

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659847

研究課題名(和文) 肝硬変症に対するヒト自己脂肪由来幹細胞による革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Advanced therapy for liver fibrosis and cirrhosis by adipose derived mesenchymal stem cell

研究代表者

橋爪 誠 (Makoto, Hashizume)

九州大学・学内共同利用施設等・教授

研究者番号：90198664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においてわれわれは、脂肪由来間葉系幹細胞の肝硬変、肝不全治療のための革新的治療法を開発するため、動物実験にて基礎的検討を行った。肝硬変ラットを作成し、同種ラットのそけい部から得られた脂肪細胞より間葉系幹細胞(ADSC)を採取し培養した。肝硬変ラットにこのADSCを尾静脈から投与し、肝線維化、肝障害について検討した。ADSC投与群では明らかに肝障害が軽減し、肝線維化も軽減された。ADSCではTNF、HGF、MMPなどの多くのサイトカインが産生されていたが、特に障害肝でのADSCからのHGF産生が強く、このことが肝不全と肝障害の軽減に寄与しているものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Liver fibrosis was introduced into rats by repeated carbon tetrachloride intraperitoneal injections. After 6 weeks ccl4 injection, rats received splenectomy operation, PKH26 labelled ADSCs were transplanted into hepatic cirrhosis rats through the caudal vein. PKH26 staining indicated migrated ADSCs existing at liver fibrotic area, with strong expression of hepatocyte growth factor (HGF) shown by anti-HGF antibodies. Three days after ADSCs transplantation, liver function and fibrosis had ameliorated, as compared to rats treated with CCl4 alone. Conclusions: This findings indicates ADSCs transplantation is a valuable method for the therapy of hepatic fibrosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：肝硬変 脂肪由来幹細胞 HGF

### 1. 研究開始当初の背景

日本における肝硬変患者は約 30 万人、その予備軍であるウイルス肝炎患者は 340 万人と推定される。特に肝硬変となってしまった患者においては、食道胃静脈瘤消出血・腹水留肝性脳症・脾機能亢進症などの門脈圧亢進および肝線維化の進行に伴い生じる肝細胞癌がその予後を左右する因子となる。

しかしながら門脈圧亢進症とその原因である肝硬変(肝線維化)に対する治療法はなく、消化管静脈瘤に対する内視鏡的治療 IVR 治療などの対症療法があるのみで、現在、肝移植以外に根本的な治療法は存在しない。また、世界的にもドナー不足の問題もあり、さらに生体肝移植が中心の本邦においては、ドナーのリスクの問題や倫理的問題もあり、肝移植は誰もが享受できる一般的な肝硬変症の治療とは言い難い。従って、肝硬変症の進行の主因である肝線維化の抑制と改善効果をもたらすような新しい治療法の開発が必要とされている。

これまでさまざまな因子が肝線維化および肝硬変モデルにおいて有用との報告がなされ、我々も動物実験モデルにて肝微小循環の改善、肝線維化抑制に関わるシグナルトランスダクションについて解明を行ってきたが、どれも臨床応用にて成功してはいない。よって単一の遺伝子やシグナルトランスダクションの制御だけでは、複雑な生体反応の制御は困難であることが明らかとなってきている。よって、細胞移植のような生体内で宿主環境に応じた組織修復機能を利用した治療法が期待される。

近年、幹細胞研究の進歩は著しく、皮膚細胞や線維芽細胞からも遺伝子導入により人工的に多能性幹細胞の作成が可能となってきている(iPS 細胞)。しかしながら遺伝子導入という点で、まだまだ倫理的な障壁があり実用化には至っていない。臨床では、すでに脳梗塞、肝硬変の治療と

して骨髄細胞移植が行われ、脳梗塞後の回復、非代償性肝硬変における肝障害の軽減が得られており、有用性が示唆されている。しかし、生体から骨髄細胞を採取する場合、患者の負担が大きい点が問題視されている。そこで低侵襲かつ大量に得られる幹細胞として皮下脂肪から得られる脂肪組織由来の間葉系幹細胞(adipose tissue derived stem cell:ADAC)が注目されている

