4 links metabolic stress to interleukin-6 expression in macrophages. *Diabetes* 63: 152-151, 2014.

1. M. Itoh, H. Kato, T. Suganami, K. Konuma, Y. Marumoto, S. Terai, H. Sakugawa, S. Kanai, M. Hamaguchi, T. Fukaiishi, S. Aoe, K. Akiyoshi, Y. Komohara, M. Takeya, I. Sakaida, Y. Ogawa. Hepatic crown-like structure: a unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans. *PLoS One* 8: e82163, 2013.

2.学会発表

1. 伊藤美智子、菅波孝祥、小沼邦葉、丸本芳雄、寺井崇二、坂井田功、小川佳宏：NASH の病勢を反映する病理組織マーカー：hepatic crown-like structure の意義：第 28 回日本糖尿病・肥満動物学会、宮崎、2014/2/14

2. 伊藤美智子、菅波孝祥、小沼邦葉、丸本芳雄、寺井崇二、佐久川廣、坂井田功、小川佳宏：NASH 発症における hepatic crown-like structure の意義：第 34 回日本肥満学会、東京、2013/10/12

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

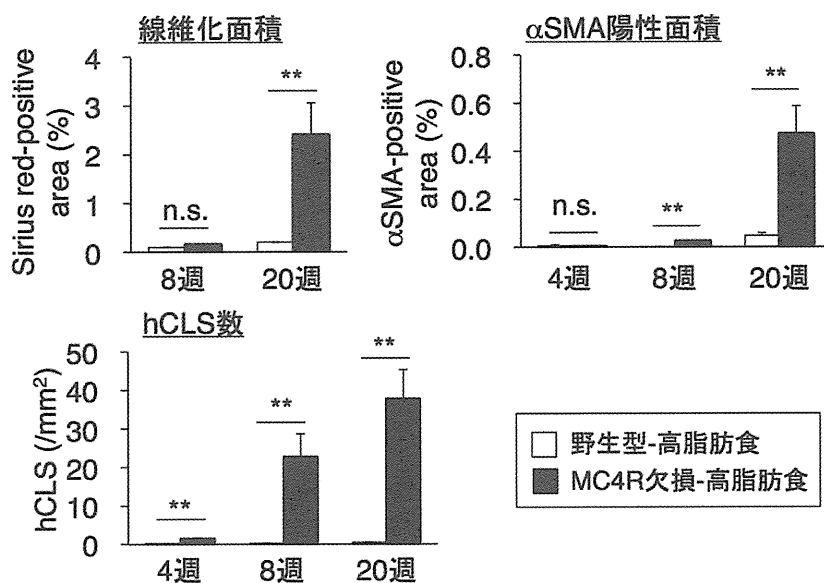
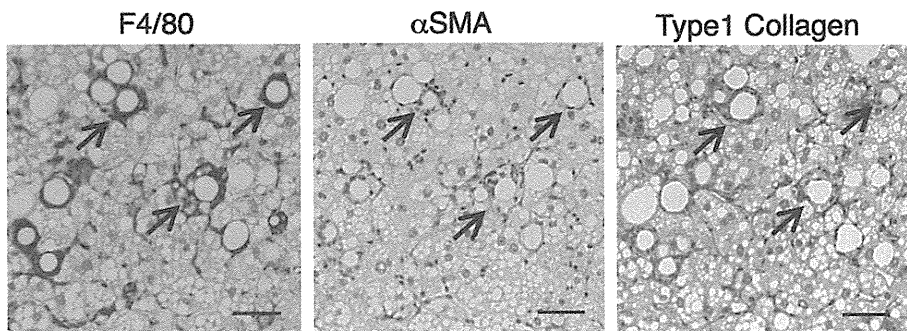


