

# 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24～26年度 総合研究報告書

研究代表者 坂井田 功

平成27(2015)年3月

# 目 次

・ 総合研究報告	-----	1
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		
・ 分担研究報告	-----	9
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		
竹原 徹郎、疋田 隼人		

. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	59
. 研究成果の刊行物・別刷	-----	65
. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	391
. 研究成果の刊行物・別刷	-----	395
. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	619
. 研究成果の刊行物・別刷	-----	623

**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))  
総合研究報告書

**「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、同年 9 月に先進医療 B における変更手続きを完了し、**12 月 12 日に第 1 例目を自己骨髄細胞投与群として実施し、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 )

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

## 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 型肝炎症に対する 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 例目を自己骨髄細胞投与群として実施し、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成し、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成した。

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

## E. 結 論

平成 24 ~ 26 年度に「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を行った。

## 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takami T, Terai S, Sakaida I. Advanced therapies using autologous bone marrow cells for chronic liver disease. *Discovery Medicine*. 2012; 14(74):7-12.
2. Terai S, Tanimoto H, Maeda M, Zaito J, Hisanaga T, Iwamoto T, Fujisawa K, Mizunaga Y, Matsumoto T, Urata Y, Marumoto Y, Hidaka I, Ishikawa T, Yokoyama Y, Aoyama K, Tsuchiya M, Takami T, Omori K, Yamamoto N, Segawa M, Uchida K, Yamasaki T, Okita K, Sakaida I. Timeline for development of autologous bone marrow infusion (ABMi) therapy and perspective for future stem cell therapy. *J Gastroenterol*. 2012; 47(5):491-7.
3. Takami T, Terai S, Sakaida I. Stem cell

- therapy in chronic liver disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2012; 28(3):203-8.
4. Iwamoto T, Terai S, Hisanaga T, Takami T, Yamamoto N, Watanabe S, Sakaida I. Bone-marrow-derived cells cultured in serum-free medium reduce liver fibrosis and improve liver function in carbon-tetrachloride-treated cirrhotic mice. *Cell Tissue Res*. 2013; 351(3): 487-95.
  5. Oishi T, Terai S, Kuwashiro S, Fujisawa K, Matsumoto T, Nishina H, Sakaida I. Ezetimibe reduces fatty acid quantity in liver and decreased inflammatory cell infiltration and improved NASH in medaka model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;422(1):22-7.
  6. Mizunaga Y, Terai S, Yamamoto N, Uchida K, Yamasaki T, Nishina H, Fujita Y, Shinoda K, Hamamoto Y, Sakaida I. Granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-1 $\beta$  are important cytokine in repair of the cirrhotic liver after bone marrow cell infusion -comparison of humans and model mice- *Cell Transplant*. 2012;21(11):2363-75.
  7. 寺井崇二, 坂井田功 自己骨髄細胞投与による肝再生、修復治療、生化学、2012; 84(8): 707-11
  8. 高見太郎, 坂井田功 肝硬変 Update「自己骨髄細胞投与による肝修復再生療法」、医学のあゆみ、2012; 240(9): 804-808
  9. 前田雅喜, 高見太郎, 藤澤浩一、山本直樹, 寺井崇二, 坂井田功 マウス肝硬変高発癌モデルにおける自己骨髄細胞投与の影

響、分子生物学が可能とした個別化医療  
(第19回浜名湖シンポジウム)、2012:  
165-170

10. 高見太郎、寺井崇二、坂井田功 肝臓の  
再生治療、Annual Review 消化器 2012、  
中外医学社、p192-197.

11. 高見太郎、寺井崇二、坂井田功 肝再生  
医学のトランスレーショナル・リサーチ、  
肝疾患レビュー2012-2013、日本メディカル  
センター、p69-75.

12. 高見太郎、寺井崇二、坂井田功 肝硬変  
診療のトピックス 自己骨髄細胞を用いた  
肝修復再生療法の現状、medicina  
2012;49(7):1238-1239.

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

14. Quintanilha LF, Takami T, Hirose Y,  
Fujisawa K, Murata Y, Yamamoto N,  
Goldenberg RC, Terai S, Sakaida I.  
Canine mesenchymal stem cells show  
antioxidant properties against  
thioacetamide-induced liver injury in  
vitro and in vivo. Hepatol Res.  
2014;44(10):E206-17.

15. 高見太郎、寺井崇二、坂井田功 肝臓  
の再生療法、Annual Review 消化器 2014、  
中外医学社、p187-193.

16. 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]

17. 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.

18. 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, Maeda M, Hirose Y,  
Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I.  
Bone marrow cell infusions suppress  
hepatocarcinogenesis in  
*N*-nitrosodiethylamine-and carbon  
tetrachloride-induced hepatocarcinogenic  
mice with liver cirrhosis. 10th ISSCR  
Annual meeting. 2012年6月13日 ~ 6月16  
日, Yokohama, Kanagawa, Japan (パシフ  
ィコ横浜)

2. Takami T, Terai S, Maeda M, Sakaida I.  
Bone marrow cell infusions suppress  
hepatocarcinogenesis in

*N*-nitrosodiethylamine-and carbon tetrachloride-induced hepatocarcinogenic mice with liver cirrhosis. FASEB meeting. 2012年7月29日～8月3日, Snowmass village, CO, USA.

3. Terai S. Invited lecture “Cell therapy using bone marrow cell for liver fibrosis.” The 29th International Society for Heart Research. 2012年10月26日, Fukuoka, Japan.

4. Terai S. Invited lecture “Current status and future perspective for cell therapy using bone marrow cell for liver cirrhosis patient-Basic study to clinical study.” The NIH seminar. 2012年11月13日, Bethesda, USA.

5. Terai S, Takami T, Sakaida I. Invited lecture “Development of cell therapy for cirrhosis.” The 20th Yonsei International Gastroenterology Symposium. 2012年11月, Seoul, Korea.

6. Terai S, Takami T, Sakaida I. Development of new cell therapy for fibrosis. The 8th JSGE & AGA Joint Meeting: Liver Fibrosis and Cirrhosis, Pathogenesis and Treatment. 2013年3月22日, Kagoshima, Japan.

7. Terai S. Development of new cell therapy using bone marrow derived cell for liver cirrhosis patient. The 16th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference Agenda, Potential Applications of Mesenchymal Multipotent Stromal Cells. 2013年2月28日, Bethesda, USA.

8. 寺井崇二. 肝硬変症患者に対する細胞療法、現状と今後の課題. Bio Japan 2012 現実化しつつある細胞治療・遺伝子治療.

2012年10月11日, 神奈川県横浜市

9. 高見太郎, 寺井崇二, 前田雅喜, 廣瀬恵一, 藤澤浩一, 山本直樹, 坂井田功. 肝硬変に対する自己骨髄細胞投与(ABMi)療法における肝発癌への影響の基礎的検討. 第11回日本再生医療学会総会. 2012年6月12日～6月14日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

10. 高見太郎, 寺井崇二, 坂井田功. 骨髄細胞投与による酸化ストレス制御を介した肝発癌抑制メカニズムの解明. 第20回 JDDW2012. 2012年10月09日～10月12日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

11. 高見太郎, 寺井崇二, 坂井田功. 骨髄細胞投与による肝発癌抑制メカニズムの解析. 第19回肝細胞研究会, 2012年6月29日～6月30日, 札幌医科大学(北海道札幌市)

12. 坂井田功. 肝硬変に対する自己骨髄細胞投与療法の現状と展望. 第12回日本再生医療学会総会. 2013年3月21日～3月23日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

13. 村田泰彦, 高見太郎, 寺井崇二, 坂井田功. ヒト骨髄由来および脂肪組織由来間葉系幹細胞における組織因子の遺伝子発現解析. 第12回日本再生医療学会総会. 2013年3月21日～3月23日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

14. 寺井崇二. 骨髄由来細胞を用いた肝硬変症治療の現状と今後の展開. 第118回日本解剖学会総会. 2013年3月28日, サンポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県高松市)

