

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590966

研究課題名(和文) ライブイメージング法を用いた間葉系幹細胞の時間・空間的解析 肝臓内ニッチの探索

研究課題名(英文) Explore the hepatic niche: spatiotemporal analyses of mesenchymal stem cells using live imaging technique

研究代表者

高原 照美 (Takahara, Terumi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号：60240777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝再生療法として効率の良い細胞治療法の開発が求められる。しかし注入された幹細胞がどのように肝臓に遊走・生着・分化していくのか、また効率の良い肝臓内ニッチの探索はなされていない。本研究では、ライブイメージングの手法を用いて、レポーター遺伝子で標識した間葉系幹細胞が肝臓に遊走・生着して分化していく時間・空間的動態をミクロおよびマクロで解析した。さらに、肝臓内ニッチに発現する有用な分子、特にMMP-9を中心に細胞外マトリックスの有用性とMMP発現の意義を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：A new and more efficient liver regeneration therapy is required. However, the details of mesenchymal stem cell migration, adhesion, and differentiation into the liver are still unknown as are the efficiency factors for the liver niche. In this study we observed the spatiotemporal dynamics of mesenchymal stem cells that were injected into the spleen and the migration, adhesion, and differentiation of the cells into the liver using multi-photon excitation microscopy. We also analyzed the essential molecules for the liver niche. Mesenchymal stem cells improve liver fibrosis but the stem cells need both their own MMP-9 for migration to the liver and also need to the local MMP-9 for migration and engraftment at the liver. Thus we confirmed that the gradient of both the extracellular matrix and CXCL12 is important.

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：間葉系幹細胞 イメージング MMP-9 ニッチ

1. 研究開始当初の背景

末期肝不全や劇症肝炎は重篤な肝再生不全の状態にあり、肝移植のみが救命の方法である。しかし提供臓器の不足から、移植を必要としない肝再生医療の開発が望まれる。そこで細胞治療のソースとして、iPS細胞をはじめとした多能性幹細胞が注目されている。しかし、安全性や有効性などいまだヒトで確認されておらず、幅広い臨床応用にはまだ時間が必要である。

一方、肝再生療法として、自己骨髄幹細胞を注入して肝再生を促す「自己骨髄細胞注入療法」が、多施設臨床試験で検討されて一定の効果が得られている(Terai S. Stem Cells 2006, Terai S. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2010)。しかし同法の問題点は、注入された骨髄幹細胞のごく一部しか肝臓に生着しないこと、注入された細胞の生体内での動態が不明であること、肝機能改善のメカニズムが十分に解明されていないこと、などがあげられる。

2. 研究の目的

効率の良い細胞治療法の開発のための基礎実験として、注入された幹細胞がどのように肝臓に遊走・生着・分化していくのか、また効率の良い肝臓内ニッチの探索を行うことを目的とする。具体的には、

注入された幹細胞が生体内でどのような運命をたどるか、その動態を個体が生きたまま観察することを目的とする。小動物蛍光イメージング装置や多光子レーザー顕微鏡を用いたライブイメージングの手法を用いて、移植された幹細胞の動態を時間・空間的にマクロ及びミクロで解析する。

幹細胞の有効な遊走・生着をめざし、肝臓内ニッチを詳細に検討する。本研究ではニッチに重要とされる MMP の発現、細胞外マトリックスとの関連も検討しニッチにとって重要な分子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 1年目

遺伝子改変動物 Luc Rat, LacZ rat を交配し、間葉系幹細胞の精製するレポーター遺伝子ルシフェラーゼ (Luc) LacZ を持つ double レポーター-TG ラットを作製し、間葉系幹細胞を得る。