図1. hCLS出現の経時変化

MC4R欠損マウス-高脂肪食20週間



Scale bars: 50µm
矢印: hCLS

図2. 肝連続切片を用いた免疫染色

野生型マウス-高脂肪食 (20週) - 単純性脂肪肝

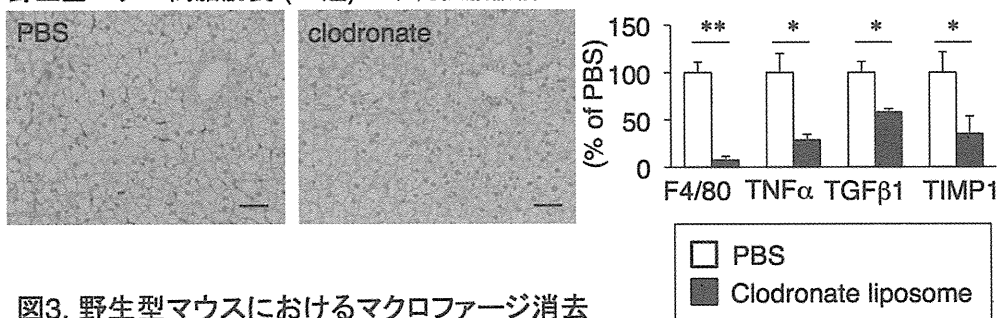


図3. 野生型マウスにおけるマクロファージ消去

MC4R欠損マウス-高脂肪食 (20週) - NASH

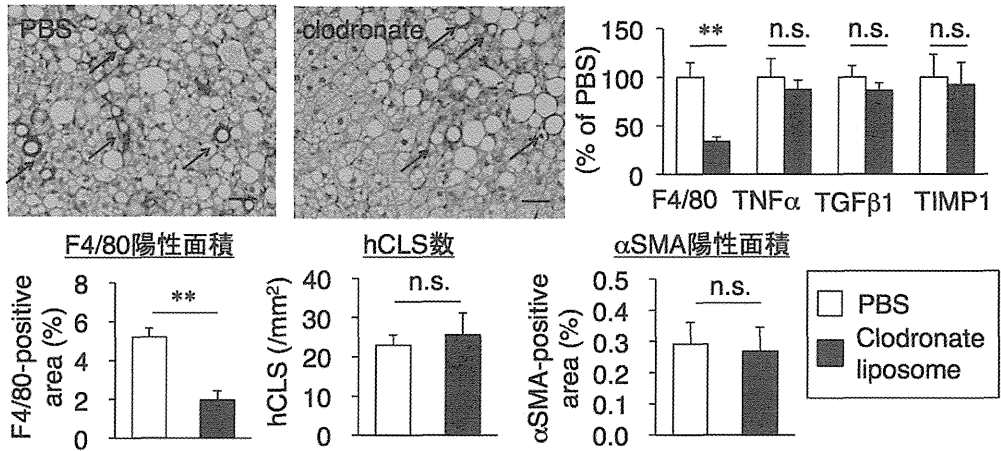


図4. MC4R欠損マウスにおけるマクロファージ消去

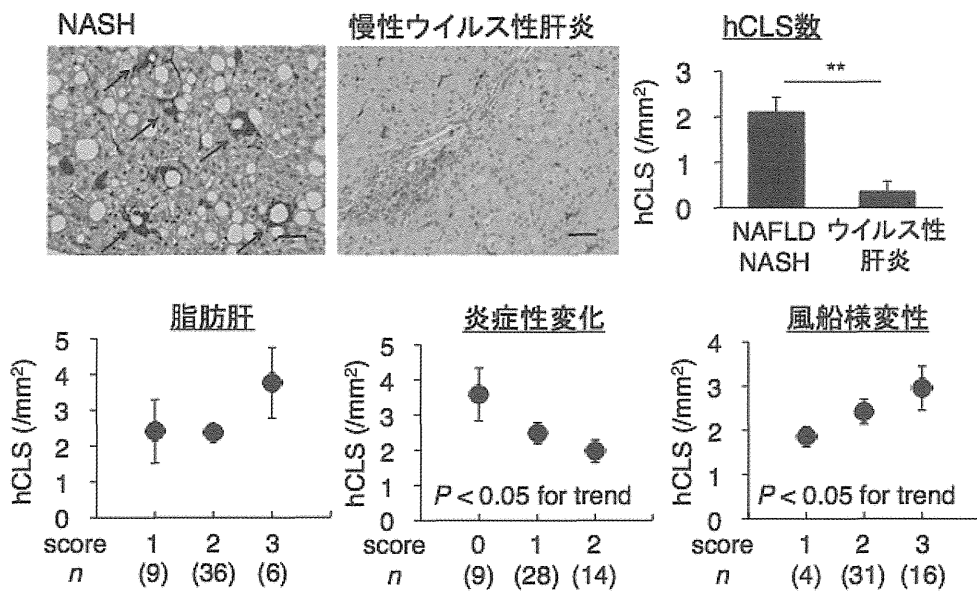


図5. ヒトNAFLD/NASHにおけるhCLS

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炎の進行に伴う肝硬変や肝細胞癌の発生が高頻度にみられ、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投与療法の実効性を目的として、骨髄中に存在する造血幹細胞と、新たな間葉系幹細胞分画(P α S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】骨髄から分離された直後と継代培養を経た P α S 細胞におけるコラーゲンと MMP 産生を、Real time RT-PCR を用いて定量解析した。また、血球系細胞もしくは P α S 細胞 (1x10E4 個/匹) を四塩化炭素の反復投与により作製した肝線維症マウスの脾臓内に投与し、移植細胞の線維肝組織への生着と抗線維化効果について検討した。

【成績】P α S 細胞における I 型コラーゲン遺伝子発現は、全骨髄細胞の約 100 倍と高く、NIH3T3 細胞とほぼ同等であった。一方、MMP-9 遺伝子の発現量は全骨髄細胞の 4 分の 1 以下と少ないのに対して、MMP-13 遺伝子発現は数千倍と著しい発現の亢進を認めた。P α S 細胞の継代培養に伴って、I 型コラーゲン遺伝子の発現はほぼ不変であったが、MMP-9 および MMP-13 遺伝子の発現は著しく低下した。脾臓内投与された P α S 細胞は、移植後1ヶ月の時点において線維肝組織への生着は認められず、抗線維化効果も全血球系細胞もしくは単球系細胞を移植した場合と同等であった。

【考案】今回の検討結果からは、移植に必要充分数の P α S 細胞を得るための継代培養を行った際にも、MMP-13 発現が低下しないための対策が急務である。また、これが難しい場合には、間葉系幹細胞に再生促進遺伝子を外来的に導入し、これを増殖させた上で肝線維症マウスに投与する、新たな治療法開発の取り組みが必要と考えられた。

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、線維化の進展とともに肝硬変から肝癌を合併する非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の対策が重要となっている。進行した肝硬変症例に対しては肝移植が唯一の治療法だが、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し、肝移植に代わる新たな治療法を確立することは、臨床的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投与が積極的に試みられている。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、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系譜が不明な点にある。

今年度は、骨髄の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分画(P α S細胞)のI型コラーゲンおよびMatrix metalloproteinases (MMP)発現について検討を行うとともに、実験的肝線維症マウスに投与した際の抗線維化効果を検証した。

B.研究方法

(1) 骨髄造血幹細胞および間葉系幹細胞の

分離と培養

C57BL/6 マウスの骨髄から、Fluorescence-activated cell sorter (FACS) を用いて骨髄の造血幹細胞分画である 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⁻ PDGFRα⁺ Sca1⁺ (PαS)細胞を採取した。後者の一部を 10 % ウシ胎仔血清を含む DMEM 培地を用いた初代培養に供し、継代を行った。

(2) 34KSL ならびに PαS 細胞の発現形質

全骨髄細胞ならびに上記の両幹細胞から RNA を抽出して、Real time RT-PCR を用いて I 型コラーゲンα2 鎖遺伝子(*Col1a2*)ならびに *MMP-13*, *MMP-9*, *MMP-2* の各 MMP 遺伝子について、その発現を定量解析した。対照として、継代を重ねた市販のマウス骨髄間葉系幹細胞(MSC)と、マウス胎仔線維芽細胞 NIH3T3 を用いた。