15. Terai S, Takami T, Sakaida I. Development of new cell therapy using bone marrow derived cell for liver cirrhosis patients. The 16th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference Agenda. 2013 Jun. Bethesda, MD, USA.
16. Terai S, Sakaida I. Development of New Cell Therapy for Liver Cirrhosis. The 23rd Conference of APASL. 2013 Jun. Singapore.
17. Takami T, Terai S, Sakaida I. The development of a less-invasive liver regeneration therapy using cultured bone marrow derived cells for cirrhotic patients. 2nd International Conference on Gastroenterology & Urology. 2013 Jun. Northbrook, IL, USA.
18. Takami T, Terai S, Quintanilha LF, Tanimoto H, Murata Y, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Basic studies using human and canine bone marrow derived mesenchymal stem cells for the development of a less invasive liver. 11th Annual meeting of ISSCR. 2013 Jun. Boston, MA, USA.
19. Takami T, Terai S, Quintanilha LF, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Basic studies for a less invasive liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells with stabilization of redox homeostasis. The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells (20th JSRH). 2013 Sep. Osaka, Japan.
20. Terai S, Takami T, Sakaida I. The development of a less-invasive liver regeneration therapy using cultured bone marrow derived cells for cirrhotic patient. JDDW2013. 2013 Oct. Kobe, Japan.
21. Takami T, Terai S, Quintanilha LF, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Basic studies for a less invasive liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells with stabilization of redox homeostasis. The liver meeting 2013, AASLD. 2013 Nov. Washington D.C., USA.
22. Takami T, Terai S, Sakaida I. Liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells with stabilization of redox homeostasis. Choshu International Liver Symposium 2014. 2014 Jan. Ube, Yamaguchi, Japan.
23. 高見太郎, 寺井崇二, 村田泰彦, 坂井田功. ヒト骨髄由来および脂肪組織由来間葉系幹細胞における組織因子およびIL-8の発現検討. 第49回日本肝臓学会総会. 2013年6月. 京王プラザホテル, 東京.
24. 高見太郎, 寺井崇二, 村田泰彦, 廣瀬恵一, 藤澤浩一, 山本直樹, 坂井田功. 肝再生修復療法としての培養ヒト骨髄間葉系細胞投与療法のメカニズム解析. 第49回日本肝臓学会総会. 2013年6月. 京王プラザホテル, 東京.
25. 高見太郎, 寺井崇二, 坂井田功. 自己骨髄細胞による肝臓再生療法の取り組み. 第40回日本肝臓学会西部会. 2013年12月. 長良川国際会議場, 岐阜.

26. 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.

27. 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..

28. Takami T, Terai S, Sakaida I. Our regeneration therapies using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. JDDW2014. 2014 Nov. Kobe, Hyogo, Japan.

29. 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.

30. 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.

31. 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

**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

**「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週間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

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

**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分類別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型肝炎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型肝炎患者にお

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。

## 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

特記事項なし。

**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

**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得た。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た。

**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

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.

**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

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3.0mg/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、本治療法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. Inoue J, Ueno Y, Kawamura K, Yamamoto T, Mano Y, Miura M, Kobayashi T, Niitsuma H, Kondo Y, Kakazu E, Ninomiya M, Kimura O, Obara N, Kawagishi N, Kinouchi Y, Shimosegawa T. Association between S21 substitution in the core protein of hepatitis B virus and fulminant hepatitis. *J Clin Virol.* 2012 Oct;55(2):147-152
2. Kondo Y, Ueno Y, Ninomiya M, Tamai K, Tanaka Y, Inoue J, Kakazu E, Kobayashi K, Kimura O, Miura M, Yamamoto T, Kobayashi T, Igarashi T, Shimosegawa T. Sequential immunological analysis of HBV/HCV co-infected patients during Peg-IFN/RBV therapy. *J Gastroenterol.* 2012 Dec;47(12):1323-1335
3. Saito T, Tomita K, Haga H, Okumoto K, Ueno Y: Bone marrow cell-based regenerative therapy for liver cirrhosis. *World J Methodol* 2013; 3: 65-69
4. Saito T, Ueno Y: Transmission of hepatitis C virus: Self-limiting hepatitis or chronic hepatitis? *World J Gastroenterol* 2013; 19: 6957-6961
5. Wada Y, Sato C, Tomita K, Ishii-Aso R,

Haga H, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Saito T, Ueno Y: Possible autoimmune hepatitis induced after chronic active Epstein-Barr virus infection. Clin J Gastroenterol 2014; 7: 58-61

6. 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

7. 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. 芳賀弘明、斎藤貴史、奥本和夫、富田恭子、佐藤智佳子、石井里佳、西瀬雄子、渡辺久剛、上野義之：ABMi 療法を施行したアルコール性肝硬変患者の骨髄シンチグラフィと肝予備能の変化についての検討 第 54 回日本消化器病学会大会、神戸；2012 年 10 月

2. 芳賀弘明、斎藤貴史、奥本和夫、富田恭子、佐藤智佳子、石井里佳、西瀬雄子、渡辺久剛、上野義之、河田純男：自己骨髄細胞投与療法を施行したアルコール性肝硬変患者の 2 年間による長期予後。 第 48 回日本肝臓学会総会、金沢；2012 年 6 月

3. 西瀬雄子、斎藤貴史、富田恭子、佐藤智佳子、石井里佳、芳賀弘明、奥本和夫、渡辺久剛、今井康陽、堀田 博、上野義之、河田純男：C 型肝炎ウイルス 1b の NS3 領域蛋白質

2 次構造を基にしたサブグループ分類と肝細胞癌発生の関連性に関する前向き研究（第 2 報）。 第 48 回日本肝臓学会総会、金沢；2012 年 6 月

5. 西瀬雄子、渡辺久剛、富田恭子、佐藤智佳子、石井里佳、芳賀弘明、奥本和夫、斎藤貴史、上野義之：当院における 70 歳以上 C 型肝炎患者の IFN 治療の現状 第 16 回日本肝臓学会大会、神戸；2012 年 10 月

6. 富田恭子、芳賀弘明、渡辺久剛、佐藤智佳子、石井里佳、奥本和夫、西瀬雄子、斎藤貴史、上野義之：神経性食欲不振症における肝障害リスク因子の検討 第 16 回日本肝臓学会大会、神戸；2012 年 10 月

7. 佐藤智佳子、渡辺久剛、上野義之：非アルコール性脂肪性肝障害を基盤とした肝癌症例の臨床的特徴 第 16 回日本肝臓学会大会(シンポジウム 8「NASH からの発癌：基礎と臨床」)、神戸；2012 年 10 月 11 日

8. Okumoto K, Saito T, Tomita K, Sato C, Ishii R, Haga H, Nishise Y, Watanabe H, Ueno Y. The serum level of B-FGF and Scf in hepatitis C patients and its prognosis with hepatocellular carcinoma. DDW2012, San Diego, USA, May 20, 2012

9. Tomita K, Haga H, Mizuno K, Katsumi T, Sato C, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Saito T, Ueno Y: Epiregulin Promotes the Emergence and Proliferation of Adult Liver Progenitor Cells. AASLD, Washington; November 2013

10. Tomita K, Haga H, Mizuno K, Katsumi T, Sato C, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Saito T, Ueno Y: The Role of Epiregulin During Liver Regeneration: the Possible Function of Promoting the

Emergence and Proliferation of Liver Progenitor Cells. 第 20 回肝細胞研究会, 大阪; 2013 年 9 月

11. Tomita K, Haga H, Katsumi T, Sato C, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Saito T, Ueno Y: Clinical Manifestations of Liver Dysfunction in Patients with Anorexia Nervosa. IDD forum, Hong Kong; June 2013

12. 富田恭子, 芳賀弘明, 勝見智大, 佐藤智佳子, 石井里佳, 奥本和夫, 西瀬雄子, 渡辺久剛, 斎藤貴史, 上野義之: 肝再生におけるエピレグリンの役割と機能解析, 第 49 回肝臓学会総会, 東京; 2013 年 6 月

