

令和元年6月5日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08983

研究課題名(和文) 自己骨髄細胞と肝幹細胞増殖因子による肝再生療法の基礎研究

研究課題名(英文) Basic study of liver regenerative therapy by autologous bone marrow cells and growth factors of hepatic stem cells

研究代表者

齋藤 貴史 (Saito, Takafumi)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：80250918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラット骨髄細胞で発現される肝幹細胞増殖因子として、fibroblast growth factor 2 (FGF2) と epiregulin の重要性が示されている。本研究において、epiregulin はマウス肝障害モデルで肝前駆細胞で構成された偽胆管周囲の stem-cell niche から発現して、肝前駆細胞の分化や増殖に関与する可能性が示された。また、肝疾患症例の血清 epiregulin 値を ELISA 法で測定した結果、劇症肝炎を含む急性肝不全例で上昇を示し、肝前駆細胞が係わる肝再生への関与が示唆された。骨髄細胞が本因子を介して重症肝障害時の肝組織修復の役割の一端を担っている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓の再生治療法として、肝臓移植の他に自己骨髄細胞を用いた細胞療法の有効性が示されている。骨髄細胞からは肝臓組織内で肝幹細胞を肝細胞へと分化・増殖させる因子が産生されており、これらの詳細を明らかにすることで、骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の発展に寄与することができる。骨髄細胞による障害肝の再生機序の一端として、骨髄細胞が産生する液性因子の epiregulin が肝前駆細胞の分化や増殖を促している可能性が示唆された。今後の肝再生治療の発展に益する知見である。

研究成果の概要(英文)：It has been shown that fibroblast growth factor 2 (FGF2) and epiregulin are important as the hepatic stem-cell growth factors produced in rat bone marrow cells. This study showed that epiregulin is detected in the stem-cell niche which includes liver progenitor cells around pseudo-bile ducts, and that it helps both differentiation and proliferation of liver progenitor cells into liver cells in the mouse liver injury model. The serum epiregulin level measured by enzyme-linked immunosorbent assay in patients with various liver diseases showed a high level in cases of acute liver failure including fulminant hepatitis, which suggests that it helps liver regeneration associated with liver progenitor cells. These results suggest that bone marrow cells play a role in part in liver regeneration in severe liver injury through epiregulin.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝再生 骨髄細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨髄細胞と肝幹細胞の両者には液性因子を介する相互作用があるとの仮説を立て、骨髄細胞と肝幹細胞の *in vitro* 共培養法を考案し共培養を行ったところ、骨髄細胞と肝幹細胞の各々において、共培養時に発現が亢進する遺伝子群が DNA マイクロアレーにより同定された。肝幹細胞の刺激により、骨髄細胞側では、表 1 に示した 9 種類の増殖因子 (FGF2, epiregulin, calcylin, heparin-binding EGF-like growth factor, VEGF, G-CSF, osteopontin, GM-CSF, platelet-derived growth factor-alpha) の遺伝子発現の亢進が確認された (文献)。これらの遺伝子でコードされる 9 因子はいずれも、肝幹細胞により刺激を受け骨髄細胞が産生する重要な様々な既知の増殖因子であり、肝幹細胞に作用し肝再生を促すものと考えられる。最も遺伝子発現が亢進していた増殖因子は fibroblast growth factor (FGF)2 であったが、先行研究により FGF2 は肝幹細胞より肝様細胞へと分化を誘導する液性因子であることが明らかにされており、FGF2 と同程度に遺伝子発現の亢進が見られた epiregulin の肝再生における役割に着目し検討を行った。

2. 研究の目的

肝不全に対する肝再生療法として、自己骨髄細胞投与療法の臨床的有用性が示唆されているが、その有効性を高めるためには治療法に改善の余地が大きい。自己骨髄細胞投与時の肝臓内では、骨髄細胞より産生される種々のサイトカインが、肝幹細胞の分化や増殖に関与すると考えられるが、それらのサイトカインについては不明な点が多い。先行研究より FGF2 が肝幹細胞の分化や増殖に関与していることが示されているが、本研究では新規の液性因子として epiregulin に着目した。本研究の目的は、肝幹細胞の分化・増殖に関与する新たな骨髄細胞由来増殖因子を同定し、その因子の肝再生における役割の一端を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) *In vivo* モデルを用いた検討

0.1%3,5-dietoxy-1,4-dihydrocollidine (DDC) を含む飼料を C57BL/6 マウスに与えて肝前駆細胞を誘導する肝障害モデルを作成した。DDC 食餌 5 週後の肝における epiregulin の発現様式を免疫組織学的に検討した。

(2) *In vitro* における epiregulin の肝幹細胞増殖に与える影響の検討

recombinant epiregulin を種々の濃度 (0、1、10、50、100ng/ml) の培地を用いて、添加培養時の EpCAM 陽性肝前駆細胞株の増殖能を WST-1 アッセイを用いて検討した。

(3) 各種肝疾患における血清 epiregulin 値の検討

劇症肝炎を含む急性肝不全 14 例、急性肝炎 24 例、慢性肝炎 24 例、肝硬変 24 例、健常者 24 例について、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて、血清 epiregulin 濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) DDC 障害肝において、epiregulin は門脈域の肝前駆細胞から構成される偽胆管周囲の間葉系細胞に発現を認めた。DDC マウスにおける血清 epiregulin も DDC 食開始後に徐々に増加傾向を示した。

(2) *In vitro* において、培養液への recombinant epiregulin の投与により、濃度依存性に EpCAM 陽性肝前駆細胞株の増殖能を促進した。

(3) 各種肝疾患患者における血清 epiregulin 値は、劇症肝炎を含む急性肝不全例において、その他の肝疾患患者および健常者コントロールに比較し有意に高値であった (図 1)。

epiregulin は、DDC 肝障害モデルの障害肝組織で、その局在より肝前駆細胞の分化や増殖を促していることが示唆された。さらに、血清中の epiregulin が、上述の DDC 肝障害モデルのみならず、急性肝不全例で上昇していることを考慮すると、epiregulin は肝前駆細胞の出現を伴うような高度な肝障害時において、肝再生に関与する重要な液性因子として骨髄細胞より産生されている可能性がある。この特性は同時に、epiregulin が肝再生の有用なバイオマーカーとなる可能性を示唆しており、今後さらに検討する価値があるものと思われる。以上より、epiregulin は肝前駆細胞より肝再生が惹起されるような高度な肝障害においては、重要な肝再生を促す液性因子となり得ることが示唆された (図 2)。

< 引用文献 >

Haga H, Saito T, Okumoto K, Ugajin S, Sato C, Ishii R, Nishise Y, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S: Enhanced expression of fibroblast growth factor 2 in bone marrow cells and its potential role in the differentiation of hepatic epithelial stem-like cells into hepatocyte lineage. *Cell Tissue Res* 2011; 343: 371-378

表1 骨髄細胞で遺伝子発現が亢進した液性因子群

Function	Accession no.	Gene name (abbreviation/ alternative name)	Ratio
Growth factor	BF284027	Fibroblast growth factor 2 (FGF2)	7.46
	NM_021689	Epiregulin	6.96
	NM_012827	Bone morphogenetic protein 4	5.28
	AF140232	S100 calcium-binding protein A6 (calcylin)	4.92
	NM_012945	Heparin-binding EGF-like growth factor	3.25
	AI175732	Vascular endothelial growth factor	2.83
	NM_017104	Colony-stimulating factor 3 (G-CSF)	2.64
	AB001382	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	2.30
	U00620	Colony stimulating factor 2 (GM-CSF)	2.30
	BE100812	Platelet-derived growth factor-alpha	2.00

(引用文献①)

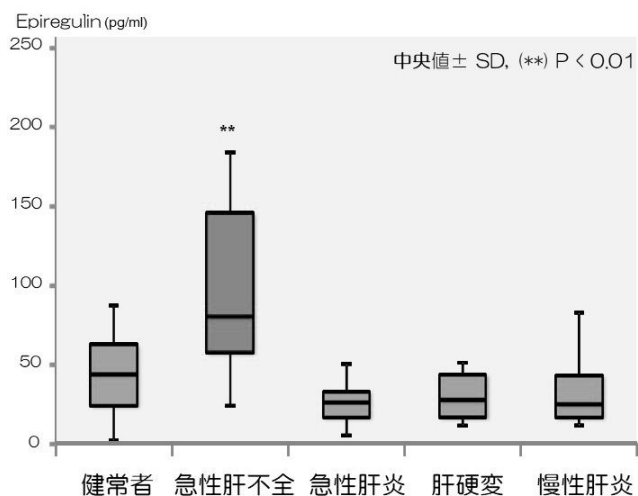


図1 各種肝疾患における血清epireglin値の比較

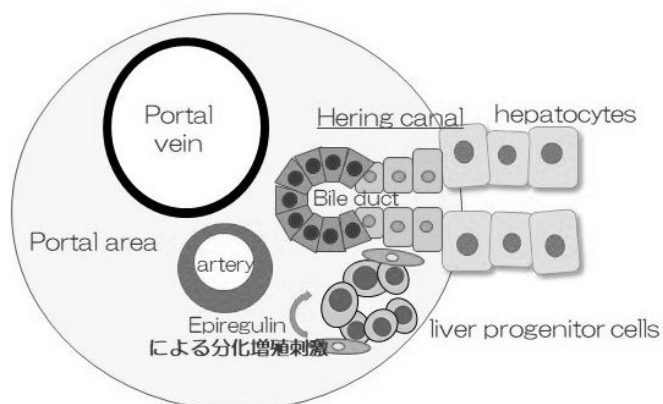


図2 Epireglinの肝組織内発現と肝前駆細胞への役割

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Saito T, Sugimoto M, Okumoto K, Haga H, Katsumi T, Mizuno K, Nishina T, Sato S, Igarashi K, Maki H, Tomita M, Ueno Y, Soga T: Serum metabolome profiles characterized by patients with hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and C. World J Gastroenterol 2016; 22: 6224-6234 査読有

(ア)DOI:10.3748/wjg.v22.i27.6224

Katsumi T, Ninomiya M, Nishina T, Mizuno K, Tomita K, Haga H, Okumoto K, Saito T, Shimosegawa T, Ueno Y: MiR-139-5p is associated with inflammatory regulation through c-FOS suppression, and contributes to the progression of primary biliary cirrhosis. Lab Invest 2016; 96: 1165-1177 査読有 DOI:10.1038/labinvest.2016.95

Makino N, Shirahata N, Honda T, Ando Y, Matsuda A, Ikeda Y, Ito M, Nishise Y, Saito T, Ueno Y, Kawata: Pancreatic hyperechogenicity associated with hypoadiponectinemia and insulin resistance: A Japanese population study. World J Hepatol 2016; 8: 1452-1458 査読有 DOI:10.4254/wjh.v8.i33.1452

〔学会発表〕(計5件)

芳賀 弘明, 齋藤 貴史, 仁科 武人, 水野 恵, 富田 恭子, 奥本 和夫, 上野 義之: C型肝炎患者でのDAA治療成功例における肝線維化改善例および悪化例のメタボローム解析. 第22回日本肝臓学会大会, 2018年

水野 恵, 奥本 和夫, 仁科 武人, 富田 恭子, 芳賀 弘明, 齋藤 貴史, 上野 義之: 肝硬変の成因別実態 当科における肝硬変の成因別実態と合併症の特徴. 第54回日本肝臓学会総会, 2018年

Nishina T, Wakao S, Haga H, Okumoto K, Katsumi T, Mizuno K, Saito T, Dezawa M, Ueno Y: Allogenic transplantation of MUSE cell ameliorates liver regeneration in large animal models of chronic liver injury. American Association for the Study of Liver Diseases. 2017年

奥本 和夫, 仁科 武人, 水野 恵, 勝見 智大, 芳賀 弘明, 齋藤 貴史, 上野 義之: トルバプタンの効果に影響を与える因子と生存予後についての検討. 第21回日本肝臓学会大会, 2017年

Saito T, Nishina T, Mizuno K, Katsumi T, Haga H, Okumoto K, Ueno Y: A case of intraductal papillary neoplasm of the bile duct associated with autoimmune hepatitis. Asian Pacific association for the study of the liver. 2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし。

(2)研究協力者

なし。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。