(3) 実験的肝線維症の作製と骨髄細胞の投与

C57BL/6 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。このマウスの脾臓内に、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の骨髄から分離した 1 x 10⁵ 個/匹の全血球系細胞(CD45⁺ Ter119⁺)、あるいは 1x10⁴ 個/匹の単球系細胞(CD11b⁺ Gr1⁺)もしくは PαS 細胞のいずれかを投与した。

(4) 線維肝組織へ生着した細胞の局在と分化動態の解析

細胞投与1ヶ月後に肝臓を摘出し、線維肝組織中の EGFP 陽性細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察するとともに、線維化の程度を Sirius red 染色により評価した。

C. 研究結果

(1) PαS 細胞におけるコラーゲンおよび MMP の遺伝子発現

PαS 細胞における *Col1a2* 遺伝子発現は、全骨髄細胞の約 100 倍と高く、NIH3T3 細胞とほぼ同等であった。一方、*MMP-9* 遺伝子の発現量は全骨髄細胞の 4 分の 1 以下と少ないのに対して、*MMP-13* 遺伝子の発現は数千倍と著しい亢進を認めた。PαS 細胞の継代培養に伴い、*Col1a2* 遺伝子の発現はほぼ不変であったが、*MMP-9* および *MMP-13* 遺伝子の発現は著しく低下した(図1)。

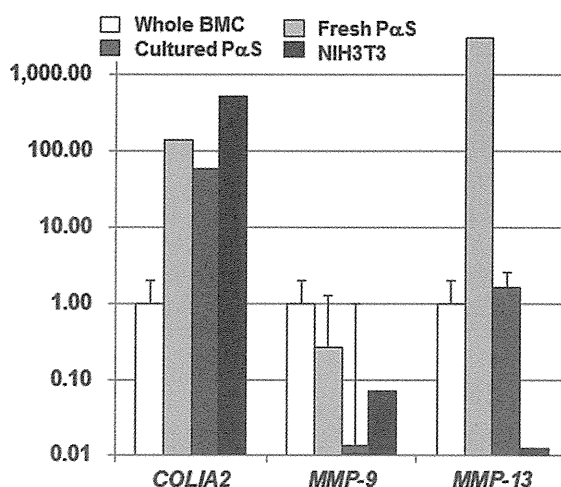


図1. 骨髄細胞におけるコラーゲンおよび MMP の遺伝子発現

一方、骨髄造血幹細胞(34KSL)においては、これら *Col1a2* や *MMP* 遺伝子の発現は、ほとんど認められなかった。

(2) 移植 PαS 細胞の線維肝組織への生着と抗線維化効果

移植1ヶ月後にマウスを犠牲死させて、線維肝組織への EGFP 陽性細胞の生着と、線維化の程度を評価した。その結果、全血球系細胞(CD45⁺ Ter119⁺)、単球系細胞(CD11b⁺ Gr1⁺)、PαS 細胞のいずれを投与した場合においても、移植細胞の線維肝組織への生着は認められ

なかった。また、抗線維化効果についても3群間で同等であった(図2)。

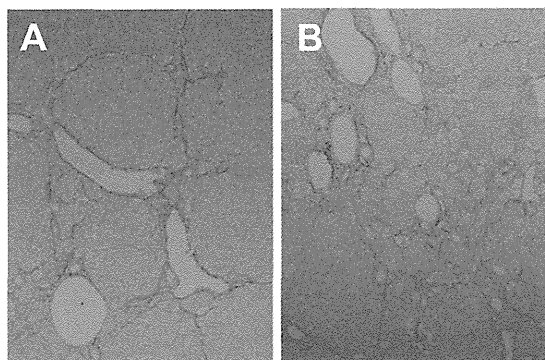


図2. 単球系細胞(CD11b⁺ Gr1⁺, 図 A)およびPαS 細胞(図B)を投与したマウスの肝線維化所見(シリウスレッド染色)

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 of 功罪については未だ結論が得られていない。

我々の昨年度の研究では、EGFP で個別に標識した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(PαS 細胞)を野生型マウスに移植して骨髄を置換した上で、四塩化炭素の反復投与を行った。その結果、多数の血球系細胞が線維肝組織に流入・生着したのに対して、間葉系幹細胞の肝組織への生着は認められなかった。これらの所見は、

線維化刺激により骨髄から動員された間葉系幹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という懸念を払拭した。しかしながら、骨髄間葉系幹細胞自体の形質発現、とりわけそのコラーゲンや MMP 産生能はこれまで検討されておらず、肝線維症マウスに外来的に投与した場合の功罪も不明であった。

今年度の検討により、骨髄間葉系幹細胞として近年新たに分離・同定された PαS 細胞が NIH3T3 細胞と同程度の I 型コラーゲン遺伝子を発現していることが明らかになったが、さらに重要な知見として PαS 細胞は全骨髄細胞と比較しても数千倍にも及ぶ *MMP-13* 遺伝子を発現していた。*MMP-13* は、マウスやラットなどの齧歯類において I 型コラーゲンを分解する主要な間質性コラゲナーゼとされている。我々は以前に、四塩化炭素の反復投与による実験的肝線維症の回復期において骨髄から線維肝組織へと動員・生着した未分化な血球系前駆細胞が *MMP-13* を発現することで肝線維化改善に寄与することを報告した。今回の知見は、PαS 細胞がこれをはるかに凌ぐ *MMP-13* を発現していることを初めて明らかに、同細胞を用いた抗線維化治療法の可能性を示した。

しかしながら、PαS 細胞は骨髄中非血球系細胞全体の 1%未満に過ぎず、肝線維症マウスに投与できる細胞数はきわめて限られている。したがって、これを培養することで移植に十分な細胞数を得ようと試みたが、継代した同細胞では *MMP-13* 遺伝子は千分の 1 以下、*MMP-9* 遺伝子の発現量も約 10 分の 1 に減少した(図 1)。肝線維症マウスへの移植実験において、*MMP-13* 遺伝子を発現していない単球系細胞を投与した場合とほぼ同等の抗線維化効果にとどまった(図 2)のは、投与細胞数(1x10E4 個/匹)という細胞数の少なさが主たる原因と推測