### 2. 研究の目的

肝硬変症患者の診療において消化管出血、腹水貯留・肝性脳症・脾機能亢進症などの門脈圧亢進症は、患者の予後を左右する合併症である。これらに対しての内視鏡治療やシャント手術などの対症療法はあるが、肝硬変そのものに対する治療法は移植以外にはないのが現状である。

本研究では、自己皮下脂肪由来間葉系幹細胞を用いた肝硬変治療の可能性と治療効果を向上させるための革新的治療法の開発することにより、臨床応用を目的とし、皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞の実験的肝硬変モデルにおける有用性について実験的検討を行い、その効果と治療メカニズムの解明を行う。また脂肪由来間葉系幹細胞の効果的大量培養の確立と反復投与法の有用性に関する検討を行い自己皮下脂肪由来間葉系幹細胞のヒト肝硬変における安全性と有用性の検討を行う。

### 3. 研究の方法

【研究 1】未分化型脂肪由来間葉系幹細胞と肝細胞分化型脂肪由来間葉系幹細胞の実験的肝硬変モデルによる改善効果に関する検討

方法 1.ラットおよびマウスの鼠径部皮下脂肪組織より得られる脂肪由来間葉系幹細胞(ratADSC または mouseADSC) (Flow cytometry にて脂肪由来間葉系細胞(CD13,CD29,CD44,CD105 陽性、CD31,CD34 陰性)であることを確認。)を用

いてES細胞から肝細胞への分化誘導を促進するとされるHGF,デキサメサゾン(FEBS let 2001)に加えて肝発生因子として胎生期に必須因子である線維芽細胞増殖因子(bFGF)や造血細胞が産生し肝細胞の機能的成熟を促進するといわれている。オンコスタチンM(Osm)(Science 1999)について、その付加的効果を培養細胞実験にて検討した。肝細胞への分化の程度については、形態学的な変化を経時的に解析するとともにアルブミン遺伝子、AFP、胆管上皮マーカであるCK19遺伝子についてRT-PCRによる解析にて肝細胞特異的遺伝子発現の検討を行う。また、四塩化炭素投与により実験的肝硬変モデル(ラットおよびマウス)を作成し(四塩化炭素週2回の8週投与)、未分化型の脂肪由来間葉系幹細胞と分化型脂肪由来間葉系細胞の投与により、肝硬変モデルにおける肝機能障害(AST/ALT)、肝合成能(Prothrombin activity, Alb)、肝線維化の程度についての検討を行った。

**方法 2.**我々の研究データでは他の骨髄由来幹細胞移植における研究と同様に、線維架橋と残存肝小葉の辺縁にADSCの正着を認め、これが線維化改善に寄与していることから、肝細胞に分化させることが、本当に肝硬変の治療に寄与するのかが疑問がある。分化させた脂肪由来細胞の方が肝機能改善効果があるとの報告もあるが、おそらく肝線維化の程度、肝不全の程度、基礎疾患などの病態により、その有効性は異なるものと考えられる。未分化と肝細胞分化型のADSCのどちらがより有効な治療となりえるのか、肝臓に正着した細胞がどのようなサイトカインを分泌して肝機能の改善、肝硬変の組織的改善に寄与しているかについての検討を行った。

方法として、投与するADSCにはあらかじめ蛍光色素であるPKH26で染色する未分化ADSCと肝細胞分化型のADSCが、肝硬変の病態において肝臓のどの部位に局在するかを蛍光

顕微鏡にて同定するとともに、正着ADSCの肝組織中でのALB産生、MMP(メタロプロテアーゼ)産生についても蛍光免疫染色にて検討した。これによりADSCが肝細胞として生着機能しているのか、他の樹状細胞や筋線維芽細胞となり機能しているのかを検討した。

#### 4. 研究成果

研究1において、ラットおよびマウス肝硬変モデルにおいて、肝臓細胞へ分化させた細胞よりもbFGFにて未分化のまま増殖させた細胞の投与の方が肝逸脱酵素の低減化に寄与していた。よってbFGFによりADSCを培養し投与することで、その効果実験を行うこととした。