間葉系幹細胞の *in vitro* の解析
間葉系幹細胞培養系に脂肪細胞分化因子、骨細胞分化因子、肝細胞分化因子を添加して間葉系幹細胞の多分化能を確認する。

ライブイメージングで幹細胞の観察
recipient ラットにルシフェリンを投与し経時的に小動物蛍光イメージング装置 (Shimazu Clairvivo OPT) で観察して、注入された幹細胞の時間・空間的動態を計測し、肝臓へ最も動員される経路の同定を行う。さらに幹細胞の形態的同定、分化の解析を行う。

2) 2年目、3年目

遺伝子改変動物 EGFP/MMP-9 KO double TG マウスから間葉系幹細胞を精製し *in vitro* の解析を行う

EGFP/ MMP-9 KO double TG マウスを作製、間葉系幹細胞を得て、間葉系幹細胞の多分化能を確認する。

ライブイメージングで幹細胞の観察
recipient マウスを経時的に小動物蛍光イメージング装置で観察して、注入された幹細胞の時間・空間的動態を観察する。さらに幹細胞の分化と形態的同定を行う。

多光子レーザー顕微鏡を用いた肝臓ニッチのミクロの解析

多光子レーザー顕微鏡を用いて幹細胞の動態を更に詳細に解析する。EGFP(+)間葉系幹細胞の肝臓での動態を顕微鏡レベルで解析する。

肝臓内ニッチの解析

前年度に続き、各種免疫染色を行うことによって肝臓のニッチを同定し、幹細胞の分化と形態的同定を行う。さらにマイクロダ イセクションを用いて肝臓ニッチの発現遺伝子をマイクロアレイを用いて解析する。同時に、細胞外マトリックスを同定する

4. 研究成果

ラット間葉系幹細胞の採取と多分化能の確認

遺伝子改変ラット (Luc/LacZ double TG) を作製し、骨髄から間葉系幹細胞を得た。得られた細胞は MACS を用いて CD11b, CD45(-) 細胞を選別し、さらに CD90(+)細胞を得た。この培養系に脂肪細胞分化因子、骨細胞分化因子、肝細胞分化因子を添加して、形態学的、免疫組織学的、分子生物学的に間葉系幹細胞の多分化能を確認した。

ライブイメージングで注入間葉系幹細胞の観察

正常ラットに四塩化炭素を投与し急性肝障害モデルを作成した。そこに、Luc/LacZ double TG 由来の 1×10^7 個の間葉系幹細胞を経尾静脈、経門脈経路で投与し、ルシフェリンを投与して小動物蛍光イメージング装置を用いて経時的に観察した。その結果、肝臓へ到達した細胞数は経門脈投与が多いことが確認された。しかし、ライブイメージングでは細胞レベルでの遊走の解析には感度が低いことが判明した。そこで以下の実験は多光子レーザー顕微鏡を使用した。

マウス間葉系幹細胞の採取と多分化能の確認

遺伝子改変マウス EGFP と MMP-9 KO マウスを交配して EGFP/MMP-9 KO double TG マウスを作成した。その骨髄から間葉系幹細胞を得て、さらに MACS で選別して、組織学的、免疫組織学的、分子生物学的にその多分化能を確認した。

多光子レーザー顕微鏡による注入間葉系幹細胞の観察

マウスの株化間葉系幹細胞を蛍光ラベルして四塩化炭素障害マウスに 1×10^6 個を脾臓から注入し、多光子レーザー顕微鏡で観察した。ラベルされた細胞は肝臓に流入していき、おもに中心静脈周囲の障害部位に遊走し生着することが 24 時間の経時的観察が可能であった。

肝臓ニッチの解析

四塩化炭素を週 2 回 6 週間投与した慢性肝障害マウスを recipient とし、 1×10^7 個の間葉系幹細胞を尾静脈から注入し、引き続き四塩化炭素を投与して 12 週目に肝臓を摘出した。対照群は肝障害を同様に誘導するが、細胞は投与せず生理食塩水のみ注入した。ドナー細胞は EGFP, EGFP/MMP-9 KO の 2 種類とした。一方 recipient は wild と MMP-9 KO マウスとした。

