

平成 24～26 年度厚生労働科学研究費補助金
(肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業))
分担研究報告書

「新規の線維肝再生促進因子 OGFRL1 の組織特異的分布と機能解析」

研究分担者氏名 : 稲垣 豊
所属機関 : 東海大学 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見られ、その対策が急務となっている。肝硬変症例に対する次世代型自家骨髄細胞移植療法の確立を目的として、本研究者が独自に同定した骨髄細胞に由来する新規の線維肝再生促進因子 Opioid growth factor receptor-like 1 (OGFRL1) について、その組織発現分布と機能解析を行った。

【方法】C57BL/6 の雄性および雌性マウスから各臓器を摘出し、RNA を抽出した上で、内因性 OGFRL1 の発現を Real time RT-PCR 法により定量解析した。また、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて OGFRL1 遺伝子の欠損 (KO) マウスを作製し、その表現型について肝再生の面から検討した。

【成績】内因性 OGFRL1 の発現は、脳神経系組織において最も高く、次いで肺、脾臓、骨髄、肝臓の順に認められた。CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、数塩基対から最長で数百塩基対の欠損を示す、複数系統の OGFRL1 KO マウスを得た。その表現型の検討では、同マウスは正常に誕生・発育し、未処理状態の肝組織には明らかな組織学的異常は認められなかった。しかしながら、野生型マウスと比較して、70%部分肝切除後の肝細胞の DNA 合成の低下と細胞分裂の遅延が認められ、OGFRL1 が肝再生に密接に関連する因子であることが証明された。

【考案】OGFRL1 発現レンチウイルスを骨髄間葉系幹細胞に感染させた上で経脾臓的に投与した先行実験では、部分肝切除後の線維肝の再生促進とともに、cyclin B1/B2/A2 をはじめとする細胞回転・細胞分裂に関わる遺伝子群発現がいずれも 10 倍程度増加していた。今回の OGFRL1 KO マウスを用いた実験結果はこれを裏付けるもので、OGFRL1 を用いた線維肝再生治療法の開発を目指す上で重要な所見が得られた。

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移植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という点は、十分に解明されていない。加えて、自家骨髄細胞に対して、線維肝の再生を促進するような *ex vivo* 処理を行い、高機能化した上で患者体内に投与するような次世代型の細胞治療戦略も確立されていない。

そこで本事業の最終年度となる 2014 年度は、骨髄間葉系幹細胞の体外修飾に基づく次世代型の細胞治療法を臨床応用に結びつけるため、本研究者が自ら同定した骨髄細胞に由来する新規の線維肝再生促進因子 Opioid growth factor receptor-like 1

(OGFRL1) について、その組織発現分布を明らかにするとともに、CRISPR/Cas9 系を用いて OGFRL1 ノックアウトマウス (KO) を作製し、その機能の解明に着手した。

B. 研究方法

1) 組織 RNA の抽出と Real time RT-PCR:

C57BL/6 の雄性および雌性マウスから主要臓器を摘出し、total RNA を抽出した。次いで、OGFRL1 に対する特異的プライマーを設計し、Real time RT-PCR 法を用いて内因性 OGFRL1 遺伝子の発現を定量解析し、臓器間で比較を行った。

2) OGFRL1 遺伝子のターゲティング:

OGFRL1 の Exon 1 配列に対応する guide RNA を設計し、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて同部分を含む OGFRL1 遺伝子の欠失を試みた。得られたマウスから tail DNA を抽出し、PCR 産物の電気泳動ないし直接シーケンシング法により OGFRL1 遺伝子の欠失範囲の同定を行った。

3) OGFRL1 KO マウスの表現型解析:

得られた OGFRL1 KO マウスについて、胎児期の発生や生後の生育状況を野生型マウスと比較した。また、成熟マウスを用いて未処理状態の肝組織像を検討した。さらに、70%の部分肝切除を行った際の肝再生について、BrdU の取り込みや有糸分裂細胞数を指標に評価を行った。

C. 研究結果

1) 内因性 OGFRL1 の組織発現分布:

OGFRL1 の発現は、脳神経系組織において最も高く、次いで肺、脾臓、骨髄、肝臓の順に認められた。その他の臓器において

は、OGFRL1 の発現はわずかであった。また、雄性マウスと雌性マウスとで、発現パターンに差異は認められなかった。

2) OGFRL1 KO マウスの作出:

CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、数塩基対から最長で数百塩基対の欠損を示す、計 7 系統の OGFRL1 KO マウスを得た。うち、3 系統では、アガロースゲル電気泳動法で容易に検出可能な数百塩基対に及ぶ遺伝子の欠損が確認された (下図)。

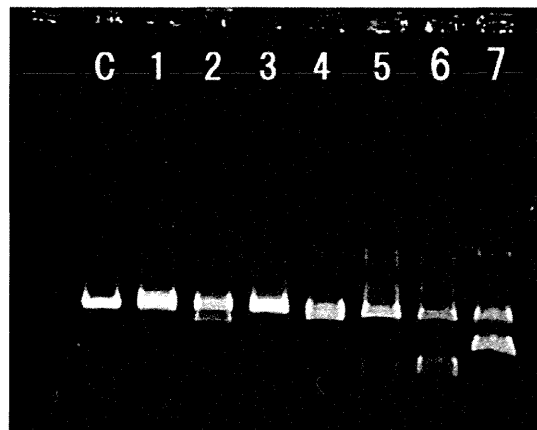


図. OGFRL1 KO マウス (F1) の電気泳動像

7 系統中 3 系統では、数百塩基対に及ぶ広範囲の欠失が確認された (Nos. 5, 6, および 7)

3) OGFRL1 KO マウスの表現型:

同マウスは正常に誕生・発育し、成熟マウスの未処理状態の肝組織に明らかな組織学的異常は認められなかった。しかしながら、70%部分肝切除を行うと、野生型マウスに比較して複数系統の OGFRL1 KO マウスで肝細胞の DNA 合成の低下と細胞分裂の遅延が認められた。

D. 考察

OGFRL1 は、四塩化炭素の反復投与により作製した実験的肝硬変症からの回復過程において、線維肝組織へと浸潤した骨髄細胞が産生する新規の再生促進因子として、本研究者らによって独自に同定された。実際、OGFRL1 を発現する組換え型レンチウイルスを骨髄間葉系幹細胞 (MSC) に感染させた上で経脾臓的に投与した先行実験では、線維化の改善とともに部分肝切除後の線維肝の再生促進が認められた。この際、OGFRL1 発現 MSC を投与した肝組織においては、cyclin B1/B2/A2 をはじめとする細胞回転・細胞分裂に関わる遺伝子群発現がいずれも 10 倍程度増加していた。今回の OGFRL1 KO マウスを用いた実験結果は、これを裏付ける所見であり、OGFRL1 が肝再生に密接に関連する因子であることが証明された。

肝硬変症例に対する自家骨髄細胞移植において、どのような細胞分画を用いるのが最も効果的であるかという点は、十分に解明されていない。MSC はその有力な細胞ソースの 1 つとされているが、本研究者ら昨年度までに行った検討では、培養に伴って MSC が有する matrix metalloproteinase-13 産生能は極端に低下し、移植に必要な充分数の MSC を得る際にその機能低下が問題となっていた。自家 MSC に対して、OGFRL1 発現を誘導するなど線維肝の再生を促進するような *ex vivo* 処理を行い、高機能化した上で患者体内に投与することは、次世代型の細胞治療法として有用な手段となることが期待される。

E. 結論

本研究者らが独自に同定した、新規の線維肝再生促進因子 OGFRL1 について、その組織発現分布と KO マウスを用いた機能解明に着手した。OGFRL1 は組織特異的発現分布を示すユニークな因子であり、その機能を解明し肝再生に対する促進機序を明らかにすることは、肝硬変症に対する安全かつ効率よい再生治療法の開発を目指す上で重要な情報をもたらすものと思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yutaka Inagaki and Reiichi Higashiyama: Interplay between bone marrow and liver in the pathogenesis of hepatic fibrosis. *Hepatol Res* 2012; 42(6): 543-548.

2. Isao Okazaki and Yutaka Inagaki: Novel strategies for hepatocellular carcinoma based on MMPs science. *Anti-Cancer Agents Med Chem* 2012; 12(7): 753-763.

3. 稲垣 豊、中尾祥絵、瀧澤友里、住吉秀明：肝線維症治療の研究はどこまで進展したか？*肝胆膵* 2012; 65(2): 253-260.

4. 稲垣 豊：今なぜ肝線維化研究が注目されているのか。 *医学のあゆみ* 2013; 244(6): 513.