され、十分な細胞数と発現形質を維持するにはさらなる工夫が必要と考えられた。

E. 結 論

P α S 細胞は、著しく多量の *MMP-13* 遺伝子を発現しており、難治性肝硬変症例に対する細胞治療法において有力な細胞ソースとなることが期待できる。その臨床的確立に向けては、移植に必要充分数の P α S 細胞を得るための継代培養を行った際にも *MMP-13* 発現が低下しないための対策が急務であると考えられた。

F. 研究発表

1.論文発表

1. Tsukui T, Ueha S, Abe J, Hashimoto S, Shichino S, Shimaoka T, Shand FHW, Arakawa Y, Oshima K, Hattori M, Inagaki Y, Tomura M, and Matsushima K: Qualitative rather than quantitative changes are hallmarks of fibroblasts in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 183: 758-773, 2013
2. Li X, Bian Y, Takizawa Y, Hashimoto T, Ikoma T, Tanaka J, Kitamura N, Inagaki Y, Komada M, and Tanaka T: ERK-dependent downregulation of Skp2 reduces Myc activity with HGF, leading to inhibition of cell proliferation through a decrease in Id1 expression. *Mol Cancer Res* 11: 1437-1447, 2013
3. Reyes-Gordillo K, Shah R, Arellanes-Robledo J, Hernández-Nazara Z, Rincón-Sánchez AR, Inagaki Y, Rojkind M, and Lakshman MR: Mechanisms of action of acetaldehyde in the up regulation of the human α 2(I) collagen gene in hepatic stellate

cells – key roles of Ski, SMAD3, SMAD4 and SMAD7. *Am J Pathol* 2014 (in press)

4. Yamaoka H, Sumiyoshi H, Higashi K, Nakao S, Minakawa K, Sumida K, Saito K, Ikoma N, Mabuchi T, Ozawa A, and Inagaki Y: A novel small compound accelerates dermal wound healing by modifying infiltration, proliferation and migration of distinct cellular components in mice. *J Dermatol Sci* 2014 (in press)
5. 住吉秀明、稲垣 豊: マウス皮膚創傷治癒モデルにおける筋膜由来線維芽細胞と希少コラーゲンのはたらき. *食品加工技術* Vol.33(No.3): 124-130, 2013
6. 稲垣 豊、茂呂 忠、住吉秀明: 肝線維化改善の分子・細胞基盤. *肝胆膵* 2014(印刷中)
7. Okazaki I, Noro T, Yamanouchi E, Kuroda H, Nakano M, Yokomori H, and Inagaki Y: Fibrogenesis and carcinogenesis in NASH: Role of MMPs and TIMPs. *Cancers* 2014 (in press)

2.学会発表

1. 住吉秀明、三上健一郎、茂呂 忠、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前駆細胞動員の制御機構. 第 49 回日本肝臓学会総会、2013 年 6 月 6 日、東京
2. 住吉秀明、山岡華児、中尾祥絵、生駒憲広、馬淵智生、小澤 明、東 清史、斎藤幸一、稲垣 豊: 新規低分子化合物 HSc025 は細胞増殖と遊走を活性化して創傷治癒を促す. 第 45 回日本結合組織学会学術大会・第 60 回マトリックス研究会大会合同学術大会、2013 年 6 月 28 日、和歌山
3. 中尾祥絵、茂呂 忠、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 45 回日本結合組織学会学術大会・第 60 回マトリックス研究会大会合同学術大会、2013 年 6 月 28 日、和歌山

4. 茂呂 忠、中尾祥絵、住吉秀明、宮沢正樹、石井恭正、石井直明、稲垣 豊: ミトコンドリア由来活性酸素惹起モデルマウスを用いた酸化ストレスによる肝線維化促進機序の解明. 第 45 回日本結合組織学会学術大会・第 60 回マトリックス研究会大会合同学術大会、2013 年 6 月 28 日、和歌山
5. Moro T, Nakao S, Sumiyoshi H, Ishii T, Miyazawa M, Ishii N, Inagaki Y: Mitochondrial oxidative stress exacerbates inflammation and subsequent fibrogenesis in high fat diet-induced murine hepatic steatosis. 17th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid, 2013.9.25, Osaka, Japan
6. Sumiyoshi Hi, Fukumitsu H, Higashiyama R, Nakao S, Minakawa K, Sueoka M, Chikada H, Kamiya A, Higashi K, Saito K, Inagaki Y: Identification of a novel bone marrow cell-derived factor that suppresses fibrogenesis and accelerates regeneration of murine fibrotic liver. The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells, 2013.9.27, Osaka, Japan
7. Moro T, Nakao S, Sumiyoshi H, Ishii T, Miyazawa M, Ishii N, Inagaki Y: Direct contribution of mitochondrial oxidative stress to hepatic fibrogenesis. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2013. 11. 3, Washington DC
8. 住吉秀明、山岡華児、中尾祥絵、生駒憲広、馬淵智生、小澤 明、東 清史、斎藤幸

一、稲垣 豊: Pirin 誘導低分子化合物 Hsc025 は細胞増殖と遊走を活性化して創傷治癒を促す. 第 13 回日本再生医療学会総会、2014 年 3 月 5 日、京都

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】

培養した ASC を NASH 肝硬変モデルマウスに 10 万個門脈から投与すると一部に梗塞像が認められたが、へパリンの併用と培養液に FGF2 を添加することで細胞のサイズを減少させることができ、30 万個の移植が可能になった。細胞投与群では2週間後に肝臓内に投与細胞が存在し、一部の細胞は肝細胞と融合している像が認められた。ASC を CD105 陽性細胞と陰性細胞に分けて投与したが、生着率に差は認められなかった。

