

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462096

研究課題名(和文)自己皮下脂肪由来間葉系幹細胞を用いた肝硬変症に対する革新的治療法の開発

研究課題名(英文)Development of Adipose derived mesenchymal stem cell therapy for liver cirrhosis

研究代表者

赤星 朋比古(Akahoshi, Tomohiko)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20336019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：背景と目的：近年、脂肪由来間葉系幹細胞(ADSC)は臨床治療における潜在的な用途があると報告されている。しかし、その詳細なメカニズムについては不明である。肝硬変ラットモデルを用いてラット肝硬変モデルへの治療効果を調べることを目的として実験的検討を行った。結果：実験的肝硬変ラットモデルにおいて、ADSC投与は、肝障害を軽減し、肝線維化を抑制した。線維症の進行を抑制した。しかし、ADSCのHGFをノックダウンした後、ADSCの効果は減弱した。結論：bFGF付加培地にて培養したADSCは、HGFを介して肝損傷と線維症の改善に重要な役割を果たしている

研究成果の概要(英文)：Background:Recent studies show that adipose tissue-derived mesenchymal stem cells(ADSC) have potential clinical applications. Here, we investigated the effect of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells infusion on a liver fibrosis rat model and elucidated the underlying mechanism.Result:bFGF treatment markedly improved the proliferation, differentiation, and hepatocyte growth factor expression ability of ADSC. Although ADSC infusion alone slightly ameliorated liver functions and suppressed fibrosis progression, bFGF-treatment significantly enhanced the therapeutic effect in association with elevated hepatocyte growth factor expression. Co-culture with ADSC led to induction of hepatic stellate cell apoptosis and enhanced hepatocyte proliferation. Mechanism investigation revealed that co-culture with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells activated c-jun N-terminal kinase-p53 signaling in hepatic stellate cell and promoted apoptosis.

研究分野：消化器外科

キーワード：間葉系幹細胞 肝硬変 幹細胞治療 門脈圧亢進症

1. 研究開始当初の背景

肝硬変は、肝障害で肝臓にびまん性の線維増生と再生結節の形成により肝小葉が改築された状態である。肝硬変は一般的に不可逆性の変化とされている。肝硬変になると、高率に癌が発生することが知られており、予後を左右する。現状で治療は肝移植しかないが、ドナー不足、免疫拒絶など問題あり、新しい治療法の開発が望まれている。

間葉系幹細胞は、軟骨損傷、心不全、肝硬変患者を対象として近年、研究が多く報告されている。また、肝硬変治療にもその有用性が、動物実験モデルにて報告されていますが、その治療のメカニズムはまだ完全に解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、脂肪由来間葉系幹細胞の肝硬変治療の可能性とそのメカニズムについて明らかにし、ヒト臨床においても応用可能な細胞培養システムと投与方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

研究項目 1：脂肪由来間葉系幹細胞(ADSC)の肝硬変治療効果に関する研究

ADSC の採集方法は、鼠径部皮下脂肪組織を採取して、コラゲナーゼにより脂肪組織を分解し、遠心分離によって細胞ペレットを回収し、フラスコに播種した。10%血清を含む aMEM 培地で培養。次に、1.0 mg/kg 四塩化炭素週 2 回 8 週間で腹腔内投与により、肝硬変ラットを作製し、Basic FGF 添加培養した ADSC を三回投与群、一回投与群、basic FGF 添加していない ADSC 投与群、PBS 投与群に分けて、ADSC を投与して、血液検査と肝組織の組織学を解析した。最後に、ADSC 投与による肝硬変治療メカニズムを解明するため、ラット肝細胞と星細胞を採集し、ADSC と共培養により、ADSC が肝細胞および星細胞に与える影響について検討した。

4. 研究成果

研究課題 1：脂肪由来間葉系幹細胞(ADSC)の肝硬変治療効果に関する研究

1. 多能性幹細胞の同定：採集された細胞が脂肪分化と軟骨分化できることをそれぞれの分化培地にて確認した。細胞表面マーカーの発現により、ADSC であることを確認した。ADSC の同定

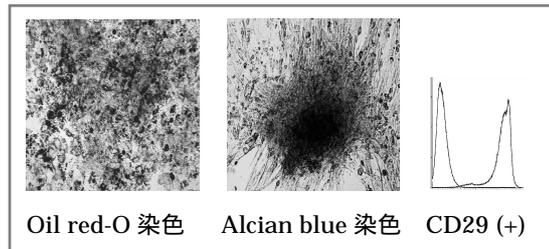


図 1. ADSC の脂肪分化、軟骨分化と表面マーカーについて検討

2. 肝硬変ラットへの ADSC 投与と治療効果の検討: ADSC 投与により、肝組織線維化面積が減少した。また、bFGF 添加培養は、ADSC の抗線維化効果を増強した。この抗線維化効果は、3 回投与でさらに増強した。(図 2)