研究2においては、ADSC投与群においてAST/ALTの肝障害は有意に抑制された。肝臓の組織学的検討では肝硬変に特徴的である線維性架橋の有意な改善を認めた。また新し知見として脾臓を摘出し、ADSCを投与した群において有意に肝線維化の改善が得られた。PHK26による細胞染色をあらかじめおこなっている細胞を投与すると、正常ラットでは肝臓にはほとんど細胞の集積を認めないが、肝硬変ラットにおいては、肝臓への投与細胞の集積を認めた。また肺、脾臓にも細胞の集積を認めた。障害肝においてはADSCが集積しやすいことがわかった。また脾臓摘出によりADSCが有意に肝臓に集積しやすいことが示された。細胞培養にてHGF,MMPなどの多数のサイトカインを産生していることがわかった。とくにbFGFを添加して培養したADSCは強くHGFを発現しており、このことが肝障害の軽減と肝硬変の改善に寄与しているものと考えられた。

以上の基礎的検討により皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞の臨床応用を行うに当たっての十分な成果をえることができた。

#### 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 12 件)

1 ) Uehara H, **Akahoshi T**, Tomikawa M, Kinjo N, Hashimoto N, Nagao Y, Kamori M, Maehara Y. Prediction of improved liver function after balloon- occluded retrograde transvenous obliteration: the relation to hepatic vein pressure gradient.

(Corresponding author)

JGastroenterol Hepatol. 2012 Jan;27(1):137-41. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06835.x.

2 ) Tomikawa M, **Akahoshi T**, Kinjo N, Uehara H, Hashimoto N, Nagao Y, Kamori M, Kumashiro R, Maehara Y, Hashizume M.

Rigid and flexible endoscopic rendezvous in spatium peritonealis may be an effective tactic for laparoscopic megasplenectomy: significant implications for pure natural orifice transluminal endoscopic surgery.

Surg Endosc. 2012 Dec;26(12):3573-9.

3 ) .Nagao Y, **Akahoshi T**(Corresponding author), Kamori M, Uehara H, Hashimoto N, Kinjo N, Shirabe K, Taketomi A, Tomikawa M, Hashizume M, Maehara Y.

Liver regeneration is promoted by increasing serotonin content in rat liver with secondary biliary cirrhosis. Hepatol Res. 2011 Aug;41(8):784-94. Epub 2011 Jun 23.

4 ) Tomikawa M, Korenaga D, **Akahoshi T**, Kohshi K, Sugimachi K, Ikeda Y, Takenaka K, Maehara Y. Trends in the treatment outcomes for advanced colorectal cancer: an analysis at a single community hospital in Japan. Surg Today. 2011 Jun;41(6):801-5. Epub 2011 May 2

5 ) Yoshida D, **Akahoshi T** (Corresponding author), Kawanaka H, Yamaguchi S, Kinjo N, Taketomi A, Tomikawa M, Shirabe K, Maehara Y, Hashizume M. (Corresponding author)

Roles of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase during revascularization and regeneration after partial

hepatectomy in a rat model.

Surg Today. 2011 Dec;41(12):1622-9. Epub 2011 Oct 4.

6 ) **Akahoshi T**, Tomikawa M, Kawanaka H, Furusyo N, Kinjo N, Tsutsumi N, Nagao Y, Hayashi J, Hashizume M, Maehara Y.

Laparoscopic splenectomy with IFN therapy in one hundred HCV-cirrhotic patients with hypersplenism and thrombocytopenia. J

Gastroenterol Hepatol. 2012 Feb;27(2):286-90.

PMID:21793908

7 ) **Akahoshi T**, Tomikawa M, Kamori M, Tsutsumi N, Nagao Y, Hashizume M, Maehara Y.

Impact of balloon-occluded retrograde transvenous obliteration on management of isolated fundal gastric variceal bleeding

Hepatol Res. 2012 Apr;42(4):385-93. d

8 ) **Akahoshi T**, Tomikawa M, Tsutsumi N, Hashizume M, Maehara Y

Merits of prophylactic sclerotherapy for esophageal varices concomitant unresectable hepatocellular carcinoma: Prospective randomized study.

.Dig Endosc. 2013 May 8. doi: 10.1111/den.12119.

9 ) Nagao Y, **Akahoshi T**, Uehara H, Hashimoto N, Kinjo N, Kawanaka H, Tomikawa M, Uchiyama H, Yoshizumi T, Soejima Y, Shirabe K, Maehara Y

Balloon-occluded retrograde transvenous obliteration is feasible for prolonged portosystemic shunts after living donor liver transplantation.

Surg Today. 2013 Mar 7.

10 ) Tsutsumi N, Tomikawa M, Uemura M, **Akahoshi T**, Nagao Y, Konishi K, Ieiri S, Hong J, Maehara Y, Hashizume M.

Image-guided laparoscopic surgery in an open MRI operating theater.

Surg Endosc. 2013 Jun;27(6):2178-84.

1 1 ) Kinjo N, Nagao Y, Akahoshi T, Masahiro K, Hashimoto N, Uehara H, Kawanaka H, Tomikawa M, Shirabe K, Hashizume M,

Hepatic vein waveform and splenomegaly predict improvement of prothrombin time after splenectomy in hepatitis C virus-related cirrhotic patients. Hepatol Res. 2013 Sep;43(9):933-41.

1 2 ) Tomikawa M, Korenaga D, Akahoshi T, Kohshi K, Sugimachi K, Nagao Y, Tsutsumi N, Takenaka K, Kakeji Y, Hashizume M, Maehara Y.

Quality of life after laparoscopy-assisted pylorus-preserving gastrectomy: an evaluation using a questionnaire mailed to the patients. Surg Today. 2012 Jul;42(7):625-32.

〔学会発表〕(計 19 件)

1 ) 第 17 回日本肝臓学会大会 東京 2013 年 10 月 11 日 ワークショップ 15

橋爪 誠

門脈圧亢進症 治療法の選択とその成績

2 ) 第 68 回日本消化器外科学会総会 宮崎 2013 年 7 月 19 日

赤星朋比古, 永田 高志, 杉森 宏, 橋爪 誠

消化管術後敗血症性 DIC に対するリコモジュリン投与の現状と治療成績

3 ) 第 20 回日本門脈圧亢進症学会総会 シンポジウム 名古屋 2013 年 9 月 20 日

赤星朋比古, 家守雄大, 川中博文, 橋爪 誠,

前原喜彦

M D C T による下部食道の血行動態の把握と E V L 後再発との関係

3 ) 日本臨床生理学会 シンポジウム 東京 2013 年 11 月 8 日

赤星朋比古, 川中博文, 橋爪 誠, 前原喜彦

脾摘が門脈循環に及ぼす影響

4 ) 日本内視鏡外科学会総会 福岡 2013 年 11 月 28 日 特別シンポジウム

赤星朋比古, 川中博文, 池田哲夫, 橋爪 誠  
次世代内視鏡手術装置による腹腔鏡下脾臓摘出術の経験

5 ) 第 17 回日本肝臓学会大会 東京 2013 年 10 月 11 日 ワークショップ

赤星朋比古, 橋爪 誠, 前原喜彦

食道胃静脈瘤に対する治療戦略 治療の変遷と外科治療の意義

6 ) 日本外科学会 シンポジウム 福岡 2013 年 4 月 13 日

赤星朋比古, 富川盛雅, 神代竜一, 戸島剛男, 調 憲, 橋爪 誠, 前原喜彦

食道胃静脈瘤における新しい治療戦略 抗ウイルス療法と腹腔鏡下脾臓摘出術の意義

7 ) 第 113 回日本外科学会定期学術集会 福岡 2013 年 4 月 13 日 基調講演

橋爪 誠

門脈圧亢進症治療の新展開.

8 ) 第 113 回日本外科学会定期学術集会

福岡 2013 年 4 月 11 日 シンポジウム 3

橋爪 誠

外科領域におけるシミュレーション、ナビゲーションの将来展望

9 ) 第 49 回日本腹部救急医学会総会 福岡 2013 年 3 月 13 日

赤星朋比古, 永田高志, 杉森 宏, 富川盛雅, 橋爪 誠

重傷腹部外傷診療における消化器外科医のかかわりにおける問題と提言 ~ 我が国の重傷外傷診療には消化器外科医の力が不可欠である ~

1 0 ) 第 83 回日本消化器内視鏡学会総会 シンポジウム 東京 2012 年 5 月 12 日

Akahoshi T

The Impact of B-RTO on Management of Isolated Fundal Gastric Variceal Bleeding Department of Disaster and Emergency Medicine, Kyushu University, Japan

