

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790667

研究課題名(和文) 肝癌合併肝硬変を含む自己培養骨髄細胞投与による新規肝臓再生療法をめざした基礎研究

研究課題名(英文) Basic researches for developing new liver regeneration therapy using cultured autologous bone marrow derived cells in decompensated liver cirrhosis patients with hepatocellular carcinomas.

研究代表者

高見 太郎 (TAKAMI TARO)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60511251

研究成果の概要(和文)：

【背景と目的】自己骨髄細胞投与が肝発癌機構に与える影響を評価するため、マウス肝硬変発癌モデルで評価した。【方法】マウス肝硬変発癌モデルに同種同系マウス GFP 陽性骨髄細胞を尾静脈から頻回投与し、肝発癌動態を評価した。【結果】投与群では、前癌性病変および腫瘍の発生率および個数は低くサイズは同等で、肝 8-OHdG 量は低値であった。【結論】自己骨髄細胞投与は肝発癌に対して抑制的に作用することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Objectives: To evaluate the effects of autologous bone marrow cell infusion (ABMi) on the mechanisms of hepatocarcinogenesis, we performed frequent BMi in hepatocarcinogenic mice with liver cirrhosis. Methods: A mouse model of hepatocarcinogenesis with liver cirrhosis (DEN/GFP-CCl<sub>4</sub> model) was developed. In the BMi group, GFP-positive bone marrow cells from syngeneic mice were infused via the tail vein in DEN/GFP-CCl<sub>4</sub> model mice. Kinetics of hepatocarcinogenesis were histologically evaluated. Results: In the BMi group, foci and tumor showed significantly lower incidence and smaller number, while size was almost equal. Moreover, hepatic 8-OHdG levels were significantly lower. Conclusions: These results suggested that frequent ABMi might contribute the suppressed tumor-initiation and no tumor-promotion during stages of hepatocarcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度     | 0         | 0       | 0         |
| 年度     | 0         | 0       | 0         |
| 年度     | 0         | 0       | 0         |
| 総計     | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：肝臓学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：骨髄細胞、肝発癌、肝硬変症

## 1. 研究開始当初の背景

非代償性肝硬変症の根治療法は肝移植であるが、慢性的ドナー不足、手術侵襲や免疫拒絶などの諸問題は依然として解決されていない。これまでに肝再生修復療法の細胞源として骨髄由来幹細胞が注目され、G-CSF 誘導自己 CD34 陽性細胞による細胞療法、CD133 陽性単核球細胞の門脈内投与療法などの報告があるがその効果は限定的であり、効果的な肝修復再生療法の開発は急務である。一方、我々はこれまでに非代償性肝硬変患者に対する肝再生修復療法として、患者自身から自己骨髄液を 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 (ABMi 療法: Autologous bone marrow cell infusion therapy) を世界に先駆けて開発し、その臨床的有効性と安全性を証明報告してきた (*Terai S. et al. Stem Cells. 2006*)。この ABMi 療法では、骨髄細胞中のある特定の細胞分画が肝硬変症の過剰に蓄積した線維を溶解しその結果、微小環境の改善により肝機能が修復・改善すると考えられている (*Sakaida I. et al. Hepatology. 2004*)。しかし現在の ABMi 療法は、肝細胞癌を有する肝硬変症例にその適応はない。なぜなら骨髄細胞が肝発癌機構に与える影響が不明確なためである。しかし、C 型肝硬変は年率約 7%で発癌していくと報告されるなど ABMi 療法適応症である非代償性肝硬変症は高発癌状態であるため、自己骨髄細胞投与が肝発癌機構に与える影響を評価することは極めて重要である。

## 2. 研究の目的

「肝細胞癌合併肝硬変を含む肝不全患者を対象とする、局所麻酔下に採取した少量の骨髄液から分離培養した自己骨髄幹細胞を投与する新規肝臓再生療法の開発」のため、マウス肝硬変発癌モデルを新規に作成し、まず自己骨髄細胞 (非培養) 投与の肝発癌への影響を解析評価する。