その結果、wild マウスを用いた対照群は組織学的に肝硬変を示した。各種マトリックス関連遺伝子 (type I collagen, type III collagen, MMP-2, TIMP-1) の発現亢進、肝星細胞の活性化を表す alpha smooth muscle actin (α -SMA) のタンパク発現の増加が認められた。TGF- β などの線維化関連サイトカインも発現亢進が見られた。一方で MMP-9 KO マウスを用いた肝障害の対照群は wild マウスの線維化と差異は見られなかった。

次に間葉系幹細胞を wild マウスに投与した群を検討した。EGFP 細胞投与群、EGFP/MMP-9 KO 細胞投与群を対照群と比較すると、EGFP 細胞投与群で有意に線維化の改善が見られた。これらは遺伝子発現、蛋白発現で確認し、それにもなって肝星細胞活性化も抑制されていた。一方で MMP-13 の発現は著明に亢進した。EGFP/MMP-9 KO 細胞投与群マウスでも有意に線維化の改善が認められたが、EGFP 細胞群と比較すると線維化改善は軽度であった。また肝臓に遊走した EGFP(+) 細胞数を観察すると EGFP/MMP-9 KO では遊走した細胞数は有意に少ないことが判明した。またこれらの細胞は主に線維化が見られる部位に生着した。以上から MMP-9 が細胞遊走・生着に重要な因子であると考えられた。

間葉系幹細胞の分化について

得られた肝臓をコラゲナーゼで灌流して、実質細胞、非実質細胞を得た。さらに FACS を用いて EGFP(+) 細胞のみ採取して細胞の分化について解析した。その結果、EGFP(+) 細胞は全細胞の約 1.5% であった。また EGFP(+) 細胞の約 50% が MMP-13 を発現し、25% が F4/80 を発現しており幹細胞の一部はマクロファージに分化することが確認された。免疫組織学的に解析したところ、EGFP(+) 細胞が MMP-13(+), F4/80(+) 細胞と重なることが確認された。間葉系幹細胞投与群で肝線維化が改善する機序として生着した細胞が MMP-13 産生細胞に分化することが一因と考えられた。

CXCL12 と MMP-9

急性四塩化炭素障害肝では CXCL12 の発現は著明に上昇した。また、*in vitro* の実験として間葉系幹細胞培養に活性型 MMP-9 と CXCL12 を添加すると、細胞の遊走能は相加的に増強し MMP inhibitor でその効果は阻害された。また、CXCR-4 (CXCL12 レセプター) の発現は活性型 MMP-9 添加で亢進し、さらに CXCL12 も発現が亢進した。CXCL12 濃度勾配が幹細胞遊走に重要であることが知られているが、その機序には MMP-9 が重要であることが示された。

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 10 件)

Nishio Y, Fujino M, Li XK, et al.

5-Aminolevulinic acid combined with ferrous iron enhances the expression of heme oxygenase-1. *Int Immunopharmacol.* 査読あり 19(2): 2014; 300-7.

doi: 10.1016/j.intimp.2014.02.003

Liu C, Zhu P, Saito T, Isaka Y, Nagahara Y, Zhuang J, Li XK.

Non-myeloablative conditioning is sufficient to induce mixed chimerism and subsequent acceptance of donor specific cardiac and skin grafts. *Int Immunopharmacol.* 査読あり 16(3): 2013;392-8.

doi: 10.1016/j.intimp.2013.02.003.

Hou J, Cai S, Kitajima Y, Li XK et al. 5-Aminolevulinic acid combined with ferrous iron induces carbon monoxide generation in mouse kidneys and protects from renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 査読あり 305(8): 2013; F1149-57.

doi: 10.1152/ajprenal.00275.2013.

Luo XY, Takahara T, Kawai K, Fujino M, Sugiyama T, Tsuneyama K, Tsukada K, Nakae S, Zhong L, Li XK. IFN-deficiency attenuates hepatic inflammation and fibrosis in a steatohepatitis model induced by a methionine- and choline-deficient high-fat diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 査読 305(12):2013;G891-9.

doi: 10.1152/ajpgi.00193.2013.

