

投与 24 時間後において有意に低下しており、ADSC による治療的効果を確認した。ConA 誘導肝炎モデルマウス肝組織に対する免疫組織化学染色をおこない CD4+、CD11b+、Gr-1+、F4/80+炎症細胞の浸潤が確認した。ConA 肝炎における肝組織内において CD11b+、Gr-1+、F4/80+細胞集簇は、ADSC 投与により著明に抑制された。また肝組織より RNA を抽出し DNA マイクロアレイにより遺伝子発現解析を行った。ADSC 投与により発現変化が生じた 309 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、NCBI より公開されている造血系細胞の遺伝子発現データ (GSE27787) と比較したところ、Gr-1 陽性細胞、Mac1 陽性細胞と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

ADSC 投与による肝炎の予防および治療効果機序として、ミエロイド炎症細胞の抑制が重要であることが示された。

E. 結論

脂肪組織由来間質細胞投与による肝再生修復効果、機序に関する知見が得られた。

研究発表

1. 論文発表

1. Komura T, Taniguchi T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Noda T, Okajima M, Kaneko S. The efficacy of Continuous Plasma Diafiltration Therapy in critical Patients with Acute Liver Failure. J Gastroenterol Hepatol

Apr:29(4):782-6, 2014

2. 学会発表

1. 酒井佳夫、関晃裕、東元真実、吉田佳子、ナスティ・アレッサンドロ、小村卓也、本多政夫、金子周一. 前臨床非アルコール性肝炎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る肝修復再生治療効果の検討、ワークショップ WS2-6、第 50 回日本肝臓学会総会、平成 26 年 5 月 29 日 ホテルニューオータニ、東京

2. Kazunori Kawaguchi, Masao Honda, Taro Yamashita, Kouki Nio, Hikari Okada, Kuniaki Arai, Yoshio Sakai, Tatsuya Yamashita, Eishiro Mizukoshi, Shuichi Kaneko. Notch signal-activated hepatoma cells are associated with Jagged1 genomic abnormality, and Notch inhibitors efficiently suppress EpCAM+ liver cancer stem cells. 第 65 回 AASLD 60 卷 S4 号 131A 2014.11.9

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

「骨髄細胞中の肝炎ウイルスの検出」

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】 肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与[Autologous Bone Marrow Cell Infusion (ABMi)]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、既に確立された HBV DNA と HCV RNA の定量系を用いて、ABMi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】

山口大学・山形大学附属病院において ABMi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】

1 例の HBs 抗原陽性者では HBV DNA 量が $1.8 \log \text{copies}/10^6 \text{PBMCs}$ と陽性であった。しかし、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 は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

ABMi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 (ABMi)]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

山口大学医学部附属病院、山形大学医学部附属病院で ABMi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

ABMi 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 copies/10⁶PBMCs 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、15 例の ABMi 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 1.7~5 log copies/10⁶PBMCs 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。考慮しなければいけない点として骨髄細胞の採取時に PCR 阻害物質であるヘパリンを使用している事である。使用量はごく少量である点、骨髄細胞から核酸を抽出する前にも洗浄をしている点からヘパリンの PCR への影響は少ないと考えられる。

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。

研究発表

1. 論文発表

1. 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* 2014;44:E172-80.

2. Morita S, Matsumoto A, Umemura T, Shibata S, Kamiyo N, Ichikawa Y, Kimura T, Joshita S, Komatsu M, Yoshizawa K, Tanaka E. Characteristics and prediction of HBeAg-negative hepatitis following seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res* 2014;44:E45-53.

2. 学会発表

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

「肝線維化における CTGF の意義と新規治療標的としての可能性」

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 職名： 特任助教
研究協力者氏名： 牧野祐紀 所属機関： 大阪大学大学院医学系研究科 職名： 大学院生
研究協力者氏名： 竹原徹郎 所属機関： 大阪大学大学院医学系研究科 職名： 教授

研究要旨：

【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。我々は以前、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。そこで本研究では肝線維化における CTGF の意義と新規治療標的としての可能性について検討した。

【方法・成績】

野生型マウスに総胆管結紮術(BDL)や四塩化炭素(CCl₄)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、いずれの線維化モデルでも CTGF の上昇が認められた。またヒト肝細胞癌切除例における非腫瘍部肝組織中の CTGF の発現量を評価すると、線維化の進展とともに CTGF の発現上昇を認めた。次に CTGF の産生源について検討するため、線維化刺激後のマウス肝臓から肝細胞と肝非実質細胞を単離すると、BDL/CCl₄ いずれのモデルにおいても、肝細胞、肝非実質細胞両者とも CTGF の発現上昇を認めた。そこで肝細胞特異的 CTGF 欠損マウス(*Alb-Cre CTGF^{lox/lox} : CTGF Δ hep* マウス)、肝星細胞特異的 CTGF 欠損マウス(*GFAP-Cre CTGF^{lox/lox} : CTGF Δ HSC* マウス)、polyI:C 誘導性肝細胞・肝非実質細胞 CTGF 欠損マウス(*Mx1-Cre CTGF^{lox/lox} : CTGF Δ hep+NPC* マウス)を作成し、BDL/CCl₄ による線維化刺激後の肝組織中 CTGF 発現レベルを評価すると、いずれの線維化モデルにおいても CTGF Δ hep+NPC マウスでのみコントロールマウスに比し有意な発現低下を認めた。肝線維化形成における CTGF の意義について検討するため、肝星細胞株 LX-2 細胞に対し recombinant CTGF を添加すると、 α -SMA、Colla1 の発現が上昇し、肝星細胞の活性化を認めた。また CTGF Δ hep マウス、CTGF Δ HSC マウス、CTGF Δ hep+NPC マウスにおいて BDL 後の線維化レベルについて評価すると、CTGF Δ hep+NPC マウスにおいてのみ線維化の軽減を認めた。

【考案】

CTGF は肝細胞と肝非実質細胞の両者から協調して産生され、線維化の進展とともに発現上昇し、肝星細胞を活性化して線維化に対し促進的に作用していることが示唆された。CTGF は肝線維化に対する有効な治療標的になり得ると考えられ、今後 CTGF を標的とした治療の開発が期待される。

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。我々は以前、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ることを見出している。CTGF は肝線維化への関与も

想定されているが、未だ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(CCl₄)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 6 週間投与して、最終投与後 24 時間の時点で評価を行った。各線維化モデルマウスにおいて肝組織中の CTGF 遺伝子発現、線維化の程度について評価したほか、線維化刺激後のマウスより初代培養肝細胞を採取し、コラゲナーゼ・プロナーゼ灌流法を用いて肝実質細胞・非実質細胞を単離し、各々の CTGF 発現量について評価した。

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(Sirius Red 染色/ヒドロキシプロリン定量)について検討した。