## 3. 研究の方法

生後 2 週オスマウス腹腔内への *N*-nitrosodiethylamine (DEN) 単回投与と、DEN 投与後 1 ヶ月からの Carbon tetrachloride 週 2 回腹腔内反復投与により「マウス肝硬変発癌モデル (DEN/GFP-CCl<sub>4</sub>モデル)」を作成し、これをコントロール群 (n=17) とした。また、DEN/GFP-CCl<sub>4</sub>モデルマウスに DEN 投与後 2 ヶ月目から 2 週間毎に同種同系マウス GFP 陽性骨髄細胞を尾静脈投与し、これを投与群 (n=23) とした。DEN 投与後 4.5 ヶ月時点 (骨髄細胞は計 5 回投与) の肝発癌動態を、組織学的に foci および腫瘍 (腺腫+肝細胞癌) の発生率、個数とサイズにより評価し、生存率も併せて検討した。また肝線維化を Sirius-red 染色により評価し、酸化ストレスは肝 8-OHdG 量 (ELISA 法) により評価し、自己骨髄細胞投与の肝発癌に与えるメカニズムを解析した。

## 4. 研究成果

DEN 投与後 4.5 ヶ月において、foci 発生率

(コントロール群/投与群 ; 61.5/23.1%),  
p<0.001)、foci 個数(1.66/0.62(個/cm<sup>2</sup>),  
p<0.01)は投与群で有意に低く、foci サイズ  
(0.35/0.36(x0.1mm<sup>2</sup>), p=0.35)は同等であつた。  
さらに、腫瘍発生率(61.5/15.4, p=0.03)  
および腫瘍個数(2.22/0.17, p<0.001)も投与  
群で有意に低下しており、腫瘍サイズ  
(3.67/3.67, p=0.43)にも差を認めなかった。  
生存率はDEN 投与後 4.5 ヶ月までの観察期間  
で有意差こそ認めないものの、投与群で改善  
傾向を認めた(DEN 投与後 3.75 ヶ月; p=0.06)。  
また背景肝の線維化は投与群で有意に少な  
く(p=0.03)、肝 8-OHdG 量も投与群でコント  
ロール群に比べ 0.85 倍と有意に低値であつた  
(p=0.005)。このように頻回の自己骨髄細胞  
投与でも肝発癌は促進されることなく抑  
制され、また腫瘍増殖も促進されないことが  
確認された。以上より、自己骨髄細胞(非培  
養)投与により肝内 Re-dox 状態の持続的な  
安定化により肝発癌が抑制された可能性が  
示唆された。

## 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 6 件)

- ① Takami T, Sakaida I. Iron regulation by  
hepatocytes and free radicals. J Clin  
Biochem Nutr. 2011;48(2):103-106. 査読有  
り
- ② Takami T, Terai S, and Sakaida I. Novel  
findings for the development of drug  
therapy for various liver diseases:  
Current state and future prospects for our  
liver regeneration therapy using  
autologous bone marrow cells for  
decompensated liver cirrhosis patients. J

Pharmacol Sci. 2011;115(3):274-278. 査読  
有り

③ 高見 太郎, 寺井 崇二, 坂井田 功 「肝  
疾患の再生治療 (Annual Review 消化器  
2011)」 2011:223-228. 査読無

④ 高見 太郎, 寺井 崇二, 坂井田 功 「肝  
疾患における再生医療・細胞療法の展望  
(Annual Review 消化器 2010)」 2010:201-206.  
査読無

⑤ 高見 太郎, 寺井 崇二, 坂井田 功  
「細胞治療技術—肝硬変も治る時代へ  
(MedicalBio)」 2010;3:54-57. 査読無

⑥ 高見 太郎, 寺井 崇二, 坂井田 功 「肝  
硬変症は幹細胞再生医療で治せるか (分子消  
化器病)」 2009;6:359-364. 査読無

[学会発表] (計 14 件)

- ① Takami T, Terai S, Maeda M, Yamamoto N,  
and Sakaida I. Autologous bone marrow  
cell infusions suppress  
tumor-initiation and do not promote  
tumor-proliferation during  
*N*-nitrosodiethylamine-induced  
hepatocarcinogenesis. ;The Liver  
Meeting 2010, AASLD,  
2010/10/31:Boston, MA, USA.
- ② 高見 太郎, 寺井 崇二, 前田 雅喜,  
山本 直樹, 坂井田 功 「肝硬変発癌マ  
ウスモデルにおいて自己骨髄細胞投与は  
肝発癌を促進させない (JDDW 2010)」  
2010/10/14:神奈川県横浜市 パシフィ  
コ横浜
- ③ Takami T, Terai S, Maeda M, Yamamoto N,  
and Sakaida I. Autologous bone marrow  
cell infusions suppress tumor  
initiation during  
*N*-nitrosodiethylamine-induced  
hepatocarcinogenesis in carbon

- tetrachloride-treated liver. ; The 1st JSGE International Topic Conference, 2010/9/25:鎌倉 鎌倉パークホテル
- ④ 高見 太郎、寺井 崇二、前田 雅喜、山本 直樹、坂井田 功「肝硬変発癌マウスモデルにおいて自己骨髄細胞投与は肝発癌を促進させない(第69回日本癌学会学術総会)」2010/9/22:大阪府大阪市 大阪国際会議場
- ⑤ Takami T, Terai S, Maeda M, Yamamoto N, and Sakaida I. Autologous bone marrow cell infusions do not promote *N*-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in carbon tetrachloride-treated liver cirrhosis mice. ; The 15th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid, Inaugural Meeting for the International Society for Hepatic Sinusoidal Research, 2010/8/31: Pasadena, CA, USA.
- ⑥ 高見 太郎、寺井 崇二、前田 雅喜、山本 直樹、坂井田 功「自己骨髄細胞投与は肝硬変発癌マウスモデルの肝発癌を促進させない(第17回肝細胞研究会)」2010/6/19:秋田県秋田市 秋田アトリオン
- ⑦ 高見 太郎、寺井 崇二、前田 雅喜、山本 直樹、坂井田 功「マウス肝硬変発癌モデルにおいて自己骨髄細胞投与は肝発癌を促進させない(第46回日本肝臓学会総会)」2010/5/27:山形県山形市 ホテルメトロポリタン山形
- ⑧ 高見 太郎、Sherief Musa、渡邊 尚子、谷本 治子、岩本 拓也、山本 直樹、寺井 崇二、坂井田 功「無血清培地によるマウス骨髄由来ディッシュ接着細胞 *ex vivo* 培養法(第9回再生医療学会総会)」2010/3/18:広島県広島市 広島国際会議場
- ⑨ 高見 太郎、寺井 崇二、坂井田 功「非代償性肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与による肝再生・修復療法の現状と展開(第83回日本薬理学会年会)」2010/3/16:大阪府大阪市 大阪国際会議場
- ⑩ 高見 太郎、寺井 崇二、坂井田 功「非代償性肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法の現状と今後の展開(第38回日本肝臓学会西部会)」2009/12/4:鳥取県米子市 米子コンベンションセンター BIG SHIP
- ⑪ Takami T, Terai S, and Sakaida I. 「Development of systems for culturing murine bone marrow-derived cells using the high-density method and isolating senescent bone marrow cells. ; Gastro2009 meeting (UEGW/WCOG), 2009/11/24: London, England.
- ⑫ 高見太郎、大森 薫、谷本治子、土屋昌子、寺井崇二、山崎隆弘、坂井田功 「Sonazoid造影超音波検査が治療と評価に有用であった肝膿瘍の一例(日本超音波医学会第45回中国地方会)」2009/9/12:広島県広島市 広島県情報プラザ
- ⑬ 高見 太郎、寺井 崇二、坂井田 功 「High density法による骨髄由来細胞培養と予期的老化骨髄細胞分離法の開発(第16回肝細胞研究会)」2009/6/26:山形県山形市 山形テルサ
- ⑭ 高見 太郎 「Thermoreversible gelation polymer(TGP)を用いた骨髄細胞培養(第10回プロメテウスの会)」2009/4/18:石川県金沢市 金沢市文化ホール

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 1 件）

名称：肝細胞癌の新規腫瘍マーカーとしての  
機能を有する抗 HHM IgG 抗体、肝癌  
のスクリーニング法および肝癌進行  
度のマーカーとしての利用

発明者：寺井 崇二、高見 太郎、  
坂井田 功、沖田 極

権利者：国立大学法人 山口大学

種類：特許

番号：特許第 4465467 号

取得年月日：平成 22 年 3 月 5 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高見 太郎 (TAKAMI TARO)

山口大学・医学部付属病院・助教

研究者番号：60511251

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし