

# 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)

肝硬変に対する細胞治療法の  
臨床的確立とそのメカニズムの解明

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 坂井田 功

平成27(2015)年3月

# 目 次

1

## ・ 総括報告書

肝硬変に対する細胞治療法の臨床的確立とそのメカニズムの解明

坂井田 功

## ・ 分担研究年度終了報告

### 1. C型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性の検討

柳瀬 幹雄

### 2. ABM<sub>i</sub>療法における血清アルブミン値と生命予後の検討、およびC型肝炎硬変に対する

多施設対照化比較試験の実施に向けた取り組み

上野 義之

### 3. 肝硬変に対する細胞治療法の臨床的確立とそのメカニズムの解明

宮島 篤

### 4. 成体肝臓が内包する免疫非依存性異常細胞排除機構の発見とその解明

仁科 博史

### 5. NASHの病態形成におけるマクロファージの病態生理的意義

小川 佳宏

### 6. 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

稲垣 豊

### 7. 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

大河内仁志

### 8. 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

酒井 佳夫

### 9. 骨髄細胞中の肝炎ウイルスの検出

梅村 武司

### 10. 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

疋田 隼人

. 研究成果の刊行に関する一覧表

. 研究成果の刊行物・別刷

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))  
総括研究報告書

「肝硬変に対する細胞治療法の臨床的確立とそのメカニズムの解明」

研究代表者氏名 : 坂井田 功

所属機関 : 山口大学大学院医学系研究科 消化器病態内科学 職名 : 教授

**研究要旨 :**

<臨床研究>我々はC型・B型肝炎ウイルス、アルコールに起因する「**肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法(ABMi療法)**」を世界に先駆け開発し、欧文報告してきた。今までの知見よりこの治療法の本質は、肝線維化改善と肝臓組織幹細胞活性化による**肝機能改善効果**をもたらす**抗線維化・再生修復療法**と考えられ、その安全性・有効性は、国内外の追試でも確認報告された。さらに2011年12月6日に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の承認を得た「C型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対するABMi療法」の「**ランダム化比較試験**」は2013年6月1日付で「先進医療B」として承認された。また多施設共同研究の支援を行い、国立国際医療研究センター及び山形大学は2014年9月17日に厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究審査委員会を経て大臣承認を得た。これに伴い山口大学では、9月に先進医療Bにおける手続きを完了し、**同年12月12日に第1例目を実施し、2015年1月30日に2例目を標準的治療群として登録した。**

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

**分担研究者(所属機関・職名)**

柳瀬 幹雄(独立行政法人国立国際医療研究センター病院・医長)

上野 義之(山形大学医学部消化器内科学・教授)

宮島 篤(東京大学分子細胞生物学研究所・教授)

仁科 博史(東京医科歯科大学難治疾患研究所・教授)

小川 佳宏(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・教授)

稲垣 豊(東海大学医学部再生医療科学・教授)

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

寺井 崇二(山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学・准教授、2015年1月以降、新潟大学医歯学総合研究科消化器内科学分野・教授)

酒井 佳夫(金沢大学医薬保健研究域・准教授)

梅村 武司(信州大学医学部附属病院消化器内科・准教授)

高見 太郎(山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学・講師)

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

## A. 研究目的

肝硬変患者に対する肝臓再生療法として、患者自身から自己骨髄細胞液を 400mL 採取して洗浄後に骨髄単核球分画を分離濃縮し、同じ患者に末梢静脈から再投与する方法「**自己骨髄細胞投与療法 (ABMi 療法: Autologous Bone Marrow cell infusion therapy)**」を世界に先駆けて開発し、その臨床的安全性・有効性を報告した (Stem Cells. 2006;24:2292-8)。さらに ABMi 療法の技術移転を行った山形大学及び韓国延世大学でも同様の安全性・有効性が改めて確認、報告された (Cell Transplant. 2010;19:1237-46、Stem Cells Dev. 2011;20:1503-10)。また国立国際医療研究センターでは、HIV 合併 C 型肝硬変症に対する ABMi 療法を、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の承認後の 2011 年 3 月より開始し、現在までに 5 例実施している。この ABMi 療法では、骨髄単核球分画の細胞が肝硬変症の線維を溶解し、肝組織幹細胞などを活性化することで肝機能が修復・改善すると考えられている (特許第 4752058 号「肝再生用骨髄細胞画分」、登録日：平成 23 年 6 月 3 日)。このように ABMi 療法は臨床的に安全性が確認され、有効性が証明されているが、保険適応されるには質の高いエビデンスを明らかにする必要がある。そこでまず、「**C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する ABMi 療法のランダム化比較試験**」を計画した。本計画はすでに「ヒト幹細胞を用いる臨床研

究に関する指針」への承認申請を行い、2011 年 12 月 6 日にその承認を得ている。この後、先進医療 B への申請を行い、2013 年 6 月 1 日付で承認を得た。また多施設共同研究の支援を行い、国立国際医療研究センター及び山形大学は 2014 年 9 月 17 日に厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究審査委員会を経て大臣承認を得た。これに伴い山口大学では、9 月に先進医療 B における手続きを完了し、**同年 12 月 12 日に第 1 例目を実施し、2015 年 1 月 30 日に 2 例目を標準的治療群として登録した**。また基礎研究では、肝線維化マウスモデルや脂肪肝炎 (NASH) モデルマウスの解析から、骨髄または脂肪組織由来細胞の抗線維化メカニズムや NASH 病態を解明し、これらモデルマウスへの ABMi 療法の治療効果を検討することで、**B 型肝炎ウイルスや非アルコール性脂肪肝炎に起因する肝硬変症への ABMi 療法の適応拡大**を目指す。さらに間葉系細胞だけでなくマクロファージ系細胞の肝硬変に対する治療効果がマウス基礎研究から示唆されたため、**培養マクロファージ系細胞投与による新規肝臓再生修復療法の開発**のための基礎研究を行う。

## B. 研究方法

### (1)「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性に関する研究」の推進

「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性に関する研究」のランダム化比較試験を先進医療 B として山口大で実施するための体制整備を完成させる。

### (2)多施設共同研究のため、国立国際医療研

## 研究センターおよび山形大学内への支援

ランダム化比較試験は、山口大で先行実施するが、その後、国立国際医療研究センターや山形大を含む多施設で実施する予定である。そのため、これら実施予定施設の支援を行う。

### (3)MMP9 発現解析のための MMP9-LacZ/DeRed Tg マウス作出

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

## C. 研究結果

### (1)「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性に関する研究」の推進

ABMi 療法をより早く多くの肝硬変症患者に提供するためには、質の高いエビデンスを創出することが不可欠である。そこで研究代表者坂井田の統括のもと、「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性に関する研究」のランダム化比較試験を山口大で実施する（その後、国立国際医療研究センターや山形大を含む多施設で実施する）。なお対象は、「90 日以上離れた 2 点において Child-Pugh スコアが 7 点（Child-Pugh B）以上の C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変の状態で現行の内科的な治療法では改善が見込めない症例」で、全 34 例（ABMi 群 17 例、標準的治療群 17 例）であり、ABMi 群は細胞投与後（標準的治療群は登録後）24 週の Child-Pugh スコアが 1 点以上改善する割合を主要評価項目としている。なお

平成 25 年度からは、先端医療振興財団の西村 勉が新規分担研究者となりデータ管理等を行う。このランダム化比較試験は、2013 年 6 月 1 日付での先進医療 B の承認を得た。**同年 12 月 12 日に第 1 例目を実施し、2015 年 1 月 30 日に 2 例目を標準的治療群として登録した。**

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

国立国際医療研究センター及び山形大学は 2014 年 9 月 17 日に厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究審査委員会を経て大臣承認を得た。今後先進医療 B への申請支援を行っていく。

### (3)MMP9 発現解析のための MMP9-LacZ/DeRed Tg マウス作出

これまでのマウス GFP/CCl<sub>4</sub> モデル研究で、投与骨髄細胞が MMP9 を発現し肝線維化を抑制することを確認している。GFP/CCl<sub>4</sub> モデルの MMP9 発現細胞を同定し MMP9 発現メカニズムを解明するため、MMP9 プロモーター下に標識蛋白 LacZ/DeRed を発現する遺伝子改変マウスを作出した。

## D. 考察

平成 26 年度より、研究代表者坂井田の統括のもと、山口大で先行して「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性に関する研究」を先進医療 B として開始した。国立国際医療研究センター及び山形大は 2014 年 9 月 17 日に厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究審査委員会を経て大臣承認を得ており、今後先進医療 B への申請を行う予定である。これらの実施により、質の高い工

ビデンスを創出し、ABMi 療法の普及に努めていく。その一方、基礎研究では、骨髄由来細胞や脂肪組織由来細胞による肝線維化改善メカニズムの解明を進める。

## E. 結論

平成 26 年度より「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性に関する研究」のランダム化比較試験を山口大で先進医療 B として先行して実施した。また、マウス基礎研究では MMP9 発現メカニズムの解析等を継続する。

## 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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*. 2015 Feb 18. [Epub ahead of print]
2. Terai S, Takami T, Yamamoto N, Fujisawa K, Ishikawa T, Urata Y, Tanimoto H, Iwamoto T, Mizunaga Y, Matsuda T, Oono T, Marumoto M, Burganova G, Quintanilha LF, Hidaka I, Marumoto Y, Saeki I, Uchida K, Yamasaki Y, Tani K, Taura Y, Fujii Y, Nishina H, Okita K, and Sakaida I. Status and Prospects of Liver Cirrhosis Treatment by Using Bone Marrow-Derived Cells and Mesenchymal Cells. *Tissue Eng Part B Rev*.