【考案】

培養細胞の投与においては細胞のサイズが投与後の梗塞によるダメージに関係することが示唆された。以前の研究において ASC は炎症部へのホーミング能力があまり高くない可能性が示唆されたので、門脈からの細胞注入によって直接肝臓への細胞供給をふやすことができた。細胞投与群で一部線維化の改善傾向が認められたが、対照群と比較して有意差が認められるほどではないため、効果の判定にはさらなる検討が必要と思われた。

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投与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投与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 2-3 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% type I 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ものを SVF(stromal vascular fraction)とした。

細胞培養

SVF を control medium または FGF2(塩基性線維芽細胞増殖因子:10ng/ml)を添加したもので 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。

ASC の表面マーカーの検索

ASC の初代培養から各継代ごとに CD105 の発現を FACS(fluorescent activated cell sorting)によって検討した。

肝硬変モデルマウスの作製と移植実験

C57BL/6 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3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 $1-3 \times 10^5$ 個を回盲部の腸間膜静脈から門脈に注入した。また ASC を磁気ビーズを使って CD105 陽性細胞と陰性細胞に分け、 $1-3 \times 10^5$ 個を投与した。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、細胞投与をしなかった群と比較検討した。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

ASC の表面マーカーの検索 (CD105)

ASC において CD105 の発現を FACS にて解析すると下図1のごとく、陽性細胞が初代培養で 32.8%、P3 で 48.1%程度存在した。

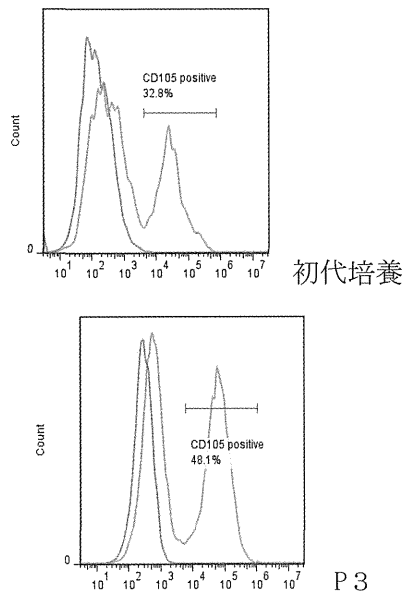


図1

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ヶ月目に Sirius red 染色にて組織学的に線維化を確認した。

NASH モデルへの投与実験

培養した ASC10 万個を門脈から投与すると肉眼的に肝臓に梗塞像が認められた。投与時にヘパリンを添加すると梗塞像が減少した。さらに ASC の培養液に FGF2 を添加すると細胞が小型化し、30 万個の投与が可能になった。

下図 2 に投与後 2 週間の組織像を示す。GFP 陽性細胞が赤く染まっており、投与細胞の生着が認められ、一部の細胞は肝細胞と融合していた。

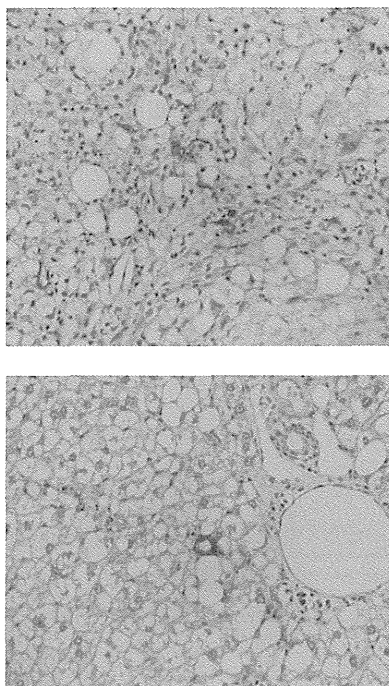


図2

ASC を CD105 陽性細胞と陰性細胞とに分けて、それぞれ移植したところ、両者において細胞の生着率に差は認められなかった。

D. 考 察

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、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 万個をこえると梗塞をおこして肝臓に大きなダメージを与えることが判明したので、投与時にヘパリンを添加することで、梗塞巣を減少させることができた。さらに培養すると細胞のサイズが大きくなるため、より梗塞をおこしやすくなると考えられたため、培養液に FGF2 を添加することで、細胞の小型化がみられ、移植細胞数を増加させることができた。

CD105 は多能性幹細胞マーカーになりうるとの報告がなされたため、ASC で検討したところ、陽性細胞と陰性細胞の数はほぼ同数であった。別の研究で ASC をそれぞれ障害を与えた筋肉へ投与したところ、陰性細胞の方が筋細胞との融合が多く見られたので、肝臓での検討を試みた。肝臓においては明らかに陽性細胞と陰性細胞とで肝細胞との融合率に差は認められなかった。移植細胞は肝臓に生着していても、必ずしも肝細胞と融合する訳ではないこと、脂肪を多く含んだ肝細胞と筋細胞では、細胞の挙動が異なることなどが原因として示唆された。

高脂肪食投与による NASH モデルを作成した所、3ヶ月後には組織学的に線維化を認めた。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で一部改善がみられる部位が存在したが、全体としてみると対照群と有意差はみとめられず、今後さらなる検討が必要であると思われた。

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門脈経由で投与すると、生着がみられ、一部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

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性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、骨髄細胞群とともに、肝再生療法への応用が期待されている。非アルコール性脂肪性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投与による肝再生療法の効果、機序の解析を行った。

【方法】動脈硬化高脂肪食給餌により、非アルコール性脂肪性肝炎による肝硬変マウスモデルを作成した。脂肪組織由来間質細胞を GFP トランスジェニックマウスの皮下脂肪組織より分離、培養継代した。肝硬変マウスに対して、脂肪組織由来間質細胞を経脾的に投与し、肝組織、肝実質細胞、肝内炎症細胞について、免疫染色、遺伝子発現解析による検討を行った。

