

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590978

研究課題名(和文) 小型骨髄由来肝修復細胞の形態解析と特異因子の探求

研究課題名(英文) The analysis of small bone marrow derived liver repair cell

## 研究代表者

山本 直樹 (YAMAMOTO, Naoki)

山口大学・大学教育機構・講師

研究者番号：90448283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：GFP/CC14モデルによる骨髄細胞投与後の肝組織を免疫電顕で解析したところ、投与した骨髄細胞は大きさ・形態から類円形の大型細胞(MMP9陽性)と核N/C比の高い小型細胞(A-6, Liv2陽性)の二種類の細胞集団が存在し、EpCAM陽性細胞は小型細胞の中に含まれることがわかった。全骨髄細胞をEpCAM陽性・陰性群に予め分離し、それぞれの群を持続肝障害(CC14)モデルに静脈投与し、その肝臓内での様々な細胞の形態や特徴、肝線維化の改善を解析したところ、EpCAM陽性群よりもEpCAM陰性群の方が肝線維化抑制効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：We developed the GFP/CC14 model which monitor the GFP-positive bone marrow cell (BMC) repopulated under CC14 induced liver cirrhosis mice. We found two kinds of GFP positive BMCs in recipient cirrhosis liver using IEM method. One group of GFP positive BMCs was similar to hepatocyte in size (15-30um) and located around fiber (MMP9 positive cell). The other group cells were small size (2-5microm) and located in destructive area (A6 positive cell, Liv2 positive cell). And EpCAM positive cells were included. These cells were circular forms and had high N/C ratio and smaller than hepatocyte. We separated EpCAM-positive and EpCAM-negative cells and then transplanted these cells into a continuous liver damaged model (CC14 model). At 4 weeks after BMC transplantation, the ratio of liver fibrosis in EpCAM-negative cells injected liver was decreased better than EpCAM-positive cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：再生医療 電子顕微鏡 肝線維化 骨髄細胞 幹細胞 免疫電顕 CCL4モデル

### 1. 研究開始当初の背景

非代償性肝硬変は肝性脳症・腹水・食道胃静脈瘤破裂を引き起こす難治疾患であり、現在の治療としては、肝移植以外対処療法が中心であり、有効な治療方法は確立されていない。肝臓線維化の要因は、肝星細胞、肝クッパー細胞、肝類洞内皮細胞、肝細胞などが相互に関わり、細胞外マトリックスの産生・分解のバランスが破綻して進展すると言われている。我々は難治性肝硬変に対し自己骨髄細胞が有効な治療となるための基礎研究として骨髄細胞の肝硬変修復評価マウスモデル(GFP/CCl<sub>4</sub>モデル)を開発、骨髄細胞が持続炎症肝線維化状態に遊走され、肝臓修復に働き(JB 2003),matrix metalloproteinase-9(MMP9)など産生し、肝機能や生存率、肝線維化を改善させることを明らかにした(Hepatology 2004)。さらに臨床治療として平成15年11月14日より肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療 Autologous Bone Marrow Cell infusion (ABMI) therapy を開始、基礎研究と同様、骨髄細胞投与により肝硬変患者の肝機能改善を認め(Stem Cells 2006)、骨髄細胞中に肝臓を修復する機能がある肝臓修復細胞が存在していることが明らかにした。またこの GFP/CCl<sub>4</sub>モデルの肝組織による高感度免疫電顕による解析で、投与した骨髄細胞は大きさ・形態から類円形の大型細胞(MMP9陽性)と核 N/C 比の高い小型細胞(A-6, Liv2, EpCAM 陽性)の二種類の細胞集団が存在していることを報告してきた。しかし未だこの二種類の骨髄細胞がどのように肝臓を修復・線維化改善させるのか、どのような形態から派生するのか不明である。またレシピエントの肝細胞や星細胞、クッパー細胞など肝類洞内細胞に投与された骨髄細胞がどのような作用を示すのか、レシピエントの環境が肝線維化以外の状態で、投与された骨髄細胞がどのような効果を示すか、どのような動態や働きを示すか解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、肝線維化状態での二種類の骨髄由来細胞の特徴や機能、特に EpCAM 陽性小型骨髄由来細胞に着目し、細胞の特徴と機能を解明することで今後骨髄細胞中の有効な肝臓修復細胞を分離可能とし、培養・増殖・保存させる手掛かりとなると考える。また線維化以外の環境において投与骨髄細胞の動態・機能を解析することで、投与される環境によって骨髄細胞の働き・游走・定着に違いがあるかどうか検証可能となり、線維化のグレードを指標とした臨床研究での治療効果判断が予測可能となると考える。今回の研究では以下の解明を行う。