2014 ;20(3):206-10.

3. 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、*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) 2014、p244-246.

### 2. 学会発表

1. Takami T, Terai S, Sakaida I. Our liver regeneration therapies using autologous bone marrow derived cells for liver cirrhosis. 29th International College of Neuropsychopharmacology (CINP). 2014 Jun. Vancouver, Canada.
2. Takami T, Terai S, Quintanilha LF, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Less invasive liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells. FASEB meeting. 2014 Aug. Keystone, CO, USA..
3. Takami T, Terai S, Sakaida I. Our regeneration therapies using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. JDDW2014. 2014 Nov. Kobe, Hyogo, Japan.
4. Matusda T, Takami T, Ishikawa T, Yamamoto N, Terai S, Sakaida I. New canine liver cirrhotic model to develop a less invasive regeneration therapy using cultured autologous bone marrow-derived cells. The Liver Meeting 2014, AASLD. 2014 Nov. Boston, MA, USA.
5. Takami T, Terai S, Paredes BD, Quintanilha LF, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Less invasive liver

regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells with redox-regulatory capacity. The Liver Meeting 2014, AASLD.2014 Nov. Boston, MA, USA.

6. 白築祥吾、寺井崇二、村田泰彦、松田崇史、石川剛、高見太郎、山本直樹、坂井田功 骨髄由来及び脂肪組織由来間葉系幹細胞(BMSC・ASC)における生物学的特性の差異に関する検討. 第13回日本再生医療学会総会. 2014年3月 京都

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)**

1.特許取得 2. 実用新案登録 3. その他  
なし

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

「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する  
自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性の検討」

研究分担者氏名 : 柳瀬 幹雄

所属機関 : 独立行政法人国立国際医療研究センター病院 消化器内科 職名 : 医長

**研究要旨 :**

【目的】C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性の検討を目的とする。

【方法】主研究機関(山口大学)による当療法の多施設ランダム化比較試験への参加: 現行の内科的な治療法では改善が見込めない C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変症で、組み入れ基準を満たす同意症例をランダムに細胞投与群、標準的治療群に割り付ける。細胞投与群は、入院のうえ治療前評価と全身麻酔下での自己骨髄細胞採取・投与を行う。治療効果の判定は臨床所見、血液所見ならびに画像所見により行う。標準的治療群では、登録から 24 週後まで標準的治療を実施する。併せて当試験参加対象となりうる C 型肝炎患者に関する当試験への適格性ならびに血小板値に着目した調査を行った。

【成績】当研究に関し厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会を経て厚生労働大臣承認を得、先進医療 B 施設認定に向け申請手続きを進めている。また対象となる C 型肝炎患者に対する調査では、肝予備能の変動への留意や血小板値に関する他疾患関連肝硬変との違いが示唆された。

【考案】自己骨髄細胞投与療法開始に向けた手続きならびに体制整備を進めた。次年度の実施を目指し準備を継続する。

共同研究者

野崎 雄一 独立行政法人国立国際医療研究センター病院 消化器内科医師

ランダム化比較試験に参加するにあたりその研究体制の整備、ならびに該当疾患患者に関する調査を行った。

**A. 研究目的**

線維化の進展した慢性肝疾患に対する根本的治療法はいまだ確立されていない。肝移植に与る患者は一部に限られ、その侵襲性や医療経済的な問題は大きい。再生医療の一環として、今回 C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性を検討する多施設

**B. 研究方法**

1、自己骨髄細胞投与療法に関するプロトコル

肝硬変を有する 20 歳から 75 歳の肝硬変患者のうち、現行の内科的な治療法では改善が見込めない C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変症に限定した症例で、本研究へ

の参加に同意が得られ、除外基準のいずれにも該当しない症例を登録する。

登録された症例をランダムに、細胞投与群、標準的治療群に割り付ける。

細胞投与群は、入院のうえ治療前評価と全身麻酔下での自己骨髄細胞採取・投与を行う。術後1週間は原則として入院下で厳重な観察を行い、以後定期的に経過を追跡する。規定された時期以外でも担当医が必要と認めた場合は調査を行う。治療効果の判定は臨床所見、血液所見ならびに画像所見により行う。

標準的治療群では、登録から24週後まで標準的治療を実施する。細胞投与治療を実施した場合には、投与後24週時までの安全性を確認する。

2、C型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に関する調査

1)平成24年度～26年度において継続通院している非代償期C型肝炎患者の一部に関して、上記プロトコルにおける適格性をみた。

2)2000年～2013年に当院で診断された肝硬変患者に関し、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)関連肝硬変とC型肝炎関連肝硬変患者群において、血小板値ならびにCT画像を基に脾体積の算出を行い比較検討した。

### C. 研究結果

1、当研究について平成24年7月院内倫理委員会承認後、同年9月厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会を経て継続審議となった。その後当研究を先進医療Bとして実施するための多施設間調整を経て、平成26年5月同審査委員会にて審議、

同年9月厚生労働大臣承認を得た。現在先進医療B施設追加に関する申請準備を行っている。

2、1)調査対象患者8名の内訳はChild-Pughスコア7点2名、8点2名、9点2名、10点1名、11点1名。経過中、総ビリルビン値が3.0mg/dl以上になったことのある患者は2名、肝細胞がん発生にて調査対象から除外された患者が1名いた。2)619例の肝硬変患者のうちNASH関連32例、C型肝炎関連342例。NASH関連肝硬変患者の血小板値は $13.4 \pm 5.9$ 万/ $\mu\text{L}$ 、C型肝炎関連肝硬変では $11.2 \pm 5.6$ 万/ $\mu\text{L}$ で両群間に有意差をみとめた( $p < 0.05$ )。Child分類で層別化したところChild分類Aにおいて両群間の血小板値に有意差をみとめた( $14.8 \pm 5.9$ 万/ $\mu\text{L}$  vs  $11.5 \pm 5.3$ 万/ $\mu\text{L}$ ,  $p < 0.01$ )。脾体積に関しては両群間で有意差をみとめなかった( $128 \pm 61$   $\text{cm}^3$  vs  $155 \pm 117$   $\text{cm}^3$ )。

### D. 考察

自己骨髄細胞投与療法開始に向けた先進医療B施設追加手続きならびに体制整備に関しては、来年度の実施を目指し引き続き作業準備に傾注する。

同療法に関する対象患者の組み入れに関しては、潜在候補者のなかにプロトコル基準から逸脱する経過をとる患者が少なからずみられ、安全性を担保する観点から慎重な観察を要すると思われた。

肝硬変患者における成因背景別の血小板値に関しては、B型肝炎患者においてC型肝炎患者より有意に高値であるとの報告がある。今回当院における後ろ向き検討ではNASH肝硬変患者群とC型肝炎患者

群間では C 型肝硬変患者群での血小板値が低いことが示唆された。血小板値を規定する因子として、循環プールとしての脾体積の他、トロンボポエチンなどの産生因子、血小板関連 PA-IgG などの免疫機序など多岐に亘る因子が挙げられる。C 型肝硬変において他の成因背景と画した血小板減少機序が存在するのか関心がもたれる。

特記事項なし。

## E. 結論

C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法開始に向けた体制整備を行った。

本療法の対象となる C 型肝炎関連肝硬変患者に関し、プロトコル適格性の検討ならびに血小板値に関する他疾患由来肝硬変との比較検討を行った。

## 研究発表

### 1. 論文発表

本研究に関する発表はなし。

### 2. 学会発表

1. 三島 沙織、野崎 雄一、正木 尚彦、青木 智則、大武 優希、藤澤 真理子、小森 寛之、櫻井 恵、三神 信太郎、小島 康志、今村 雅俊、柳瀬 幹雄

非アルコール性脂肪性肝炎由来の肝硬変患者の血小板値の検討

JDDW 2014 神戸 2014.10

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得

特記事項なし。

2. 実用新案登録

特記事項なし。

3. その他

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

「ABMi療法における血清アルブミン値と生命予後の検討、およびC型肝炎に対する  
多施設対照化比較試験の実施に向けた取り組み」

研究分担者 : 上野 義之

所属機関 : 山形大学医学部消化器内科学 職名 : 教授

**研究要旨 :**

【目的】アルコール性肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与 (Autologous Bone Marrow Cells Infusion: ABMi) 療法を行い、治療後 24 週間ならびに 72 週間に亘る持続的な肝機能改善効果 (血清アルブミン、総蛋白、プロトロンビン活性) について報告してきた。今回、更に長期間の経過観察を行うことで、ABMi 療法施行後の患者の生命予後を明らかにする。また、C型肝炎患者に対する多施設対照化比較試験に参加するための準備を進める。

【方法】1.当科で先行研究として ABMi 療法を施行したアルコール性肝硬変患者 5 例について、生命予後ならびに血清アルブミン値と予後の関係を検討した。2.ヒト幹細胞に関わる臨床研究の開始に必要な申請を行った。