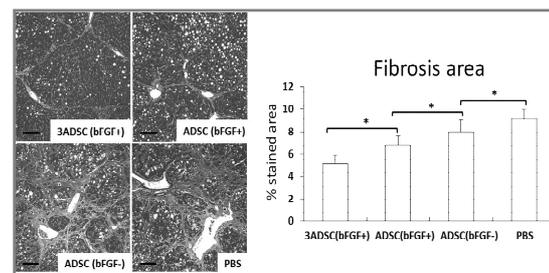


図 2. 肝線維化の評価

3. 各組織における ADSC の分布についてバイオイメージングによる ADSC の臓器分布、蛍光免疫染色により、PKH26 にて標識した ADSC の細胞追跡を行ったところ、投与 3 日目において、細胞は一部肺にも存在していたが、肝硬変ラットの肝臓の主に門脈域を中心に細胞の局在を認めた。肝硬変ラットと正常ラットを比較すると、有意に肝硬変ラットに於いて、投与された ADSC は肝臓に集積していた。

4 .ADSC の肝硬変治療効果のメカニズムについての検討：肝線維化の改善するメカニズムを解明するために、ADSC と肝細胞および肝星細胞を用いて共培養実験を行った。

ADSC は肝細胞の増殖と肝星細胞の細胞死を促進することが分かった。(図3)

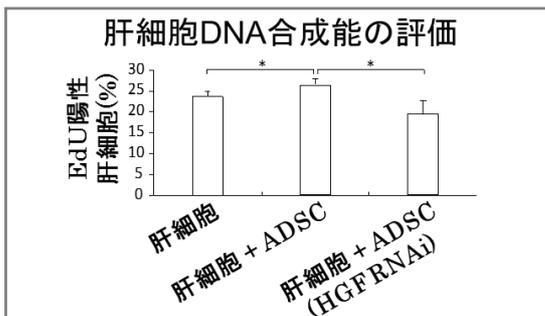


図3 . ADSC が肝細胞に与える影響について
ADSC 由来の HGF は肝細胞の増殖を促進した。

5 .ADSC と肝星細胞および肝細胞との共培養システムにおける検討。

ADSC 由来の HGF は星細胞のアポトーシスを誘導した。また ADSC の HGF を knock down すると共培養にてえられた結果が減弱することが分かった。さらに western blot 法により ADSC による肝星細胞の細胞死には図5のようなメカニズムがあることを確認した。

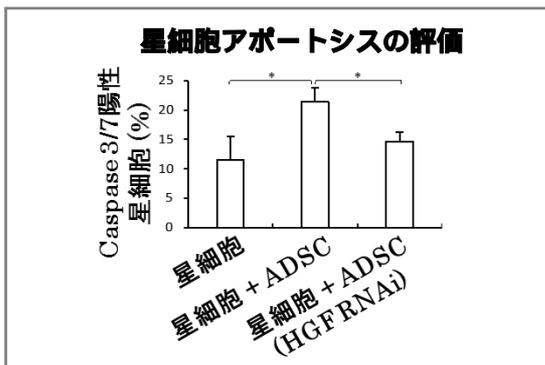


図4 . ADSC が星細胞に与える影響について
ADSC 由来の HGF は星細胞のアポトーシスを誘導した。

考察

骨髄細胞投与により肝硬変症の改善効果があるとして基礎的実験がすすめられ、臨床応用が本邦でも進行中である。しかしながら骨髄採取は侵襲的な方法であり、より低侵襲な方法が望まれる。本方法は、皮下の

脂肪組織から投与する幹細胞を採取することができ、人への応用をする場合、入院しなくても局所麻酔で可能である。また、われわれは採取した幹細胞をより増殖するために bFGF の培養液を添加したが、bFGF の非投与群に比べ HGF の発現が高かった。HGF はこれまで、肝星細胞に対しては細胞死(アポトーシス)を促進し肝線維化の改善に寄与するとの報告がある^{3,4}。

脂肪由来幹細胞は、培養が比較的容易であり、培養を行いながら、反復投与が可能である。今後臨床応用に有用と考えられる。

5. 結論

脂肪由来間葉系幹細胞は、肝硬変ラットにおいて局所での HGF を介して肝硬変の改善に寄与している可能性が示唆された。

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21件)

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 2014; 44(4):633-639.

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. 2014; 26(2): 172-177

Akahoshi T, Uehara H, Tomikawa M, Kawanaka H, Hashizume M, Maehara Y : Comparison of open, laparoscopic, and hand-assisted laparoscopic devascularization of the

upper stomach and splenectomy for treatment of esophageal and gastric varices: A single-center experience. Asian J Endosc Surg. 2014; 7(2):138-144

Nakadate R, Kenmotsu H, Arata J, Oguri S, Uemura M, Byunghyun C, Akahoshi T, Ikeda T, Ohuchida K, Hashizume M: Mechanically connected master-slave laparoscopic device: low friction, low inertia prototype. Int J CARS 2014; 9:147-148

Ohuchida K, Nagai E, Ieiri S, Akahoshi T, Ikeda T, Tanaka M, Hashizume M : New advances in three-dimensional endoscopic surgery. Medical science. 2014 (in press)

Nakadate R, Nakamura S, Moriyama T, Kenmotsu H, Oguri S, Arata J, Uemura M, Ohuchida K, Akahoshi T, Ikeda T, Hashizume M : Gastric endoscopic submucosal dissection using novel 2.6-mm articulating devices: an ex vivo comparative and in vivo feasibility study. Endoscopy. 2014 (in press)

Kasagi Y, Saeki H, Akahoshi T, Kawasaki J, Ando K, Oki E, Ohga T, Tomikawa M, Kakeji Y, Shirabe K, Maehara Y. : Non-cirrhotic portal-systemic encephalopathy caused by enlargement of a splenorenal shunt after pancreaticoduodenectomy for locally advanced duodenal cancer: report of a case. Surg Today. 2014; 44(8): 1573-1576

Kinjo N, Kawanaka H, Akahoshi T, Matsumoto Y, Kamori M, Nagao Y, Hashimoto N, Uehara H, Tomikawa M, Shirabe K, Maehara Y. : Portal vein thrombosis in liver cirrhosis. World J Hepatol. 2014; 27;6(2):64-71

赤星朋比古、川中博文、池田哲夫、橋爪 誠 : b) 腹空鏡下脾摘除術のピットフォールと対策. 「外科」2014 : 76 (12) 1447-1455

川中博文、赤星朋比古、金城 直、吉田大輔、橋本直隆、上原英雄、松本佳大、吉屋匠平、

別城悠樹、伊藤心二、二宮瑞樹、山下洋市、池上 徹、吉住朋晴、富川盛雅、調 憲、前原喜彦：肝硬変症における脾摘術後の門脈血行動態の変化からみた肝脾相関についての検討 . 日本門脈圧亢進症学会雑誌 2014:20(1):24-31

赤星朋比古、橋爪 誠 : 門脈圧亢進症 . medicina 2014: 51(1) 82-86

赤星朋比古、橋爪 誠 : 食道胃静脈瘤に対する治療の変遷と外科的治療の意義. 消化器内科 2014 : 59(2):164-170

赤星朋比古、橋爪 誠 : 肝硬変ラットモデルにおける脂肪由来間葉系幹細胞投与の治療効果についての検討. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業平成 26 年度報告書 : 2014

Tang WP, Akahoshi T, Piao JS, Narahara S, Murata M, Kawano T, Hamano N, Ikeda T, Hashizume M : Basic fibroblast growth factor-treated adipose tissue-derived mesenchymal stem cell infusion to ameliorate liver cirrhosis via paracrine hepatocyte growth factor. J Gastroenterol Hepatol 2015 : 30(6):1065-1074

Akasaki Y, Sugimori H, Momii K, Akahoshi T, Matuura S, Iwamoto Y, Maehara Y, Hashizume M : A Simple predictive formula for the Blood Requirement in Patients with High-energy Blunt Injuries Transferred within One Hour Post-trauma. Acute care medicine and surgery. 2015 (in Press)

Uemura M, Sakata K, Tomikawa M, Nagao Y, Ohuchida K, Ieiri S, Akahoshi T, Hashizume M : Novel Surgical Skill Evaluation with Reference to Two-handed Coordination. Fukuoka Acta Med. 2015: 106 (7) :213-221

Tang WP, Akahoshi T, Piao JS, Narahara S, Murata M, Kawano T, Hamano N, Ikeda T, Hashizume M : Splenectomy enhances the therapeutic effect of adipose

tissue-derived mesenchymal stem cell infusion on liver cirrhosis rats. Liver international. 2015: (in press)

Kotani K, Kawabe J, Morikawa H, Akahoshi T, Hashizume M, Shiomi S: Comprehensive Screening of Gene Function and Networks by DNA Microarray Analysis in Japanese Patients with Idiopathic Portal Hypertension. Mediators of Inflammation. 2015: (in press)

Kawanaka H, Akahoshi T, Kinjo N, Harimoto N, Itoh S, Tsutsumi N, Matsumoto Y, Yoshizumi T, Shirabe K, Maehara Y: Laparoscopic Splenectomy with Technical Standardization and Selection Criteria for Standard or Hand-Assisted Approach in 390 Patients with Liver Cirrhosis and Portal Hypertension. J Am Coll Surg. 2015: 221(2):354-366

Sumida K, Chong Y, Miyake N, Akahoshi T, Yasuda M, Shimono N, Shimoda S, Maehara Y, Akashi K: Risk Factors Associated with Stenotrophomonas maltophilia Bacteremia: A Matched Case-Control Study. PLoS One. 2015: 24;10(7):e0133731.

赤星朋比古、富川盛雅、橋爪 誠: 突発性門脈圧亢進症. 小児外科 2015: 47 (3) : 273-276

〔学会発表〕(計9件)

1. 赤星朋比古: 門脈圧亢進症に対する腹腔鏡下脾臓摘出術の意義 - 肝臓と脾臓との相関について -. 第 27 回日本小児脾臓研究会、2014 年 3 月 1 日、熊本 (特別講演)

2. 赤星朋比古: 肝硬変症における肝脾相関 腹腔鏡下脾臓摘出術の視点から . 第 3 回脾臓研究会、2014 年 4 月 26 日、東京 (特別講演)

3. 赤星朋比古、川中博文、松本佳大、富川盛雅、橋爪 誠、前原喜彦: 脾硬度の門脈圧亢進症における意義に関する臨床および実験

的検討. 第 21 回日本門脈圧亢進症学会総会、2014 年 9 月 13 日、東京 (要旨演題)

4. 赤星朋比古、川中博文、富川盛雅、橋爪 誠: 門脈圧亢進症における腹腔鏡下脾臓摘出術および胃上部血行遮断術. 第 21 回日本門脈圧亢進症学会総会、2014 年 9 月 12 日、東京 (教育セミナー)

5. 赤星朋比古、川中博文、安田光広、橋爪 誠、前原喜彦: 腹腔鏡下脾臓摘出術の latest modern technique と Acute care surgery への展望. 第 6 回日本 Acute Care Surgery 学会学術集会、2014 年 9 月 21 日、青森 (一般)

6. 赤星朋比古: 教育セミナー 腹腔鏡下脾臓摘出術. 第 22 回日本門脈圧亢進症学会、2014 年 9 月 12 日、東京 (教育セミナー)

7. 赤星朋比古、川中博文、前原喜彦: 胃静脈瘤に対する治療戦略と難治例における外科治療の意義. 第 88 回日本内視鏡学会総会、2014 年 10 月 24 日、神戸 (シンポジウム)

8. 赤星朋比古、池田哲夫、川中博文、橋爪 誠、前原喜彦: 門脈大循環シャントによる肝性脳症に対する Balloon retrograde transvenous obliteration (B-RTO) の治療成績. 第 51 回日本肝臓学会総会、2015 年 5 月 22 日、熊本

9. 赤星朋比古、川中博文、橋爪 誠: 脾臓が門脈循環および肝機能に及ぼす影響についての検討. 第 23 回日本消化器関連学会週間 (JDDW), 2015 年 10 月 8 日、東京 (パネルディスカッション)

〔図書〕(計3件)

1. 赤星朋比古、橋爪 誠: 食道バルーンタンポナーデによる止血. 治療 1. 処置および治療: 消化器病治療 第 2 版 医学書院 2014: 321-323 (分担執筆)

2. 赤星朋比古、川中博文、池田哲夫、橋爪 誠: 特集: 消化器外科手術ピットフォールとリカバリーショット. II. 各論 6. 脾 b) 腹腔鏡下脾摘術のピットフォールと対策. 外科 (2014 年 11 月 増刊) 別冊 南江堂

2014 : 76(12):1447-1455

3. Hashizume M, Tomikawa M, Akahoshi T :

Laparoscopic Gastric Devascularization
and Splenectomy for Portal Hypertension.

Atlas of Laparoscopic Hepato-

Pancreato-Biliary Surgery. Cine-Med 2015

〔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

赤星 朋比古 (Akahoshi Tomohiko)

九州大学大学院・医学研究院・准教授

研究者番号 : 20336019

(2)研究分担者

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

(3) 研究分担者

村田 正治 (Murata Masaharu)

九州大学大学院・医学研究院・准教授

研究者番号 : 30304744

(4) 研究分担者

富川 盛雅

九州大学大学院・医学研究院・

特任准教授

研究者番号 : 60325454