13. 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

14. 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

15. 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

16. 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

17. 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**

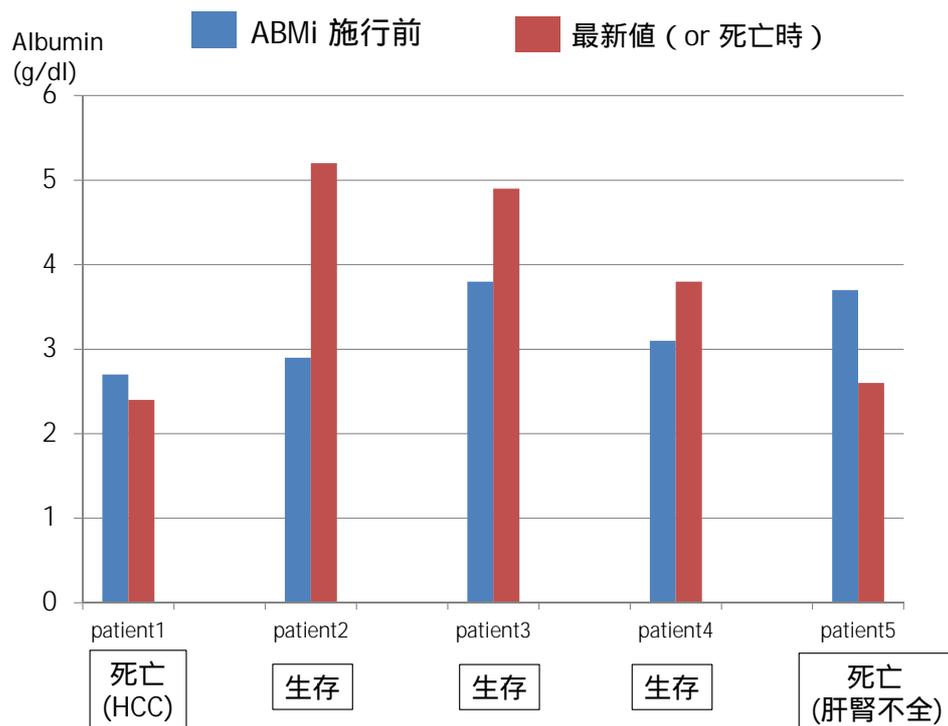
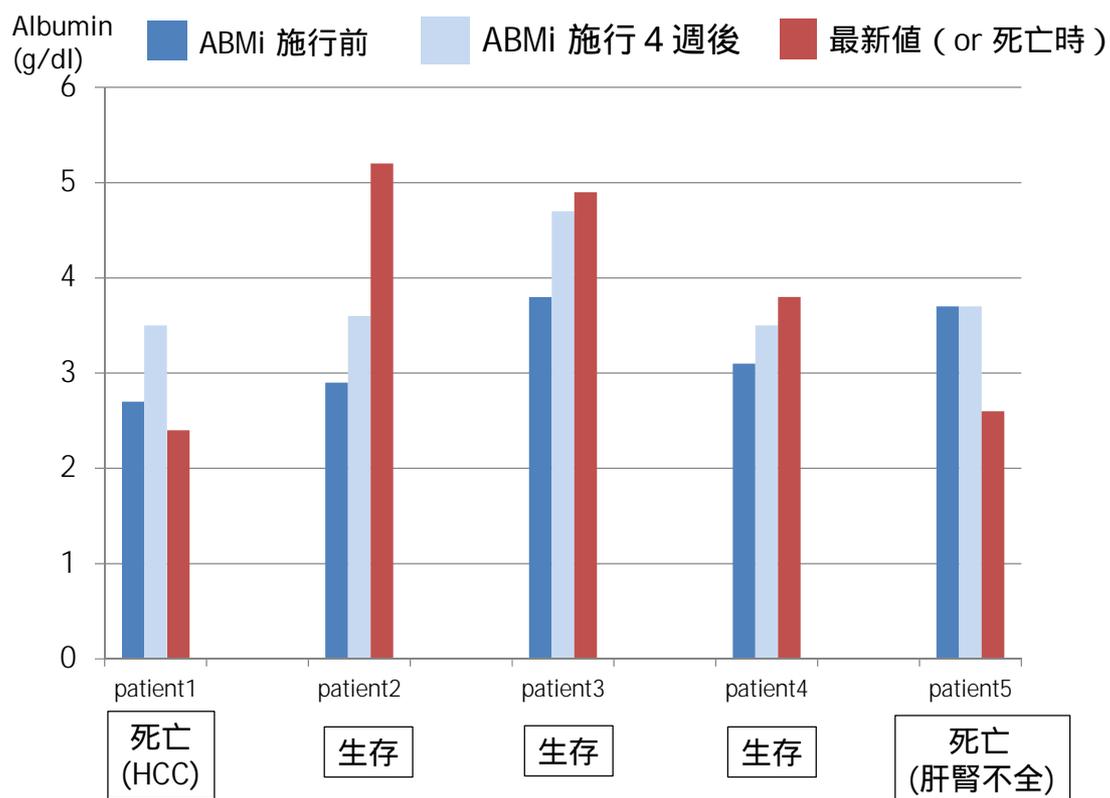


図 2 血清アルブミン値の早期反応と長期経過・生命予後



**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. Takase H., Itoh T., Wang T., Koji T., Akira S., Takikawa Y., and Miyajima A. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes and Development* 27, 169-181, 2013.

2. Inagaki F., Tanaka M., Inagaki N., Yagai T., Sato Y., Sekiguchi K., Oyaizu N., Kokudo N., and Miyajima A. Nephronectin is upregulated in acute and chronic hepatitis and aggravates liver injury by recruiting CD4 positive cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 751-756, 2013.

3. Tanimizu N., Kikkawa Y., Mitaka T. and Miyajima A.  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 5-Containing laminins regulate the development of bile

ducts via  $\beta$ 1-integrin signals. *J. Biol. Chem.* 287, 28586-28597, 2012.

4. Senga K., Mostov K. E., Mitaka T., Miyajima A., and Tanimizu N. Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25. *Mol Biol. Cell.* 23, 2845-2855, 2012.

5. Miyaoka Y., Ebato K., Kato H., Arakawa S., Shimizu S., and Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Current Biology* 22, 1166-1175, 2012.

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

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

8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. 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. 谷貝 知樹, 田中稔、宮島篤. 肝再生および肝線維化における Semaphorin 3E の機能, 第 85 回日本生化学会大会. 福岡, 2012 年 12 月 16 日

2. 佐藤 郁、田中稔、宮島篤. オンコスタチン M による骨髄造血環境の制御機構の解明. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡、2012 年 12 月 14 日 ~ 16 日.

3. 田中稔、小森 忠祐、森川吉博、仙波恵美子、宮島篤. オンコスタチン M はマクロファージの M1/M2 バランスに作用しインスリン抵抗性を改善する. 第 85 回日本生化学会、福岡、2012 年 12 月 16 日.

4. 西條栄子、内木隆寛、宮島篤. 肝臓の発生および代謝機能獲得における Tribbles 遺伝子の

役割. 第35回分子生物学会、福岡、2012年12月12日

5. 稲垣冬樹、田中稔、稲垣奈都子、國土典宏、宮島篤. 肝炎におけるネフロネクチンの病態生理的意義. 第19回肝細胞研究会、札幌、2012年6月29日

6. 金子 洸太、伊藤 暢、宮島 篤  
A novel 3D imaging technique reveals dynamic behavior of the biliary tree in regenerating livers. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡, 2012 年 12 月 12 日

7. Tohru Itoh, Hinako Takase, Atsushi Miyajima, "Critical role of FGF7 in regulating mouse adult liver stem/progenitor cells and regeneration in damaged livers" International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting. Pacifico Yokohama, June 14th, 2012

8. Tohru Itoh, Hinako Takase, Atsushi Miyajima. "FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration" Keystone Symposia "Stem Cell Regulation in Homeostasis and Disease" Banff, February 28, 2013.

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

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

11. Yagai T, Tanaka M and Miyajima A, Function of Semaphorin 3E in liver

- fibrosis and regeneration. 第 20 回肝細胞研究会。大阪、2013.
12. Miyajima A., Liver stem cells in development and regeneration, Asia Pacific Association of Study of Liver Disease, Singapore, June 8, 2013
13. Omi A, Kaniwa T, Enomoto Y and Miyajima A. Two subsets of mature mouse NK cells based on the expression of Ly6C, 第 78 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会/ 第 21 回 マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム 合同学術集会, 東京、2013.
14. Omi A, Kaniwa T, Enomoto Y and Miyajima A. Expression of Ly6C defines two subsets of mature mouse NK cells, 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Milano, 2013.
15. Omi A, Kaniwa T, Enomoto Y, Miyajima A. Expression of Ly6C defines two subsets of mature NK cells、第 42 回 日本免疫学会学術集会, 幕張、2013.
16. 佐藤郁、田中稔、宮島篤, Role of Oncostatin M in the bone marrow microenvironment for hematopoiesis、日本血液学会, 札幌、2013.
17. 松田道隆 田中稔 宮島篤 Mechanism of liver fibrosis induced by Oncostatin M, 第 20 回 肝細胞研究会,大阪、2013.
18. 田中稔、谷貝知樹、宮島篤、肝細胞死から見た肝障害後の再生および線維化の制御機構、第 86 回日本生化学会、横浜、2013.
19. Tanaka M., Komori T, Matsuda M, Morikawa Y and Miyajima A., Oncostatin M regulates the cross talk between insulin resistance and liver fibrosis by switching the M1/M2 activation of macrophages. International Symposium on Transcription and Metabolism. 淡路島、2013.
20. 谷貝 知樹、田中 稔、原田 憲一、中沼 安二、稲垣 冬樹、西條 栄子、宮島 篤. 胆管傷害および胆管癌における sterile alpha motif domain containing 5 の発現解析, 第 86 回日本生化学会大会, 横浜、2013.
21. 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
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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
26. 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.

27. 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

28. 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

**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

**「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が期待される。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. Shoji Hata, Jun Hirayama, Hiroaki Kajihō, Kentaro Nakagawa, Yutaka Hata, Toshiaki Katada, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina (2012) A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to SN2 alkylating agents. *J. Biol. Chem.* 287, 22089-22098.
2. Yoshimi Uchida, Tomomi Osaki, Tokiwa Yamasaki, Tadanori Shimomura, Shoji Hata, Kazumasa Horikawa, Shigenobu Shibata, Takeshi Todo, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina (2012) Involvement of the Stress Kinase Mitogen-activated Protein

Kinase Kinase 7 in the Regulation of the Mammalian Circadian Clock. *J. Biol. Chem.* 287, 8318-8326.

3. Yoshimi Uchida, Tadanori Shimomura, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina (2012) Light, reactive oxygen species, and magnetic fields activate ERK/MAPK signaling pathway in cultured zebrafish cells. *Appl. Magn. Reson.* 42, 69-77.
4. Miki Nishio, Koichi Hamada, Kohichi Kawahara, Masato Sasaki, Fumihito Noguchi, Shuhei Chiba, Kensaku Mizuno, Satoshi O. Suzuki, Youyi Dong, Masaaki Tokuda, Takumi Morikawa, Hiroki Hikasa, Jonathan Eggenschwiler, Norikazu Yabuta, Hiroshi Nojima, Kentaro Nakagawa, Yutaka Hata, Hiroshi Nishina, Koshi Mimori, Masaki Mori, Takehiko Sasaki, Tak W. Mak, Toru Nakano, Satoshi Itami, and Akira Suzuki (2012) Cancer Susceptibility and embryonic lethality in Mob1A/1B double mutant mice. *J. Clin. Invest.* 122(12):4505-4518.
5. Tadashi Yokoi, Yuko Seko, Tae Yokoi, Hatsune Makino, Shin Hatou, Masakazu Yamada, Tohru Kiyono, Akihiro Umezawa, Hiroshi Nishina, Noriyuki Azuma (2012) Establishment of Functioning Human Corneal Endothelial Cell Line with High Growth Potential. *PLoS ONE* 7(1):e29677
6. Ken Okada, Akihide Kamiya, Keiichi Ito, Ayaka Yanagida, Hidenori Ito, Hiroki Kondou, Hiroshi Nishina and Hiromitsu Nakauchi (2012) Prospective isolation and characterization of bipotent progenitor cells in early mouse liver development. *Stem*

**Cells and Development** 21, 1124-1133.

7. Shoji Hata and Hiroshi Nishina (2012) [Letters to the Editor] Reply to Sun et al.: Targeting YAP acetylation in cancer. **J. Biol. Chem.** 287, 35443.

8. Tokiwa Yamasaki, Hiroshi Kawasaki and Hiroshi Nishina (2012) [review] Diverse roles of JNK and MKK pathways in the brain. **J. Signal Trans.** 2012: 459265.

9. Hiroshi Nishina (2012) [commentary] hDlk-1: A cell surface marker common to normal hepatic stem/progenitor cells and carcinomas. **J. Biochem.** 152, 121-123.

10. Asaoka Y, Terai S, Sakaida I, Nishina H. The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dis Model Mech.* 2014; 6: 905-14.

11. Oudhoff MJ, Freeman SA, Couzens AL, Antignano F, Kuznetsova E, Min PH, Northrop JP, Lehnertz B, Barsyte-Lovejoy D, Vedadi M, Arrowsmith CH, Nishina H. Gold MR, Rossi FM, Gingras AC, Zaph C. Control of the Hippo pathway by Set7-dependent methylation of Yap. *Dev. Cell* 2013; 26(2): 188-94.

12. Arima N, Uchida Y, Yu R, Nakayama K, Nishina H. Acetylcholine Receptors Regulate Gene Expression that Is Essential for Primitive Streak Formation in Murine Embryoid Bodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 435: 447-53.

13. 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

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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.

18. Keita Nakanaga, kotaro Hama, Kuniyuki Kano, Takanoa Sato, Hiroshi Yukiura, Asuka Inoue, Daisuke Saigusa, Hidetoshi Tokuyama, Yoshihisa Tomioka, Hiroshi Nishina, Atsuo Kawahara and Junken Aoki. Overexpression of autotaxin, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, enhances cardiac bifida induced by hypo-sphingosine-1-phosphate signaling in zebrafish embryo.

**J. Biochem.** 2014; 155: 235-241.

## 2. 学会発表

1. Hiroshi Nishina; A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to S<sub>N</sub>2 alkylating agents [2012 FASEB Science Research Conference, Aspen, USA, July 2012]

2. Tokiwa Yamasaki and Hiroshi Nishina; Stress-activated protein kinase MKK7

regulates axon elongation in the developing cerebral cortex [Neuroscience 2012, SfN's 42nd annual meeting, New Orleans, USA, Oct 2012]

3. Shoji Hata and Hiroshi Nishina; A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to S<sub>N</sub>2 alkylating agents [International Symposium on GENETIC AND EPIGENETIC CONTROL OF CELL FATE, Kyoto, Japan, November 2012]

4. Hiroshi Nishina; Liver Formation and Disease: Lessons from Fish and Mouse [4<sup>th</sup> World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Taipei, Taiwan, November 2012]

5. 仁科博史; Liver development, regeneration and disease: lessons from mice and fish [第9回心血管幹細胞研究会;2012年1月/東京]

6. 仁科博史; Liver development, regeneration and disease: lessons from mice and fish [東京大学薬学セミナー;2012年1月/東京]

7. 仁科博史; モデル生物を用いた器官形成機構の解明[山口大学医学部セミナー;2012年1月/宇部]

8. 岩月麻美子他; 神経組織特異的 Mkk7 欠損マウスの解析[第132回日本薬学会; 2012年3月/札幌]

9. 畠星治、仁科博史; がん遺伝子産物 YAP の新規翻訳後修飾アセチル化の同定 [第16回日本肝臓医生物学研究会; 2012年3月/熱海]