5. 住吉秀明、稲垣 豊：コラーゲン分子種と線維症形成へのかかわり。 *医学のあゆみ* 2013; 244(6): 515-520.

6. 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(3): 758- 773, 2013

7. 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(11): 1437-1447, 2013

8. 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

9. Kamiya A, Inagaki Y. Stem and progenitor cell systems in liver development and regeneration. *Hepatology Res* 2015; 45(1): 29-37.

10. 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 2014; 103(9): 2171-2175.

11. Abe J, Shichino S, Ueha S, Hashimoto S, Tomura M, Inagaki Y, Stein JV, Matsushima K. Lymph node stromal cells negatively regulate antigen-specific CD4+ T cell responses. *J Immunol* 2014; 93(4):1636-1644.

12. 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(Basel)* 2014 Jun 27;6(3):1220-55.

13. 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; 68(5): 709-715.

14. 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; 74(3): 204-213.

15. 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 $\alpha 2(I)$ collagen gene in hepatic stellate cells - key roles of Ski, SMAD3, SMAD4 and SMAD7. *Am J Pathol* 2014; 184(5): 1458-1467.

2. 学会発表

1. 住吉秀明、瀧澤友里、中尾祥絵、三上健一郎、茂呂 忠、穂積勝人、紙谷聡英、稲垣 豊：細胞系譜特異的 Notch/Jagged-1 シグナルによる肝線維化と再生の病態形成。第 12 回日本再生医療学会総会、横浜、2013 年

2. Hanako Yamaoka, Hideaki Sumiyoshi, Sachie Nakao, Kaori Minakawa, Yuri Takizawa, Norihiro Ikoma, Tomotaka Mabuchi, Akira Ozawa, Kiyoshi Higashi, Koichi Saito, and Yutaka Inagaki: A novel small compound antagonizing TGF- β /Smad signal stimulates migration and proliferation of keratinocytes and enhances wound healing. 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Naha, 2012

3. Yutaka Inagaki, Hideaki Sumiyoshi, Hiroshi Fukumitsu, Reiichi Higashiyama, Sachie Nakao, Kaori Minakawa, Yuri Takizawa, Hanako Yamaoka, Tadashi Moro, Isao Okazaki, Koichi Saito, Kiyoshi Higashi: Identification of a novel bone marrow cell-derived factor that suppresses fibrogenesis and accelerates regeneration of murine fibrotic liver. 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2012
4. 瀧澤友里、辺 颯、小山 遼、楊 宇、駒田雅之、福光 寛、中尾祥絵、皆川香織、山岡華児、住吉秀明、稲垣 豊、喜多村直実、田中利明：Hepatocyte growth factor (HGF)による細胞増殖制御機構の解明. 第19回肝細胞研究会、札幌、2012年
5. 稲垣 豊：線維肝の再生における骨髄と肝臓の臓器相関. 第11回日本再生医療学会総会、シンポジウム5 「臓器再生の名脇役達ー血管再生と炎症・間質組織の生理学および病理学的役割ー」、横浜、2012年
6. 住吉秀明、福光 寛、東山礼一、中尾祥絵、皆川香織、茂呂 忠、山岡華児、瀧澤友里、東 清史、斎藤幸一、稲垣 豊：骨髄細胞に由来する新たな肝線維化改善・再生促進因子の同定と臨床応用. 第11回日本再生医療学会総会、横浜、2012年
7. 茂呂 忠、東山礼一、住吉秀明、稲垣 豊：胆汁うっ滞型肝線維症におけるコラーゲン産生細胞の起源と初期動態. 第48回肝臓学会総会、ワークショップ21 「肝線維化の病態解明と治療への展開」、金沢、2012年
8. 三上健一郎、東山礼一、遠藤 哲、坂本十一、沢田直也、福田眞作、稲垣 豊：Notch/Jagged-1 シグナルを介した肝前駆細胞動員と線維化の制御機構. 第48回肝臓学会総会、ワークショップ21 「肝線維化の病態解明と治療への展開」、金沢、2012年
9. 福光 寛、東山礼一、住吉秀明、稲垣 豊：骨髄細胞に由来する新たな肝線維化改善・再生促進因子の同定と臨床応用. 第48回肝臓学会総会、ワークショップ15 「肝再生、幹細胞研究が臨床医学にもたらす可能性」、金沢、2012年
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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

- 同学術大会、2013年6月28日、和歌山
14. 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
15. Sumiyoshi H, 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
16. 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
17. 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
18. 稲垣 豊. 肝臓の線維化とその治療. 第111回内科学会総会・講演会、シンポジウム3 「臓器の線維化とその治療」、東京、2014年4月13日
19. 茂呂 忠、住吉秀明、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繊維化促進機序の解明. 第50回日本肝臓学会総会、東京、2014年5月29日
20. 住吉秀明、東 清史、中尾祥絵、皆川香織、紙谷聡英、茂呂 忠、斎藤幸一、稲垣 豊. 骨髄細胞に由来する新たな肝繊維化改善・再生促進因子の同定. 第46回日本結合組織学会学術大会・第61回マトリックス研究会大会合同学術大会、名古屋、2014年6月7日
21. 稲垣 豊、石井恭正、茂呂 忠 : ミトコンドリア酸化ストレスによる肝線維化の病態形成. 第21回肝細胞研究会、シンポジウム1 「肝疾患の病態を制御するメカニズム」、東京、2014年6月27日
22. 山口典子、目崎喜弘、三浦光隆、稲垣 豊、吉川 究. ビタミン E 類縁化合物、トコロールの肝臓星細胞に対するアノイキス誘導は MMP 合成の促進を伴う. 第87回日本生化学会大会、京都、2014年10月16日
23. Sumiyoshi H, Kamiya A, Inagaki A. A novel therapy for liver fibrosis using ex vivo modified mesenchymal stem cells. 第18回日本肝臓学会大会、International Symposium 1 “Stem cells in liver regeneration and therapy: Present and future scope”, 神戸、2014年10月23日
24. Moro T, Sumiyoshi H, Inagaki Y. Direct contribution of mitochondrial oxidative stress to hepatic fibrogenesis. 第18回日本肝臓学会大会、International Symposium 2 “Mechanisms of hepatic

and pancreatic fibrosis: Clinical implications”, 神戸、2014年10月23日

25. Yokomori H, Okazaki I, Oda M, Ando W, Suzuki Y, Nobuhiko T, Yamanouchi E, Kuroda H, Kojima S, Hara M, Inagaki Y. Localizations and functional roles of MMP-1 in the early and advanced stages of human non-alcoholic steatohepatitis. 45th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2014. 11. 11.

26. Ando W, Yokomori H, Inagaki Y, Okazaki I, Suzuki Y, Nobuhiro T, Yamanouchi E, Tanabe H, Kuroda H, Kojima S, Hara M, Oda M, Komiyama T. The serum levels of SDF-1 α correlated with the fibrosis and suggested the appearance of hepatic progenitor cells in the advanced stage of NASH. 45th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2014. 11. 11.

27. 住吉秀明、大塚正人、木村 穰、福光寛、中尾祥絵、近田裕美、紙谷聡英、稲垣豊。ゲノム編集技術を用いた線維肝再生促進因子 OGREL1 の機能解析。第28回肝臓洞壁細胞研究会学術集会、岡山、2014年12月13日

28. 住吉秀明、大塚正人、木村 穰、福光寛、中尾祥絵、近田裕美、紙谷聡英、稲垣豊。ゲノム編集技術を用いた線維肝再生促進因子 OGFRL1 の機能解析。第14回再生医療学会、横浜、2015年3月20日

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

平成 24～26 年度厚生労働科学研究費補助金
(肝炎等克服実用化研究事業 (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)に MMP2 を強制的に発現させたものを作製し、 2×10^5 個の細胞を門脈経由で投与した。1週間後に肝臓組織を採取して、組織学的検討を行った。

【成績】

ASCにMMP2を強制的に発現させると、in vitro ではコラーゲンを分解できることを確認した。NASH 肝硬変モデルに移植して組織学的に検討したところ、一部の細胞の生着は認めたが、明らかな線維化の改善は認められなかった。

【考案】

これまでの検討で、投与細胞数を多くすると塞栓像が認められたために、今回は投与細胞数を減らしたので、塞栓自体は抑制できたが、一方で生着細胞数も少なくなり、線維化の改善につながらなかった可能性が示唆された。

A. 研究目的

生体肝移植に代わる次世代の肝再生療法の開発は、肝硬変症患者の救命のために喫緊の課題である。肝硬変患者に対する自己骨髄細胞を用いた細胞移植療法の効果が報告されており、特に骨髄細胞の抗線維化作用が注目されている。骨髄には造血幹細胞以外に多能性をもつ間葉系幹細胞の存在が知られている。一方脂肪組織にも骨髄と同様に多分化能をもつ間葉系幹細胞が存在するので、肝硬変の治療に使えるのではないかと考えた。これまでに我々は脂肪由来の間葉系幹細胞はマウスの急性肝炎モデルに投与をすると効果があることを確認している。そこで今回はマウスの肝硬変モデルを作成して、脂肪由来の間葉系幹細胞を移植した場合の効果を検討することを目的とした。

B. 研究方法

脂肪組織由来の間葉系幹細胞(ASC)の分離

GFP マウス (C57BL/6 由来, ♀ 10 週齢) の鼠径部の脂肪塊を摘出して phosphate buffered saline (PBS) で洗浄して、control medium [Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, low-glucose; GIBCO) + 10% fetal calf serum (FCS; GIBCO) + 1% penicillin-streptomycin (SIGMA)] の入った dish に移した後、メスで 2-3 mm まで細かく刻み、CO₂ incubator 内で 1 時間培養した。脂肪塊を遠心 (1,300 rpm, 6 min, room temperature) し、液体を吸引し、0.12 % type1 collagenase (Wako) を加え、37 °C で振盪 (30 min) し、細胞を解離した。解離した細胞に control medium を加え、遠心 (1300 rpm, 6 min, room temperature) し、上清及び沈まなかった細胞を吸引したものを 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、 1×10^6 / 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 に MMP2 遺伝子を強制発現

レトロウイルス(pMY)に MMP2 遺伝子と Puro 耐性遺伝子を導入したものを作製し、P3 の ASC に transfection し、Puromycin で ASC を選択培養した。

細胞抽出液と培養上清を採取し、その MMP2 の活性はゼラチンゼイモグラフィーアッセイキットを使用して in vitro で評価した。

肝硬変モデルマウスの作製と移植実験

C57/BL6 マウスに離乳直後よりココアバターを多く含む高脂肪食(オリエンタル酵母に特注)を3ヶ月間にわたって投与し、NASH 肝硬変モデルを作製した。このマウスに同系 GFP マウスの MMP2 を強制発現させた ASC 2×10^5 個を回盲部の腸間膜静脈から門脈に注入した(n=4)。1 週間後に肝臓組織を採取して、組織学的検討を行い、細胞移植をしなかった群と比較した。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。

GFP 陽性細胞は抗 GFP 抗体を用いて、ALP 活性をもつ二次抗体で赤く発色させた。

C. 研究結果

ASC に MMP2 遺伝子を強制発現

レトロウイルスで MMP2 遺伝子を ASC に導入後、puromycin で生き残った細胞から細胞抽出液と培養上清を採取し、ゼラチンゼイモグラフィーアッセイを行った。