【成績】1.アルコール性肝硬変患者 5 例について、ABMi 療法施行後の平均観察期間は 5.05 年(range:2.42 年-7.25 年)であった。患者の生命予後は 死亡 2 例、生存 3 例であった。2 例の死因は肝細胞がん、および肝不全・腎不全であった。2.血清アルブミン値を、ABMi 直前値、最新値 (死亡例は死亡前値) を用いて検討した。生存例 (3 例) では、全例、血清アルブミン最新値が ABMi 直前値に比較し上昇していたが、死亡例 (2 例) では血清アルブミン死亡直前値は ABMi 直前値に比較し低下していた。ABMi 療法施行 4 週後の血清アルブミン値は、生存例 3 例、肝細胞がん発病までは経過良好であった死亡例 1 例で、ABMi 直前値に比較して上昇していた。一方、肝不全・腎不全で死亡した症例では、ABMi 療法施行 4 週後の血清アルブミン値は ABMi 直前値と差が認められなかった。3.C型肝炎患者に対する多施設対照化比較試験について、平成 26 年 4 月に厚生労働省「ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会」へ研究申請を行い、同年 9 月に研究許可に関する大臣意見をえた。山口大学先進医療 (B) 協力医療機関として申請手続きを進めている。

【考案】アルコール性肝硬変に対する ABMi 療法では、長期生存例では血清アルブミン値の改善が見られることが確認された。また ABMi 療法施行 4 週後の早期の血清アルブミン値の反応が、その後の血清アルブミン値の改善および生命予後を予測する上で有用なマーカーとなり得る可能性がある。今後の臨床研究において検討する価値があるものと思われる。

共同研究者

齋藤貴史 山形大学医学部消化器内科学  
准教授

奥本和夫 山形大学医学部消化器内科学  
助教

富田恭子 山形大学医学部消化器内科学  
大学院

**A. 目的**

生体肝移植に代わる次世代の肝再生療法

の開発は、肝硬変患者の生命予後の改善のため喫緊の課題である。骨髄内には multipotent progenitor cell の存在が知られており、肝再生を目的とした肝硬変患者に対する自己骨髄細胞移植 (Autologous Bone Marrow Cells Infusion: ABMi) 療法が、主に C型肝炎ウイルスによる非代償性肝硬変患者に対して施行され、24 週間の術

後経過において Child-Pugh スコアや血清アルブミン値などの肝機能検査値全般の改善が報告されている(Terai S et al. Stem Cell 2006)。

私達は、2006年から2009年にかけて、アルコール性肝硬変患者に対する ABMi 療法を、山口大学チームとともに当大学医学部附属病院で施行した。ABMi 療法を施行されたアルコール性肝硬変 5 症例の症例対照研究では、24 週間にわたり臨床データの改善がみられることを報告した (Stem Cells Dev 2011; 20: 1503-1510)。肝炎ウイルス慢性持続感染のない、アルコール性肝硬変症では、本療法の肝機能改善効果がウイルス性肝疾患よりも期待出来るものと考え、72 週間 (2 年間) の長期間にわたる肝機能検査値の変動を評価した結果、肝機能改善効果 (血清アルブミン、総蛋白、プロトロンビン活性) が持続することを確認している。今回、ABMi 療法施行患者の生命予後を明らかにするとともに、血清アルブミン値と予後との関係を検討した。また、C 型肝硬変患者に対する多施設対照化比較試験に参加するため、ヒト幹細胞に関わる臨床研究を行うための研究組織の整備を行い、厚生労働省へ臨床研究の申請を行った。

## B. 方法

当科では、ABMi 療法施行前に 6 か月間以上の禁酒を確認できた 6 例 (男性) のアルコール性肝硬変患者に対し ABMi 療法を施行した。肝生検にて肝硬変 (F4) が確認され、かつ、総ビリルビン値 3.0 mg/dl 未満、血小板数 50,000/ $\mu$ l 以上、画像検査で肝細胞がんがなく、腹水や脳症がコントロールされ心肺機能良好で全身麻酔が可能な患

者、を対象とした。自己骨髄細胞は、全身麻酔下で 400ml の骨髄液を採取し、洗浄後に静脈内投与を行った。平成 22 年度までに 6 例 (男性) に施行した。ABMi 療法施行後の 24 週間の経過観察中に飲酒により脱落した 1 例を除外し、5 例を解析対象とした。平成 27 年 1 月 15 日現在における、患者の生命予後を明らかにした。観察期間のエンドポイントは、生存例は平成 27 年 1 月 15 日、死亡例は死亡時とした。また、血清アルブミン値について、ABMi 療法直前値、ABMi 療法施行 4 週後、最新値 (死亡例は死亡前値) を用いて、生命予後との関係を検討した。

## C. 結果

### 1. ABMi 療法施行患者の生命予後

ABMi 療法施行症例 (5 例) の、生命予後を表 1 に示す。ABMi 療法施行後の平均観察期間は 5.05 年 (range: 2.42 年-7.25 年) であった。患者の生命予後は 死亡 2 例、生存 3 例であった。2 例の死因は、肝細胞がん、および肝不全・腎不全であった。肝機能検査値の最新値 (死亡例は死亡前値) の検討では、生存例 (3 例) では血清アルブミン値の高値と child-pugh スコアの改善が認められるのに対し、死亡例 (2 例) では低アルブミン血症および child-pugh スコアの増悪が認められた、

### 2. 血清アルブミン値と生命予後の検討

血清アルブミンの ABMi 療法直前値、最新値 (死亡例は死亡前値) を用いて、予後との関係を検討した (図 1)。生存例 (3 例) では、全例、血清アルブミン最新値が ABMi 療法直前値に比較し上昇していたが、死亡例 (2 例) ではいずれも血清アルブミン死

亡前値は ABMi 直前値に比較し低下していた。ABMi 療法施行 4 週後の早期の血清アルブミン値を加えて、予後との関係を検討した (図 2)。ABMi 療法施行 4 週後の血清アルブミン値は、生存例 3 例、肝細胞がん発病までは経過良好であった死亡例 1 例 (肝細胞がん症例) では、ABMi 療法直前値に比較して上昇していた。一方、肝不全・腎不全で死亡した症例では、ABMi 療法施行 4 週後の血清アルブミン値は ABMi 直前値と差が認められなかった。

#### D. 考察

アルコール性肝硬変患者に対する ABMi 療法では、治療後 24 週間ないしは 72 週間の肝機能改善に関わる有効性が確認されている。ウイルス持続感染の影響がないアルコール性肝硬変において、ABMi 療法は、禁酒が守られた場合には良好な肝機能の持続的改善が得られ、良い適応であると思われる。

今回、ABMi 療法を受けた患者の生命予後を検討した結果、死亡例の死因は肝細胞がん、および肝不全・腎不全であった。死亡例では、死亡前の肝機能検査値において、低アルブミン血症が顕著であり、child-pugh スコアの増悪も見られた。一方、アルコール性肝硬変に対する ABMi 療法における長期生存例では、血清アルブミン値と child-pugh スコアの改善が確認された。そして、ABMi 療法施行 4 週後の早期の血清アルブミン値を ABMi 療法直前値と比較検討すると、肝不全・腎不全による死亡例では、早期のアルブミン上昇が認められなかった。ABMi 療法施行 4 週後の早期の血清アルブミン値の反応性が、ABMi に

よる肝再生効果を反映し、その後の血清アルブミン値の改善および生命予後を予測する上で有用なマーカーとなる可能性がある。

今後、実施を予定している C 型肝硬変に対する多施設対照化比較試験において、血清アルブミン値の早期反応と予後の関係を更に検討する価値があるものと思われた。

#### E. 結論

ABMi 療法により、生命予後の良好な例では、血清アルブミン値の改善が認められる。また、ABMi 療法施行後 4 週目の早期の血清アルブミン値の反応が、本治療の有効性を予測する上で有用なマーカーとなり得る可能性がある。今後の更なる検討を要する。

#### 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tomita K, Haga H, Mizuno K, Katsumi T, Sato C, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Saito T, Ueno Y: Epiregulin promotes the emergence and proliferation of adult liver progenitor cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2014; 307(1): G50-57
- 2) 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 2014; 44(10): E26-31

##### 2. 学会発表

- 1) 水野 恵、渡辺久剛、阿蘇里香、宇賀神

智、勝見智大、富田恭子、佐藤智佳子、奥本和夫、西瀬雄子、斎藤貴史、上野義之：当院における肝硬変の成因別実態と合併症の臨床的特徴。第 50 回日本肝臓学会総会、東京；2014 年 5 月

2) 渡辺久剛、斎藤貴史、上野義之：本県における肝炎対策の現状と課題をふまえた「やまがた肝炎ネットワーク」の構築と肝疾患診療連携体制。第 50 回日本肝臓学会総会、東京；2014 年 5 月

3) 富田恭子、芳賀弘明、水野 恵、勝見智大、佐藤智佳子、奥本和夫、西瀬雄子、渡辺久剛、斎藤貴史、上野義之：高度肝障害時に Epipegulin は肝前駆細胞を誘導・増殖させることにより肝再生に寄与する。第 50 回日本肝臓学会総会、東京；

2014 年 5 月

4) 佐藤智佳子、渡辺久剛、上野義之：糖尿病患者では潜在的 NASH が混在し NASH では肝病態進展に糖尿病が促進的役割を果たす。第 50 回日本肝臓学会総会、東京；2014 年 5 月

5) 渡辺久剛、佐藤智佳子、上野義之：生活習慣からみた非 B 非 C 肝癌の臨床的特徴と囲い込みのためのリスクファクター。第 18 回日本肝臓学会大会、神戸；2014 年 10 月

#### **知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)**

1. 特許取得 2. 実用新案登録  
なし。

**表 1 アルコール性肝硬変に対する ABMi 療法施行症例の生命予後**

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5
ABMi施行時年齢	59	61	60	75	69
観察期間	2年5ヶ月	7年3ヶ月	5年3ヶ月	5年2ヶ月	5年2ヶ月
生命予後 (2015.1.15)	死亡 (HCC)	生存	生存	生存	死亡 (肝・腎不全)
最新(死亡例は死亡前)臨床データ					
Albumin (g/dl)	2.4	5.2	4.9	3.8	2.6
T.bilirubin (mg/dl)	2.5	1.1	1.3	2.2	1.9
PT (%)	62	101	107	63	71
Ascites	moderate	none	none	none	minimal
Coma	none	none	none	none	grade
Child-Pugh score ( ) 治療前	11 (8)	5 (7)	5 (5)	7 (8)	8 (6)

**図 1 血清アルブミン値の長期経過と生命予後**

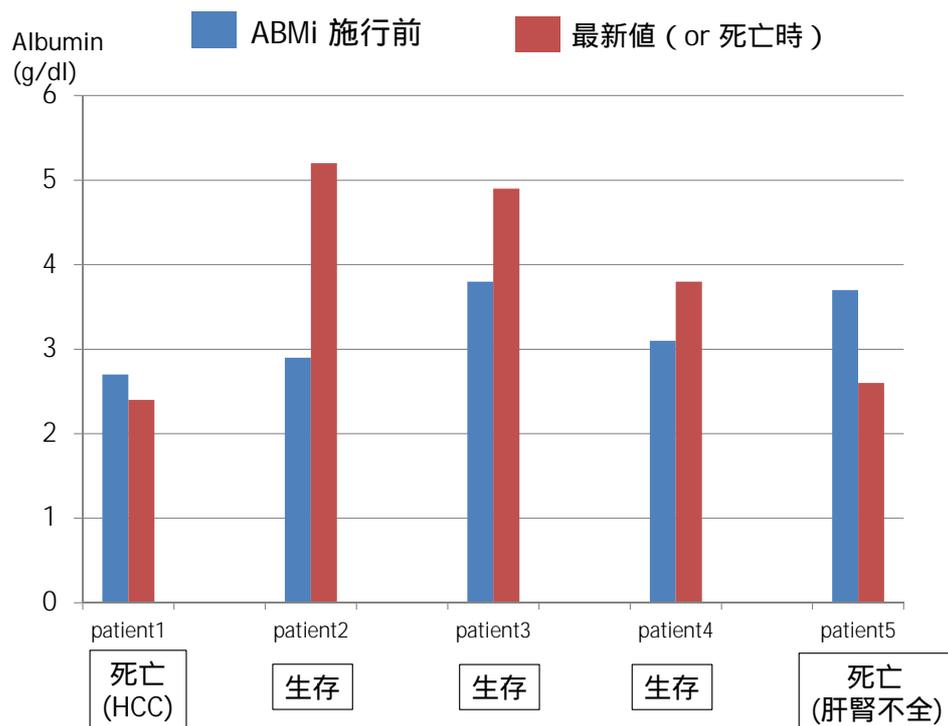
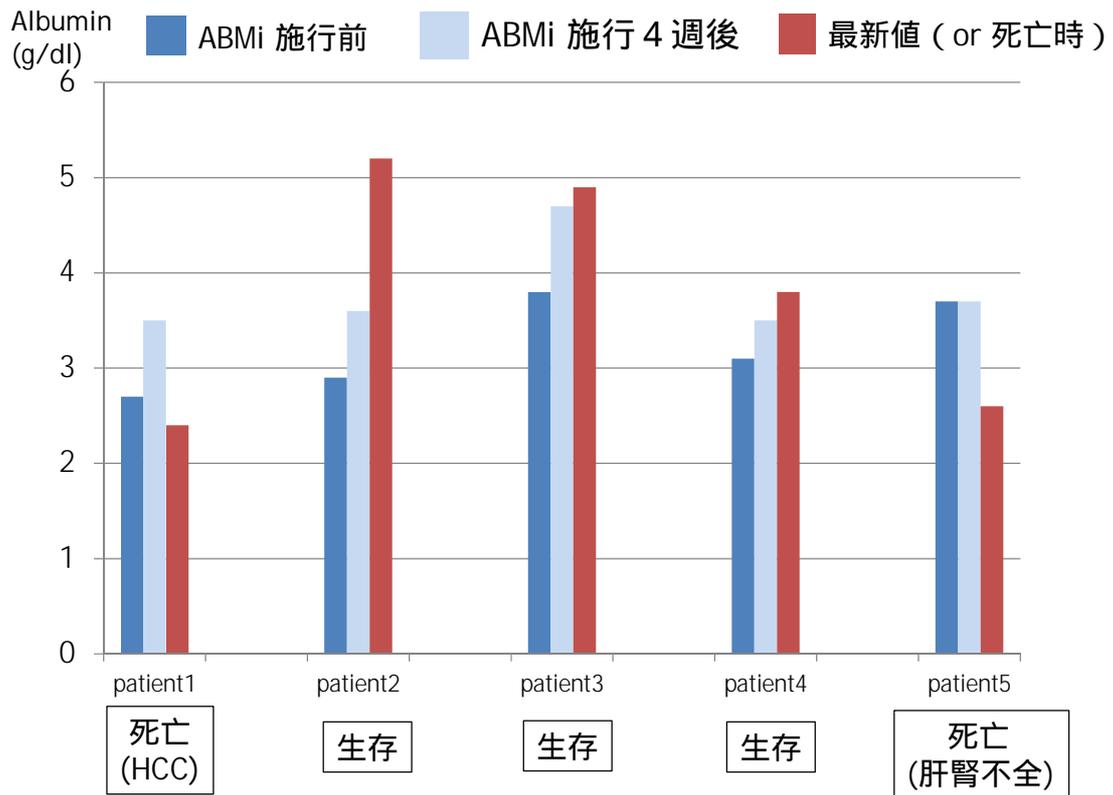


図2 血清アルブミン値の早期反応と長期経過・生命予後



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

「肝硬変に対する細胞治療法の臨床的確立とそのメカニズムの解明」

研究分担者氏名 : 宮島 篤

所属機関 : 東京大学分子細胞生物学研究所 職名 : 教授

**研究要旨 :**

【目的】 肝線維化あるいはその改善に関わる骨髄中の細胞種および因子の解析

【方法】 骨髄中で存在比率の高い単球、好中球に着目し、それらの細胞群を単離して、遺伝子発現解析を行う。また、遊走した単球や好中球が反応する因子を推測して、その因子と各種免疫細胞の表面マーカーとの共染刺激を行い、その因子を認識する細胞種を特定する。さらに、各種免疫細胞をその因子で刺激し、線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現変化を解析する。

【成績】 遺伝子発現解析の結果、線維を溶解すると考えられる MMP-8, 9, 13 の発現量は、単球より好中球の方が高いことが明らかとなった。一方で炎症抑制性サイトカインである IL-10 の発現量は好中球より単球で高いことがわかった。また、単球や好中球を DAMPs の一つである HMGB1 で刺激すると、単球は炎症性サイトカインやケモカインを産生し、好中球は MMP13 を高発現することが明らかになった。

【考案】 本実験により、骨髄投与療法による治療効果には単球によるサイトカイン産生、及び好中球の MMP によるコラーゲンの溶解が寄与している可能性が示された。また、遊走した肝臓内で単球や好中球が反応する物質として DAMPs の一つである HMGB1 が候補の一つであることが示された。

共同研究者

榎本豊、田中稔、伊藤暢

**A. 研究目的**

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

そこでまず、フローサイトメーターにより、マウスの骨髄中に多く存在する細胞種を特定する。そして、各細胞種で線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現量の比較検討を行う。次に、肝臓内に遊走した各細胞種が反応する因子を推測して、その因子と各種免疫細胞の表面マーカーとの共染色を行い、その因子を認識する細胞種を特定する。さらに、各種免疫細胞をそ

の因子で刺激を行い、線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現変化を解析する。

**B. 研究方法**

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

四塩化炭素投与では、肝細胞がネクロシスを起こすことが知られている。ネクロシスを起こした細胞からは DAMPs の一つである HMGB1 が放出され、広く免疫細胞を活性化することが知られている。そこで、四塩化炭素投与により傷害を与えたマ

ウスの血清から、HMGB1 の存在量を ELISA 法により定量した。また、その肝臓内で HMGB1 と各種免疫細胞のマーカーを抗体により共染色して、HMGB1 を認識する細胞種を特定した。次に、単球や好中球を HMGB1 で刺激を行い、線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現変化を解析した。