Abe T, Li XK, et al. Hydrogen-rich University of Wisconsin solution attenuates renal cold ischemia-reperfusion injury.

Transplantation. 査読あり 94(1): 2012;14-21.

doi: 10.1097/TP.0b013e318255f8be

Tsumura H, Ito M, Li XK, et al.

The role of CD98hc in mouse macrophage functions. Cell Immunol. 査読あり 276(1-2): 2012;128-34.
doi: 10.1016/j.cellimm.2012.04.012.
Liu Z, Hou J, Chen J, Tsumura H, Ito M, Ito Y, Hu X, Li XK. Deletion of CD98 heavy chain in T cells results in cardiac allograft acceptance by increasing regulatory T cells. Transplantation. 査読あり 93(11): 2012;1116-24.
doi: 10.1097/TP.0b013e31824fd7cd.
Kitazawa Y, Li XK, et al. Bone marrow-derived conventional, but not cloned, mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation and prevent graft-versus-host disease in rats. Cell Transplant. 査読あり 21(2-3): 2012;581-90.
doi:10.3727/096368911X605510.
Kawai K, Xue F, Takahara T, Kudo H, Yata Y, Zhang W, Sugiyama T. Matrix metalloproteinase-9 contributes to the mobilization of bone marrow cells in the injured liver. Cell Transplant 査読あり 21(2-3):2012;453-64.
doi:10.3727/096368911X605367.
Luo XY, Takahara T, et al. Theaflavin attenuates ischemia-reperfusion injury in a mouse fatty liver model. Biochem Biophys Res Commun. 査読あり 417(1): 2012;287-93.
doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.102.
〔学会発表〕(計5件)
Takahara T. IFN- deficiency attenuates hepatic inflammation and fibrosis in mouse steatohepatitis. The 17th International Society of Hepatic Sinusoidal Research and 27th Annual Meeting for Hepatic Sinusoidal Research Japan. 2013,9,23-25, Osaka
Luo XY, Takahara T, et al. IFN- deficiency attenuates hepatic inflammation and fibrosis in a steatohepatitis model induced by a methionine- and choline-deficient high-fat diet. The 63th Annual Meeting of the America Association for the Study of Liver Disease. 2012, 11,9-13, Boston
Kawai K, Takahara T, et al. MMP-9 promotes the trafficking of transplanted bone marrow cells that attenuates hepatic fibrosis in chronic CCl4 liver injury. The 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. 2012, 6,13-16, Yokohama
Luo XY, Takahara T, et al. Theaflavin attenuates ischemia-reperfusion

injury in a mouse fatty liver model. The 10th International Society of Hepatic Sinusoidal Research. 2011, 9,22-24, Florence
Takahara T, Kawai K et al. Magic-Factor, a partial agonist of Met, act as a safe hepatotrophic cytokine. The 62th Annual Meeting of the America Association for the Study of Liver Disease. 2011, 11,4-8, San Francisco
〔図書〕(計3件)
高原照美 学際企画 病気の分子形態学 2011, 370
高原照美 文光堂 B型肝炎の診療を極める 2013 160
高原照美,高野敦子 西村書店 消化器病学 2013, 1234
〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)
なし
取得状況(計 0件)
なし
〔その他〕
ホームページ等
なし
6. 研究組織
(1)研究代表者
高原 照美(TAKAHARA, terumi)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授
研究者番号: 6 0 2 4 0 7 7 7
(2)研究分担者
梨井 康(LI, xiao kan)
国立成育医療研究センター・研究所・室長
研究者番号: 6 0 3 2 1 8 9 0
(3)連携研究者
池田 智明(IKEDA, tomoaki)
国立循環器病研究センター・周産期婦人科部・部長
研究者番号: 8 0 2 0 2 8 9 4