

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24年5月1日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790647

研究課題名（和文） 骨髄幹細胞とマクロファージの相互作用を用いた次世代型肝修復療法の開発

研究課題名（英文） Development of the novel liver repair therapy with interaction between bone marrow stem cells and macrophages

研究代表者

石川 剛 (ISHIKAWA TSUYOSHI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20569305

研究成果の概要（和文）：肝硬変マウスに対する骨髄幹細胞移植において、肝内に誘導されたマクロファージの多くはレシピエント由来であり、その過程には stromal derived factor 1/CXCR4 シグナリングが密接に関与していることが示唆された。さらに、これらのマクロファージが matrix metalloproteinase 9 を発現することによって線維溶解が生じることが証明された。本研究より、骨髄幹細胞とマクロファージの相互作用によって MMP9 を介した線維化改善がもたらされる可能性が示され、次世代型新規肝修復療法になり得る。

研究成果の概要（英文）：Macrophages which are infiltrated into the liver after bone marrow stem cell transplantation to cirrhotic mice are mainly originated from recipients and stromal derived factor 1/CXCR4 signaling is closely related to the migration of macrophages from bone marrow to the liver. And also, matrix metalloproteinase 9 expressed by macrophages can reduce collagen fiber in the liver. We will develop the novel liver repair therapy to improve hepatic fibrosis with interaction between bone marrow stem cells and macrophages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

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：肝再生・肝線維化・骨髄細胞・マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

非代償性肝硬変症患者に対する我が国での唯一の根治療法は生体肝移植であるが、ドナー不足・高額な医療費・免疫拒絶などの問題から未だ普及に至らず、対症療法を余儀なくされる症例が大多数である。従ってこれに代わる新たな治療法として、幹細胞を用いた肝

臓再生療法の開発が急務である。その細胞療法ソースとして骨髄幹細胞・胚性幹細胞(ES細胞)・臍帯血幹細胞・肝幹細胞(oval cell)・人工多能性幹細胞(iPS細胞)などが挙げられるが、我々はその細胞源として骨髄幹細胞を選択し基礎研究を進めてきた。自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の早期実現を

目指して、まず我々は「骨髄細胞から肝細胞への分化・増殖評価モデル(GFP/CCl₄モデル)」を確立した。同モデルを用いた実験より、移能・線維化および生命予後が有意に改善すること (Sakaida I. *et al.* Hepatology 2004) を報告した。さらに新規モノクローナル抗体 Liv8 を用いた解析で骨髄中の Liv8 陰性分画群がより効率よく肝細胞に分化すること (Yamamoto N. *et al.* Biochem Biophys Res Commun. 2003)、microarray-SOM 法による解析で骨髄細胞から肝細胞への分化過程において特徴的な遺伝子発現の変動が認められること (Omori K. *et al.* FEBS Lett. 2004)、線維芽細胞増殖因子 2(FGF2) が骨髄細胞から肝細胞への分化過程を促進し、更に recombinant FGF2 併用骨髄移植が肝合成能及び生命予後を有意に改善すること (Ishikawa T. *et al.* Cell Tissue Res. 2006) を併せて報告した。これらの基礎研究結果を基盤として 2003 年 11 月より世界に先駆けて『非代償性肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法 (Autologous Bone Marrow Cell infusion (ABMi) therapy)』の Phase I 臨床研究を開始し、その後「Liver Regeneration with Cell transplantation (LRCT) study」・「Yamaguchi-Yonsei Project」として国内外の大学との多施設共同研究を推進しその有用性・安全性を明らかにしてきた (Terai S. *et al.* Stem Cells 2006, 肝再生骨髄細胞画分 特開 2007-89532 号)。

一方、研究代表者は米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health; NIH) 留学中に種々の conditional KO マウスを用いて肝幹細胞の活性化に関する検討を行い、また幹細胞由来肝再生過程における ECM 制御に注目して研究を進めた。肝内在性の Kupffer 細胞さらには stromal derived factor 1 (SDF1)/CXCR4 シグナリングを介して骨髄から肝臓へ誘導されたマクロファージが matrix metalloproteinase 9 (MMP9) を産生することで肝線維化を抑制し、幹細胞の活性化に重要な役割を果たしていることを証明した (アメリカ肝臓病学会 Liver meeting 2009 口演発表、Young investigator travel award 受賞、Hepatology 2012)。