・類円形の大型骨髄細胞と核 N/C 比の高い小型骨髄細胞が肝機能・肝線維化改善にどのような役割を持ち機能しているのか。またそれぞれの細胞はどのような特異的な

発現マーカーを示すのか。

- ・小型骨髄細胞(EpCAM 陽性)と EpCAM 陰性細胞群のどちらの集団が肝臓修復作用に最も有効な作用を持っているのか。
- ・肝線維化改善においてサイトカイン・ケモカイン等のような因子が関わっているのか。

### 3. 研究の方法

#### **GFP/CCl<sub>4</sub> モデルの骨髄由来肝修復細胞の特徴と特異マーカー探索**

GFP/CCl<sub>4</sub>モデルでの骨髄細胞投与後の肝組織を浮遊切片法による高感度免疫電顕法と FEI 社製の透過型電子顕微鏡 Tecnai12BT と走査型電子顕微鏡 Quanta3D FEG Dual Beam システムを用いて二種類の骨髄由来肝臓修復細胞である核 N/C 比の高い小型細胞と類円形の大型細胞の形態学的変化、肝細胞、星細胞等周囲の細胞との関係について微細構造と 3D 構築による立体構造を構築し解析する。また CD45, CD44, F4/80, CD68, αSMA, CD90, MAC-1, Sca-1, CD34, E-cadherin, EpCAM, Maim 等の様々な細胞マーカーの抗体による高感度免疫電顕を網羅的に行い、同じく浮遊切片法による免疫染色・蛍光二重染色と比較しつつ骨髄細胞中の肝臓修復細胞の特徴を探索する。

#### **小型骨髄由来 EpCAM 陽性細胞の分離と機能解析**

GFP/CCl<sub>4</sub>モデルでの骨髄細胞投与後の肝組織をコラゲナーゼ還流し、EpCAM 抗体、GFP 抗体による FACS 解析で、EpCAM 陽性 GFP 陽性小型骨髄由来細胞が肝組織内であるいは GFP 陽性細胞中にどのぐらいの割合で存在しているかを解析する。また EpCAM 陽性 GFP 陽性小型骨髄由来細胞を BeckmanCoulter MoFlo Astrios で分離する方法を確立させ、細胞の形態の特徴・培養増殖や保存可能かどうかの解析を行い、網羅的に特異的な遺伝子発現の解析を行う。また GFP/CCl<sub>4</sub>モデルの骨髄細胞投与肝組織をコラゲナーゼ還流し、p75NTR や EpCAM, F4/80 等特異抗体と GFP 抗体による FACS 解析を実施、電顕解析結果と比較して、投与した骨髄細胞が肝臓内のどの細胞分画のマーカーを発現しているかを解析し、免疫染色・電顕解析結果と比較・評価する。

#### **GFP/CCl<sub>4</sub>モデルでの EpCAM による骨髄細胞分離投与解析**

GFP 陽性全骨髄細胞を EpCAM 陽性・陰性群に BeckmanCoulter MoFlo Astrios と AutoMACS で分離し、それぞれの群を持続肝障害(CCl<sub>4</sub>)モデルに静脈投与し、その肝臓内での EpCAM 陽性・陰性細胞の形態や特徴を我々が解析した GFP/CCl<sub>4</sub>モデルの免疫電顕での EpCAM 陽性細胞と同じかどうか、EpCAM 陰性細胞の特徴等を比較する。またそれぞれの細胞の定着率や肝機能・肝線維化

