

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09030

研究課題名(和文) 自己組織化ペプチドハイドロゲルを用いた効率的な肝再生細胞療法開発のための基盤研究

研究課題名(英文) Fundamental research for the development of an efficient hepatic regenerative cell therapy using self-assembling peptide hydrogel

研究代表者

中村 徹 (Nakamura, Toru)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：30341332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は自己組織化ペプチドハイドロゲル(PuraMatrix)を用いた肝再生治療の臨床応用を目指した基礎的研究である。組織工学に必要な足場材料として3次元的環境を初めて可能にしたPuraMatrixにヒトiPS細胞より分化誘導させた肝細胞あるいは血管内皮細胞を混和させ、肝硬変モデルマウスの肝臓に脾臓を経由して投与し治療効果を検証した。PuraMatrixにiPS細胞より分化誘導させた肝細胞あるいは血管内皮細胞を混和させたものを移植した群において対照群と比較し、アザン染色及びSMA染色による肝線維化の程度は有意に改善し肝再生は促進していた。

研究成果の概要(英文)：This study is a fundamental study aiming at the clinical application of liver regeneration therapy using self-assembling peptide hydrogel (PuraMatrix). We investigated whether transplantation of PuraMatrix, which enabled for the first time a three-dimensional environment as a scaffolding material for tissue engineering, mixed with human iPS cells-derived hepatocytes (iHep), endothelial cells (iEC), and equal volumes of iHep and iEC could reduce established liver fibrosis and up-regulate hepatic regeneration in liver cirrhotic model mice. Reduction of liver fibrosis by transplantation of iHep, iEC, and equal volumes of iHep and iEC with and without peptide hydrogel was demonstrated by Mallory's Azan histologic staining and by immunohistochemical analysis for alpha-SMA in CCl4-treated livers.

研究分野：肝再生

キーワード：ペプチドハイドロゲル iPS細胞 肝硬変 肝再生 細胞療法

1. 研究開始当初の背景

肝線維症は、細胞外マトリクス (ECM) が肝臓に異常沈着した状態をいい、肝線維症が進行すると肝硬変症となる。現在日本には約 30 万人の肝硬変患者がいると推定されているが、その成因は肝炎ウイルスに起因するものが多く、約 70% が C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染で約 20% が B 型肝炎ウイルス感染によるものである。日本のウイルス性肝炎の多くを占める HCV 感染による肝硬変症例では高率に肝細胞癌が発症することが分かっており、肝硬変症は肝細胞癌の発生母地となるだけでなく肝予備能の低下から手術や化学療法を十分に行うことができない場合がある。進行した肝硬変に対する根治治療は肝移植しかないのが現状であるがその肝移植は絶対的なドナー不足であり、外科的侵襲など克服しなければならない課題は数多くある。

近年、骨髄あるいは末梢血幹細胞を用いた再生医療の報告が相次いでいるなか、さらに ES 細胞や iPS 細胞といった次世代を担う細胞材料を用いた基礎的データも散見される。ES 細胞は免疫の問題が絡むが、自己の幹細胞 (iPS 細胞、CD34 陽性細胞など) を用いる場合は免疫拒絶の問題は回避できる利点がある。

申請者らは CD34 陽性細胞移植による肝硬変症に対する有効性を基礎・臨床レベルで明らかにしたが、臨床応用まで至ったことにより新たな問題点が浮上してきた。その問題点とは、移植細胞数をいかに確保するか、生着率をいかに向上させるか (効率よく行えるか)、移植細胞に何をを用いるべきか (単一の細胞あるいは混合させた細胞) である。細胞数の解決策は効率よく培養・増幅させることであるが、この点に関しては無血清培地を用いた効率的な培養法の確立に成功したため、次のステップとして生着率の向上を考えた。近年細胞外 ECM を保持したまま培養した細

胞をシート状に回収できる細胞シート (例: 温度応答性ポリマー培養基材) を用いた再生医療研究が進められている背景がある。組織工学に必要な足場材料は β -リン酸三カルシウムの生体親和性の高い多孔質セラミックス、ポリ乳酸などの合成ポリマーあるいは天然 ECM の精製物などが用いられてきたが、化学合成品の持つ安全性と 3 次元的環境を提供する ECM の両者の特徴を合わせもつ足場材料はこれまで実用化されていなかった。1993 年 MIT で開発された自己組織化ペプチド (PuraMatrix) は生体内に存在するアミノ酸のみから構成されており、生理的条件化で直径 10nm 程の繊維を形成しハイドロゲルとなる。これまでに PuraMatrix を用いて様々な細胞において生着、増殖が確認され、さらに生体内へ細胞なしあるいは細胞とともに注入することにより、骨や脳神経などの損傷部位の再生促進作用を示した報告がなされた。肝硬変症に PuraMatrix を応用した報告はないが、肝硬変症に対する細胞治療でも細胞の生着率の向上に十分寄与することが予想される。肝硬変症に対する細胞治療に用いる細胞に関しては、骨髄単核球細胞、間葉系細胞、末梢血幹細胞など基礎・臨床の多方面から様々な報告がなされ、どの細胞を用いることが最も再生効率が良いのかまでの結論は出ていない。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでに幹細胞治療による肝再生療法に関する基礎的・臨床的研究成果を数多く報告してきた。近年細胞シートを用いた再生医療研究が進められているが細胞療法において標的組織への生着率は大きな課題のひとつである。申請者らは組織工学に必要な足場材料として 3 次元的環境を初めて可能にした PuraMatrix を用いた肝再生治療の臨床応用を目指している。本研究の目的は PuraMatrix を細胞療法に併用し、肝硬

変患者へと展開するための基礎的研究基盤の確立である。

3. 研究の方法

PuraMatrix 溶液の至適濃度と投与量の決定とその安全性評価：

- 1) 肝組織内に注入する PuraMatrix 濃度 (0.25 ~ 2.5%) と投与量 (0.2 ~ 1.0ml) を振り分け、生体への安全性と有効性を検討する。注入する肝組織については、まずは正常肝を対象とし、生体への安全性も評価する。対照溶液として生食水を投与した。
- 2) 動物実験モデルは、Wistar ラット正常肝に対し PuraMatrix 溶液を 7 葉ある肝臓に対し最大の 1 葉に注入する。PuraMatrix 単独投与 (細胞なし) の肝硬変症動物モデル肝への注入、有効性評価：
 - 1) で決定した投与濃度、投与量に従い、硬変肝へ PuraMatrix を単独投与し、治療効果を検討する。
 - 2) 動物実験モデルは、四塩化炭素誘発肝硬変モデルラットを作成する (四塩化炭素を週 2 回 6 週間投与)。その後、硬変肝へ PuraMatrix を直接注入する。四塩化炭素はその後も投与し続け、投与開始 10 週目に屠殺する。
 - 3) 治療効果判定は、Azan 染色による線維化面積の定量評価、細胞投与後の肝組織での mRNA 発現 (Col1a1, Acta2, Timp1)、免疫組織学的染色 (Collagen-1, alpha-SMA, PCNA)、血液生化学データを比較検討した。対照溶液として生食水を投与した。
PuraMatrix にヒト iPS 細胞より分化誘導させた肝細胞 (iHep)、血管内皮細胞 (iEC)、あるいは両者を同数で混和したもの (iMix) を免疫不全肝硬変症動物モデル肝へ注入、有効性評価：

- 1) 硬変肝に対し、PuraMatrix に iHep、iEC、iMix を混和させて投与し、治療効果を検討する。
- 2) 動物実験モデルは、四塩化炭素誘発免疫不全肝硬変マウスを作成する (四塩化炭素を週 2 回 4 週間投与)。その後、細胞を混和させた PuraMatrix を硬変肝に脾臓を経由して注入する。四塩化炭素はその後も投与し続け、投与開始 8 週目に屠殺する。
- 3) 治療効果判定は、Azan 染色による線維化面積の定量評価、細胞投与後の肝組織での mRNA 発現 (Col1a1, Acta2, Timp1)、免疫組織学的染色 (Collagen-1, alpha-SMA, PCNA)、血液生化学データを比較検討した。対照群として生理食塩水あるいは PuraMatrix を投与した。

4. 研究成果

正常肝に対し PuraMatrix を注入したところ、PuraMatrix 濃度が濃い場合、血管内への誤流入が高率に発生し、肺塞栓等を引き起こし死亡させてしまうことが分かった。安全性を考慮した場合の投与濃度は 1.0% 以下と判断した。投与量については、一葉あたり 0.2ml 程度が限界と判明し、0.5ml 以上投与した場合は、前述同様、血管内への誤流入が高率に発生し、肺塞栓等を引き起こし死亡させてしまうことが分かった。以上より、投与濃度 0.25%、投与量 0.2ml と決定し、in vivo 実験に進んだ。

Azan 染色による線維化面積の定量評価を行ったところ、PuraMatrix 投与群において対照群と比較し、肝線維化の程度は増悪していた。抗 I 型コラーゲン抗体に対する免疫染色においても、同様の結果であった。念のため実験予定ではなかった正常肝に対しても同様の動物実験

を行ったが、PuraMatrix 注入箇所を中心に過剰の線維沈着を認めた。以上より PuraMatrix 単独投与での治療効果は乏しいと判断した。

Azan 染色による線維化面積の定量評価を行ったところ、対照群と比較し、iHep、iEC 単一投与群および iMix 投与群いずれの群でも肝線維化の程度は改善した。iHep あるいは iEC 単一投与群と iMix 投与群間での有意差はなく、上乘せ効果は認められなかった。mRNA 発現レベルにおいても対照群と比較し、iHep、iEC 単一投与群および iMix 投与群いずれの群でも Col1a1, Acta2, Timp1 発現量は有意に低く、免疫染色においても同様の結果だった。抗 PCNA 抗体に対する免疫染色において対照群と比較し、iHep、iEC 単一投与群および iMix 投与群いずれの群でも PCNA 陽性肝細胞数は増加しており、肝再生促進効果を確認できた。iHep あるいは EC 単一投与群と iMix 投与群間での有意差は認められなかった。血液生化学データにおいて対照群と比較し、iHep、iEC 単一投与群および iMix 投与群いずれの群でも AST, ALT 値は有意に低く、肝障害程度は改善していた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nakamura T, Koga H, Iwamoto H, Tsutsumi V, Imamura Y, Naitou M, Masuda A, Ikezono Y, Abe M, Wada F, Sakaue T, Ueno T, Ii M, Alev C, Kawamoto A, Asahara T, Torimura T. Ex vivo expansion of circulating CD34(+) cells enhances the regenerative effect on rat liver

cirrhosis. Mol Ther Methods Clin Dev. 査読有, 2016 27; 3: 16025. doi: 10.1038/mtm.2016.25.

〔学会発表〕(計 7 件)

中村徹, 古賀浩徳, 増田篤高, 岩本英希, 池園友, 和田史孝, 阪上尊彦, 上野隆登, 鳥村拓司, 培養 CD34+細胞を用いた肝硬変に対する肝再生治療, 第 102 回日本消化器病学会総会, 2016 年, 東京。
中村徹, 古賀浩徳, 増田篤高, 岩本英希, 池園友, 和田史孝, 阪上尊彦, 上野隆登, 鳥村拓司, 培養 CD34+細胞を用いた細胞移植療法による肝線維化改善促進の機序解明, 第 52 回日本肝臓学会総会, 2016 年, 幕張。

中村徹, 古賀浩徳, 増田篤高, 岩本英希, 池園友, 和田史孝, 阪上尊彦, 田中俊光, 上野隆登, 鳥村拓司, 培養 CD34+細胞を用いた免疫不全ラット肝硬変モデルに対する細胞療法の肝線維化改善促進の機序解明, 第 48 回日本臨床分子形態学会総会, 2016 年, 熊本。

Nakamura T, Koga H, Iwamoto H, Masuda A, Ikezono Y, Wada F, Sakaue T, Tanaka T, Abe M, Ueno T, Torimura T. Long term outcome of autologous G-CSF mobilized PB-CD34+ cell therapy in patients with decompensated liver cirrhosis. 67th AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASE, 2016, Boston.

中村徹, 古賀浩徳, 増田篤高, 岩本英希, 和田史孝, 安倍満彦, 鳥村拓司, 肝硬変に対する末梢血 CD34 陽性細胞を用いた新たな治療法の開発, 第 24 回肝細胞研究会, 2017 年, 旭川。

中村徹, 古賀浩徳, 鳥村拓司, 自家末梢血 CD34 陽性細胞を用いた肝再生治療

開発の臨床研究、第 25 回日本消化器関連学会週間、2017 年、福岡。

Toru Nakamura, CD34+ Cell Therapy for Liver Cirrhosis, 7th World Centenarian Initiative Clinical Application of CD34-Positive Cells for Cardiac, Cerebral, Vascular, Bone and Liver Regeneration. 2017, Tokyo.

〔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〕

特記なし。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 徹 (Nakamura Toru)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号 : 30341332

(2)研究分担者

古賀 浩徳 (Koga Hironori)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号 : 90268855

(3)研究分担者

池園 友 (Ikezono Yu)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号 : 10461419

(4)増田 篤高 (Masuda Atsutaka)

久留米大学・医学部・助教
研究者番号 : 40647872