## C. 研究結果

### 骨髄中の細胞種の特定

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

### 線維化改善関連遺伝子の発現比較

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

### 血清中の HMGB1 の定量解析、及び肝臓内における HMGB1 の蓄積

四塩化炭素投与により傷害を与えたマウスの血清から、HMGB1 の存在量を ELISA

法により定量した。その結果、四塩化炭素投与後 24 時間から 72 時間の間、つまり肝細胞の傷害が見られる時間帯に、血清中の HMGB1 レベルが高くなることが明らかになった。さらに、肝臓の免疫染色の結果、その時期には肝臓内でも HMGB1 が傷害部位に広く蓄積していることがわかった。そして、その蓄積した HMGB1 には単球や好中球、好酸球などの免疫細胞が隣接しており、HMGB1 を認識して活性化している可能性が示唆された。

### HMGB1 による単球、好中球への刺激

次に単球や好中球を *in vitro* で HMGB1(1000 ng/ml) 24 時間刺激したところ、単球では TNF $\alpha$  や IL-6 などのサイトカイン、MIP1 や MIP2、MCP-1 などのケモカインの発現量が上昇することが明らかになった。一方好中球では、サイトカインの分泌はほぼ見られなかったが、MMP-13 の発現量が上昇することが明らかになった。

## D. 考察

肝硬変の治療効果を示す細胞種や遊走した細胞が反応する因子を特定することは、ABMi 法による治療効果を高めたり、その治療メカニズムを明らかにしたりする上で不可欠である。本研究結果により、骨髄中の単球や好中球が重要であることを示唆する結果が得られた。近年では単球や好中球は炎症の抑制にも働く細胞であると考えられており、治療効果が期待できる細胞種である。

また、単球はサイトカインの分泌、好中球は MMP を高発現するなど、その役割の違いを示唆する興味深い結果が得られた。

今後は、投与する細胞数やそのタイミング、刺激の有無など様々な条件を検討し、よりよい治療方法を模索していく。

## E. 結論

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

## 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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* Aug;184(8):2250-2259, 2014.

4. 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.* Sep;44(9):2638-47, 2014.

5. 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* 2014 Dec 31;9(12):e116209.

### 2. 学会発表

1. 松田道隆、田中稔、宮島篤、Mechanism of liver fibrosis induced by Oncostatin M. FASEB Summer Research Conferences. Keystone Resort (U.S.A.)2014/7/6-11
2. 松田道隆、田中稔、宮島篤、オコスタチン M によるマウス肝繊維化促進機構の解析. 第 28 回肝類洞壁細胞研究会学術集会. 岡山. 2014.12.13.
3. 谷貝 知樹、松井 理司、原田 憲一、中沼 安二、稲垣 冬樹、西條 栄子、宮島 篤、田中 稔. 胆管傷害および胆管癌における sterile alpha motif domain containing 5 の発現解析. 第 21 回 肝細胞研究会. 東京、2014.6.27.
4. 木庭乾、榎本豊、尾見歩惟、宮島篤. Overexpression of IL-4 augments NK cell activities in vivo. 第 43 回日本免疫学会学術集会. 京都市. 2014.12.10.

あ

5. Tohru Itoh, Seitaro Ino, and Atsushi Miyajima. Notch signaling promotes proliferation of adult liver progenitor cells and progenitor-dependent liver regeneration. FASEB Summer Research Conferences. Keystone. 2014.7.8

6. Kota Kaneko, Tohru Itoh, Atsushi Miyajima. Novel visualization method reveals connection of adult liver progenitor cells to biliary trees in various liver injuries. FASEB Summer Research Conferences. Keystone. 2014.7.8.

7. 神元健児、金子洸太、伊藤暢、宮島篤. マウス肝臓の再生過程における胆管系前駆細胞の性状解析. 第47回発生生物学会. 名古屋市. 2014.5.27

8. 宮島篤. 肝臓の炎症・再生 - 基礎から応用へ. 第35回日本炎症・再生医学会 教育講演 2014.7.3.

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)**

1.特許取得

該当なし

2.実用新案登録

該当なし

3.その他

なし

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

「成体肝臓が内包する免疫非依存性異常細胞排除機構の発見とその解明」

研究分担者氏名 : 仁科 博史

所属機関 : 東京医科歯科大学 職名 : 教授

**研究要旨 :**

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

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

【成績】活性型 YAP を発現する異常肝細胞が、遺伝子導入後 3～7 日で排除されることを見出した。免疫不全 NOG マウスでも同様の排除現象が観察されたことから、本現象は免疫非依存的な現象であることが判明した。cDNA アレイ解析の結果、細胞移動や細胞増殖に関与する遺伝子発現の誘導が観察された。

【考案】これまで老化した肝細胞が免疫系によって排除されることが報告されていたが、免疫非依存的な異常肝細胞の排除現象の報告はない。本現象は、肝臓が本来持つ恒常性維持機構だと推察される。本機構を高める方法は、新たな肝疾患に対する療法に繋がることが期待される。自己骨髄細胞を用いた療法による効果と関連しているかの検討が重要と考える。

**A. 研究目的**

自己骨髄細胞を用いた療法はその有効性が示されつつあるが、その作用点は複数あると考えられる。肝臓自身が持つ恒常性維持機構を高める作用もその一つであると考えられる。それ故、

肝臓内に障害・老化・形質転換した不適切な細胞が生じた場合、これら不適切な細胞を除去し肝臓の恒常性を保つ機構を明らかにすることは重要である。また、恒常性維持機構の増強ができれば、予防医学に貢献できる。それ故、本研究では、我々が新たに見出した免疫系とは独立した異常細胞の排除機構の解析を目的とした。

**B. 研究方法**

各種のヒトがん器官サイズを制御する Hippo シグナル伝達経路および標的分子 YAP が関与することが国内外の研究者から報告されている。そこで活性化型 YAP をモザイク状に正常肝臓に導入することで、異

常肝細胞を正常肝細胞集団の中に誘導した。モザイク発現を可能にする hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法を用いて、マウスの尾静脈からプラスミド DNA を導入した。野生型 B6 マウスや免疫不全マウス NOG マウス、細胞運命を追跡可能な ROSA マウスを用いて、異常肝細胞の運命を解析した。さらに本細胞応答に関与する遺伝子発現を cDNA アレイによって解析した。

**C. 研究結果**

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

## D. 考察

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

## E. 結論

成体肝臓が内包する免疫非依存性異常細胞排除機構を発見した。正常肝細胞集団の中に異常な肝細胞が生じると作動する恒常性維持機構と考えられる。本機構に関与する分子機構の解明が期待される。また、自己骨髄細胞を用いた療法による効果との関連が興味深い。

## 研究発表

### 1. 論文発表

1. Sean Porazinski, Huijia Wang, Yoichi Asaoka, Martin Behrndt, 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**, 2015; in press

2. 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.** 2015; 457: 493-499.

3. Yoichi Asaoka, Shoji Hata, Misako Namee, 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** 2014; 9: e97365.

4. 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.** 2014; 443: 917-923.

5. 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.*** 2014; 34: 1607-1621.

6. 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 fibrosis induced by hypo-sphingosine-1-phosphate signaling in zebrafish embryo. ***J. Biochem.*** 2014; 155: 235-241.

7. Shuji Terai, Taro Takami, Naoki Yamamoto, Koichi Fujisawa, Tsuyoshi Ishikawa, Yohei Urata, Haruko Tanimoto, Takuya Iwamoto, Yuko Mizunaga, Takashi Matsuda, Takashi Oono, Miho Marumoto, Guzel Burganova, Luiz Fernando Quintanilha, Isao Hidaka, Yoshio Marumoto, Issei Saeki, Koichi Uchida, Takahiro Yamasaki, Kenji Tani, Yasuho Taura, Yasuhiko Fujii, Hiroshi Nishina, Kiwamu Okita, and Isao Sakaida. Status and prospects of liver cirrhosis treatment by using bone marrow-derived cells and mesenchymal cells. ***Tissue Engineering Part B: Reviews*** 2014; 20: 1-5.

