

令和 4 年 6 月 12 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08407

研究課題名(和文) NASHに対するCD34陽性細胞製剤による高効率な肝再生促進と発癌抑制療法の開発

研究課題名(英文) Development of highly efficient hepatic regeneration and inhibition of carcinogenesis for NASH using CD34-positive cell therapy

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はNASHモデルマウスに対しCD34陽性細胞を用いた細胞移植療法を検討した基礎的研究である。NASH肝硬変モデルマウスにおいて移植したCD34陽性細胞は肝内に生着し、移植細胞数依存性に肝線維化の抑制のみならず、肝再生の促進、抗アポトーシス作用を認めた。その機序として炎症微小環境としたIFN- γ を介してCXCL10を抑制することで、Tリンパ球やマクロファージ、NK細胞の肝臓への遊走を阻害していることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝硬変の動向として、食生活の欧米化に伴い非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)に伴う肝硬変が増加すると考えられている。本研究はNASHを誘導するモデルマウスを作製し、NASHモデルマウスに対しCD34陽性細胞を細胞移植し、現在進行中の臨床研究「C型肝硬変に対する肝再生医療」をNASH肝硬変患者にも適応拡大可能の可否について検討した。NASH肝硬変患者に対し、本邦においては間葉系幹細胞を用いた基礎及び臨床研究の報告が散見されるものの、CD34陽性細胞を用いた肝再生医療研究の報告は国内外に無く、学術的・社会的意義は極めて高いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether transplantation of CD34-positive cells reduce liver fibrosis and promote hepatic regeneration in NASH model mice. We demonstrated that engrafted CD34-positive cells suppress liver injury and liver fibrogenesis, promote hepatocyte proliferation and show anti-apoptotic effects in a dose-dependent manner. The mechanism was thought to be that CD34-positive cells inhibit the migration of T lymphocytes, macrophages, and NK cells to the liver by suppressing CXCL10 via IFN- γ , which is the inflammatory microenvironment.

研究分野：肝硬変

キーワード：NASH 肝硬変 CD34陽性細胞 細胞療法 肝線維症 肝再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在日本には約 40 万人の肝硬変患者がいると推定されているが、その原因として C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染が大多数を占める。HCV に起因する肝硬変を由来とする肝細胞癌は国内での癌死因の第 4 位に位置する。2014 年 9 月以降直接作用型抗ウイルス剤 (DAA 製剤) の発売以降、C 型肝炎は制御可能となった一方で、生活習慣の欧米化に伴い、肥満や糖尿病などの生活習慣に由来する非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)、中でも進行性線維化病態を示す非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に伴う肝硬変の症例は今後増加することが予想されている。肝硬変にまで至った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、肝硬変は肝細胞癌の発生源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。さらに進行した非代償性肝硬変に対し確立された根本的治療法は肝移植のみであるが、ドナー不足や耐術能の問題からその適応は一部の症例に留まり、克服しなければならない課題は多い。

近年、骨髄あるいは末梢血幹細胞、間葉系幹細胞 (MSC) を用いた再生医療研究が臨床応用にまで進められた報告が相次いでいるなか、肝硬変に対する再生治療について、本邦においては骨髄細胞あるいは MSC を用いた、抗線維化等を介した肝細胞機能の改善に寄与する幹細胞群または培養にて分化誘導した非実質細胞群の細胞移植によるアプローチがすでに臨床応用され、臨床試験が進められている。

1997 年、骨髄に由来する血管内皮前駆細胞が浅原らにより末梢血中の単核球成分の一部に存在することが報告され、さらに CD34 陽性細胞分画に豊富に存在することが証明されたが、この細胞の最大の特徴は炎症、虚血、障害部位に特異的に取り込まれ、血管形成に寄与することである。その結果、循環器領域においては慢性閉塞性動脈硬化症あるいは心筋梗塞等の虚血性疾患を対象に CD34 陽性細胞を用いた臨床試験が全世界でなされ、多くの研究者により安全性と有効性が報告された。日本においては現在、重症下肢虚血患者、難治性骨折 (偽関節) 患者を対象とした臨床試験が進行中である。

申請者はこれまでに肝硬変に対する末梢血 CD34 陽性細胞を用いた肝再生治療に関する基礎的・臨床的研究を詳細に行ってきた。その治療効果とメカニズムは、肝内の血管形成の促進と移植細胞より産生される多彩な増殖因子 (肝再生促進因子) の周囲組織への供給により肝線維化の抑制と肝再生の促進、予後の改善を認めることを明らかにし、この基礎研究をもとに非代償性肝硬変患者を対象とした臨床試験にまで発展させ、2014 年にその論文を掲載、現在 AMED からの支援を受け、HCV に起因する肝硬変患者を対象とした多施設共同非盲検無作為化比較試験が進行中である。