10. 宮村憲央、[仁科博史](#)；がん遺伝子 YAP による肝細胞がんの発症機構の解明[第 16 回日本肝臓医生物学研究会；2012 年 3 月 / 熱海]
11. [仁科博史](#)；質量顕微鏡法[第 55 回日本腎臓学会学術総会;2012 年 6 月 / 横浜]
12. 畠星治他；がん遺伝子産物 YAP の新規翻訳後修飾アセチル化の同定[第 19 回肝細胞研究会；2012 年 6 月 / 札幌]
13. 宮村憲央他；がん遺伝子産物 YAP による細胞競合および肝がん誘導系の確立 [第 19 回肝細胞研究会；2012 年 6 月 / 札幌]
14. 内田好海他；ストレス応答性キナーゼ MKK7 による概日リズム制御機構の解明 [第 11 回生命科学研究会；2012 年 6 月 / 秋田]
15. 浅岡洋一；ストレス応答性 MAP キナーゼシグナル伝達系のゼブラフィッシュ初期胚における役割の解明[第 34 回日本比較生理生化学会；2012 年 7 月 / 葉山] 第 21 回吉田奨励賞受賞講演
16. 山崎世和他；細胞の生死を制御するストレス応答性 MKK7 の神経系における生理的役割の解明 [第 21 回日本 Cell Death 学会；2012 年 7 月 / 名古屋]
17. [仁科博史](#)；マウスとメダカから学ぶ肝形成と肝疾患[秋田大学医学部セミナー;2012 年 8 月 / 秋田]
18. 有馬誉恵他；神経細胞特異的欠損マウスを用いた概日リズム制御機構におけるストレス応答性キナーゼ MKK7 の機能解析 [第 11 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィオーラム;2012 年 9 月 / 福岡]
19. 内田好海他;ストレス応答性 MKK7-JNK シグナル経路による分子時計制御 [第 11 回ファーマバイオフィオーラム 2012；2012 年 9 月 / 福岡]
20. 平山順他；ストレス応答性リン酸化酵素による概日リズム制御 [第 19 回日本時間生物学学会学術大会；2012 年 9 月 / 札幌]
21. 山崎世和他；JNK signaling is required for the maintenance of motor performance in old-age animals [第 35 回日本神経科学大会；2012 年 9 月 / 名古屋]
22. 平山順他；Light-dependent UV-tolerance in zebrafish early embryo [第 18 回小型魚類研究会；2012 年 9 月 / 京都]
23. 浅岡洋一他；Analysis of the Hippo signaling pathway regulating neuronal differentiation in the retina. [第 18 回小型魚類研究会；2012 年 9 月 / 京都]
24. 宮村憲央、[仁科博史](#)；がん遺伝子 YAP による肝細胞癌発症機構の解明[第 17 回日本肝臓医生物学研究会；2012 年 10 月 / 旭川]
25. 千葉恭敬、[仁科博史](#)；がん遺伝子 YAP 誘導性肝細胞がんのゲノム解析 [第 17 回日本肝臓医生物学研究会；2012 年 10 月 / 旭川]
26. 斎藤光介、[仁科博史](#)；YAP パラログ TAZ の肝がん誘導能の検討 [第 17 回日本肝臓医生物学研究会；2012 年 10 月 / 旭川]
27. 浅岡洋一、[仁科博史](#)；器官サイズ制御因子 YAP の網膜分化における機能解析 [第 5 回 RRM；2012 年 12 月 / 東京]
28. [仁科博史](#)；がん遺伝子 yap 依存的異常肝細胞の排除と肝細胞がんの発症 [第 35 回日本分子生物学会年会；2012 年 12 月 / 福岡]
29. 平山順他；ストレス応答性キナーゼによる概日リズム制御 [第 35 回日本分子生物学会年会；2012 年 12 月 / 福岡]
30. 畠星治他；がん遺伝子産物 YAP アセチル化サイクルの同定[第 85 回日本生化学会大会；2012 年 12 月 / 福岡]
31. [Hiroshi Nishina](#)；A novel mouse model of oncogene yap-dependent abnormal

- hepatocyte disappearance. [The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells, Osaka, September 26-27, 2013]
32. Shoji Hata, Yutaka Hata and Hiroshi Nishina; A novel acetylation cycle of YAP is triggered to S<sub>N</sub>2 alkylating agents [Keystone Symposia on The Hippo Tumor Suppressor Network, Monterey USA, May 19-23, 2013]
33. Norio Miyamura and Hiroshi Nishina; A novel mouse model of oncogene yap-dependent abnormal hepatocyte disappearance [Keystone Symposia on The Hippo Tumor Suppressor Network, Monterey USA, May 19-23, 2013]
34. 仁科博史; 異常肝細胞排除現象の発見と機構解明 [第 19 回日本肝臓医生物学研究会; 2013 年 11 月 30 日 / 札幌]
35. 仁科博史; Roles of Hippo signaling pathway in murine liver [第 86 回日本生化学会大会; 2013 年 9 月 11-13 日 / 横浜]
36. 仁科博史; 細胞の生死を制御する JNK シグナル伝達系の新規生理機能の解明 [第 22 回日本 Cell Death 学会; 2013 年 7 月 19-20 日 / 京都]
37. 仁科博史; 肝臓のサイズとがん発症を制御する Hippo シグナル伝達系 [日本生化学会関東支部例会; 2013 年 6 月 15 日 / 山梨]
38. 仁科博史; ストレス応答性 MKK の生化学・生理機能の解明 [新潟大学医歯学系分子細胞機能学セミナー; 2013 年 3 月 4 日 / 新潟]
39. 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]
40. 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]
41. 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]
42. 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]
43. 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]
44. 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]
45. 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]
46. 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]
47. 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]

48. 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]
49. 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]
50. 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]
51. 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]
52. 濱部凜他；ロ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]
53. 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]
54. 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]
55. 濱部凜他；ロ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]
56. 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]
57. 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]
58. 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]
59. 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]
60. 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]
61. 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]
62. 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]
63. 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

**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

**「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・αSMA 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。

研究協力者氏名 : 菅波 孝祥、伊藤 美智子

**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  $\text{mm}^2$  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> マクロファー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. Satoh-Asahara N, Shimatsu A, Sasaki Y, Nakaoka H, Himeno A, Tochiya M, Kono S, Takaya T, Ono K, Wada H, Suganami T, Hasegawa K, Ogawa Y. Highly purified eicosapentaenoic acid increases interleukin-10 levels of peripheral blood monocytes in obese patients with dyslipidemia. *Diabetes Care* 2012; 35:2631-2639
2. Watanabe Y, Nakamura T, Ishikawa S, Fujisaka S, Usui I, Tsuneyama K, Ichihara Y, Wada T, Hirata Y, Suganami T, Izaki H, Akira S, Miyake K, Kanayama HO, Shimabukuro M, Sata M, Sasaoka T, Ogawa Y, Tobe K, Takatsu K, Nagai Y. The Radioprotective 105/MD-1 complex contributes to diet-induced obesity and adipose tissue inflammation. *Diabetes* 2012; 61:1199-1209
3. Y. Iwasaki, T. Suganami, R. Hachiya, I. Shirakawa, M. Kim-Saijo, M. Tanaka, M.

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

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

5. 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.

6. 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. Suganami T, Itoh M, Tanaka M, Kamei Y, Terai S, Sakaida I, Ogawa Y,

Melanocortin-4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. 2012 Keystone Symposia, Boston, US, 2012