## 2. 学会発表

1. 仁科博史 ; 器官サイズ制御シグナル Hippo 系による組織形成機構とその破綻病態[神戸大学医学部セミナー;2014年1月10日/神戸]

2. 仁科博史 ; Mouse Embryonic Stem Cell-Based Drug Screen for Novel Modulators of Cell Differentiation in Early Mammalian Embryogenesis[熊本大学 HIGO Program ; 2014年2月12日/熊本]

3. 内田好海、仁科博史 ; マウス胚性幹細胞を用いた薬剤スクリーニングによる三胚葉分化制御シグナルの同定とスタチン催奇性発症機構の解明 [ 第 20 回日本肝臓医生物学研究会 ; 2014年2月15日/東京 ]

4. 有馬誉恵、仁科博史 ; マウス初期胚におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の機能解析 [ 第 134 回日本薬学会 ; 2014年3月27-30日/熊本 ]

5. Ruoxing Yu and Hiroshi Nishina ; Assessment of teratogenic mechanisms of FDA pregnancy category D and X drugs using murine ES cell-derived 3D culture system [ 第 134 回日本薬学会 ; 2014年3月27-30日/熊本 ]

6. 仁科博史 ; 器官サイズ制御シグナル Hippo 系による組織形成機構とその破綻病態[東京女子医科大学セミナー ; 2014年5月29日/東京]

7. 内田好海、仁科博史 ; スタチンの初期胚発生に対する作用機構の解明 [ 第 13 回生命科学研究会;2014年6月20-21日/札幌 ]

8. 浅岡洋一、仁科博史 ; 器官サイズ制御因子 Yap の網膜視細胞分化における機能解析 [ 第 13 回生命科学研究会 ; 2014年6月20-21日/札幌 ]

9. 宮村憲央、仁科博史 ; 成体マウス肝臓においてモザイク状の Hippo シグナル伝達

- 系破綻は細胞排除を誘導する[第 21 回肝細胞研究会;2014年6月27-28日/東京]
10. 内田好海、仁科博史;スタチン催奇性の分子機構の解明[第 21 回肝細胞研究会; 2014年6月27-28日/東京]
  11. 仁科博史;器官サイズを制御する転写共役因子 YAP の役割 [第 23 回日本 Cell Death 学会; 2014年7月18-19日/東京]
  12. 浅岡洋一、仁科博史;器官サイズを制御する Hippo-Yap シグナル伝達系の網膜分化における機能解析 第 23 回日本 Cell Death 学会; 2014年7月18-19日/東京]
  13. 浅岡洋一他; Hippo signaling regulates a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. [日本比較生理生化学会第 36 回大会; 2014年7月28日~8月1日/札幌]
  14. 濱部凜他; ノックアウトゼブラフィッシュを用いた時計遺伝子 *Per2* と *Cry1a* の解析 [第 13 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム;2014年9月20-21日/富山]
  15. 浅岡洋一、仁科博史; Hippo-Yap signaling acts as a molecular switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation. [第 20 回小型魚類研究会; 2014年9月20-21日/東京]
  16. 平山順他; Study on a light signaling pathway for circadian entrainment in zebrafish. [第 20 回小型魚類研究会;2014年9月20-21日/東京]
  17. 濱部凜他; ノックアウトゼブラフィッシュを用いた時計遺伝子 *zPer2* および *zCry1a* の解析 [第 3 回修飾シグナル病若手ワークショップ;2014年9月30-10月2日/湯河原]
  18. 宮村憲央、仁科博史; Hippo シグナル系破綻によって誘導されるマウス肝細胞の動態の解析[第 21 回日本肝臓医生物学研究会; 2014年10月4-5日/静岡]
  19. 仁科博史;スタチン催奇性誘導機構の解析[第 21 回日本肝臓医生物学研究会; 2014年10月4-5日/静岡]
  20. 仁科博史;成体マウス肝臓においてモザイク状の Hippo シグナル伝達系破綻は細胞排除を誘導する[第 87 回日本生化学会大会; 2014年10月15-18日/京都]
  21. 平山順他;ゼブラフィッシュ概日リズムの光同調を担うシグナル経路の解析 [第 21 回日本時間生物学会学術大会;2014年11月8-9日/福岡]
  22. 浅岡洋一、仁科博史; Hippo-Yap シグナル伝達系による網膜視細胞の分化制御機構 [第 7 回 RRM; 2014年11月22日/東京]
  23. 仁科博史;がん原遺伝子産物 YAP 依存的肝細胞消失を誘導する新規マウスモデルの確立[第 37 回日本分子生物学会; 2014年11月25-27日/横浜]
  24. 浅岡洋一、仁科博史;網膜光受容細胞の分化における Hippo-Yap シグナル伝達系の役割[第 37 回日本分子生物学会; 2014年11月25-27日/横浜]
  25. 仁科博史;細胞内シグナル伝達系[秋田大学医学部セミナー; 2014年12月12日/秋田]

**H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)**

1.特許取得

ナシ

2. 実用新案登録

ナシ

3. その他

ナシ

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

「NASH の病態形成におけるマクロファージの病態生理的意義」

研究分担者氏名 : 小川 佳宏

所属機関 : 東京医科歯科大学 職名 : 教授

研究要旨 :

【目的】肥満の脂肪組織では細胞死に陥った脂肪細胞をマクロファージが取り囲んで貪食する組織像として crown-like structure (CLS) が良く知られており、CLS を構成するマクロファージは monocyte attractant protein-1 (MCP-1)/C-C motif chemokine receptor 2 (CCR2) 系を介して浸潤するものと考えられている。我々は、独自に開発した NASH モデルであるメラノコルチン 4 型受容体欠損マウス (MC4R-KO) を用いて、NASH に特徴的な病理組織マーカーである hepatic crown-like structure (hCLS) が炎症・線維化の起点となることを報告した。本研究では NASH 発症過程におけるマクロファージの動態・hCLS 形成における MCP-1/CCR2 系の機能的意義を検討した。

【方法】MC4R-KO マウスに野生型あるいは CCR2-KO マウスの骨髄を移植し、4 週間の回復期間の後に 20 週間の高脂肪食負荷により NASH を誘導した。

【成績】CCR2-KO マウスの骨髄を移植した MC4R-KO マウスでは脂肪組織におけるマクロファージ浸潤と CLS 形成が減少した。肝非実質細胞分画を用いた FACS 解析により CD11b<sup>hi</sup> 浸潤性マクロファージの消失が確認されたが、肝組織学的解析では対照群と同程度に hCLS が観察され、炎症性マーカーの発現にも変化は認められなかった。肝線維化面積・ $\alpha$ SMA 陽性面積および線維化マーカーの発現にも変化はなかった。

【考案】脂肪組織 CLS とは異なり、hCLS は MCP-1/CCR2 系非依存的に形成されると考えられた。脂肪を蓄積して細胞死に陥った肝細胞と常在性マクロファージの相互作用によりマクロファージの機能的変化が誘導され、炎症・線維化機転が促進されることが示唆された。

A. 研究目的

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH: non-alcoholic steatohepatitis) はメタボリックシンドロームの肝臓における表現型と考えられており、栄養性に肝硬変や肝癌を発症する病態として注目されている。肥満の程度が比較的軽度の本邦においても成人の約 30% に脂肪肝が認められ、NASH の有病率は約 1% にのぼると想定されている。今後、NASH を原因とする肝硬変・肝癌の増加が予測されるため、病態の理解と予防あるいは早期の治療が喫緊の課題である。

従来、肥満に合併する糖脂質代謝障害を背景とし、NASH を経て肝細胞癌を発症する動物モデルが存在しないことが、NASH 研究の障壁となってきた。我々は、摂食調節に重要なメラノコルチン 4 型受容体欠損

マウス (MC4R-KO マウス) が、高脂肪食負荷により脂肪肝から NASH・肝細胞癌を発症することを報告し (*Am. J. Pathol.* 179: 2454-2463, 2011)、本モデルを用いて NASH の病態解明に取り組んできた。

近年、全身の軽度の慢性炎症がメタボリックシンドロームの基盤病態を形成することが明らかになってきた。肥満の脂肪組織では細胞死に陥った脂肪細胞をマクロファージが取り囲む crown-like structure (CLS) がよく知られており (*J. Lipid Res.* 46: 2347-2355, 2005)、CLS を構成するマクロファージは CD11c 陽性であることが報告されている (*J. Clin. Invest.* 117: 175-184, 2007)。昨年度までに我々は NASH を発症した MC4R-KO マウスの肝臓では細胞死に陥った肝実質細胞をマクロフ

マクロファージが取り囲む組織像 (hCLS: hepatic crown-like structure) が多数認められること、hCLS 数は肝線維化面積と正の相関を示すこと、hCLS 近傍にコラーゲンの沈着および  $\alpha$ SMA 陽性筋線維芽細胞が認められることを見出した (PLOS ONE 8: e82163, 2013)。さらに、hCLS はヒト NAFLD/NASH においても認められることを確認している。本年度は、hCLS を構成するマクロファージの動態を解析した。

## B. 研究方法

### 1. マウス骨髄移植

骨髄ドナーとして GFP および CCR2-KO マウスの大腿骨、脛骨を採取し、周辺の筋肉を除去後に両端を切断した。3%FBS/PBS にて骨髄細胞をフラッシュし、ACK バッファーを用いて溶血処理を行った。骨髄細胞を PBS にて洗浄し、 $1 \times 10^7$  個/ml になるように調整した。レシピエントである野生型および MC4R-KO マウスに 7.5Gy の  $\gamma$  線照射を行い、骨髄液を 0.3ml ずつ尾静脈より投与した。4 週間の回復期間を置き、骨髄が 90% 以上置換されていることを確認し、高脂肪食負荷を行った。

### 2. 肝非実質細胞分画の FACS 解析

麻酔下にマウスの腹部を切開し、門脈から PBS15ml を灌流した。1 個体につき 5ml の Hanks' Balanced Salt Solution (Ca, Mg (+)) / type IV collagenase 1mg/ml / DNaseI 50 $\mu$ g/ml) を使用し、GentleMACS (Miltenyi 社) を用いて細胞を分散した。30% Percoll に懸濁して 1800rpm, 4, 15min 遠心し、沈殿した細胞を肝非実質細胞分画として使用した。 $1 \times 10^6$  個の細胞を 50 $\mu$ l の FACS バッファーに懸濁し、Fc block 後に

CD45, CD11b, F4/80 抗体を各 0.5 $\mu$ l ずつ加え、氷上で 10min 反応させた。細胞をバッファーで洗浄し、死細胞除去のため 7-AAD を加えて FACS 解析に供した。

## 3. 組織学的解析

脂肪組織および肝臓を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン切片を作成した。Sirius red 染色および F4/80  $\cdot$   $\alpha$ SMA 免疫染色を行い、画像解析ソフト Winroof (Mitani Co.) を用いて Sirius red  $\cdot$  F4/80  $\cdot$   $\alpha$ SMA 陽性面積を測定した。脂肪組織における F4/80 陽性細胞数、CLS 数、および肝臓における hCLS 数は目視にてカウントし、単位 mm<sup>2</sup> 当たりに換算した。

## C. 研究結果

### 1. 脂肪組織の解析

精巢上体周囲脂肪組織の F4/80 染色を行ったところ、野生型マウスと比較して MC4R-KO マウスでは F4/80 陽性マクロファージが増加しており、CLS 数も著明に増加していた (図 1)。骨髄の CCR2 を欠損すると浸潤マクロファージ数、CLS 数は有意に減少した (図 1)。

### 2. 肝臓におけるマクロファージ分画の変化

肝臓の非実質細胞分画の FACS 解析において、CD45 陽性細胞を F4/80、CD11b にて展開すると、F4/80 を高発現するマクロファージ (F4/80<sup>hi</sup>) と、CD11b を高発現するマクロファージ (CD11b<sup>hi</sup>) が存在することが知られている。NASH の発症により F4/80<sup>hi</sup> マクロファージの割合に変化は認められなかったが、CD11b<sup>hi</sup> マクロファ

ジ分画が著明に増加し、骨髄の CCR2 を欠損することによりこの変化が消失することが明らかになった (図 2)。

### 3. 肝臓における炎症・線維化変化

F4/80 染色では骨髄の CCR2 を欠損しても対照群の MC4R-KO マウスと同程度に F4/80 陽性細胞が認められ、hCLS の数にも変化はなかった (図 3)。また、炎症性マーカーである TNF $\alpha$  や CD11c の発現にも変化は認められなかった (図 3)。HE 染色では NASH に特徴的とされる肝細胞風船様変性や炎症細胞浸潤も同等に認められ、線維化・ $\alpha$ SMA 陽性面積、線維化マーカー (COL1A1, TIMP1) の発現にも変化はなかった (図 4)。

### D. 考察

MC4R-KO マウスにおいて骨髄の CCR2 を欠損させると脂肪組織へのマクロファージ浸潤、CLS 形成が抑制されたことから、既報と同様に脂肪組織 CLS は MCP-1/CCR2 系を介して浸潤したマクロファージが寄与していると考えられた。一方、肝臓では FACS 解析において認められる CD11b<sup>hi</sup> マクロファージは MCP-1/CCR2 系依存的と考えられ、hCLS は F4/80<sup>hi</sup> マクロファージが中心となり、MCP-1/CCR2 系非依存的に形成されることが示唆された。

これまでの検討において hCLS が炎症・線維化の起点となって NASH の病態形成に寄与することが示唆されている。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

脂肪組織 CLS とは異なり、hCLS は MCP-1/CCR2 系非依存的に形成されることが示唆された。脂肪を蓄積して細胞死に陥った肝実質細胞と常在性マクロファージの相互作用によりマクロファージの機能的変化が誘導され、炎症・線維化機転が促進されることが示唆された。

### 研究発表

#### 1. 論文発表

1. K. Konuma\*, M. Itoh\*, T. Suganami, S. Kanai, N. Nakagawa, T. Sakai, H. Kawano, M. Hara, S. Kojima, Y. Izumi, Y. Ogawa. Eicosapentaenoic acid ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in a novel mouse model using Melanocortin 4 receptor-deficient mice. **PLoS ONE** 10: e0121528, 2015. \*Equally contributed.
2. M. Tanaka, K. Ikeda, T. Suganami, C. Komiya, K. Ochi, I. Shirakawa, M. Hamaguchi, S. Nishimura, I. Manabe, T. Matsuda, K. Kimura, H. Inoue, Y. Inagaki, S. Aoe, S. Yamasaki, Y. Ogawa. Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. **Nat Commun** 5: e4982, 2014.

#### 2. 学会発表

1. 伊藤美智子、加藤秀昭、菅波孝祥、小沼邦葉、酒井建、小川佳宏 : NASH 発症過程におけるマクロファージの動態解析

—hepatic crown-like structure に注目

して：第 35 回日本肥満学会、宮崎、

2014/10/24

2. 加藤秀昭、伊藤美智子、菅波孝祥、小沼邦葉、小川佳宏：非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）における hepatic crown-like structure の意義：第 57 回日本糖尿病学会、大阪、2014/5/24

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）**

1. 特許取得

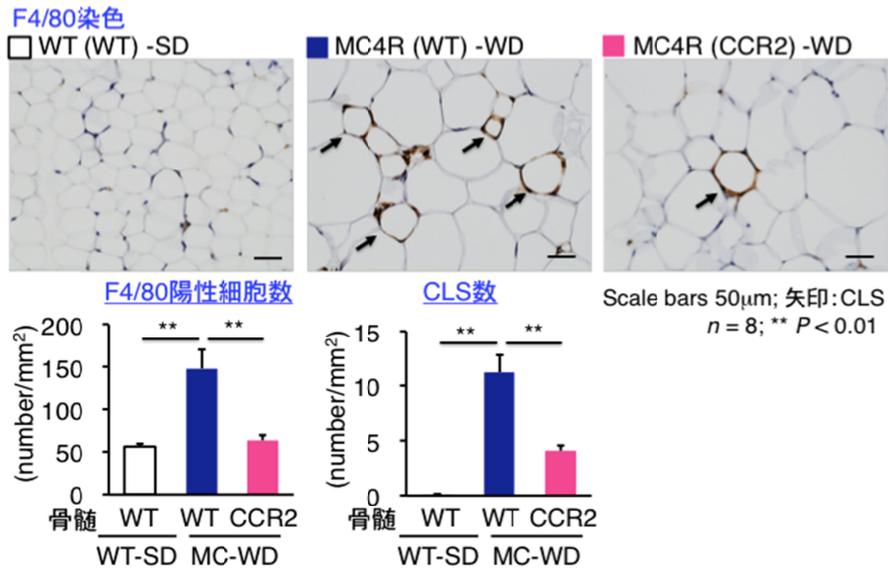
なし

2. 実用新案登録

なし

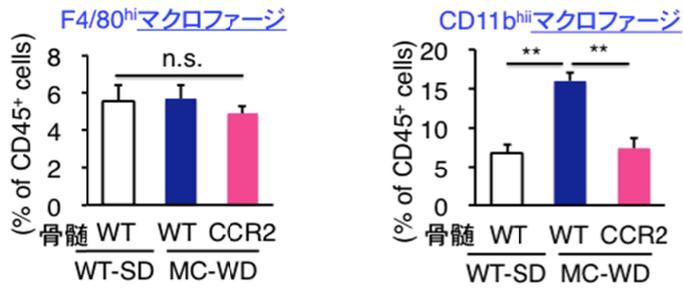
3. その他

なし



**図1. 脂肪組織を用いた組織学的解析**

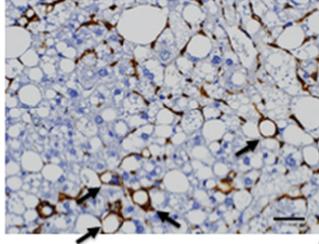
WT: 野生型, MC4R: MC4R-KO, CCR2: CCR2-KO, 括弧内は骨髄  
SD: 通常食, WD: 高脂肪食