細胞実験として肝癌細胞株 HepG2 およ

び肝星細胞株 LX-2 を用いて、肝細胞および肝星細胞に対して recombinant TGF- β や recombinant CTGF で刺激した際の遺伝子発現の変化について検討した。

臨床検体を用いた検討として、ヒト肝細胞癌切除 93 例における背景肝組織(正常肝/慢性肝炎/肝硬変)と非腫瘍部 CTGF 発現レベルとの関連について検討した。

遺伝子組み換え実験は、大阪大学遺伝子組換え安全委員会の承認のもと行った。

(倫理面への配慮)

臨床検体を用いた実験は、大阪大学医学部附属病院の倫理委員会の承認もと、インフォームドコンセントを得た上で行った。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

まず肝線維化と CTGF との関連について検討するため、BDL 及び CCl₄ 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) の発現増強を伴い、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、肝組織中の CTGF の発現上昇を認めた。またヒト肝細胞癌切除 93 例における背景肝組織(正常肝/慢性肝炎/肝硬変)と非腫瘍部 CTGF 発現レベルとの関連について検討すると、肝線維化の進展に伴い CTGF の発現上昇を認めた。

次に CTGF の産生源について検討するため、線維化刺激後のマウス肝臓から肝細胞と肝非実質細胞を単離すると、BDL/CCl₄ いずれのモデルにおいても、肝細胞、肝非実質細胞とも CTGF の発現量はコントロー

ルマウスに比し有意に上昇した。肝細胞および肝非実質細胞が CTGF を産生することを確認するため、肝癌細胞株 HepG2 および肝星細胞株 LX-2 を用いて、CTGF の誘導因子である TGF- β を添加し刺激すると、HepG2・LX-2 いずれも CTGF の発現上昇を認め、肝細胞・肝星細胞ともに CTGF を産生することが示唆された。

そこで肝細胞特異的 CTGF 欠損マウス (*Alb-Cre CTGF^{fllox/fllox}:CTGF Δ hep* マウス)、肝星細胞特異的 CTGF 欠損マウス (*GFAP-Cre CTGF^{fllox/fllox}:CTGF Δ HSC* マウス)、polyI:C 誘導性肝細胞・肝非実質細胞 CTGF 欠損マウス (*Mx1-Cre CTGF^{fllox/fllox}:CTGF Δ hep+NPC* マウス) を作成し、BDL/CCl4 投与後の肝組織中 CTGF 発現量についてコントロールマウス (Cre-) と欠損マウス (Cre+) で比較した。その結果、いずれの線維化モデルにおいても、CTGF Δ hep マウス、CTGF Δ HSC マウスでは CTGF の発現は低下せず、CTGF Δ hep+NPC マウスでのみ有意な発現低下を認め、CTGF の発現抑制のためには肝細胞・非実質細胞両者において CTGF を抑制する必要があることが示唆された。

最後に肝線維化形成における CTGF の意義について検討した。肝星細胞株 LX-2 細胞に対し recombinant CTGF を添加すると、 α -SMA、Col1a1 の発現が上昇し、肝星細胞の活性化を認めた。また CTGF Δ hep マウス、CTGF Δ HSC マウス、CTGF Δ hep+NPC マウスにおいて BDL 後の線維化レベルについてコントロールマウス (Cre-) と比較すると、各系統ともコントロールマウスと比較し、血清肝胆道系酵素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 Δ hep+NPC マウスにおいてのみ肝組織中 Col1a1、Col1a2 発現量、シリウスレッド染色陽性領域、ヒドロキシプロリン含有量が有意に減少し、線維化が軽減した。

D. 考察

今回の結果から、CTGF は線維化の進展とともに肝細胞と肝非実質細胞の両者から協調して産生され、肝星細胞を活性化して線維化に対し促進的に作用していることが示唆された。肝細胞・非実質細胞の両者において CTGF を阻害することで線維化改善効果が得られ、CTGF は肝線維化に対する有効な治療標的になり得ると考えられた。

E. 結論

CTGF の抑制は線維化を抑制し、CTGF は肝線維化に対する有効な治療標的となり得る。

研究発表

1. 論文発表

Synthetic lethal interaction of combined CD26 and Bcl-xL inhibition is a powerful anticancer therapy against hepatocellular carcinoma. Kawaguchi T, Kodama T, Hikita H, Makino Y, Saito Y, Tanaka S, Shimizu S, Sakamori R, Miyagi T, Wada H, Nagano H, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. *Hepatology*. 2014 Oct 9. doi: 10.1111/hepr.12434. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1. Yuki Makino, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Takahiro Kodama,

Minoru Shigekawa, Yugo Kai, Yasutoshi Nozaki, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara.

「Significance of Ras pathway and connective tissue growth factor in the development of hepatocellular carcinoma」 The 65th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease, Boston USA, 2014年11月7日-11日 発表日 2014年11月9日.

2. Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. 「The impact of CTGF on liver fibrosis」 第18回日本肝臓学会大会 (JDDW2014) 神戸, 10月23日-24日 発表日 10月23日
3. 牧野祐紀, 疋田隼人, 竹原徹郎. 「肝発癌・進展における Ras 経路の活性化と CTGF」 第18回日本肝臓学会大会 (JDDW2014) 神戸, 2014年10月23日-24日 発表日 2014年10月23日.
4. Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. 「The impact of CTGF on liver fibrosis」 第18回日本肝臓学会大会 (JDDW2014) 神戸, 10月23日-24日 発表日 10月23日.
5. 牧野祐紀, 疋田隼人, 竹原徹郎. 「肝発癌・進展における Ras 経路の活性化と CTGF」 第18回日本肝臓学会大会 (JDDW2014) 神戸, 2014年10月23日-24日 発表日 2014年10月23日.
6. Yuki Makino, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Yugo Kai, Yasutoshi Nozaki, Tasuku Nakabori, Yoshinobu

Saito, Satoshi Tanaka, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara.

「Significance of connective tissue growth factor (CTGF) for the oncogenesis and progression of hepatocellular carcinoma」 日本癌学会 第73回総会 横浜, 2014年9月25-27日 発表日 2014年9月26日.

7. 疋田隼人, 牧野祐紀, 巽智秀, 川口司, 重川稔, 小玉尚宏, 阪森亮太郎, 宮城琢也, 竹原徹郎. 「Ras 経路の活性化による肝発癌における CTGF の意義」 第50回日本肝臓学会総会 東京 2014年5月29-30日 発表日 2014年5月29日.
8. 牧野祐紀, 疋田隼人, 齋藤義修, 川口司, 阪森亮太郎, 宮城琢也, 巽智秀, 竹原徹郎. 「肝線維化形成における CTGF の意義」 第50回日本肝臓学会総会 東京 2014年5月29-30日 発表日 2014年5月29日.