改善効果を GFP/CCl4 モデルの場合での結果と比較・検証する。

#### 4. 研究成果

GFP/CCl4 モデルでの骨髄細胞投与後の肝組織を浮遊切片法による高感度免疫電顕法と FEI 社製の透過型電子顕微鏡 Tecnai12BT と走査型電子顕微鏡 Quanta3D FEG Dual Beam システムを用いて二種類の骨髄由来肝臓修復細胞である核 N/C 比の高い小型細胞と類円形の大型細胞の形態学的変化を解析したところ、核 N/C 比の高い小型細胞群の中に EpCAM 陽性細胞群が含まれることがわかった。また GFP/CCl4 モデルでの骨髄細胞投与後の肝組織を コラゲナーゼ 還流し、EpCAM 抗体、GFP 抗体による FACS 解析で、EpCAM 陽性 GFP 陽性骨髄由来細胞の解析の割合を解析し培養等を試みたが、殆どが解析中に死細胞となり、詳細な解析が困難だった。また AutoMACS 等による様々な細胞分離方法を試してみたが、培養あるいは細胞解析は困難であった。GFP 陽性全骨髄細胞を EpCAM 陽性・陰性群に予め分離し、それぞれの群を持続肝障害 (CCl4) モデルに静脈投与し、その肝臓内での様々な細胞の形態や特徴、肝線維化の改善を解析した。結果として EpCAM 陽性群よりも陰性群投与群の方が肝線維化抑制効果を認めたと、全骨髄細胞投与群の方が肝線維化改善をさらに認めた。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

**Terai S, Takami T, Yamamoto N, Fujisawa K, Sakaida I.**

Status and prospect of liver cirrhosis treatment by using bone-marrow-derived cells and mesenchymal cells. *Tissue Eng Part B Rev.* 査読有 2014 Jun;20(3):206-10.

DOI: 10.1089/ten.TEB.2013.0527

Ishikawa T, Shiratsuki S, Matsuda T, Iwamoto T, **Takami T**, Uchida K, **Terai S**, Yamasaki T, Sakaida I.

Occlusion of portosystemic shunts improves hyperinsulinemia due to insulin resistance in cirrhotic patients with portal hypertension.

*J Gastroenterol.* 査読有 2014 Oct;49(9):1333-41.

DOI: 10.1007/s00535-013-0893-z

Quintanilha LF, **Takami T**, Hirose Y, **Fujisawa K**, Murata Y, **Yamamoto N**, Goldenberg RC, **Terai S**, Sakaida I.

Canine mesenchymal stem cells show antioxidant properties against thioacetamide-induced liver injury in vitro and in vivo.

*Hepatol Res.* 査読有 2014 Oct;44(10):E206-17.

DOI: 10.1111/hepr.12204.

Tanimoto H, **Terai S**, **Takami T**, Murata Y, **Fujisawa K**, **Yamamoto N**, Sakaida I.

Improvement of liver fibrosis by infusion of cultured cells derived from human bone marrow.

*Cell Tissue Res.* 査読有 2013 Dec;354(3):717-28.

DOI: 10.1007/s00441-013-1727-2.

Iwamoto T, **Terai S**, Hisanaga T, **Takami T**, **Yamamoto N**, Watanabe S, Sakaida I.

Bone-marrow-derived cells cultured in serum-free medium reduce liver fibrosis and improve liver function in carbon-tetrachloride-treated cirrhotic mice.

*Cell Tissue Res.* 査読有 2013 Mar;351(3):487-95

DOI: 10.1007/s00441-012-1528-z

Saeki I, **Terai S**, **Fujisawa K**, **Takami T**, **Yamamoto N**, Matsumoto T, Hirose Y, Murata Y, Yamasaki T, Sakaida I

Bortezomib induces tumor-specific cell death and growth inhibition in hepatocellular carcinoma and improves liver fibrosis.

*J Gastroenterol.* 査読有 2013 Jun;48(6):738-50.

DOI: 10.1007/s00535-012-0675-z

**Takami T**, **Terai S**, Sakaida I.

Advanced therapies using autologous bone marrow cells for chronic liver disease.

*Discov Med.* 査読有 2012 Jul;14(74):7-12.

Mizunaga Y, **Terai S**, **Yamamoto N**, Uchida K, Yamasaki T, Nishina H, Fujita Y, Shinoda K, Hamamoto Y, Sakaida I.

Granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-1 $\beta$  are important cytokines in repair of the cirrhotic liver after bone marrow cell infusion: comparison of humans and model mice.

*Cell Transplant.* 査読有 2012;21(11):2363-75.

DOI: 10.3727/096368912X638856

**Terai S**, Tanimoto H, Maeda M, Zaitso J, Hisanaga T, Iwamoto T, **Fujisawa K**, Mizunaga Y, Matsumoto T, Urata Y, Marumoto Y, Hidaka I, Ishikawa T, Yokoyama Y, Aoyama K, Tsuchiya M, **Takami T**, Omori K, **Yamamoto N**, Segawa M, Uchida K, Yamasaki T, Okita K, Sakaida I.

Timeline for development of autologous bone marrow infusion (ABMi) therapy and perspective for future stem cell therapy.

*J Gastroenterol.* 査読有 2012 May;47(5):491-7.

DOI: 10.1007/s00535-012-0580-5.

**Takami T**, **Terai S**, Sakaida I.

Stem cell therapy in chronic liver disease.

Curr Opin Gastroenterol. 査読有 2012 May;28(3):203-8.

DOI: 10.1097/MOG.0b013e3283521d6a

Maeda M, **Takami T**, **Terai S**, Sakaida I. Autologous bone marrow cell infusions suppress tumor initiation in hepatocarcinogenic mice with liver cirrhosis.

J Gastroenterol Hepatol. 査読有 2012 Mar;27 Suppl 2:104-11.

DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.07016.x.

Haraguchi T, Tani K, Takagishi R, Oda Y, Itamoto K, **Yamamoto N**, **Terai S**, Sakaida I, Nakazawa H, Taura Y.

Therapeutic potential of canine bone marrow stromal cells (BMSCs) in the carbon tetrachloride (CCl4) induced chronic liver dysfunction mouse model.

J Vet Med Sci. 査読有 2012 May;74(5): 607-11.

Haraguchi T, Tani K, Koga M, Oda Y, Itamoto K, **Yamamoto N**, **Terai S**, Sakaida I, Nakazawa H, Taura Y.

Matrix metalloproteinases (MMPs) activity in cultured canine bone marrow stromal cells (BMSCs).

J Vet Med Sci. 査読有 2012 May;74(5): 633-6

Iwamoto T, **Terai S**, Mizunaga Y, **Yamamoto N**, Omori K, Uchida K, Yamasaki T, Fujii Y, Nishina H, Sakaida I.

Splenectomy enhances the anti-fibrotic effect of bone marrow cell infusion and improves liver function in cirrhotic mice and patients.

J Gastroenterol. 査読有 2012 Mar;47(3): 300-12.

DOI: 10.1007/s00535-011-0486-7.

[学会発表](計 17 件)

山本 直樹

肝線維化における骨髄由来肝臓修復細胞の特徴

第 14 回日本再生医療学会総会

2015 年 3 月 19 ~ 21 日

パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

高見 太郎

培養骨髄間葉系細胞投与における肝臓再生メカニズムの解明

第 14 回日本再生医療学会総会

2015 年 3 月 19 ~ 21 日

パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Takami Taro

Less invasive liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells with redox-regulatory capacity

65th The liver meeting AASLD

2014 年 11 月 7 ~ 11 日

Boston USA

Matsuda Takeshi

New canine cirrhotic model to develop a less invasive regeneration therapy using cultured autologous bone marrow derived cells

65th The liver meeting AASLD

2014 年 11 月 7 ~ 11 日

Boston USA

Takami Taro

Our regeneration therapies using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis

JDDW 2014 international symposium

2014 年 10 月 23 ~ 26 日

神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

松田 崇史

培養自己骨髄間葉系細胞投与の安全性・有効性および投与経路評価のためのイヌ肝線維化モデル

第 50 回日本肝臓学会総会

2014 年 5 月 29 ~ 30 日

ホテルニューオータニ東京(東京都赤坂)

白築 祥吾

骨髄由来及び脂肪組織由来間葉系幹細胞における生物学的特性の差異に関する検討

第 50 回日本肝臓学会総会

2014 年 5 月 29 ~ 30 日

ホテルニューオータニ東京(東京都赤坂)

高見 太郎

自己骨髄細胞による肝臓再生療法の取り組み

第 40 回日本肝臓学会西部会

2013 年 12 月 6 ~ 7 日

長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

Takami Taro

Basic studies for a less invasive liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells with stabilization of redox homeostasis

64th The liver meeting AASLD

2013 年 11 月 1 ~ 5 日

Washington DC USA

Takami Taro

Basic studies for a less invasive liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells with stabilization of redox homeostasis

20th JSRH

2013 年 9 月 26 ~ 27 日

大阪国際会議場(大阪)

高見 太郎

ヒト骨髄由来及び脂肪組織由来間葉系幹細胞における組織因子および IL-8 発現検討

第 49 回日本肝臓学会総会  
2013 年 6 月 6～7 日  
京王プラザホテル(東京都新宿)  
高見 太郎  
骨髄間葉系細胞による低侵襲肝修復療法  
のための基礎研究  
第 26 回肝臓洞壁細胞研究会学術集会  
2012 年 11 月 17～18 日  
ANA クラウンプラザホテル宇部(山口県宇  
部市)  
高見 太郎  
骨髄細胞投与による酸化ストレス制御を  
介した肝発癌抑制メカニズム解析  
第 20 回 JDDW 2012  
2012 年 10 月 10～13 日  
神戸国際会議場(兵庫県神戸市)  
Takami Taro  
Basic studies for the development of a  
less invasive liver regeneration therapy  
using thermoreactive organic inorganic  
nanocomposite gels cultured bone  
marrow derived cells  
10th ISSCR annual meeting  
2012 年 6 月 13～16 日  
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)  
高見 太郎  
肝硬変に対する有機 無機ナノハイブリ  
ットシステムによる低侵襲肝修復療法  
のための基礎研究  
第 12 回日本再生医療学会総会  
2012 年 6 月 10～12 日  
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)  
山本 直樹  
肝臓線維化環境における骨髄由来肝臓修  
復細胞の特徴  
第 12 回日本再生医療学会総会  
2012 年 6 月 10～12 日  
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)  
高見 太郎  
肝硬変に対する自己骨髄細胞投与療法に  
おける肝発癌への影響の基礎的検討  
第 12 回日本再生医療学会総会  
2012 年 6 月 10～12 日  
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

特記事項なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：ソラフェニブの副作用低減剤  
発明者：山本 直樹, 山崎 隆弘, 坂井田 功  
権利者：山口大学  
種類：特許  
番号：2012-243488  
出願年月日：2012 年 11 月 5 日  
国内外の別： 国内

取得状況(計 0 件)

特記事項なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ichinai-yamaguchi.jp/contents4/?categoryId=7>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 直樹 (YAMAMOTO, Naoki)

山口大学・大学教育機構・講師

研究者番号：90448283

(2)研究分担者

寺井 崇二 (TERAI, Shuji)

新潟大学・医歯学系研究科・教授

研究者番号：00332809

高見 太郎 (TAKAMI, Taro)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60511251

藤澤 浩一 (FUJISAWA, Koichi)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00448284

(3)連携研究者

なし