ABMi 療法の現状での効果は「肝機能の改善・維持」が主たるものであるが、抗線維化という観点からの検討は未だ十分とはいえない。臨床の現場では高度の線維化を背景とした門脈圧亢進症状のコントロールに苦慮している症例が少なくなく、この病態を対象とした効率のよい画期的な治療法の確立が待たれる。

2. 研究の目的

非代償性肝硬変患者の様々な病態の中心は

植された骨髄由来細胞が肝芽細胞の表現型を経て肝細胞に分化し (Terai S. *et al.* J Biochem. 2003)、その過程において肝合成高度の肝線維化に起因する門脈圧亢進症状であり、今回の研究では我々独自の GFP/CCl₄ モデルを用いて新規抗線維化療法を開発すべく基礎実験を進める。

3. 研究の方法

【研究 1】骨髄由来炎症細胞浸潤と肝線維化の関連性を明確にし、その過程に関わるサイトカインを解明する。

- (1) GFP/CCl₄ モデルにおいて Kupffer 細胞およびマクロファージの肝内での動態を明らかにするために pan-macrophage marker である抗 F4/80 抗体を用いて免疫染色・ウェスタンブロットを行う。
- (2) 肝内に浸潤したマクロファージ (F4/80 陽性細胞) がレシピエント由来か、ドナー由来かを明確にするために GFP と F4/80 の蛍光二重染色を行う。
- (3) GFP/CCl₄ モデルの肝組織を用いて、SDF1 さらにはそのレセプターである CXCR4 に対する免疫染色・ウェスタンブロット解析を行う。
- (4) 抗 SDF1 抗体投与により SDF1/CXCR4 シグナリングをブロックし、肝内への炎症細胞浸潤 (特にマクロファージ) の動態を観察する。

【研究 2】肝組織および全骨髄細胞から F4/80 陽性分画を分離・抽出し、それらの培養・移植により線維化改善効果を証明する。

- (1) GFP/CCl₄ モデルの肝組織から、全 F4/80 陽性細胞群 (全マクロファージ + Kupffer 細胞)、F4/80 陽性 GFP 陰性細胞群 (レシピエントの骨髄由来マクロファージ + Kupffer 細胞)、F4/80 陽性 GFP 陽性細胞群 (ドナーの骨髄由来マクロファージ) をそれぞれ FACS で分離・抽出し、gelatin zymography でそれらのコラーゲン溶解活性 (MMP 活性) を解析する。
- (2) FACS で分離した F4/80 陽性細胞 (マクロファージ) と骨髄細胞を共培養し、マイクロアレイ・免疫染色・ウェスタンブロット・real-time PCR などで MMP をはじめとした線維溶解に関わる因子に関する解析を行う。
- (3) ドナーの骨髄由来マクロファージの効果を解析すべく、全骨髄細胞、F4/80 陽性骨髄細胞、F4/80 陰性骨髄細胞をそれぞれ慢性肝障害マウスに尾静脈から移植し、それらの肝組織を用いて肝線維化に関する詳細な検討を行う (シリウスレッド染色・免疫染色、in situ zymography、gelatin zymography、ウェスタンブロットなど)。

- (4) レシピエントの骨髄由来マクロファージの効果を解析すべく、レシピエント（慢性肝障害マウス）に GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) を投与することでマクロファージを誘導し、それらの肝組織を用いて肝線維化に関する詳細な検討を行う（シリウスレッド染色、免疫染色、in situ zymography、gelatin zymography、ウェスタンブロットなど）。