2. 小川佳宏, メタボリックシンドロームと自然炎症, 第49回日本臨床分子医学会学術集会, 京都, 2012

3. 菅波孝祥, 小川佳宏, 脂肪組織炎症における飽和脂肪酸の意義, 第85回日本内分泌学会学術総会, 名古屋, 2012

4. 菅波孝祥, 小川佳宏, 慢性炎症とインスリン抵抗性, 第55回日本糖尿病学会年次学術集会, 横浜, 2012

5. 菅波孝祥, 小川佳宏, 脂肪組織の慢性炎症と飽和脂肪酸, 第33回日本炎症・再生医学会, 福岡, 2012

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

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

8. 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

9. 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

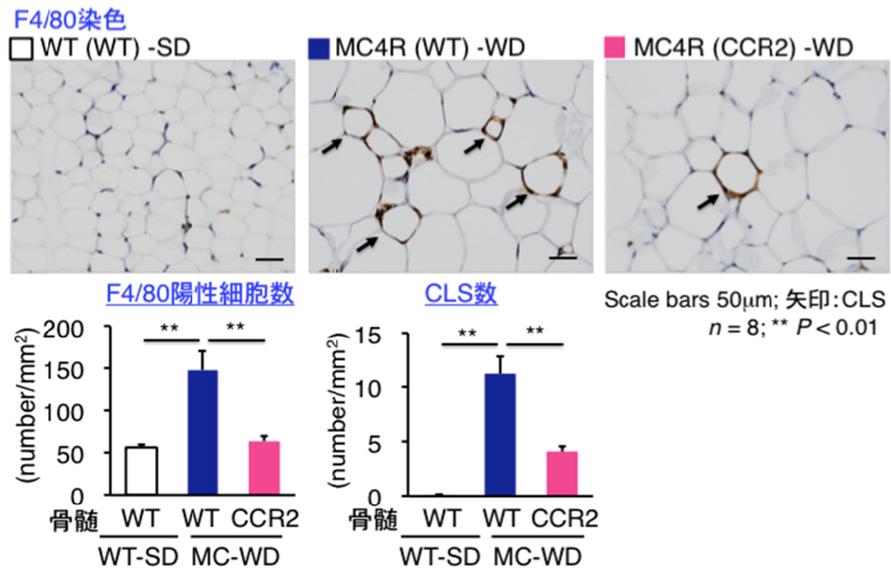


図1. 脂肪組織を用いた組織学的解析

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

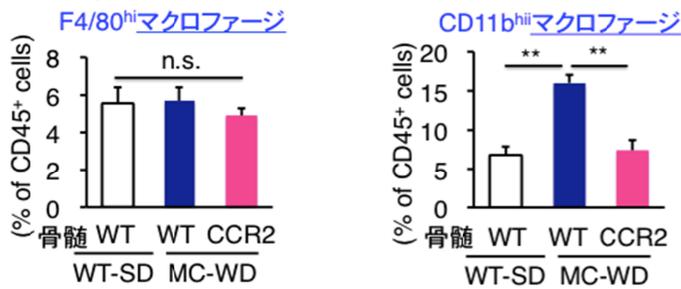


図2. 肝非実質細胞分画を用いたFACS解析

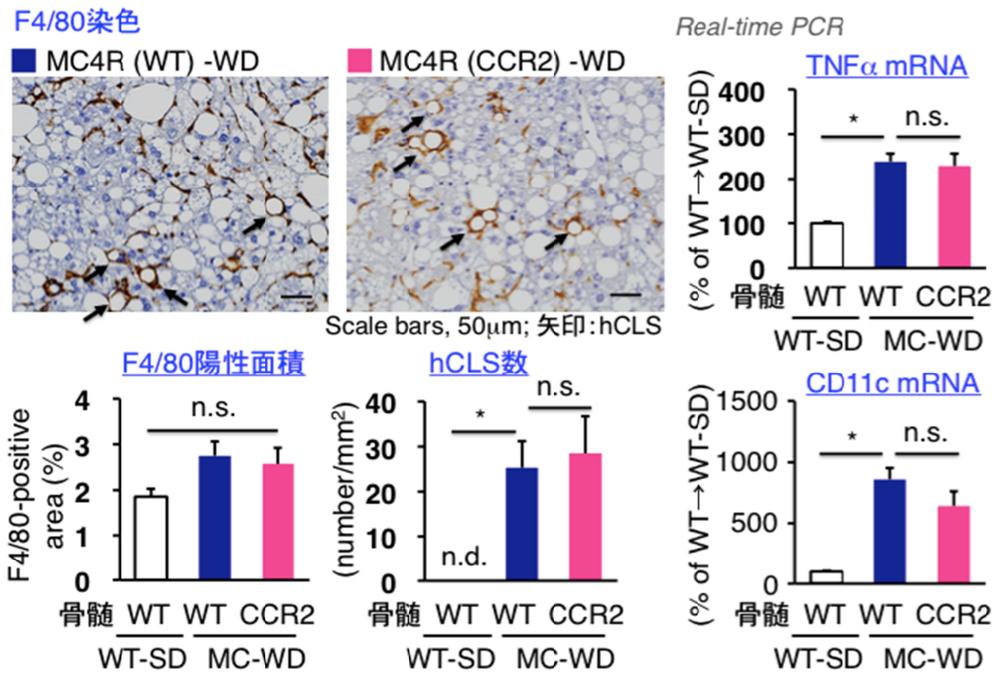


図3. 肝臓における炎症性変化

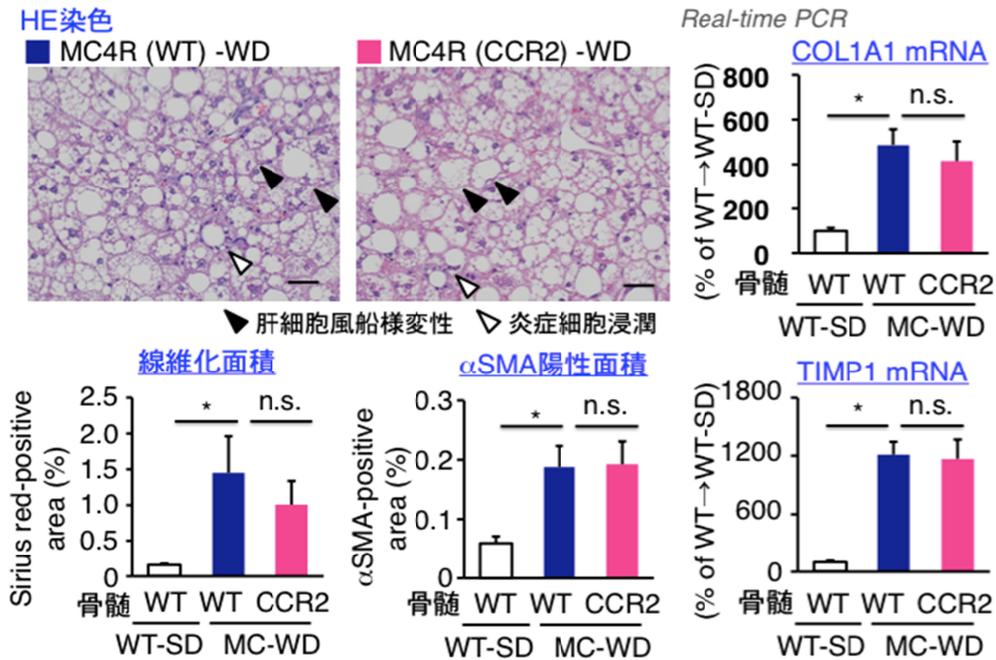


図4. 肝臓における線維化変化

**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、本研究者ら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、本研究者ら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)。

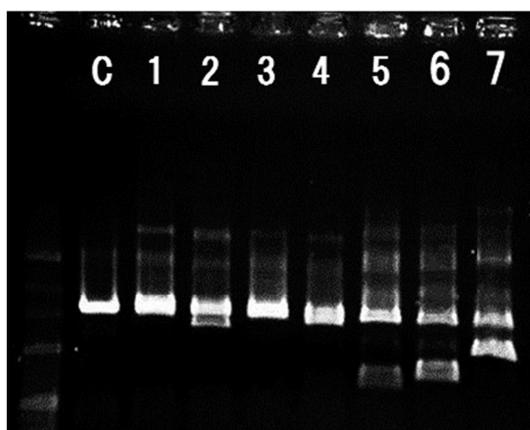


図. OGFRL1 KO マウス (F1) の電気泳動像

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. 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：マウス皮膚創傷治療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. *Hepatol 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- $\beta$ /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 穎、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 - 血管再生と炎症・間質組織の生理学的および病理学的役割 - 」、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

同学会大会、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 $\alpha$  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.

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 OGREL1 の機能解析。第14回再生医療学会、横浜、2015年3月20日

1. 特許取得： なし
2. 実用新案登録： なし
3. その他： なし

**G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)**

**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、 $2 \times 10^5$  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 °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  $\mu$ m filter を通した後、 $1 \times 10^6$  / 10 cm dish に播種した。培地交換は 2 日に 1 回行い、1 週間後にトリプシン処理して再播種した。細胞を Passage 5 まで培養を続けた後、control medium + 10 % dimethyl sulphoxide (DMSO) (SIGMA) 内に移し液体窒素中で凍結保存するか、または実験に使用した。

## ASC 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。

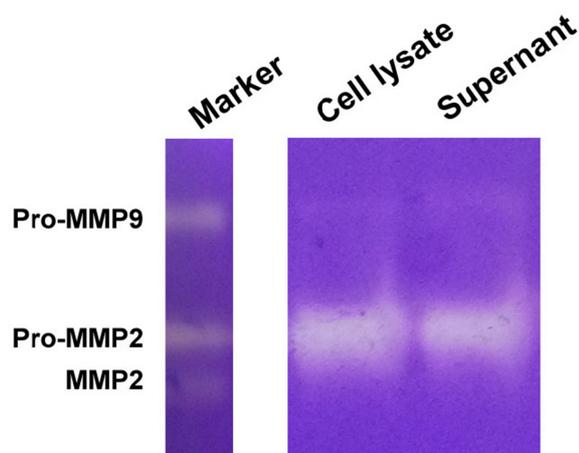
GFP 陽性細胞は抗 GFP 抗体を用いて、ALP 活性をもつ二次抗体で赤く発色させた。

## 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。

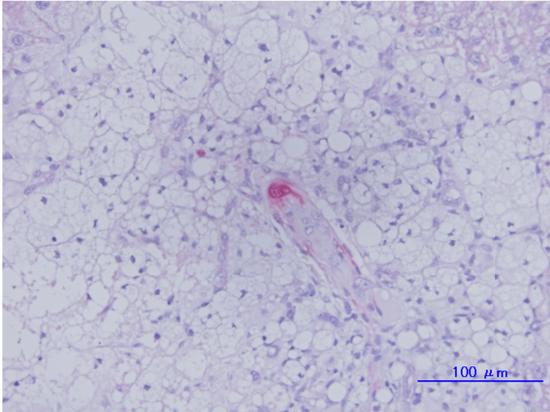


### 図1 ゼラチンゼイモグラフィーアッセイ

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。

**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<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>、Gr-1<sup>+</sup>、F4/80<sup>+</sup> 炎症細胞の浸潤が確認されたが、肝組織内 CD11b<sup>+</sup>、Gr-1<sup>+</sup>、F4/80<sup>+</sup> 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 64<sup>th</sup> 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 copies/10<sup>6</sup>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  $1.8 \log \text{copies}/10^6 \text{PBMCs}$  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 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  $1.7 \sim 5 \log \text{copies}/10^6 \text{PBMCs}$  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. 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(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、Colla1 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。

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(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>Ylox/flox</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>Ylox/flox</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>Ylox/flox</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>Ylox/flox</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/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- $\beta$  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>flx/flx</sup>:CTGF $\Delta$ hep* マウス)、肝星細胞特異的 CTGF 欠損マウス (*GFAP-Cre CTGF<sup>flx/flx</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>flx/flx</sup>:CTGF $\Delta$ 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 $\Delta$ 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

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. 正田隼人, 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, 正田隼人, 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.

11. 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

12. 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.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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
Takiya CM, Paredes BD, Mesquita LF, Dias GS, Faccioli LA, Takami T, Terai S, Sakaida I, Goldenberg RC.	Chapter 10 “Liver Resident Stem Cell” Liver Stem/Progenitors Cells and Cell Therapy	Goldenberg RC. and Carvalho AC.	Resident Stem Cells and Regenerative Therapy	ELSEVIER		2012	190-193
畠 星治、仁科博史	Hippoシグナリング	山本 雅、仙波憲太郎、山梨裕司	シグナル伝達キーワード事典	羊土社	東京	2012	58-60
仁科博史 分担執筆		日本薬学会	薬学用語 辞典	東京化学同人	東京	2012	

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
Takami T, Terai S, Sakaida I.	Advanced therapies using autologous bone marrow cells for chronic liver disease.	Discovery Medicine.	14(74)	7-12	2012
Terai S, Tanimoto H, Maeda M, Zaitu J, Hisanaga T, Iwamoto T, Fujisawa K, Mizunaga Y, Matsumoto T, Urata Y, Marumoto Y, Hidaka I, Ishikawa T, Yokoyama Y, Aoyama K, Tsuchiya M, Takami T, Omori K, Yamamoto N, Segawa M, Uchida K, Yamasaki T, Okita K, Sakaida I.	Timeline for development of autologous bone marrow infusion (ABMi) therapy and perspective for future stem cell therapy.	J Gastroenterol.	47(5)	491-497	2012
Takami T, Terai S, Sakaida I.	Stem cell therapy in chronic liver disease.	Curr Opin Gastroenterol.	28(3)	203-208	2012
Iwamoto T, Terai S, Hisanaga T, Takami T, Yamamoto N, Watanabe S, Sakaida I.	Bone-marrow-derived cells cultured in serum-free medium reduce liver fibrosis and improve liver function in carbon-tetrachloride-treated cirrhotic mice.	Cell Tissue Res.	351(3)	487-495	2013

Oishi T, Terai S, Kuwashiro S, Fujisawa K, Matsumoto T, Nishina H, Sakaida I.	Ezetimibe reduces fatty acid quantity in liver and decreased inflammatory cell infiltration and improved NASH in medaka model.	Biochem Biophys ResCommun.	422(1)	22-27	2012
Mizunaga Y, Terai S, Yamamoto N, Uchida K, Yamasaki T, Nishina H, Fujita Y, Shinoda K, Hamamoto Y, Sakaida I.	Granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-1 $\beta$ are important cytokine in repair of the cirrhotic liver after bone marrow cell infusion -comparison of humans and model mice-	Cell Transplant.	21(11)	2363-2375	2012
寺井崇二、坂井田功	自己骨髄細胞投与による肝再生、修復治療	生化学	84(8)	707-711	2012
高見太郎、寺井崇二、坂井田功	肝臓の再生治療	Annual Review消化器 2012		192-197	2012
高見太郎、寺井崇二、坂井田功	肝再生医学のトランスレーショナル・リサーチ	肝疾患レビュー 2012-2013		69-75	2012
高見太郎、寺井崇二、坂井田功	肝硬変診療のトピックス 自己骨髄細胞を用いた肝修復再生療法の現状	medicina	49(7)	1238-1239	2012
高見太郎、坂井田功	肝硬変Update「自己骨髄細胞投与による肝修復再生療法」	医学のあゆみ	240(9)	804-808	2012
前田雅喜、高見太郎、藤澤浩一、山本直樹、寺井崇二、坂井田功	マウス肝硬変高発癌モデルにおける自己骨髄細胞投与の影響	分子生物学が可能とした個別化医療 (第19回浜名湖シンポジウム)		165-170	2012
Inoue J, Ueno Y, Kawamura K, Yamamoto T, Mano Y, Miura M, Kobayashi T, Niitsuma H, Kondo Y, Kakazu E, Ninomiya M, Kimura O, Obara N, Kawagishi N, Kinouchi Y, Shimosegawa T	Association between S21 substitution in the core protein of hepatitis B virus and fulminant hepatitis	J Clin Virol	55(2)	147-152	2012
Kondo Y, Ueno Y, Ninomiya M, Tamai K, Tanaka Y, Inoue J, Kakazu E, Kobayashi K, Kimura O, Miura M, Yamamoto T, Kobayashi T, Igarashi T, Shimosegawa T	Sequential immunological analysis of HBV/HCV co-infected patients during Peg-IFN/RBV therapy	J Gastroenterol.	47(12)	1323-1335	2012

Takase H., Itoh T., Wang T., Koji T., Akira S., Takikawa Y., and Miyajima A.	FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration	Genes and Developmen	27	169-181	2013
Inagaki F., Tanaka M., Inagaki N., Yagai T., Sato Y., Sekiguchi K., Oyaizu N., Kokudo N., and Miyajima A	Nephronectin is upregulated in acute and chronic hepatitis and aggravates liver injury by recruiting CD4 positive cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun	430	751-756	2013
Tanimizu N., Kikkawa Y., Mitaka T. and Miyajima A.	$\alpha$ 1- and $\alpha$ 5-Containing laminins regulate the development of bile ducts via $\beta$ 1-integrin signals.	J. Biol. Chem.	287	28586-28597	2012
Senga K., Mostov K. E., Mitaka T., Miyajima A., and Tanimizu N.	Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25.	Mol Biol. Cell.	23	2845-2855	2012
Miyaoka Y., Ebato K., Kato H., Arakawa S., Shimizu S., and Miyajima A	Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration.	Current Biology	22	1166-1175	2012
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.	Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: a causal link between apoptosis and carcinogenesis.	J Hepatol.	57	92-100	2012
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.	Inhibition of autophagy potentiates the anti-tumor effect of the multi-kinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma.	Int J Cancer.	131	548-557	2012
Shoji Hata, Jun Hirayama, Hiroaki Kajihō, Kentaro Nakagawa, Yutaka Hata, Toshiaki Katada, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina	A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to SN2 alkylating agents.	J. Biol. Chem.	287	22089-22098	2012

Yoshimi Uchida, Tomomi Osaki, Tokiwa Yamasaki, Tadanori Shimomura, Shoji Hata, Kazumasa Horikawa, Shigenobu Shibata, Takeshi Todo, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina	Involvement of the Stress Kinase Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 7 in the Regulation of the Mammalian Circadian Clock.	J. Biol. Chem.	287	8318-8326	2012
Yoshimi Uchida, Tadanori Shimomura, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina	Light, reactive oxygen species, and magnetic fields activate ERK/MAPK signaling pathway in cultured zebrafish cells.	Appl. Magn. Reson.	42	69-77	2012
Miki Nishio, Koichi Hamada, Kohichi Kawahara, Masato Sasaki, Fumihito Noguchi, Shuhei Chiba, Kensaku Mizuno, Satoshi O. Suzuki, Youyi Dong, Masaaki Tokuda, Takumi Morikawa, Hiroki Hikasa, Jonathan Eggenschwiler, Norikazu Yabuta, Hiroshi Nojima, Kentaro Nakagawa, Yutaka Hata, Hiroshi Nishina, Koshi Mimori, Masaki Mori, Takehiko Sasaki, Tak W. Mak, Toru Nakano, Satoshi Itami, and Akira Suzuki	Cancer Susceptibility and embryonic lethality in Mob1A/1B double mutant mice.	J. Clin. Invest.	122(12)	4505-4518	2012
Tadashi Yokoi, Yuko Seko, Tae Yokoi, Hatsune Makino, Shin Hatou, Masakazu Yamada, Tohru Kiyono, Akihiro Umezawa, Hiroshi Nishina, Noriyuki Azuma	Establishment of Functioning Human Corneal Endothelial Cell Line with High Growth Potential.	PLoS ONE	7(1)	e29677	2012
Ken Okada, Akihide Kamiya, Keiichi Ito, Ayaka Yanagida, Hidenori Ito, Hiroki Kondou, Hiroshi Nishina and Hiromitsu Nakauchi	Prospective isolation and characterization of bipotent progenitor cells in early mouse liver development.	Stem Cells and Development	21	1124-1133	2012
Shoji Hata and Hiroshi Nishina	[Letters to the Editor] Reply to Sun et al.: Targeting YAP acetylation in cancer.	J. Biol. Chem.	287	35443	2012
Tokiwa Yamasaki, Hiroshi Kawasaki and Hiroshi Nishina	[review] Diverse roles of JNK and MKK pathways in the brain.	J. Signal Trans.	2012	459265	2012

Hiroshi Nishina	[commentary] hDlk-1: A cell surface marker common to normal hepatic stem/progenitor cells and carcinomas.	J. Biochem.	152	121-123	2012
平山 順、仁科博史	活性酸素シグナルと概日リズム	実験医学 2012年11月 増刊号		36-41	2012
宮村憲央、仁科博史	モデル生物を用いた肝発生および肝サイズ制御機構の解明	肝胆膵	65	21-28	2012
Satoh-Asahara N, Shimatsu A, Sasaki Y, Nakaoka H, Himeno A, Tochiya M, Kono S, Takaya T, Ono K, Wada H, Suganami T, Hasegawa K, Ogawa Y	Highly purified eicosapentaenoic acid increases interleukin-10 levels of peripheral blood monocytes in obese patients with dyslipidemia.	Diabetes Care	35	2631-2639	2012
Watanabe Y, Nakamura T, Ishikawa S, Fujisaka S, Usui I, Tsuneyama K, Ichihara Y, Wada T, Hirata Y, Suganami T, Izaki H, Akira S, Miyake K, Kanayama HO, Shimabukuro M, Sata M, Sasaoka T, Ogawa Y, Tobe K, Takatsu K, Nagai Y	The Radioprotective 105/MD-1 complex contributes to diet-induced obesity and adipose tissue inflammation.	Diabetes	61	1199-1209	2012
Inagaki Y, Higashiyama R	Interplay between bone marrow and liver in the pathogenesis of hepatic fibrosis.	Hepatol Res	42 (6)	543-548	2012
Okazaki I, Inagaki Y	Novel strategies for hepatocellular carcinoma based on MMPs science.	Anti-Cancer Agents Med Chem	12(7)	753-763	2012
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	65(2)	253-260	2012
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	244(6)	513	2013
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	244(6)	515-520	2013
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新規治療法開発の可能性	肝胆膵	65巻1号	63-71	2012

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
酒井佳夫 金子周一	肝硬変に対する再生医療の臨床試験評価		再生医療における臨床研究と製品開発	技術情報協会	東京	2013	427-431

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
Tanimoto H, Terai S, Takami T, Murata Y, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I.	Improvement of liver fibrosis by infusion of cultured cells derived from human bone marrow.	Cell Tissue Res	354(3)	717-728	2013
Quintanilha LF, Takami T, Hirose Y, Fujisawa K, Murata Y, Yamamoto N, Goldenberg RC, Terai S, Sakaida I.	Canine mesenchymal stem cells show antioxidant properties against thioacetamide-induced liver injury in vitro and in vivo.	Hepatol Res	44(10)	E206-217	2014
高見 太郎、寺井 崇二、坂井田 功	肝臓の再生療法	Annual Review消化器2014 (中外医学社)		187-193	2014
Saito T, Tomita K, Haga H, Okumoto K, Ueno Y	Bone marrow cell-based regenerative therapy for liver cirrhosis	World J Methodol	3	65 - 69	2013
Saito T, Ueno Y	Transmission of hepatitis C virus: Self-limiting hepatitis or chronic hepatitis?	World J Gastroenterol	19	6957 - 6961	2013
Wada Y, Sato C, Tomita K, Ishii-Aso R, Haga H, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Saito T, Ueno Y	Possible autoimmune hepatitis induced after chronic active Epstein-Barr virus infection	Clin J Gastroenterol	7	58 - 61	2014
Komori T., Tanaka M., Senba E., Miyajima A. and Morikawa Y.	Lack of Oncostatin M receptor $\beta$ leads to adipose tissue inflammation and insulin resistance by switching macrophage phenotype.	J Biol Chem	288	21861-21875	2013
Miyaoka Y. and Miyajima A.	To divide or not to divide: revisiting liver regeneration	Cell Division	8	8	2013
Arima N, Uchida Y, Yu R, Nakayama K, Nishina H	Acetylcholine receptors regulate gene expression that is essential for primitive streak formation in murine embryoid bodies.	Biochem Biophys Res Commun	435	447-453	2013

Oudhoff MJ, Freeman SA, Couzens AL, Antignano F, Kuznetsova E, Min PH, Northrop JP, Lehnertz B, Barsyte-Lovejoy D, Vedadi M, Arrowsmith CH, Nishina H, Gold MR, Rossi FM, Gingras AC, Zaph C.	Control of the Hippo Pathway by Set7-Dependent Methylation of Yap	Dev Cell	26(2)	188-194	2013
Asaoka Y, Terai S, Sakaida I, Nishina H.	The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease	Dis Model Mech	6	905-914	2014
山崎世和 仁科博史	脳におけるSAPK/JNKシグナルの役割	CLINICAL NEUROSCIENCE (中外医学社)	31	654-656	2013
M. Itoh, H. Kato, T. Suganami, K. Konuma, Y. Marumoto, S. Terai, H. Sakugawa, S. Kanai, M. Hamaguchi, T. Fukaiishi, S. Aoe, K. Akiyoshi, Y. Komohara, M. Takeya, I. Sakaida, Y. Ogawa	Hepatic crown-like structure: a unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans.	PLoS One	8	E82163	2013
Y. Iwasaki, T. Suganami, R. Hachiya, I. Shirakawa, M. Kim-Saijo, M. Tanaka, M. Hamaguchi, T. Takai-Igarashi, M. Nakai, Y. Miyamoto, Y. Ogawa	Activating transcription factor 4 links metabolic stress to interleukin-6 expression in macrophages.	Diabetes	63	152-161	2014
Li X, Bian Y, Takizawa Y, Hashimoto T, Ikoma T, Tanaka J, Kitamura N, Inagaki Y, Komada M, 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
Tsukui T, Ueha S, Abe J, Hashimoto S, Shichino S, Shimaoka T, Shand HW F, Arakawa Y, Oshima K, Hattori M, Inagaki Y, Tomura M, Matsushima K	Qualitative rather than quantitative changes are hallmarks of fibroblasts in bleomycin-induced pulmonary fibrosis.	Am J Pathol	183(3)	758-773	2013
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	33 (3)	124-130	2013

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	43(11)	2956-2968	2013
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	58(3)	1133-1142	2013
Morita S, Matsumoto A, Umemura T, Shibata S, Kamiyo N, Ichikawa Y, Kimura T, Joshita S, Komatsu M, Yoshizawa K, Tanaka E.	Characteristics and prediction of hepatitis B e-antigen negative hepatitis following seroconversion in patients with chronic hepatitis B.	Hepatol Res	44(10)	E45-53	2014
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	44(10)	E172-180	2014
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	8	e83381	2013
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	288(42)	30009-30018	2013
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	59(6)	1239-1245	2013

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, F ujisawa K, Burganova G, Quin tanilha 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, Iwamot o T, Mizunaga Y, Matsuda T, Oono T, Marumoto M, Burga nova G, Quintanilha LF, Hidak a I, Marumoto Y, Saeki I, Uc hida 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, S aito 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, K atsumi T, Sato C, Aso R, Oku moto 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, Suzuk i A, Motohashi H, and Yama moto 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