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
該当なし

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
高見太郎、 坂井田功	急性肝不全に対する 骨髄細胞を用いた肝 臓再生療法の現状	竹原徹郎、 持田智	Hepatology Practice 第4巻 「難治性肝疾 患の診療を極める 基本から最前線まで 」	文光堂	日本	2014年	244-246.
稲垣 豊	肝線維化研究の進歩 と治療の展望	日本肝臓学会	日本肝臓学会50年の あゆみ	大村印刷	東京	2013	175-181

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
Shiratsuki S, Terai S, Murata Y, Takami T, Yamamoto N, Fujisawa K, Burganova G, Quintanilha LF, Sakaida I.	Enhanced survival of mice infused with bone marrow-derived as compared with adipose-derived mesenchymal stem cells.	Hepatol Res.		[Epub ahead of print]	2015
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.	20(3)	206-210	2014
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	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol	307(1)	G50-57	2014
Tomita K, Haga H, Ishii G, Katsumi T, Sato C, Aso R, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Saito T, Otani K, Ueno Y	Clinical manifestations of liver injury in patients with anorexia nervosa	Hepatol Res	44(10)	E26-31	2014
Taguchi K, Hirano I, Itoh T, Tanaka M, Miyajima A, Suzuki A, Motohashi H, and Yamamoto M	Nrf2 enhances cholangiocyte expansion in Pten-deficient livers.	Mol. Cell. Biol	34	900-913	2014

Komori T, Tanaka M, Semba M, Miyajima A, and Morikawa Y.	Deficiency of OSMRb exacerbates high-fat diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice.	J. Biol. Chem.	289	13821-13837	2014
Yagai T, Miyajima A and Tanaka M	Semaphorin 3E secreted by damaged hepatocytes regulates the sinusoidal regeneration and liver fibrosis during liver regeneration.	American J. Pathology	184	2250-2259	2014
Omi A, Enomoto Y, Kiniwa T, Miyata N and Miyajima A	Mature resting Ly6Chigh natural killer cells can be reactivated by IL-15	Eur. J. Immunology.	44	2638-2647	2014
Sato F, Miyaoka Y, Miyajima A and Tanaka M	Oncostatin M maintains the hematopoietic microenvironment in the bone marrow by affecting adipogenesis and osteoblastogenesis	PLoS One	8	e116209	2014
梶 星治、堅田 利明、仁科 博史	器官サイズを調節する転写共役因子YAPの活性制御	生化学(日本生化学会)	86	464-468	2014
千葉 恭敬、仁科 博史	肝臓形成および肝がんにおけるHippo-YAPシグナル経路の役割	医学のあゆみ	251	405-409	2014
Keita Nakanaga, kotaro Hama, Kuniyuki Kano, Takanoa Sato, Hiroshi Yukiura, Asuka Inoue, Daisuke Saigusa, Hidetoshi Tokuyama, Yoshihisa Tomioka, Hiroshi Nishina, Atsuo Kawahara and Junken Aoki	Overexpression of autotaxin, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, enhances cardiac bifida induced by hypo-sphingosine-1-phosphate signaling in zebrafish embryo.	J. Biochem.	155	235-241	2014
Zeyu Yang, Kentaro Nakagawa, Aradhan Sarkar, Junichi, Maruyama, Hiroaki Iwasa, Yijun Bao, Mari Ishigami-Yuasa, Shigeru Ito, Hiroyuki Kagechika, Shoji Hata, Hiroshi Nishina, Shinya Abe, Masanobu Kitagawa, Yutaka Hata	Screening with a novel cell-based assay for TAZ activators identifies a compound that enhances myogenesis in C2C12 cells and facilitates muscle repair in the muscle injury model.	Mol. Cell. Biol.	34	1607-1621	2014
Tadanori Shimomura, Norio Miyamura, Shoji Hata, Ryota Miura, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina	The PDZ-binding motif of Yes-associated protein is required for its co-activation of TEAD-mediated CTGF transcription and oncogenic cell transforming activity. Biochem. Biophys.	Res. Commun	443	917-923	2014

Yoichi Asaoka, Shoji Hata, Misako Namae, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina	The Hippo pathway controls a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish.	PLoS ONE	9	e97365	2014
Yuta Motimaru, Morio Azuma, Natsuki Oshima, Yuta Ichijo, Kazuhiro Satou, Kouhei Matsuda, Yoichi Asaoka, Hiroshi Nishina, Takashi Nakakura, Chihiro Mogi, Koichi Sato, Fumikazu Okajima	Extracellular acidification activates ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 and GPR4 homologs of zebrafish.	Biochem. Biophys. Res. Commun	457	493-499	2015
Sean Porazinski, Huijia Wang, Yoichi Asaoka, Martin Behrnt, Tatsuo Miyamoto, Hitoshi Morita, Shoji Hata, Takashi Sasaki, S.F. Gabby Krens, Yumi Osada, Satoshi Asaka, Akihiro Momoi, Sarah Linton, Joel B. Miesfeld, Brian A. Link, Takeshi Senga, Atahualpa Castillo-Morales, Araxi O. Urrutia, Nobuyoshi Shimizu, Hideaki Nagase, Shinya Matsuura, Stefan Bagby, Hisato Kondoh, Hiroshi Nishina*, Carl-Philipp Heisenberg* and Makoto Furutani-Seiki* (*Corresponding authors)	YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape.	Nature		in press	2015
Tanaka M, Ikeda K, Suganami T, Komiya C, Ochi K, Shirakawa I, Hamaguchi M, Nishimura S, Manabe I, Matsuda T, Kimura K, Inoue H, Inagaki Y, Aoe S, Yamasaki S, Ogawa Y	Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis.	Nat Commun	5	4982	2014
K. Konuma et al.	Eicosapentaenoic acid ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in a novel mouse model using Melanocortin 4 receptor-deficient mice	PLoS ONE	10	e0121528	2015