4. 研究成果

【研究 1】

- (1) pan-macrophage marker である F4/80 に対する免疫染色・ウェスタンブロットを行った結果、骨髄細胞投与群において肝内マクロファージが有意に増加し、またそれらが門脈周囲から中心静脈方向へ移動することが明らかになった。
- (2) 肝内に浸潤したマクロファージ (F4/80 陽性細胞) の起源を明確にするために GFP と F4/80 の蛍光二重染色を行った結果、一部に F4/80 と GFP の共陽性細胞が認められたが、その多くは F4/80 陽性 GFP 陰性細胞でありレシピエント由来であることが示された。
- (3) monocyte や T cell の科学刺激物質である SDF1 さらにはそのレセプターである CXCR4 に対する免疫染色・ウェスタンブロット解析を行った結果、骨髄細胞投与によりそれらの発現が有意に増強することが証明された。
- (4) 抗 SDF1 抗体投与により SDF1/CXCR4 シグナリングをブロックした結果、肝内への炎症細胞浸潤（特にマクロファージ）が有意に抑制されることが明らかとなった。

【研究 2】

- (1) GFP/CC1₄ モデルの肝組織から、①全 F4/80 陽性細胞群、②F4/80 陽性 GFP 陰性細胞群、③F4/80 陽性 GFP 陽性細胞群をそれぞれ FACS で分離・抽出し gelatin zymography を行った結果、すべてに MMP9 活性が認められた。
- (2) FACS で分離した F4/80 陽性細胞（マクロファージ）と骨髄細胞を共培養し、マイクロアレイ・免疫染色・ウェスタンブロット・real-time PCR などを行った結果、強い MMP9 発現が確認された。
- (3) ドナーの骨髄由来マクロファージの効果を解析すべく、①全骨髄細胞、②F4/80 陽性骨髄細胞、③F4/80 陰性骨髄細胞をそれぞれ慢性肝障害マウスに尾静脈から移植し、それらの肝組織を用いて肝線維化に関する詳細な検討を行った（シリウスレッド染色・免疫染色、in situ zymography、gelatin zymography、ウエ

スタンブロットなど）。結果、①と②ではほとんど差がなく、③に比して有意に肝線維化が抑制された。

- (4) レシピエントの骨髄由来マクロファージの効果を解析すべく、レシピエント（慢性肝障害マウス）に対して GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) を投与し、それらの肝組織を用いて肝線維化に関する詳細な検討を行った（シリウスレッド染色、免疫染色、in situ zymography、gelatin zymography、ウェスタンブロットなど）。GM-CSF 投与群と非投与群を比較すると前者において明らかに線維化が改善し、MMP9 発現および活性が有意に上昇した。

肝硬変マウスに対する骨髄幹細胞移植においてドナー由来のマクロファージが肝臓に浸潤するが、肝内に誘導されたマクロファージの多くはレシピエント由来であり、その過程には SDF1/CXCR4 シグナリングが密接に関与していることが示唆された。さらに、これらのマクロファージ（Kupffer 細胞を含む）が MMP9 などのゼラチン分解酵素を発現することによって線維溶解が生じることが証明された。本研究より、骨髄幹細胞とマクロファージの相互作用によって MMP9 を介した線維化改善がもたらされる可能性が示され、次世代型新規肝修復療法になり得ると考えられた。今回の研究では in vivo 実験のデータがほとんどであり、in vitro 研究による分子生物学的メカニズムの解明が必要と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

- ① Ishikawa T, Factor VM, Marquardt JU, Raggi C, Seo D, Kitade M, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling is required for stem cell-mediated liver regeneration in mice. *Hepatology* 2012 Apr;55(4): 1215-26 (査読有)

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 石川 剛、Oval cell の活性化に伴う肝再生・修復過程における HGF/c-Met シグナリングの役割、JDDW 2010、2010 年 10 月 14 日、横浜 パシフィコ横浜
- ② 石川 剛、HGF/c-Met シグナリングは oval cell 由来肝再生に必須である、第 46 回日本肝臓学会総会、2010 年 5 月 28 日、山形 メトロポリタン山形
- ③ 石川 剛、HGF/c-Met シグナリングは oval cell 由来肝再生に必須である、第 96 回日本消化器病学会総会、2010 年 4 月

23 日、新潟 新潟県民会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 剛 (ISHIKAWA TSUYOSHI)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20569305