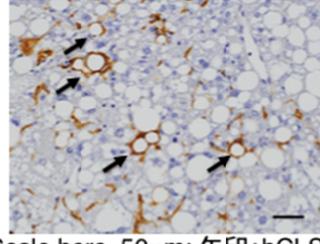
**図2. 肝非実質細胞分画を用いたFACS解析**

**F4/80染色**

■ MC4R (WT) -WD



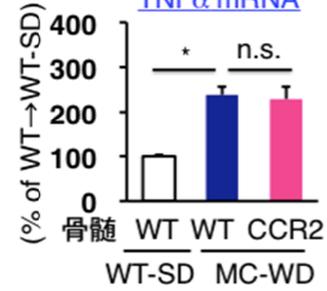
■ MC4R (CCR2) -WD



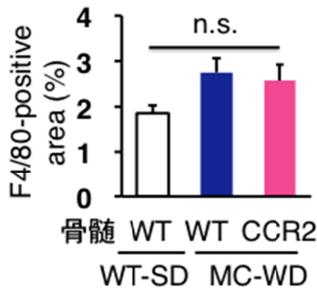
Scale bars, 50μm; 矢印:hCLS

*Real-time PCR*

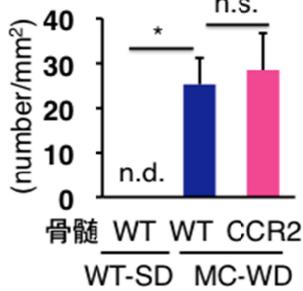
**TNFα mRNA**



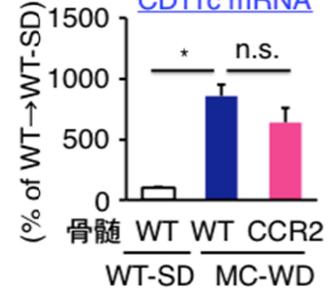
**F4/80陽性面積**



**hCLS数**



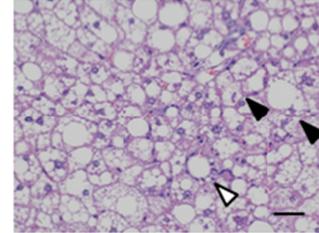
**CD11c mRNA**



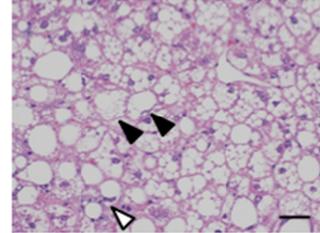
**図3. 肝臓における炎症性変化**

**HE染色**

■ MC4R (WT) -WD



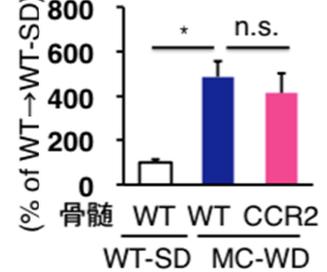
■ MC4R (CCR2) -WD



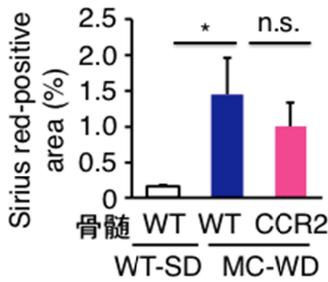
▼ 肝細胞風船様変性 ◁ 炎症細胞浸潤

*Real-time PCR*

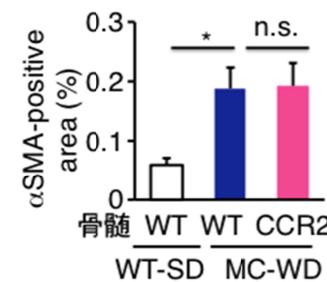
**COL1A1 mRNA**



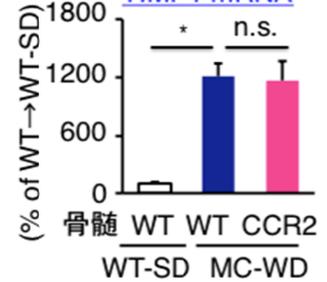
**線維化面積**



**αSMA陽性面積**



**TIMP1 mRNA**



**図4. 肝臓における線維化変化**

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呈す、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)。

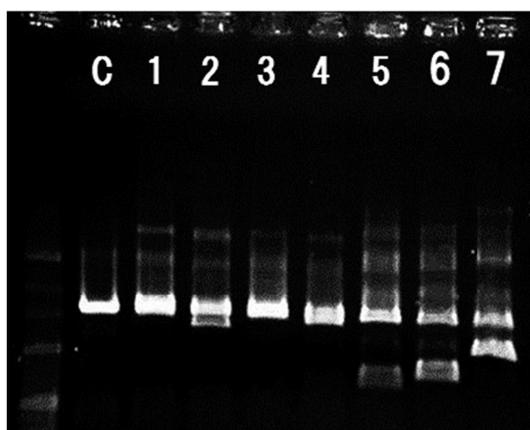


図. OGFRL1 KO マウス (F1) の電気泳動像

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. Kamiya A, Inagaki Y. Stem and progenitor cell systems in liver development and regeneration. *Hepatol Res* 2015; 45: 29-37.
2. 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: 2171-2175.
3. 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* 2014; 5: 4982.
4. 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; 93:1636-1644.
5. Okazaki I, Noro T, Yamanouchi 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* 2014; 6: 1220-1255.

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; 68: 709-715.
7. 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: 204-213.
8. 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: 1458-1467.

## 2. 学会発表

1. 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
2. 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線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
3. 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線維化改善・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

4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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.

9. Ando W, Yokomori H, Inagaki Y, Okazaki I, Suzuki Y, Nobuhiro T, Tamanouchi E, Tanabe H, Kuroda H, Kojima S, Hara M, Oda M, Komiyama T. The serum levels of SDF-1 $\alpha$  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.
10. 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 回肝類洞壁細胞研究会学術集会、岡山、2014 年 12 月 13 日
11. 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

## 「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、 $2 \times 10^5$  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られたが、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、CO<sub>2</sub> incubator 内で 1 時間培養した。脂肪塊を遠心 (1,300 rpm, 6 min, room temperature) し、液体を吸引し、0.12 % type1 collagenase (Wako) を加え、37 で振盪 (30 min) し、細胞を解離した。解離した細胞に control medium を加え、遠心 (1300 rpm, 6 min, room temperature) し、上清及び沈まなかった細胞を吸引したものを SVF(stromal vascular fraction)とした。

## 細胞培養

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

で resuspend し、40 µm 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 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  $2 \times 10^5$  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。

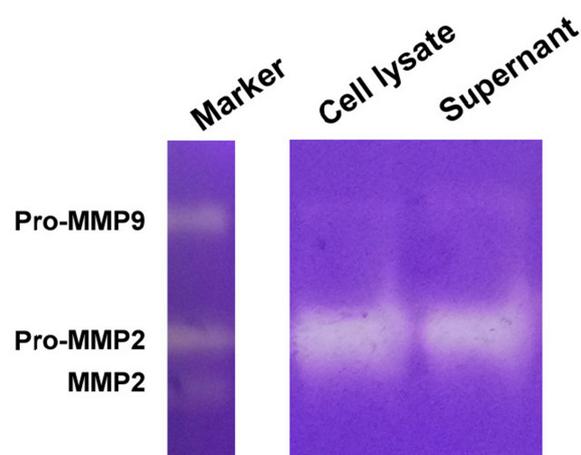
GFP 陽性細胞は抗 GFP 抗体を用いて、ALP 活性をもつ二次抗体で赤く発色させた。

## 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。



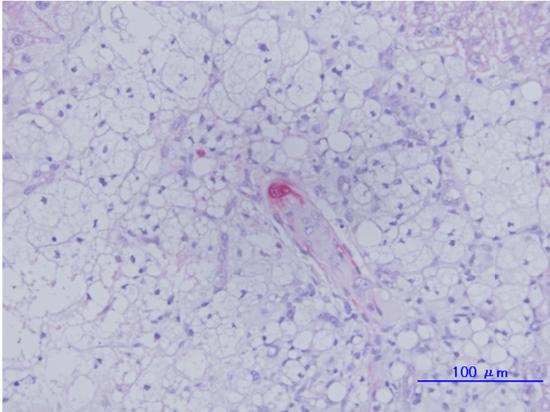
### 図1 ゼラチンゼイモグラフィーアッセイ

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。

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. 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・アレクサンドロ、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 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

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/10<sup>6</sup>PBMCs 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/10<sup>6</sup>PBMCs 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, Kamijo 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

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」

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(CCl<sub>4</sub>)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/CCl<sub>4</sub> 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<sup>fllox/fllox</sup> ; CTGF $\Delta$ hep* マウス)、肝星細胞特異的 CTGF 欠損マウス(*GFAP-Cre CTGF<sup>fllox/fllox</sup> ; CTGF $\Delta$ 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<sup>fllox/fllox</sup> ; CTGF $\Delta$ hep+NPC* マウス)を作成し、BDL/CCl<sub>4</sub> 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 $\Delta$ 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、 $\alpha$ -SMA、Col1a1 の発現が上昇し、肝星細胞の活性化を認めた。また CTGF $\Delta$ hep マウス、CTGF $\Delta$ HSC マウス、CTGF $\Delta$ 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 $\Delta$ 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(CCl<sub>4</sub>)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<sup>fllox/fllox</sup>* 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<sup>fllox/fllox</sup>* : CTGF $\Delta$ 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<sup>fllox/fllox</sup>* : CTGF $\Delta$ LIV) 及び肝星細胞特異的に CTGF を欠損するマウス (*GFAP-Cre CTGF<sup>fllox/fllox</sup>* : CTGF $\Delta$ 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- $\beta$  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 CCl<sub>4</sub> 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/CCl<sub>4</sub> 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- $\beta$  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<sup>fllox/fllox</sup>:CTGF $\Delta$ hep* マウス)、肝星細胞特異的 CTGF 欠損マウス (*GFAP-Cre CTGF<sup>fllox/fllox</sup>:CTGF $\Delta$ 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<sup>fllox/fllox</sup>:CTGF $\Delta$ 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 $\Delta$ hep マウス、CTGF $\Delta$ HSC マウスでは CTGF の発現は低下せず、CTGF $\Delta$ 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、 $\alpha$ -SMA、Col1a1 の発現が上昇し、肝星細胞の活性化を認めた。また CTGF $\Delta$ hep マウス、CTGF $\Delta$ HSC マウス、CTGF $\Delta$ 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 $\Delta$ 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 Bel-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](#). *Hepatol Res*. 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, 正田隼人, 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, 正田隼人, 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. 正田隼人, 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, 正田隼人, 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
畠 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 cardia 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, Mi sako 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 Behrndt, 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	肝胆膵	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 Bcl-xL inhibition is a powerful anticancer therapy against hepatocellular carcinoma	Hepatol Res.			In Press