Reyes-Gordillo K, Shah R, Ar ellanes-Robledo J, Hernandez- Nazara Z, Rincon-Sanchez AR, Inagaki Y, Rojkind M, Laksh man MR	Mechanisms of action of acetaldehyde in the up regulation of the human $\alpha 2(I)$ collagen gene in hepatic stellate cells - key roles of Ski, SMAD3, SMAD4 and SMAD7.	Am J Pathol	184 (5)	1458 -1467	2014
Yamaoka H, Sumiyoshi H, Hi gashi K, Nakao S, Minakawa K, Sumida K, Saito K, Ikoma N, Mabuchi T, Ozawa A, Ina gaki Y	A novel small compound accelerates dermal wound healing by modifying infiltration, proliferation and migration of distinct cellular components in mice.	J Dermatol Sci	74 (3)	204-213	2014
稲垣 豊、茂呂 忠、住吉秀明	肝線維化改善の分子・細胞基盤	肝胆臓	68 (5)	709-715	2014
Okazaki I, Noro T, Yamanouc hi E, Kuroda H, Nakano M, Yokomori H, Inagaki Y	Fibrogenesis and carcinogenesis in nonalcoholic steatohepatitis (NASH): Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs).	Cancers	6	1220 -1255	2014
Abe J, Shichino S, Ueha S, H ashimoto S, Tomura M, Inagak i Y, Stein JV, Matsushima K	Lymph node stromal cells negatively regulate antigen-specific CD4+ T cell responses.	J Immunol	193 (4)	1636 -1644	2014
稲垣 豊、住吉 秀明	肝臓の線維化とその治療	日本内科学会雑 誌	103 (9)	2171 -2175	2014
Kamiya A, Inagaki Y	Stem and progenitor cell systems in liver development and regeneration.	Hepatol Res	45 (1)	29-37	2014
Komura T, Taniguchi T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E , Noda T, Okajima M, Kaneko S.	Efficacy of Continuous Plasma Diafiltration Therapy in critical Patients with Acute Liver Failure.	J Gastroenterol Hepatol	29	682-686	2014
Kawaguchi T, Kodama T, Hiki ta H, Makino Y, Saito Y, Tan aka S, Shimizu S, Sakamori R , Miyagi T, Wada H, Nagano H, Hiramatsu N, Tatsumi T, T akehara T.	Synthetic lethal interaction of combined CD26 and Bel-xL inhibition is a powerful anticancer therapy against hepatocellular carcinoma	Hepatol Res.			In Press

IV 急性肝不全を理解するための基礎研究

5 急性肝不全に対する骨髄細胞を用いた肝再生療法の現状

要点

- 臨床研究では、急性肝不全（正確には acute on chronic liver failure）に対する G-CSF 投与のランダム化比較試験による有効性を Grag らが論文報告している。
- 基礎研究でも、急性肝障害（肝不全）モデル系に対する G-CSF、全骨髄細胞や骨髄 MSC 投与の有効性を示した論文報告があり、今後の臨床研究における安全性および有効性評価が待たれる。

はじめに

慢性肝疾患の終末像である肝硬変症に対する骨髄細胞を用いた肝再生療法としては、筆者らの「肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与 (autologous bone marrow cell infusion : ABMi) 療法」や、国外からも骨髄間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell : MSC) 投与等の有効性が論文報告されている¹⁾。その一方、急性肝不全に対する臨床研究論文はこれまでのところ Grag らの acute on chronic liver failure (ACLF) に対する顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor : G-CSF) 投与が生命予後を改善したという報告のみである²⁾。

本項ではおもに骨髄細胞を用いた急性肝不全に対する肝再生療法の基礎研究成果を中心に概説する。

I G-CSF を用いた研究

肝硬変症に対する臨床研究論文としては、すでに Gordon らの G-CSF で誘導した自己末梢血 CD34 陽性細胞を門脈または肝動脈から投与したところ血清アルブミン値が上昇したとの報告、アルコール性肝硬変症に対する G-CSF 投与が肝前駆細胞の増殖を促進させたとの Spahr らの報告等がある。一方、急性肝不全（正確には ACLF）に対するランダム化比較臨床研究としては、5 μ g/kg G-CSF 皮下投与 (n=23) により末梢血好中球や肝内 CD34 陽性細胞数が増加し、肝腎症候群、肝性脳症といった合併症が減少することで投与 2ヵ月後の生存率は有意に高かったとの成績を、Garg らは報告している²⁾。基礎研究では、D-ガラクトサミン誘導急性肝不全ラットモデルへの G-CSF 投与が肝内 CD34 陽性細胞を増加させ肝細胞増殖を促進（肝内 Ki-67 陽性細胞が増加）により、生存率と生存期間を有意に延長するとの報告がある³⁾。しかし一方で、四塩化炭素急性肝障害ラットモデルに対する G-CSF 腹腔内投与には効果がなかったとの報告もある等⁴⁾、今後の研究の蓄積が待たれる。

II 全骨髄細胞を用いた研究

筆者らは四塩化炭素誘導マウス肝硬変モデルへの同種同系全骨髄細胞投与が肝線維化および肝臓

肝線維化研究の進歩と治療の展望

稲垣 豊

東海大学 医学部再生医療科学

はじめに

肝線維症は、肝炎ウイルス感染、アルコール多飲、非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、自己免疫学的機序、薬物性、金属代謝異常など、本章の各稿で取り上げられているおよそ全ての肝細胞傷害によってもたらされる共通の病態である。また、これ以外にも肝外胆管閉塞や肝うっ血により肝線維化は引き起こされる。線維化の進行に伴って肝組織中にはコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスが過剰に沈着し、その終末像である肝硬変では肝細胞機能不全や門脈圧亢進症が問題となる。さらに、高頻度に合併する肝細胞癌の発生を抑止する上でも、肝線維化研究は重要なテーマである。近年、肝線維症の非侵襲的診断と治療法の開発が従来にも増して注目されており、その背景を理解することで肝線維化研究の必要性と重要性とが見えてくる。

肝線維化過程において中心的役割を担う肝星細胞は、かつては伊東細胞 (Ito cells) と呼ばれたように、1951年に伊東俊夫教授によって発見された¹⁾。また、ビタミンAを貯蔵し²⁾、コラーゲンを産生する³⁾ 本細胞の特徴は和氣健二郎教授らにより実証されるなど、発見当初より日本人との関わりが深い細胞である。肝線維化過程において星細胞が果たす役割や、線維肝組織中に増加するI型コラーゲンとこれを分解するmatrix metalloproteinase (MMP) の産生調節機構など、肝線維化研究は大きな進歩を遂げた。しかしながら、臨床の現場に目を向けると、今もって肝線維症に対する特異的かつ効果的な治療薬は存在しない。肝線維化研究の成果はいつになったら臨床に還元できるのかという批判に、その研究に携わる者は真摯に耳を傾ける必要がある。本稿では、近年の肝線維化研究の進歩を概説するとともに、新規治療法の開発に向けて克服すべき問題点と今後の展望に関する私見を述べて、ご批判を仰ぎたい。

肝星細胞のバイオロジーと線維化病態

1) 肝星細胞の活性化機構

肝星細胞は肝類洞周囲のDisse腔に存在し、生理的条件下では前述したようにビタミンAの貯蔵細胞であるとともに、その長い突起と収縮機能を介して類洞内微小循環の調節に寄与している。しかしながら、肝細胞壊死や炎症に伴って放出された液性因子の刺激を受けると次第にビタミンAの脂肪滴を失い、 α -smooth muscle actin (α SMA) 陽性の筋線維芽細胞様の細胞 (myofibroblast-like cells) に形質転換して、活発にコラーゲン産生を行うようになる。この星細胞の活性化やコラーゲン産生を促進する代表的因子としてplatelet-derived growth factor (PDGF) や後述するtransforming growth factor- β (TGF- β) がよく知られ、最近ではケモカインの関与にも注目が集まっている⁴⁾。その発生学的起源についてはこれまで多くの議論があったが、近年になって中胚葉に由来することが証明された⁵⁾。

正常肝組織から分離した星細胞をプラスチック・ディッシュ上で培養すると、脂肪滴の減少とともに α SMAを発現し、コラーゲン産生を活発に行うようになる。この現象は、生体における星

細胞の活性化を擬するモデルとして、肝線維化機序の解明や抗線維化薬剤の効果判定などに頻用されてきた。しかしながら、線維化刺激により生体内で活性化した星細胞と培養により活性化した星細胞における遺伝子発現プロフィールを網羅的に解析すると、両者は完全には一致しなかった⁶⁾。培養細胞を用いた*in vitro*試験で得られた研究成果を*in vivo*で検証する際に、とりわけ留意すべき点である。

後述するように、肝線維症は可逆的な病態である。四塩化炭素の反復投与を中止して肝線維化所見が改善する際に活性化星細胞数は急激に減少することから、アポトーシスに陥ると考えられてきた⁷⁾。ところが最近、実験的肝線維症の改善過程において、活性化した星細胞の約半数は非活性型に戻るといった報告がなされた(図1)⁸⁾。これまでも、培養星細胞の活性型と非活性型との相互移行については、脂肪細胞の分化・脱分化過程と類似してperoxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ)などの転写因子による制御が報告されていた⁹⁾が、この可逆性が*in vivo*においても証明された意義は大きい。しかしながら、線維化の改善に伴って非活性型に移行した星細胞は、線維化刺激を全く受けていない静止期の星細胞と同一とは言えず、再度の線維化刺激に対する反応性も高いという。星細胞が有するこの可逆性を肝線維症治療に応用するには、さらに詳細なメカニズムの解明が必要である。

ビタミンAの活性体であるレチノイン酸に対する受容体のdominant negative formを肝細胞特異的に発現させたマウスでは、脂肪肝炎とともに肝細胞癌が自然発生した¹⁰⁾。また、活性化星細胞において発現が増加するcytoglobinの遺伝子を欠失させたマウスでは、diethylnitrosamineによる化学発癌が増強された¹¹⁾。いずれも、肝線維化と発癌の病態連繋を理解する上で重要な知見である。

2) コラーゲン産生細胞のheterogeneity

活性化した肝星細胞がコラーゲン産生を通じて肝線維化過程において中心的役割を担っていることは前述した通りであるが、星細胞以外にもコラーゲン産生細胞の存在が指摘されるようになった(図1)。その中でも、門脈域に存在するportal fibroblastsは、胆管結紮モデルに代表される胆汁うっ滞に伴う肝線維症の発症と進展において重要な役割を演じている¹²⁾。コラーゲン産生細胞のheterogeneityに関連して、I型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子(COL1A1)プロモーターと α SMA遺伝子プロモーターのデュアル・レポーターマウスを用いた研究では、正常肝および胆管結紮による線維肝のいずれにおいてもCOL1A1発現細胞と α SMA発現細胞は完全に一致せず、それぞれ単独陽性の細胞と両者陽性細胞が混在していた¹³⁾。星細胞や筋線維芽細胞のheterogeneityは、その起源とも関連して重要な問題を孕んでいる。

近年、骨髄由来細胞がコラーゲンを産生して肝線維化の進展に関わる¹⁴⁾、あるいは星細胞や筋線維芽細胞自体が骨髄に由来する¹⁵⁾という報告が相次いだ。しかしながら、COL1A1遺伝子あるいはこれと協調発現するI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子(COL1A2)のエンハンサー・プロモーターをルシフェラーゼやEGFP遺伝子に連結したレポーターマウスを用いて感度ならびに特異度に優れた解析を行うと、骨髄由来細胞のコラーゲン産生は否定的¹⁶⁾あるいはきわめて限局的であった¹⁷⁾。全ての実験方法には限界があるが、現在では線維肝組織に浸潤した骨髄由来細胞は炎症性サイトカインやケモカインを産生することで間接的に肝線維化の進展に関わるとする意見が多い。

同様の問題は、上皮間葉移行(endothelial-to-mesenchymal transition, EMT)についても指摘できる。当初は、四塩化炭素投与や総胆管結紮後のマウス、あるいは移植後に再発した原発性胆汁性肝硬変症例において肝細胞や胆管上皮細胞のEMTの関与が報告された。しかしながら、アルブミンやkeratin-19、あるいは α -フェトプロテインといった肝臓における上皮系細胞に特異的な遺伝子のプロモーターを用いたfate mapping studyにより、少なくともマウスを用いた実験的肝線維化過程においてはEMTのコラーゲン産生への直接的関与は否定された¹⁸⁾。

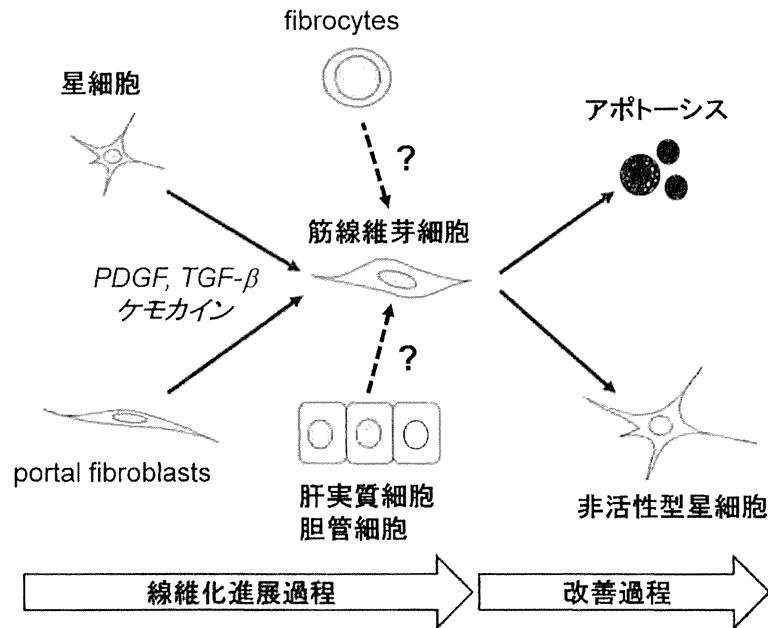


図1 コラーゲン産生細胞のheterogeneityと活性化・脱活性化過程
肝におけるコラーゲン産生細胞である筋線維芽細胞（様細胞）の起源としては、肝実質内の星細胞や門脈域に存在するportal fibroblastsの他、近年では造血細胞由来のfibrocytesや肝実質細胞ないし胆管細胞のEMTの関与が注目された。しかしながら、その後の研究ではfibrocytesやEMTの関与は限局的ないし否定的とする意見が多い。肝線維化の改善過程においては、活性化した星細胞はアポトーシスに陥ることで排除されると考えられていたが、最近ではその一部は非活性型に移行することが報告された。