上述のように、ウイルス性肝炎患者が減少する一方で、NASH に起因する非 B 非 C 肝硬変症例が今後本邦でも増加することが予想されている。本邦において、脂肪肝が 1,500 万症例、その 10% 程度が NASH に進行し、さらに 10% 程度が肝硬変や肝細胞癌を発症すると想定されている。NASH 肝硬変はウイルス性肝硬変とは組織学的にも全く異なる病態で、脂肪肝から NASH へ進行する発症機序は未だ不明な点が多いなか、その重要な要因のひとつに酸化ストレスが挙げられる。CD34 陽性細胞は虚血等により生じた酸化ストレスが原因となる組織障害部位にも取り込まれることから、同障害部位で血管新生が促進され、組織内虚血は改善し、抗酸化作用を示すことが考えられる。申請者がこれまで蓄積してきた基礎・臨床データのみで直ちに CD34 陽性細胞を用いた肝硬変に対する肝再生治療の NASH 肝硬変患者への適応拡大には問題があると考え

られるため、本研究では CD34 陽性細胞移植治療の対象患者の拡大を検討する上でも大変重要な基盤的研究であると考えている。

2. 研究の目的

NASH 誘導モデルマウスに対しマウス CD34 陽性細胞を用いた細胞療法を検討し、現在進行中の臨床研究対象症例を NASH 肝硬変患者にも適応拡大可能か否かを検討する。

3. 研究の方法

- 1) 正常マウス骨髄より単核球分画を分離し、さらに磁気細胞分離装置を用いて CD34 陽性細胞を分離した。分離した CD34 陽性細胞は、各種成長因子 (VEGF, SCF, IL-6, Flt-3, TPO) を添加した StemSpan-SFEM 培地で 7 日間培養・増幅させ、移植細胞として用いた。
- 2) NASH 肝硬変モデルマウスは、治療効果判定用モデルとして、C57BL/6J 雄性マウス 6 週令にコリン欠乏メチオニン減量 60%脂肪食 (CDAHFD60) を給餌させ、12 週間 (軽度線維化モデル) あるいは 20 週間 (高度線維化モデル) の給餌にて作製した。②造腫瘍性試験用モデルとして、同様のマウスに CDAHFD60 を 40 週間給餌させ、前癌性病変を自然発症させた。なお、後述の遺伝子解析 (RNA-seq 解析) 時の比較対象のために、通常食 (NCD) を給餌したモデルも同時に作製した。
- 3) 各モデルで 1 回 (CD34s 群) あるいは 2 回 (CD34d 群) の培養 CD34 陽性細胞移植を行い、生食群 (Ctrl 群) と比較し、抗線維化、抗炎症効果を評価した。
- 4) 高度線維化モデルを用いて、NCD 群と Ctrl 群、CD34d 群とで RNA-seq 解析を行い、細胞移植効果の作用機序を解析した。
- 5) 造腫瘍性試験用モデルマウスにおいては細胞移植を計 6 回を行い、Ctrl 群と比較し、細胞移植群において十分な抗腫瘍性を有しているか、安全性試験を行った。

4. 研究成果

- 1) CDAHFD60 の給餌により、肝小葉内におけるシリウスレッド染色陽性域は 20 週までは増加したが、20 週と 40 週では有意差を認めなかった (0w, 0.37 ± 0.05 ; 12w, 4.22 ± 0.85 ; 20w, 8.69 ± 0.70 ; 40w, $8.58 \pm 0.48\%$)
- 2) 軽度線維化、高度線維化両モデルにおいて、Ctrl 群と比較し細胞移植群で量依存性に有意に線維化進展が阻止された。血液生化学検査では Ctrl 群と比較し、CD34d 群において ALT は有意に低下した (Ctrl vs CD34s vs CD34d : 252.6 ± 55.05 vs 230.8 ± 16.45 vs 178.2 ± 22.63 IU/L)。肝線維化評価では、シリウスレッド染色陽性域は Ctrl 群と比較して CD34d 群で有意に減少し (Ctrl vs CD34s vs CD34d : 8.69 ± 0.70 vs 8.06 ± 0.24 vs $6.72 \pm 0.47\%$)、肝線維化関連遺伝子 (*Col1a1*, *Timp1*) の発現低下を認めた。また SMA 陽性面積率は移植回数に依存して減少し、さらに CD34d 群では CD34s 群と比較しても有意に減少した。一方でオイルレッド O 染色では明らかな脂肪滴の減少を認めなかった。さらに、Ki67 に対する免疫組織化学染色による肝細胞増殖能を評価したところ、CD34d 群において有意な Ki67 陽性肝細胞数の増加を認めた。逆に、TUNEL 染色による肝細胞のアポトーシスを評価したところ、CD34d 群において有意な TUNEL 陽性肝細胞数の減少を認めた。
- 3) 抗線維化・抗炎症作用の機序解明のために、まず NCD 群と Ctrl 群を比較し、発現亢進した遺伝子群の中から、CD34d 群で有意に減少した遺伝子群を 123 個抽出した。それらを用いた gene ontology 解析では “defense response to virus” が最も変化し、

Ddx58(Rig-I)/Irf7/Stat1/Cxcl10 axis が抑制されていた。Irf7 は 1 型 IFN の転写因子として知られており、IFN- γ 、IFN- β 、さらに NASH に関わりの強い IFN- γ の肝組織中の蛋白濃度を ELISA 法で測定したところ、CD34d 群で IFN- γ が減少していた。また CXCL10 についても同様に測定したが、CD34d 群で発現低下を確認でき、免疫組織化学染色においても、CXCL10 陽性細胞数の減少を確認した。CXCL10 のレセプターである CXCR3 発現が報告されているヘルパー T 細胞、細胞障害性 T 細胞、マクロファージ、NK 細胞をそれぞれ抗 CD4、CD8、F4/80、NK1.1 抗体に対する免疫組織化学染色を行ったところ、CD34d 群でそれぞれが有意に減少していた。

- 4) 本細胞移植に対する安全性試験として、肝内に形成された腫瘍サイズと個数を計測したところ、培養 CD34 陽性細胞移植により総腫瘍数は減少傾向にあったが、腫瘍径が 8mm 以上の腫瘍個数は増加していた。割合にすると、培養 CD34 陽性細胞移植群において、腫瘍径が 3mm 未満の割合は減少し、8mm 以上の割合が増加していた。CD34 陽性細胞移植自体に造腫瘍性は持たないものの、腫瘍増殖促進作用を持つ可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中村徹
2. 発表標題 C型非代償性肝硬変症に対する自家末梢血CD34陽性細胞移植による肝再生治療
3. 学会等名 第6回 Tsukushi Case Symposium (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村徹、増田篤高、鳥村拓司
2. 発表標題 QOL改善を目指した自家末梢血CD34陽性細胞移植による肝硬変治療開発
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村徹、増田篤高、鳥村拓司
2. 発表標題 C型非代償性肝硬変症に対する自家末梢血CD34陽性細胞を用いた肝再生治療開発
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田篤高、中村徹、鳥村拓司
2. 発表標題 NASHモデルマウスにおける培養CD34陽性細胞移植療法の抗線維化作用の検討
3. 学会等名 第28回日本消化器関連学会週間 (JDDW)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村徹、増田篤高、鳥村拓司
2. 発表標題 C型非代償性肝硬変患者に対する自家末梢血CD34陽性細胞の経肝動脈投与による肝再生医療研究
3. 学会等名 第28回日本消化器関連学会週間 (JDDW)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田篤高、中村徹、鳥村拓司
2. 発表標題 NASHモデルマウスにおける培養CD34陽性細胞移植療法の抗線維化作用の検討
3. 学会等名 第34回肝類洞壁細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田篤高、中村徹、鳥村拓司
2. 発表標題 NASHモデルマウスに対する培養CD34陽性細胞移植の抗線維化作用
3. 学会等名 第52回日本臨床分子形態学会総会・学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村徹
2. 発表標題 肝硬変症に対するCD34陽性細胞移植による肝臓再生療法の確立を目指して
3. 学会等名 第52回日本臨床分子形態学会総会・学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村徹、増田篤高、鳥村拓司
2. 発表標題 CD34陽性細胞を用いた肝硬変症に対する細胞移植治療
3. 学会等名 第52回日本臨床分子形態学会総会・学術学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toru Nakamura, Hironori Koga, Atsutaka Masuda, Hideki Iwamoto, Hiroyuki Suzuki, Takahiko Sakaue, Toshimitsu Tanaka, and Takuji Torimura
2. 発表標題 CD34-positive cell transplantation improves liver fibrosis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis
3. 学会等名 70TH AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES (AASLD) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村徹、古賀浩徳、鳥村拓司
2. 発表標題 非代償性肝硬変に対する末梢血CD34陽性細胞移植による肝臓再生療法の現状
3. 学会等名 第43回 日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中村徹、増田篤高、鳥村拓司	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本メディカルセンター	5. 総ページ数 8
3. 書名 臨牀消化器内科 Clinical Gastroenterology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	増田 篤高 (MASUDA ATSUTAKA) (40647872)	久留米大学・医学部・助教 (37104)	
研究分担者	安倍 満彦 (ABE MITSUHIKO) (70624518)	久留米大学・医学部・助教 (37104)	
研究分担者	鈴木 浩之 (SUZUKI HIROYUKI) (70817832)	久留米大学・医学部・助教 (37104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関