図1のごとく、細胞抽出液と培養上清ともに MMP2 の酵素活性があることを確認した。

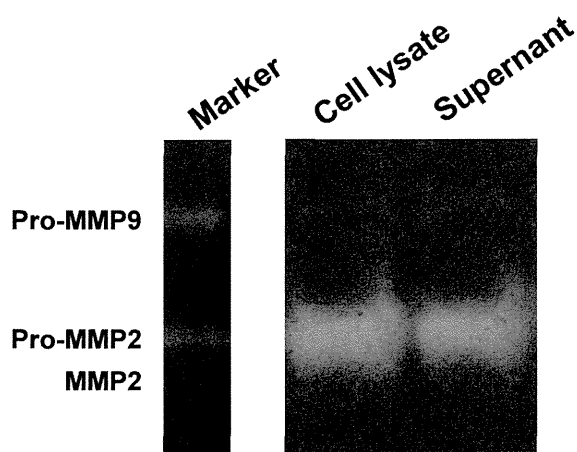


図1 ゼラチンゼイモグラフィーアッセイ

ASC の細胞抽出液と培養上清を電気泳動してコラーゲンの分解を検討した。Pro-MMP2 の位置で最もコラーゲンが分解された。

NASH モデルへの移植実験

培養した ASC 20 万個を門脈から移植した。図2に移植後1週間の組織像を示す。GFP 陽性細胞が赤く染まっており、移植細胞の生着が認められた。

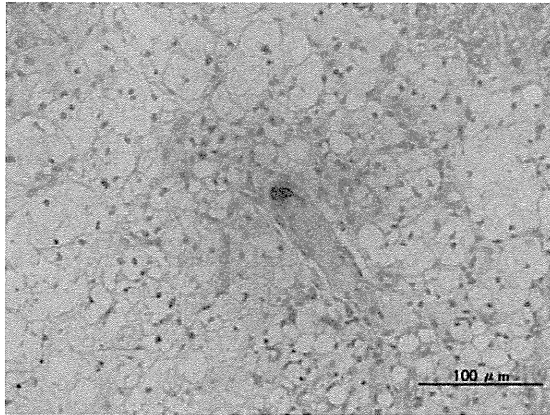


図2 細胞移植後1週間の NASH モデル肝臓組織

抗 GFP 抗体を用いた免疫染色を行い、GFP 陽性細胞が赤く染色されている。

シリウスレッド染色を行い、細胞移植群と非移植群において線維化の程度を比較したが、両者に有意な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。投与細胞数が多くな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、培養時に FGF2 を添加することで、細胞の小型化をはかり、投与時にヘパリンを添加した。

ASC に MMP2 を強制発現させることで、in vitro においてコラーゲンを分解する酵素活性をもった ASC を作製することができた。しかし NASH モデルマウスに投与しても、明らかな線維化の改善は認められなかった。その原因としては生着した細胞数が十分でなかった可能性が考えられる。これまでの経験で、投与細胞数を多くすると塞栓をおこしてしまうため、今回は

細胞数を少なめにした。今後至適細胞数の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に MMP2 を強制発現させて移植し、NASH モデルにおいて線維化の改善を検討したが、in vivo での明らかな効果は証明できなかった。

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。

平成 24～26 年度厚生労働科学研究費補助金
(肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業))
分担研究報告書

「肝硬変に対する脂肪組織由来間質細胞の治療効果機序の解明」

研究分担者氏名：酒井 佳夫
所属機関：金沢大学 職名：准教授

研究要旨：

【目的】間葉系幹細胞は、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化能に加え、肝細胞への分化能も報告されている。また、強力な抗炎症効果を有する。脂肪組織には間葉系幹細胞が豊富に含まれ、脂肪組織由来間質細胞(ADSC)を用いた肝疾患に対する再生療法への応用開発が期待されるが、その治療効果機序には不明な点が多い。本研究では Concanavalin A (ConA)誘導肝炎モデルマウスを用いて、ADSC による炎症についての治療効果機序を検討した。

【方法】C57BL/6 マウスに対し Concanavalin A を経尾静脈的に投与し、ConA 誘導肝炎モデルマウスを作成した。脂肪組織由来間質細胞を C57BL/6 マウスの皮下脂肪組織より分離、培養継代し獲得した。ConA 誘導肝炎モデルマウスに対して、ADSC を経尾静脈的に投与し、血液生化学所見、および肝組織における免疫染色、遺伝子発現解析による検討を行った。

【成績】ConA 誘導肝炎モデルマウスにおいて投与後 6～24 時間後の血清 ALT 活性値および LDH 活性値上昇を確認した。一方、ADSC 投与により血清 ALT 活性値および LDH 活性値は有意な改善を認め、ADSC による治療効果を確認した。ConA 誘導肝炎モデルマウス肝組織内において CD4+、CD11b+、Gr-1+、F4/80+炎症細胞の浸潤が確認されたが、肝組織内 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、ADSC を投与した ConA 肝炎マウスの肝組織の遺伝子発現解析により、ADSC による肝炎抑制効果は、ミエロイド系炎症細胞の抑制によることが示唆された。

【考案】ADSC 投与による ConA 肝炎の治療効果は、ミエロイド系細胞の抑制によることが示され、ADSC 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。

A. 研究目的

脳死肝移植の件数が伸び悩むなか、細胞移植による再生医療は大きく注目されている。特に間葉系幹細胞は多分化能および抗炎症作用の報告があり、また自己由来の細胞を用い、遺伝子操作を行わないことから再生療法への応用・開発が強く期待されている。一方で治療効果機序には不明な点が多い。本研究では Concanavalin A (ConA)誘導肝炎モデルマウスを用い、ADSC による治療の効果と機序の詳細を検討した。

B. 研究方法

C57BL/6 マウスに対し Concanavalin A を経尾静脈的に投与し、ConA 誘導肝炎モデルマウスを作成した。脂肪組織由来間質細胞を

C57BL/6 マウスの皮下脂肪組織より分離、培養継代し獲得した。ConA 誘導肝炎モデルマウスに対して、ConA 投与 3 時間後に ADSC を経尾静脈的に投与した。ConA 投与 24 時間後に血液を採取し、血清 ALT 活性値および LDH 活性値を確認した。肝組織を採取し CD4、CD11b、Gr-1、F4/80 抗体を用いた免疫染色を行い検討した。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による検討を行った。

C. 研究結果

ConA 誘導肝炎モデルマウスにおいて投与後 6～24 時間後の血清 ALT 活性値および LDH 活性値上昇を確認した。血清 ALT 活性値および LDH 活性値は ConA 投与 3 時間後

に ADSC 投与を投与したところ、ConA 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. 酒井佳夫、山下太郎、金子周一 肝癌幹細胞の生物学的特徴と幹細胞標的の新規治療法開発の可能性 肝胆膵65巻1号63-71頁、2012年7月
2. 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.

3. 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.

4. 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、金子周一. 肝硬変に対する脂肪組織由来間質細胞による肝再生療法開発. JDDW. 神戸. 2012
2. Akihiro Seki, Yoshio Sakai, Takuya Komura, Mami Higashimoto, Haruo Fujinaga, Masao Honda, Takashi Wada, Toshinari Takamura, Takahiro Ochiya, Shuichi Kaneko. Therapeutic effect of adipose derived mesenchymal stem cell to murine NASH liver cirrhosis inactivating Kupffer/Macrophage and helper T cell. AASLD, Boston, 2012.
3. 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

4. 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

5. 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

6. 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

7. 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

8. 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 巻 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

平成 24～26 年度厚生労働科学研究費補助金
(肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業))
分担研究報告書

「骨髓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髓細胞投与[Autologous Bone Marrow Cell Infusion (ABMi)]療法は患者本人の骨髓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髓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・保存された骨髓細胞に 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、保存された骨髓細胞を用いて 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 型肝炎患者の骨髓細胞中には 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・保存された骨髓細胞を用い、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髓細胞投与[Autologous Bone Marrow Cell Infusion (ABMi)]療法は患者本人の骨髓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。患者自身の骨髓細胞を注入するとはいえ、実際に骨髓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、保存された骨髓細胞を用いて 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髓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 ABM/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. 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;44(10) : E45-53.
2. 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; 44(10) : E172-80.
3. 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。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 24～26 年度厚生労働科学研究費補助金
(肝炎等克服実用化研究事業 (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 の意義と新規治療標的としての可能性」

平成 24 年度研究分担者氏名 : 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
平成 25～26 年度研究分担者氏名 : 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、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。

H24 年度 ; 研究協力者 : 疋田隼人、小玉
尚宏、川口司

H25 年度以降 ; 研究協力者 : 竹原徹郎、
川口司、牧野祐紀

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/CC14 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/CC14 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

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

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

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

3. 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.

4. 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.

5. 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. Synthetic lethal interaction of combined CD26 and Bcl-xL inhibition is a powerful

anticancer therapy against hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2014 Oct 9. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1. Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Tanaka, Yoshinobu Saito, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Wei Li, Takuya Miyagi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. (2012) Oxidative stresses play a major role in cancer development in apoptosis-prone liver. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌, 9月19 - 21日. (oral presentation)

2. 疋田隼人, 巽智秀, 竹原徹郎. (2012) 肝細胞障害が誘導する酸化ストレスと肝発癌. 第54回日本消化器病学会総会. 神戸, 10月10 - 12日. (oral presentation)

3. 小玉尚宏, 疋田隼人, 竹原徹郎. (2012) 血小板減少は肝線維化の増悪因子である. 第54回日本消化器病学会総会. 神戸, 10月10 - 12日. (oral presentation)

4. Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Tanaka, Yoshinobu Saito, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Wei Li, Takuya Miyagi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. (2012) Oxidative stresses play a major role in cancer development in apoptosis-prone liver. **The 63rd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease.** Boston, USA, November 8 - 12. (oral presentation)

5. Takahiro Kodama, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Hinako Tsunematsu, Kumiko Nishio, Takatoshi Nawa, Minoru

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

6. 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.

7. 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.

8. 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.

9. 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.

10. 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.