コラーゲン産生と分解の分子機構

1) TGF-β/Smad3によるコラーゲン遺伝子転写の促進とその制御

TGF-βは肝線維化の進展過程において中心的役割を担っており、その作用は星細胞の活性化、コラーゲン遺伝子転写の促進、MMP発現の抑制、MMP阻害因子tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)の発現促進など、多岐にわたる¹⁹⁾。近年、星細胞のToll-like receptor 4 (TLR4)を介するTGF-βシグナルの増強機序が明らかにされた²⁰⁾。これは自然免疫と肝線維化を繋ぐ接点であると同時に、コレステロールの過剰摂取による肝線維化進展にも関わることで注目されている²¹⁾。

著者らは、COL1A2遺伝子のプロモーター上にTGF-βによる転写促進を伝達する領域を世界で初めて同定し、これをTGF-β-responsive element (TbRE)と命名した²²⁾。TbREにはSp1とSmad3、さらにCBP/p300 coactivatorが結合し、これらタンパク間の相互作用によりCOL1A2転写を促進させる²³⁾。また、活性化星細胞では恒常的にリン酸化されたSmad3が核内に蓄積することでCOL1A2転写が亢進しており²⁴⁾、核内Smad3が線維化治療の標的になり得ると考えた。例えば、IFN-γの細胞内シグナル伝達物質であるYB-1は、TbREに結合するSmad3とCBP/p300 coactivatorとの相互作用を阻害することで、TGF-βによるCOL1A2転写の促進に対して拮抗的に抑制した²⁵⁾。YB-1過剰発現アデノウイルスを投与すると肝線維化の進展が抑制され²⁶⁾、これらの知見に基づいてYB-1の核内移行を促進する新規低分子化合物HSc025が開発された。これ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に投与すると、血清トランスアミナーゼ値の有意な低下と

ともに、肝細胞の脂肪変性と線維の蓄積が有意に改善された²⁷⁾。

コラーゲンは組織や臓器の形態保持のみならず、創傷治癒や組織の修復においても重要な役割を担っていることから、他臓器へ及ぼす副作用を軽減するには線維化組織あるいはコラーゲンの産生細胞特異的に薬剤を運搬・作用させる工夫が必要となる。ビタミンA封入りポソームを用いることで、コラーゲン特異的シャペロンHSP47 siRNAの星細胞選択的な導入と肝線維化の改善が動物実験で示された²⁸⁾。

2) 骨髄由来細胞の肝線維化改善への関与と細胞治療への応用

コラーゲン合成に関する研究の進歩に比して、分解系の研究は未だに立ち遅れている。問題を複雑にする1つの要因は、齧歯類においてコラーゲン線維を分解する主要な間質性コラーゲナーゼであるMMP-13が線維化の改善過程では既存線維を分解する²⁹⁾一方で、線維化初期においてはむしろ促進的に働く³⁰⁾など、病期によって相反する作用を示すことにある。

著者らは、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された細胞が、MMP-13、MMP-9を順次発現することで線維化改善に寄与することを明らかにした³¹⁾。この際G-CSFを投与すると、骨髄由来細胞の線維肝組織内への生着が増強し、MMP-9の発現亢進とともに線維化の改善が促進された。線維化改善と再生の促進は、肝線維症マウスに自家骨髄細胞を投与した際にも認められ³²⁾、これら動物実験のデータに基づいて肝硬変症例に対する自家骨髄細胞の注入療法が国内外の複数の施設で試みられている³³⁾³⁴⁾。また、骨髄間葉系幹細胞³⁵⁾や血管内皮前駆細胞³⁶⁾を投与した場合にも同様の効果が認められており、どのような細胞分画を投与するのが臨床的に最も効果的かについてはさらに検証が必要である。

肝線維症治療の問題点と将来展望

1) 今、なぜ線維化研究が注目されているのか？

近年、肝線維化研究と線維症治療薬開発の試みが産学をあげて活発になってきたのには、いくつかの理由がある。第1に、C型ならびにB型慢性肝炎に対する治療法の進歩により、近い将来にNASHが慢性肝疾患の主因となることが予想されるなど、わが国における肝臓病診療には大きなパラダイムシフトが起こっている。NASHに対しても、早期から線維化進展を防ぐ薬剤、あるいは肝硬変症例に対して線維の蓄積を改善させて肝細胞機能の回復や肝発癌の抑止をもたらすような薬剤の登場が熱望されている。すなわち、肝線維症はポスト肝炎ウイルス時代の治療ターゲットと言える。

第2に、ウイルス性肝炎に対する治療法の進歩は、肝線維症が可逆的な病態であることを証明した³⁷⁾。これまで、アルコール性肝硬変の禁酒症例などにおいて日常臨床で感じていた肝線維症の可逆性が実証された意義は大きい。組織におけるコラーゲン含量は合成と分解のバランスの上に成り立っており、コラーゲン合成を促進させる原因を取り除くことによって、進行した肝線維症であっても組織学的に改善する。また、原因治療が困難な場合であっても、コラーゲンの合成を抑制する、あるいは分解を適切に誘導することで、肝線維症は治療可能な病態である。

第3に、肝線維症に対する非侵襲的評価方法の開発が挙げられる。血中線維化マーカーに加えて、超音波装置やMRを用いた肝の弾性度診断が可能になった³⁸⁾³⁹⁾。肝組織生検は今なお最も信頼できる肝線維症の診断手段であるが、全症例に対して治療前後で実施することは現実的でない。弾性度診断もまだ完全とは言えないが、肝線維化治療薬の開発やその臨床試験において、多数例の中から比較的均一な対象集団を設定し、比較対照試験により治療効果を判定する上で、大きな力となることが期待されている。また、組織学的な線維化のスコア化が、コラーゲン合成と分解のダイナミッ

表1 肝線維症に対する抗線維化治療の試み

1) 抗線維化効果が認められたもの

疾患名	薬剤名または治療方法	文献
C型慢性肝炎	インターフェロン単独療法	Shiratori Y. <i>Ann Intern Med</i> (2000)
C型肝硬変	ペグインターフェロン・リバ ビリン併用療法	Poynard T. <i>Gastroenterology</i> (2002)
B型慢性肝炎	ラミブジン	Kweon YO. <i>J Hepatol</i> (2001) Liaw YF. <i>N Engl J Med</i> (2004)
自己免疫性肝炎	ステロイド、アザチオプリン	Dufour JF. <i>Ann Intern Med</i> (1997)
原発性胆汁性肝硬変	ウルソデオキシコール酸	Corpechot C. <i>Hepatology</i> (2000)
胆管狭窄型慢性膵炎	内視鏡的ドレナージ	Hammel P. <i>N Engl J Med</i> (2001)
NASH	ピオグリタゾン	Aithal GP. <i>Gastroenterology</i> (2008)

2) 抗線維化効果が明らかでないもの

疾患名	薬剤名	文献
NASH	グリタゾン製剤、ビタミンE	Ratziu V. <i>Hepatology</i> (2010) Sanyal AJ. <i>N Engl J Med</i> (2010)
C型慢性肝炎 (非著効例 ならびに 再燃例)	IL-10 インターフェロン γ グリタゾン製剤 アンジオテンシンII受容体拮抗薬	Nelson DR. <i>Hepatology</i> (2003) Pockros PJ. <i>Hepatology</i> (2007) McHutchison J. <i>Gastroenterology</i> (2010) Abu Dayyeh BK. <i>Dig Dis Sci</i> (2011)

クな変化をリアルタイムで反映しているとは言いがたい。最近、血清タンパク質の糖鎖構造の変化が線維化の進展と改善を鋭敏に反映することが報告され、新たな血中線維化マーカーとして期待されている⁴⁰⁾。

最後に、近年の再生医学・再生医療の進歩は、肝線維症の病態研究や治療戦略についても大きな知見をもたらした。肝の線維化と再生とは常に表裏一体の関係にあり、進行した線維肝では再生が妨げられ、逆に再生状態にある肝臓は線維化刺激の影響を受けにくい。肝線維化と再生の病態連繫に立脚した新たな線維症治療が模索されており、前述した自家骨髄細胞を用いた肝硬変治療法の開発はその好例である。

2) 肝線維症治療薬の現状と問題点

これまで種々の慢性肝疾患に対して用いられてきた治療法の中で、C型慢性肝炎のインターフェロン療法やB型慢性肝炎のラミブジン治療など、原因療法が奏功した症例における肝線維化の改善効果は顕著である(表1)。また、自己免疫性肝炎に対する免疫抑制療法や、原発性胆汁性肝硬変症に対するウルソデオキシコール酸治療でも、線維化の改善が認められた。一方、現在最も注目を浴びているNASHについては、その病態形成にPPAR- γ シグナルや酸化ストレスの関与が指摘されているにも関わらず、ピオグリタゾン投与の有効性を示した一部の報告を除くと、グリタゾン製剤やビタミンE投与の肝線維化抑制効果は概して否定的である。また、ウイルス学的著効が得られなかったC型慢性肝炎症例に対してインターフェロン γ やグリタゾン製剤の投与が試みられたが、いずれも無効であった。さらに、アンジオテンシンII受容体拮抗薬の投与が肝組織中の酸化ストレスや線維化関連遺伝子の発現を抑制したことでその抗線維化効果が期待されたが、長期投与では十分な線維化抑制効果は得られなかった(表1)。

このように、いわゆる「線維化治療薬」が奏功しない理由としては、薬効自体の問題や副作用の懸念のみならず、臨床研究デザインの限界が挙げられる。すなわち、様々な進行速度を有する多くの慢性肝疾患患者の中から比較的均一な対象集団を設定し、通常10年単位の長期経過をたどる肝線

維症に対する薬物の投与効果を、1年前後という短期の比較対照試験で評価することの困難さである。感度ならびに特異度に優れた肝線維化の進展と改善の診断方法、しかも線維化の程度 (fibrosis) ではなく、ダイナミックな合成系 (fibrogenesis) や分解系 (fibrolysis) の非侵襲的診断法の開発が期待される。米国では肝臓病学会と食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) が合同ワークショップを開催し、抗線維化効果を評価する臨床研究デザインの確立とエンドポイントの設定に丸となって取り組んでいる。わが国においても、この問題に関する強い認識と早急な対応が必要である。

おわりに

紙面の関係で、近年における肝線維化研究の進歩の全てを紹介することはできなかったが、冒頭に述べたように肝線維症治療薬の開発に対する産学の関心の高まりは著しい。培養細胞を用いた *in vitro* 試験や動物実験によって数多くの抗線維化作用物質が同定・報告されていながら、なぜ臨床で十分な効果を発揮できないのか。どのような患者を線維化治療の対象に選んで、どのような評価系を構築すべきか。コラーゲン産生細胞特異的に薬剤を到達させて副作用を軽減するには、さらにもどのような工夫が必要か。肝線維症治療薬の一刻も早い臨床応用に向けて、肝臓専門医と創薬研究者に託された課題は大きい。

文 献

- 1) Ito T. Recent advances in the study on the fine structure of the hepatic sinusoidal wall. *Gumma Rep Med Sci* 1973 ; 6 : 119-163
- 2) Wake K. 'Sternzellen' in the liver : Perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat* 1971 ; 132 : 429-462
- 3) Senoo H, Hata R, Nagai Y, et al. Stellate cells (vitamin A-storing cells) are the primary site of collagen synthesis in non-parenchymal cells in the liver. *Biomed Res* 1984 ; 5 : 451-458
- 4) Seki E, De Minicis S, Gwak GY, et al. CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2009 ; 119 : 1858-1870
- 5) Asahina K, Tsai SY, Li P, et al. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology* 2009 ; 49 : 998-1011
- 6) De Minicis S, Seki E, Uchinami H, et al. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology* 2007 ; 132 : 1937-1946
- 7) Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998 ; 102 : 538-549
- 8) Kisseleva T, Cong M, Paik Y, et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 : 9448-9453
- 9) She H, Xiong S, Hazra S, et al. Adipogenic transcriptional regulation of hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 4959-4967
- 10) Yanagitani A, Yamada S, Yasui S, et al. Retinoic acid receptor alpha dominant negative form causes steatohepatitis and liver tumors in transgenic mice. *Hepatology* 2004 ; 40 : 366-375
- 11) Thuy le TT, Morita T, Yoshida K, et al. Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. *Am J Pathol* 2011 ; 179 : 1050-1060
- 12) Beaussier M, Wendum D, Schiffer E, et al. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries. *Lab Invest* 2007 ; 87 : 292-303
- 13) Magness ST, Bataller R, Yang L, et al. A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell populations. *Hepatology* 2004 ; 40 : 1151-1159
- 14) Forbes SJ, Russo FP, Rey V, et al. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004 ; 126 : 955-963
- 15) Miyata E, Masuya M, Yoshida S, et al. Hematopoietic origin of hepatic stellate cells in the adult liver. *Blood* 2008 ; 111 : 2427-2435
- 16) Higashiyama R, Moro T, Nakao S, et al. Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen

- production during hepatic fibrogenesis in mice. *Gastroenterology* 2009 ; 137 : 1459-1466. e1
- 17) Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, et al. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol* 2006 ; 45 : 429-438
 - 18) Chu AS, Diaz R, Hui JJ, et al. Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial-to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis. *Hepatology* 2011 ; 53 : 1685-1695
 - 19) Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into transforming growth factor- β Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 2007 ; 56 : 284-292
 - 20) Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, et al. TLR4 enhances TGF- β signaling and hepatic fibrosis. *Nature Med* 2007 ; 13 : 1324-1332
 - 21) Teratani T, Tomita K, Suzuki T, et al. A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2012 ; 142 : 152-164 e10
 - 22) Inagaki Y, Truter S, Ramirez F. Transforming growth factor- β stimulates $\alpha 2$ (I) collagen gene expression through a cis-acting element that contains an Sp1-binding site. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 14828-14834
 - 23) Zhang W, Ou J, Inagaki Y, et al. Synergistic cooperation between Sp1 and Smad3/Smad4 mediates transforming growth factor $\beta 1$ stimulation of $\alpha 2$ (I) collagen (COL1A2) transcription. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 39237-39245
 - 24) Inagaki Y, Mamura M, Kanamaru K, et al. Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 2001 ; 187 : 117-123
 - 25) Higashi K, Inagaki Y, Fujimori K, et al. Interferon- γ interferes with transforming growth factor- β signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 43470-43479
 - 26) Inagaki Y, Kushida M, Higashi K, et al. Cell type-specific intervention of TGF- β /Smad signaling suppresses collagen gene expression and hepatic fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2005 ; 129 : 259-268
 - 27) Higashi K, Tomigahara Y, Shiraki H, et al. A novel small compound that promotes nuclear translocation of YB-1 ameliorates experimental hepatic fibrosis in mice. *J Biol Chem* 2011 ; 286 : 4485-4492
 - 28) Sato Y, Murase K, Kato J, et al. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nature Biotechnology* 2008 ; 26 : 431-442
 - 29) Watanabe T, Niioka M, Hozawa S, et al. Gene expression of interstitial collagenase in both progressive and recovery phase of rat liver fibrosis induced by carbon tetrachloride. *J Hepatol* 2000 ; 33 : 224-235
 - 30) Uchinami H, Seki E, Brenner DA, et al. Loss of MMP 13 attenuates murine hepatic injury and fibrosis during cholestasis. *Hepatology* 2006 ; 44 : 420-429
 - 31) Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, et al. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2007 ; 45 : 213-222
 - 32) Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004 ; 40 : 1304-1311
 - 33) Schulte Am Esch II J, et al. *Stem Cells* 2005 ; 23 : 463-470
 - 34) Terai S, Ishikawa T, Omori K, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006 ; 24 : 2292-2298
 - 35) Fang B, Shi M, Liao L, et al. Systemic infusion of FLK1 (+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004 ; 78 : 83-88
 - 36) Nakamura T, Torimura T, Sakamoto M, et al. Significance and therapeutic potential of endothelial progenitor cell transplantation in a cirrhotic liver rat model. *Gastroenterology* 2007 ; 133 : 91-107.e1
 - 37) Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M, et al. Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann Intern Med* 2000 ; 132 : 517-524
 - 38) Berzigotti A, Castera L. Update on ultrasound imaging of liver fibrosis. *J Hepatol* 2013 ; 58 : 180-182
 - 39) Wang Q-B, Zhu H, Liu HL, et al. Performance of magnetic resonance elastography and diffusion-weighted imaging for the staging of hepatic fibrosis : A meta-analysis. *Hepatology* 2012 ; 56 : 239-247
 - 40) Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, et al. A serum "sweet-doughnut" protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. *Sci Rep* 2013 ; 3 : 1065

Original Article

Enhanced survival of mice infused with bone marrow-derived as compared with adipose-derived mesenchymal stem cells

Shogo Shiratsuki,¹ Shuji Terai,¹ Yasuhiko Murata,¹ Taro Takami,¹ Naoki Yamamoto,¹ Koichi Fujisawa,¹ Guzel Burganova,^{1,2} Luiz Fernando Quintanilha^{1,3} and Isao Sakaida¹¹Department of Gastroenterology and Hepatology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Ube, Japan,²Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia; and³Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Aim: Less invasive therapies using mesenchymal stem cells (MSC) are being developed to treat patients with severe liver cirrhosis. MSC constitute a promising cell source for regenerative therapy and are frequently isolated from bone marrow (BMSC) or adipose tissue (ASC). Therefore, this study assessed the characteristics of these two cell types and their safety for cell infusion.

Methods: *In vitro*, exhaustive genetic analysis was performed using human (h)BMSC and hASC. Subsequently, the expression of mRNA and protein was evaluated. *In vivo*, mouse (m)BMSC or mASC was infused into serial mice via the peripheral vein, and 24-h survival rate, prothrombin time and cause of death were analyzed.

Results: On polymerase chain reaction, western blotting, enzyme-linked immunoassay and fluorescence-activated cell sorting, tissue factor was found to be expressed at higher levels in hASC than in hBMSC. Prothrombin time in mice infused with

mASC (>120 s) was markedly longer than that of untreated mice (6.5 ± 1.7 s) and that of mice infused with BMSC (6.7 ± 0.8 s) ($P < 0.001$), indicating that pro-coagulation activity was potentially enhanced after ASC infusion. The 24-h survival rates in the mASC- and mBMSC-infused groups were 46.4% (13/28) and 95.5% (21/22), respectively; in the former, the rate decreased with increasing number of infused mASC. This cell number-dependent effect was not observed with mBMSC. A histopathological analysis of mice that died immediately following mASC infusion revealed multiple thrombi in the blood vessels of the lungs.

Conclusion: These results indicate that BMSC are a superior and safer cell source for regenerative therapy.

Key words: matrix metalloproteinase, mesenchymal stem cell, pro-coagulation, tissue factor

INTRODUCTION

REGENERATIVE THERAPY IS a potential cure for organ failure patients. We have previously reported on the efficacy and safety of autologous bone marrow cell infusion (ABMi) therapy,¹ which has shown promise as a therapeutic strategy for treating liver cirrhosis.^{2,3} However, current ABMi therapy requires the collection of bone marrow by aspiration under general anesthesia, so there are strict criteria regarding the general health of patients. This prompted us to develop a cell therapy approach using mesenchymal stem cells (MSC) for liver regeneration,

which have both healing and immunosuppressive properties.⁴ MSC can be derived from bone marrow (BMSC) and adipose tissue (ASC). Although they have similar features, their full characterization can help to determine the optimal source of MSC and the most effective cell type for treating human diseases. The present study compares the safety of infusions using BMSC and ASC. The results showed an enhanced pro-coagulation activity associated with ASC, indicating that BMSC are the more attractive option for cell therapy.

METHODS

Animals

C57BL/6 WILD-TYPE MICE (SLC Japan, Shizuoka, Japan) were used for experiments. All animal studies were performed in accordance with the institutional

Correspondence: Dr Shuji Terai, Department of Gastroenterology and Hepatology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami-Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan. Email: terais@yamaguchi-u.ac.jp
Received 9 December 2014; revision 5 February 2015; accepted 10 February 2015.