1 1 ) 第 66 回 日本手術手技研究会 福岡

2012年5月25日

赤星朋比古、富川盛雅、橋本直隆、家守雅大、長尾吉泰、調 憲、橋爪 誠、前原喜彦  
腹腔鏡脾臓摘出術の latest modern technique

12)

第67回日本消化器外科学会総会 富山 企画関連口演 2012年7月18日  
赤星朋比古、富川盛雅、橋本直隆、長尾吉泰、家守雄大、橋爪 誠、前原喜彦  
脾機能亢進症を伴う門脈圧亢進症、肝硬変症における腹腔鏡下脾臓摘出術の意義。

13)

第19回日本門脈圧亢進症学会総会 東京 2012年9月7日  
赤星朋比古、富川盛雅、長尾吉泰、橋爪 誠、前原喜彦  
門脈圧亢進症および肝硬変患者における脾臓摘出術後の長期合併症に関する検討

14)

第40回 日本救急医学会総会 京都 2012年11月13日  
赤星朋比古、杉森宏、藤村直幸、永田高志、橋爪 誠、前原喜彦  
消化管術後敗血症性 DIC に対するリコモジュリン投与の現状と治療成績

15) 第47回日本肝臓学会総会 東京 2011年6月3日

赤星朋比古、富川盛雅、長尾吉泰、家守雄大、堤 敬史、橋爪 誠、前原喜彦  
脾臓摘出による肝機能改善効果における検討

16) 第81回日本消化器内視鏡学会総会 名古屋 2011年8月18日

赤星朋比古、富川盛雅、橋爪 誠  
当科における食道胃静脈瘤における治療の変遷と成績

17) 第18回日本門脈圧亢進症学会総会、福岡 2011年9月16日 パネルディスカッション2

赤星朋比古、富川盛雅、橋本直隆、長尾吉泰、家守雄大、橋爪 誠、前原喜彦  
血小板減少を伴うC型肝炎・肝硬変症患者における腹腔鏡下脾臓摘出後PEG-IFN + RBV療法の治療成績についての検討。

18) 第24回日本内視鏡外科学会総会 大阪 2011年12月7日 シンポジウム2

赤星朋比古、富川盛雅、長尾吉泰、家守雄大、橋本直隆、橋爪 誠、前原喜彦  
血小板減少を伴うC型肝炎・肝硬変症患者における腹腔鏡下脾臓摘出後インターフェロン治療についての検討。

19) 第39回日本救急医学会総会・学術集会 東京 2011年10月19日 パネルディスカッション

赤星朋比古、永田高志、杉森 宏、橋爪 誠  
Acute care surgeryにおける消化器外科医の関わりにおける諸問題と対策。

〔図書〕(計 3件)

1) 赤星朋比古、橋爪 誠:

脾臓 5 門脈亢進症に対するシャント手術 「手術」5月臨時増刊号 Vol.67 No.6 2013 最新 肝胆脾手術アトラス; 1032-1039 (分担)

2) 赤星朋比古、富川盛雅、橋爪誠

腹腔鏡下胃上部血行遮断術兼脾摘術 (Hassab手術)  
食道・胃静脈瘤 改訂第3版・第83回日本消化器内視鏡学会総会記念出版 267-273, 2012 (分担補筆)

3) 赤星朋比古、富川盛雅、橋爪誠、前原喜彦

バルーン閉塞下逆行性経静脈塞栓術 (B-RTO) Medicina 第49巻 第7号, 1199-1203, 2012

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cmeit.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋爪 誠 (HASHIZUME MAKOTO)

九州大学大学院 医学研究院・教授

研究者番号: 90198664

(2) 研究分担者

赤星 朋比古 (AKAHOSHI TOMOHIKO)

九州大学大学院 医学研究院 講師

研究者番号: 20336019

(3) 連携研究者

村田 正治 (MURATA MASAHARU)

九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点 准教授

研究者番号: 30304744

(4) 連携研究者

富川 盛雅 (TOMIKAWA MORIMASA)

九州大学病院 先端医工学診療部 准教授

研究者番号: 60325454