【成績】投与した脂肪組織由来間質細胞は、投与14日間生着、また、肝内生着部位のアルブミン発現の増強が示唆された。脂肪組織由来間質細胞を投与した肝硬変マウスにおいて、肝実質細胞のアルブミン発現、 α -フェトプロテイン発現の亢進、肝組織における α -SMA陽性細胞の減少、肝線維化の改善が確認された。脂肪組織由来間質細胞を投与した肝硬変マウスの肝組織の遺伝子解析により、発現が减弱した遺伝子は肝内の炎症、免疫応答に、亢進した遺伝子は、発生、分化に関連することが示された。肝内炎症細胞の遺伝子発現解析により、脂肪組織由来間質細胞を投与により発現が减弱した遺伝子は、Gr-1陽性細胞、Mac-1陽性細胞、Th1、Th2、Th17細胞への関連が示唆された。

【考案】肝硬変マウスモデルに対して、脂肪組織由来間質細胞の投与による肝機能改善効果、線維化改善効果および、抗炎症効果が示された。肝硬変に対する脂肪組織由来間質細胞投与による肝再生修復療法の可能性が示唆された。

A.研究目的

肝硬変は、慢性肝炎の終末像であり、肝不全へと進展する重篤な状態である。肝不全へと進展する肝硬変に対する根治的な治療法は、肝移植のみであり、代替となる治療法の開発が望まれている。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、骨髄細胞群とともに、肝再生療法への応用が期待されている。本研究では、非アルコール性脂肪性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投与による肝再生修復効果の検討を行った。

B.研究方法

C57BL/6 マウスに対して、動脈硬化高脂肪食を32週～40週投与して肝硬変マウスを作成した。脂肪組織由来間質細胞は、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、継代し獲得した。肝硬変状態のマウスに対して、 1×10^5 個の脂肪組織由来間質細胞を経脾的に、分布に関する検討では1回、その他の検討では隔週にて2回投与した。投与後、1週、2週後においてそれぞれ肝組織、肝実質細胞、肝内炎症細胞を採取した。採取した組織、細胞より RNA を抽出し、リアルタイム定量 PCR、DNA マイクロアレイにより遺伝子発現を解析した。また、採取した肝組織について免疫組織学的検討を行った。

C. 研究結果

肝組織の免疫染色によって、肝硬変マウスに投与した GFP 発現脂肪組織由来間質細胞の肝内への生着を14日間確認し、生着部位のアルブミン発現増強が確認された。脂肪組織由来間質細胞を投与した肝硬変マウスにおいて、肝実質細胞のアルブミン遺伝子発現、 α -フェトプロテイン発現が PBS 投与群と比較し、有意に上昇した。また、肝内 α -SMA 陽性細胞数が投与後1週後より有意に減少し、肝線維化面積は、2週後有意に減少していることが、AZAN 染色、IV 型コラーゲン染色にて確認された。肝組織の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現によって、脂肪組織由来間質細胞投与により発現変化が生じた 1249 遺伝子に関する階層クラスタリングで、細胞投与群とコントロール群に判別され、細胞投与により発現が亢進した 797 遺伝子は細胞骨格、発生に関連し、発現が減弱した 452 遺伝子は、炎症、免疫応答に関連した。また、肝内炎症細胞の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析によって、フィルタを通過した 5065 遺伝子の発現の階層クラスタリング解析で細胞投与群とコントロール群が判別され、細胞投与により発現が減弱した 658 遺伝子について、NCBI より公開されている造血系細胞、ヘルパー T 細胞の遺伝子発現データと比較したところ、Gr-1 陽性細胞、Mac1 陽性細胞、Th1、Th2、Th17 細胞に主に関連することが示され、これらの細胞が治療標的であることが示唆された。

D. 考察

非アルコール性脂肪性肝炎により進展した肝硬変マウスモデルに対して、脂肪組織由来間質細胞投与が再生修復効果を有することが示された。肝内炎症に対しては、ミエロイド系、活性化 CD4⁺T 細胞に対する抑制効果を有する

ことが示され、肝再生修復効果の機序の一つであることが示唆された。

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再生修復効果、機序に関する知見が得られた。

研究発表

1.論文発表

1. Higashimoto M, Sakai Y, Takamura M, Usui S, Nasti A, Yoshida K, Seki A, Komura T, Honda M, Wada T, Furuichi K, Ochiya T, Kaneko S. Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4⁺T-cell suppression. Eur J Immunol. 2013 Nov;43(11):2956-68.
2. Seki A, Sakai Y, Komura T, Nasti A, Yoshida K, Higashimoto M, Honda M, Usui S, Takamura M, Takamura T, Ochiya T, Furuichi K, Wada T, Kaneko S. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. Hepatology. 2013 Sep;58(3):1133-42.

2.学会発表

1. Akihiro Seki, Yoshio Sakai, Mami Higashimoto, Takuya Komura, Alessandro Nasti, Keiko Yoshida, Takahiro Ochiya, Takashi Wada, Masao Honda, Shuichi Kaneko. Features of immunomodulatory and therapeutic effects of mesenchymal stromal/stem cells on non-alcoholic steatohepatitis murine model in early and

cirrhotic phases. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Washington DC, Nov.1-5, 2013

2. 酒井佳夫、関晃裕、金子周一. 脂肪組織由来間質細胞を用いた肝硬変に対する肝再生療法実用化への基礎的検討. シンポジウム消S10-1、第55回日本消化器病学会大会、 グランドプリンスホテル新高輪、東京、平成25年10月10日
3. 酒井佳夫、関晃裕、金子周一. 肝硬変マウスモデルにおける脂肪組織由来間質細胞投与による肝修復再生効果の検討. パネルディスカッション PD1-08、第40回日本肝臓学会西部会、岐阜都ホテル、岐阜、平成25年12月6日
4. 関晃裕、酒井佳夫、Alessandro Nasti、吉田佳子、東元真実、小村卓也、本多政夫、金子周一. 肝硬変マウスモデルにおける脂肪組織由来幹細胞による肝修復再生療法の検討. ポスターセッションP-156、第49回日本肝臓学会総会、京王プラザホテル、東京、平成25年6月6日

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

「ヘパリン添加時の血漿・末梢血単核球中の HCV RNA 定量系の確立」

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。実際に採取された骨髄細胞中に肝炎ウイルス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】4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 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。

共同研究者

田中榮司 信州大学医学部内科学第二・教授

A.研究目的

我々は自己骨髄細胞投与[Autologous Bone Marrow Cell Infusion (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 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影響を与えた可能性が否定できない。今後、ABM療法を施行する際に HCV RNA 動態を検討することは重要となるため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。

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 4 症例(血

清ウイルス量 6 logIU/mL 以上)から抗凝固剤としてクエン酸 Na が入った試験管とヘパリン Na が入った試験管 (BD バキュテイナ™ CPT™ 単核球分離用採血管)にて採取され、保存された血漿と末梢血単核球を用いて希釈系列を作成して HCV RNA の定量をそれぞれ 2 回ずつ行った。さらに、ヘパリン Na が入った試験管で採血された血漿と末梢血単核球に前処理としてヘパリナーゼを加えて抽出を行った場合の HCV RNA の定量を行い比較検討した。

C. 研究結果

クエン酸 Na 試験管とヘパリン 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 試験管採血では 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 のみ測定可能であった。次に、ヘパリン Na 採血検体に対してヘパリナーゼを加えてから抽出すると HCV RNA は 3-6 log copies/mL で測定が可能となり、感度は上昇した。

表1 ヘパリン添加血漿中のHCV RNA

	クエン酸 Na	ヘパリン Na	ヘパリナー ゼ処理
6 log copies/mL	8/8	8/8	8/8
5 log copies/mL	8/8	8/8	8/8
4 log copies/mL	8/8	0/8	8/8
3 log copies/mL	8/8	0/8	4/8
2 log copies/mL	8/8	0/8	0/8

同様に施行した末梢血単核球のHCV RNA量の検討結果を表2に示す。血漿と同様に通常では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 採血検体では5-6 log copies/mLのみ測定可能であった。ヘパリン Na 採血検体に対してヘパリナーゼを加えてから抽出するとHCV RNA量は3-6 log copies/mLの範囲で測定が可能となり、感度は約2 log copies/mL上昇した。

表2 ヘパリン添加PBMC中のHCV RNA

	クエン酸 Na	ヘパリン Na	ヘパリナー ゼ処理
6 log copies/mL	8/8	8/8	8/8
5 log copies/mL	8/8	8/8	8/8
4 log copies/mL	8/8	0/8	8/8
3 log copies/mL	8/8	0/8	4/8
2 log copies/mL	8/8	0/8	0/8

D. 考 察

ヘパリン Na の試験管から採取された検体にヘパリナーゼを前処理してから抽出するとHCV RNAの検出感度は2log copies/mL程度改善する事が明らかとなった。実際に骨髓採取に使用されるヘパリンの量はごくわずかであり、洗浄して保存されていることを考慮するとヘパリナーゼを使用して抽出すれば問題がないと予想される。

E. 結 論

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。今後の骨髓採取にはヘパリンを使用しない方法も検討されており、問題なく定量は可能と考えられる。

G. 研究発表

1.論文発表

- Morita S, Matsumoto A, Umemura T, Shibata S, Kamijo N, Ichikawa Y, Kimura T, Joshita S, Komatsu M, Yoshizawa K, Tanaka E. Characteristics and prediction of hepatitis B e-antigen negative hepatitis following seroconversion in patients with chronic hepatitis B. Hepatol Res 2013 in press
- Okuhara S, Umemura T, Joshita S, Shibata S, Kimura T, Morita S, Komatsu M, Matsumoto A, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Ota M, Tanaka E. Serum levels of interleukin-22 and hepatitis B core-related antigen are associated with treatment response to entecavir therapy in chronic hepatitis B. Hepatol Res 2013 in press
- Nozawa Y, Umemura T, Joshita S, Katsuyama Y, Shibata S, Kimura T, Morita S, Komatsu M, Matsumoto A, Tanaka E, Ota M. KIR, HLA, and IL28B variant predict response to antiviral therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients in Japan. PLOS ONE 2013 8 e83381.

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。)

- 特許取得 なし
- 実用新案登録 なし
- その他 なし

厚生労働省科学研究費
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

「肝線維化における CTGF の意義」

研究分担者氏名： 疋田 隼人

所属機関： 大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学 職名： 寄附講座助教

研究要旨：肝線維化は慢性肝炎/肝硬変の中心的病態であるが、その制御機構は複雑で未だ不明な点が多い。以前肝線維化が自然発症する P53 が持続活性化した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、線維化の進行したマウスにおいて CTGF(connective tissue growth factor)の著しい上昇が認められた。さらに慢性肝炎・肝硬変患者の肝組織で上昇しており、肝線維化進展への CTGF の関与が示唆された。そこで本研究では肝線維化における CTGF の意義を検討した。野生型マウスに総胆管結紮術(BDL)や四塩化炭素投与により肝線維化を誘導し、肝組織中 CTGF の発現を検討すると、いずれの線維化刺激でも CTGF の上昇が認められた。肝線維化形成時における CTGF 上昇の意義を検討するために、肝細胞特異的に CTGF を欠損するマウス (CTGF Δ HEP)、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 (CTGF Δ LIV) を作成した。これらのマウスに BDL を施行したところ、CTGF Δ HEP マウスではコントロールマウスと同程度に肝組織中の CTGF の遺伝子発現の上昇を認めた。一方、BDL を施行した CTGF Δ LIV マウスでは、CTGF の上昇が著明に抑制されていた。さらに、CTGF Δ LIV マウスは、BDL 後の線維化もコントロールマウスに比し軽度であった。以上より、BDL 刺激により主に非実質細胞 CTGF が産生され、この産生された CTGF が肝線維化を進展させると考えられた。そこで、線維化刺激時における CTGF の産生細胞、産生機構を解明するために、肝星細胞特異的に CTGF を欠損するマウス (CTGF Δ HSC) を作成し、四塩化炭素投与により線維化刺激を行った。しかし CTGF Δ HSC マウスではコントロールマウスと比較し有意な CTGF の発現の低下を認めず、肝星細胞以外の非実質細胞が肝線維化刺激時に CTGF を産生し、肝線維化を増悪させている可能性が示唆された。これらの結果をもとに今後 CTGF を標的とした治療の開発が期待される。

共同研究者

竹原 徹郎 大阪大学消化器内科学

川口 司 大阪大学消化器内科学

牧野 祐紀 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

肝線維化は慢性肝炎/肝硬変の中心的病

態であるが、その制御機構は複雑で未だ不明な点が多い。一方 CTGF (connective tissue growth factor)は慢性肝炎・肝硬変患者の肝組織で上昇しており、肝線維化への関与も想定されているが十分な解析は行われていない。そこで今回、マウス肝線維化モデルを用いて肝線維化進展における

CTGF の意義検討し、肝線維化抑制を目指した新規治療法の開発につなげることを目的とした。

B. 研究方法

マウス肝線維化モデルとして、総胆管結紮術 (BDL) 及び四塩化炭素投与モデルを検討した。BDL モデルでは BDL 施行後 3 週間の時点で、四塩化炭素投与モデルでは、0.5mg/kg を週 2 回合計 4 週間投与して、最終投与後 24 時間の時点で評価を行った。

マウスは、*CTGF^{flox/flox}* と各 Cre トランスジェニックマウスを交配し、肝細胞特異的に CTGF を欠損するマウス (*Alb-Cre CTGF^{flox/flox}*; CTGF Δ HEP)、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^{flox/flox}*; CTGF Δ LIV) 及び肝星細胞特異的に CTGF を欠損するマウス (*GFAP-Cre CTGF^{flox/flox}*; CTGF Δ HSC) を作成した。これらのマウスに BDL や四塩化炭素投与を行い、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)

遺伝子組み換えを用いた実験は、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. 研究結果

始めに、総胆管結紮術及び四塩化炭素投与によるマウス線維化モデルで、線維化とともに CTGF が上昇するかを検討した。両モデルとも、線維化刺激によりコラーゲン遺伝子 (*Col1a1* 及び *Col1a2*) の発現増強を伴

って、シリウスレッド染色による検討で強い線維化の形成を認めたと同時に、肝臓において CTGF の発現は上昇を認めた。

次に肝線維化における、CTGF の役割を検討するために、CTGF Δ HEP マウス、CTGF Δ LIV マウスを作成した。CTGF Δ HEP 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血清 T-Bil 値や、ALP 値だけでなく、肝臓中の CTGF の遺伝子発現の上昇を認めた。一方、CTGF Δ LIV マウスでは、コントロールマウスと比較し、血清 T-Bil 値や、ALP 値は同様に上昇を認め、胆汁うっ滞刺激は同程度負荷されたが、CTGF の上昇は有意に抑制された。また、p CTGF Δ LIV において、BDL 後に認められる肝組織中のコラーゲン遺伝子 (*Col1a1* 及び *Col1a2*) の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。よって、肝線維化刺激時に、肝臓の非実質細胞が産生する CTGF は肝線維化を増悪させることが示唆された。

最後に線維化刺激時の CTGF の産生細胞を検討するために、CTGF Δ HSC マウスを作成した。CTGF Δ HSC マウスに四塩化炭素投与により線維化刺激を行った。コントロールマウスと比較して、血清 ALT 値だけでなく肝組織における CTGF、*Col1a1* の発現量にも差を認めず、線維化刺激時の CTGF 産生細胞として、肝星細胞以外の非実質細胞である可能性が示唆された。

D. 考察と結論

今回の結果から、肝線維化刺激により CTGF は上昇し、CTGF の抑制は線維化を抑制することが明らかとなった。また CTGF Δ HEP マ

ウス、CTGF ΔHSC 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、CTGF ΔLIV 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、線維化刺激後の主な CTGF 産生細胞は、クッパー細胞など星細胞以外の非実質細胞であることが示唆された。今後 CTGF の抑制による肝線維化進展抑制治療の可能性が期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Kodama T, Hikita H, Kawaguchi T, Saito Y, Tanaka S, Shigekawa M, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Kanto T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. The Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins Bim and Bid are functionally active and restrained by anti-apoptotic B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) family proteins in healthy liver. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(42): 30009-30018. Epub 2013 Aug 28.
- [2] Kawaguchi T, Kodama T, Hikita H, Tanaka S, Shigekawa M, Nawa T, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. Carbamazepine promotes liver regeneration and survival in mice. *J Hepatol.* 2013; 59(6): 1239-1245. Epub 2013 Jul 18.

2. 学会発表

- [1] Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Satoshi Shimizu, Wei Li, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Naoki

Hiramatsu, Tetsuo Takehara. Oxidative stress induced by continuous hepatocyte apoptosis drives liver carcinogenesis independently of regeneration and DNA methylation status. The 64th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Washington, USA, November 1 - 5 2013.

- [2] Tsukasa Kawaguchi, Takahiro Kodama, Satoshi Tanaka, Kaori Mukai, Satoshi Aono, Minoru Shigekawa, Satoshi Shimizu, Hayato Hikita, Wei Li, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. A novel hepato-proliferative effect of carbamazepine during liver regeneration. The 64th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Washington, USA, November 1 - 5 2013.
- [3] Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Tsukasa Kawaguchi, Satoshi Tanaka, Satoshi Shimizu, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tetsuo Takehara. The 17th International Symposium on Cell of the Hepatic Sinusoid. Continuous apoptosis in hepatocytes induces oxidative stress and leads to liver carcinogenesis. Osaka, Japan, September 23 - 25 2013.
- [4] Hayato Hikita, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Kawaguchi Tsukawa, Satoshi Shimizu, Takahiro Kodama,

Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi,
Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara.
The rheostat regulating hepatocyte
apoptosis by BH3-only proteins in
developing and adult liver. The 20th
Annual Meeting of the Japanese
Society for the Research of Hepatic
Cells. Osaka, Japan, September 26 -
27 2013.

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし