

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)一般

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22580371

研究課題名（和文） 自家骨髄移植によるイヌの肝再生医療の確立に関する研究

研究課題名（英文） Establishment of liver regenerative medicine by autologous transplantation in dog

研究代表者

久末 正晴 (HISASUE MASAHARU)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：80333144

研究成果の概要（和文）：

免疫不全マウス（NOG マウス）を用いて骨髄移植の評価を行った。NOG マウスに四塩化炭素を投与し急性肝障害モデルマウスを作製し、蛍光色素標識（PKH26GL）した犬の骨髄細胞を投与し移植細胞の分布と肝機能の回復具体を評価した。その結果、移植細胞は主に肝臓への集簇が認められ、非肝障害モデルではその傾向は認められなかった。

次に、治療効果を検討するために慢性肝障害（肝線維症モデル）の NOG マウスを作製し犬の骨髄細胞の移植を行った。しかしながら骨髄細胞投与群では非投与群に比べて線維化は進行し、その理由として異種間の移植による免疫拒絶反応(GVHD)が発生しているものと考えられた。

また、犬に対する骨髄細胞投与の影響を評価するため肝臓の部分切除を行った肝障害モデル動物犬にて自家骨髄移植を実施した。その結果、重篤な副作用等は認められず少なくとも急性障害はないものと考えられた。自然発生の重度の肝障害（肝線維症）の症例に対して骨髄移植を実施した。

研究成果の概要（英文）：

The effect of canine bone marrow transplant was evaluated in immune deficient mouse (NOG mice). The distribution and therapeutic effect were assessed using fluorescence staining (PKH26GL) in the acute liver injured mice induced by CCl4. Transplanted cells were accumulated in injured liver tissue, but it was not seen in normal liver tissue. Canine bone marrow cells were transplanted into chronic liver injured NOG mice to evaluate therapeutic effect.

Autologous bone marrow transplantation was performed to assess the influence of this therapy in the liver injured dog by surgical excision. Abnormal finding after transplantation was not confirmed, suggesting that server complication is occurred. After then bone marrow transplantation was applied into spontaneous cases with liver deficiency.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：臨床獣医学

科研費の分科・細目：再生医療

キーワード：移植、骨髄、犬肝臓、繊維症

1. 研究開始当初の背景

小動物臨床では、イヌの肝炎、肝線維症、胆管炎といった難治性の肝疾患が多く認められ、近年その発生数は急速に増加している。現在、これらの疾患に対して肝保護剤、利胆剤、線維化抑制剤の投与などが行われているが、いずれも肝再生を促すものではなく、病態が末期の状態では治療不応性である。したがって根治的な治療法の開発は重要性が高く、かつ緊急の課題である。

近年、骨髄中の幹細胞や間質細胞が血球以外にも、肝臓細胞をはじめ筋細胞、神経細胞、血管内皮細胞といった細胞に分化できることが明らかとなっており、骨髄由来細胞を用いて多様な臓器細胞の再生治療への応用が模索されている。現在、ヒトやラットの骨髄由来の細胞に肝細胞増殖因子(HGF)を添加し培養すると、肝細胞が分化することが報告されている。しかしながら、HGF 誘導による移植肝細胞の生着率は 0.03~5%程度と概して低く、さらに何らかの増殖因子を添加し肝細胞へ分化誘導した細胞は、必ず 100%純粋な肝細胞へ形質転換できているか個々の症例で解析した上で投与する必要がある。したがって、骨髄をはじめ脂肪組織や iPS 細胞から肝細胞への分化誘導を用いた移植治療は、依然として安全性に問題のある、膨大な手間とコストがかかる非現実的でハードルの高い治療技術とされている。

ところが近年、ヒトの肝硬変の臨床例において骨髄を肝細胞へ分化誘導することなく移植する「自己骨髄細胞投与療法:Autologous bone marrow infusion(ABMI)」が肝再生を促し肝機能の改善効果があるという画期的な報告がなされた。本邦では肝硬変の患者に ABMI 療法を実施したところ、49%の症例で肝機能の改善効果が認められた。しかしながら、治療の安全性、移植細胞の肝臓への生着率、他の臓器への浸潤の有無、治療効果などは詳細に検討されていない。特に、ABMI 療法の長期にわたる治療有効性や安全性および生着のモニタリングは、小型のマウスやラットモデルでは解析不可能であり、是非とも肝障害モデルおよび自然発生の肝障害のイヌにおける評価が必要である。

2. 研究の目的

(1) 肝細胞誘導に適切な前処置薬の検討

ABMI 療法の成否を決定する因子一つに、移植細胞集団中の「造血幹細胞の割合」が重要であるとされている。そこで、我々は健常実験動物において G-CSF や M-CSF をはじめ

とするサイトカイン製剤、HGF および様々な増殖因子を含む胎盤抽出物(プラセンタ)を投与し、造血幹細胞の割合を増やす最も効果的な前処置方法を確立する。

(2) 移植細胞の生着効率の評価

移植細胞がどの程度肝臓組織へ生着したのか、現在のところ明らかでない。我々は肝障害モデル動物で、移植細胞に蛍光色素標識し、MRI 検査による画像診断や免疫染色にて肝臓を含む全身臓器への分布状況と生着効率を評価する。

(3) ABMI 療法の治療効果の判定

肝障害モデル動物を作製して、ABMI 療法における生着効率の検討および治療効果の判定を行う。技術的なノウハウや安全性が確認できた上で臨床例に対する治験を開始する。

(4) ABMI 療法の作用機構の解明

ABMI 療法は、肝細胞の再生だけでなく、肝組織の線維化を抑制している事が予想され、その機序を解明するため、線維化のマーカーやそれに関連する因子について評価を行う。

3. 研究の方法

まず、健常実験犬を用いて ABMI 療法に適切な前処置薬の検討を行う。G-CSF、M-CSF をはじめとするいくつかのサイトカインや増殖因子を投与し、骨髄中における造血幹細胞や肝細胞の前駆細胞マーカーなどの発現量を表面抗原解析によって解析する。また、ABMI 療法の投与経路を決定するため、骨髄細胞を採取し蛍光標識した後に実験動物へ投与し、MRI 検査にて全身臓器における分布を経時的に評価する。さらに、肝障害モデル動物で、移植細胞に蛍光色素標識し、MRI 検査にて肝臓を含む全身臓器への分布状況と、肝細胞を特異的に認識する抗体(アルブミン、CYP450)との二重染色を行って生着効率を評価する。肝障害モデル動物および臨床例における治療効果の判定には、血清学的検査、画像診断、および肝臓生検による病理組織学的検査を行い、かつ肝線維化のマーカーや MMP9 などの発現解析を予定している。

4. 研究成果

(1) 肝細胞誘導に適切な前処置薬の検討

実験ビーグルに G-CSF 投与を投与し、骨髄中の CD34 および CD133 陽性細胞数を評価した。しかしながら、投与後に CD34 および CD133 陽性細胞数の軽度の増加は認められたもの

の有意な差は認められなかった。

(2) 移植細胞の生着効率の評価

骨髄細胞を蛍光標識後、肝障害モデルマウスに静脈経路にて移植した。肝臓組織には移植した細胞が生着し、障害組織中では平均5.0%認められた。

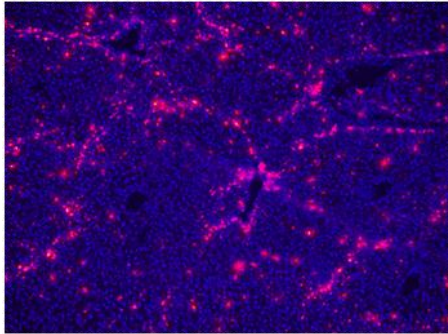


図1. NOG マウス肝に分布したイヌ骨髄細胞

(3) ABMI 療法の治療効果の判定

急性肝障害免疫不全マウスを作製し、蛍光標識を施したイヌ骨髄細胞を静脈内投与した。投与細胞は障害肝に分布する性質を持つてはいたものの、急性肝障害モデルでは明らかな治療効果は認められなかった。一方、CC14 長期投与による慢性肝障害モデルでは、骨髄全有核細胞を投与した個体の方が、むしろ肝線維化は著しく亢進した。また、2 例の慢性障害で治験を実施した。これまで、副作用は認められておらず、安全性の高い治療であることが示唆された。

(4) ABMI 療法の作用機構の解明

肝線維化免疫不全マウスに対してイヌ骨髄細胞を静脈内投与し、線維化に与える影響を組織学的手法で評価した。イヌ骨髄細胞を投与することで線維化は増強し、投与細胞中のリンパ球が関与していることが示唆された。

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1件)

Takashi Kato, Masaharu Hisasue, Kazuhito Segawa, Ayumi Fujimoto, Eri Makiishi, Sakurako Neo, Kyohei Yasuno, Ryosuke Kobayashi and Ryo Tsuchiya. Accumulation of xenotransplanted canine bone marrow cells in NOD/SCID/ γ_c^{null} mice with hepatitis induced by CCl₄. J. Vet. Med. Sci. 75(7), 2013, 845-855.

[学会発表] (計3件)

① 加藤崇、久末正晴、根尾櫻子、藤本あゆ

み、土屋亮、NOD/shi-scid, IL-2 γ null(NOG)マウスにおける肝障害モデル作製に関する研究、第152回日本獣医学会学術集会、2011、大阪

② 加藤崇、久末正晴、瀬川和仁、藤本あゆみ、根尾櫻子、小林亮介、土屋亮、NOGマウスを利用したイヌ骨髄細胞の障害肝へのHoming作用の解析、第154回日本獣医学会学術集会、2012、岩手

③ 加藤崇、久末正晴、瀬川和仁、藤本あゆみ、安野恭平、小林亮介、根尾櫻子、土屋亮、四塩化炭素急性肝障害NOGマウスに対するイヌ骨髄細胞投与の検討、第19回肝細胞研究会、2012、札幌

④ 加藤崇、久末正晴、瀬川和仁、藤本あゆみ、安野恭平、小林亮介、根尾櫻子、土屋亮、第12回日本再生医療学会総会、2013、横浜

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

Facebook 麻布大学 内科学第2研究室

<https://www.facebook.com/pages/%E9%BA%B%E5%B8%83%E5%A4%A7%E5%AD%A6-%E5%86%85%E7%A7%91%E5%AD%A6%E7%AC%AC2%E7%A0%94%E7%A9%B6%E5%AE%A4-Azabu-University-Laboratory-of-Internal-Medicine-2/337730806277747>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久末 正晴 (HISASUE MASAHARU)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号 : 80333144

(2) 研究分担者

荻原 喜久美 (OGIHARA KIKUMI)

麻布大学・生命・環境科学部・講師

研究者番号 : 50154381

根尾 櫻子 (NEO SAKURAKO)

麻布大学・獣医学部・助教

研究者番号 : 50532107

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :