

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460995

研究課題名(和文) 脂肪組織由来間質細胞群の細胞分画特性解析と肝修復再生療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of characteristics of cellular subfractions in adipose tissue-derived stromal cells for development of liver repair/regenerative therapy

研究代表者

酒井 佳夫 (Sakai, Yoshio)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：80401925

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)：本研究では、マウス非培養脂肪組織由来間質細胞群の細胞分画を解析し、その特性を検討した。また、マウス肝疾患モデルを用いて、肝疾患状態に対する効果を検討した。非培養脂肪組織由来間質細胞群には、約10～20%のCD45陽性細胞が存在した。CD45陽性細胞は、表面抗原発現解析、遺伝子発現より、M2フェノタイプマクロファージ様の特性を有することを明らかとした。急性肝炎マウスに対する非培養脂肪由来間質細胞群、間質細胞群のCD45陽性細胞分画の投与による治療効果を確認した。非培養脂肪組織由来間質細胞群のCD45陽性細胞分画の炎症修飾能における重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the cellular fractions of murine uncultured adipose tissue derived stromal cells and assessed their characteristics. In addition, we investigated their effect on the liver disease condition using murine liver disease models. We found that the 10-20% of uncultured adipose tissue-derived stromal cells expressed CD45 antigen. CD45+ cells were disclosed to be characteristics of M2 phenotype macrophage in view of surface antigen analysis as well as gene expression analysis. Administration of the entire uncultured adipose tissue derived stromal cells and their CD45+ fraction were effective to acute murine hepatitis. Thus, these results indicated that the relative importance of CD45+ cellular fraction of the uncultured adipose tissue derived stromal cells in the context of their immunomodulatory effect.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肝臓学 肝再生 脂肪組織由来間質細胞

1. 研究開始当初の背景

肝臓は、生体で最大の代謝機能を担い、生命活動の維持に極めて重要な臓器である。慢性肝疾患には、B型・C型の慢性ウイルス性肝炎、非アルコール性脂肪肝炎、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変等がある。我が国における慢性肝疾患の人口は大きく、C型肝炎ウイルス感染者およびB型肝炎ウイルス感染者は、約180万人および約130万人、また、現在の国民的健康課題である生活習慣病に多くみられる非アルコール性脂肪性肝炎の患者数は、約100万人と推測される。慢性肝疾患は、持続する肝内炎症に伴い肝線維化が進展し、肝硬変に至る。我が国における肝硬変の患者数は約40～50万人と推定され非常に大きい。肝硬変は、末期的には代謝機能が破綻し、致命的な肝不全に至る。また肝硬変状態は、予後を悪化させる肝癌発生の高危険状態であり、C型肝炎硬変の場合の肝癌発症率は、年率7%にのぼる。肝硬変の唯一の根治的治療は肝移植であるが、肝移植実施数は待機患者数に比し著しく少ない。2011年の改正臓器移植法全面施行後も脳死肝移植数増加は限定的であり、健常者ドナーへの侵襲の問題がある生体肝移植が現在も主に行われている。また、移植レシピエントは免疫抑制剤の継続投与が必要であり、QOLが低下する。よって肝移植を回避すべく、進行した慢性肝疾患、肝硬変に対して、肝臓の慢性炎症の抑制、線維化の改善、肝予備能を改善する新たな治療法の確立が切望されている。

2. 研究の目的

脂肪組織の間質細胞は、多分化能、炎症修飾能を有する間葉系幹細胞を含有する多様な細胞群である。脂肪組織は、骨髄組織とともに、培養せずに自己由来の間葉系幹細胞を比較的豊富に含む間質細胞を獲得できる組織である。アクセス採取が比較的容易な脂肪組織由来間質細胞を用いた臓器修復再生療法の基礎研究・臨床研究が国内外で行われている。これまでに申請者は、肝疾患に対する脂肪組織由来間質細胞を用いた肝修復再生療法開発の基礎研究および臨

床研究を行ってきた。基礎研究では、非アルコール性脂肪性肝炎による肝硬変マウスモデルにおける脂肪組織由来間質細胞投与による肝修復再生治療効果とその機序 (Hepatology 2013 vol.58, p.1133-42) およびマウス急性肝炎モデルにおける脂肪組織由来間質細胞投与による治療効果とその抗炎症効果の機序を解明し、報告した (Eur J Immunol 2013 in press) 。また、肝再生療法実用化にむけた安全性臨床試験として、「肝硬変に対する自己脂肪組織由来間質細胞の経肝動脈投与による肝再生療法の臨床研究」を厚生労働省ヒト幹審査委員会の承認を得て実施した (Regenerative Therapy 2017) 。脂肪組織由来間質細胞を用いた肝再生療法実現のため、これらの研究に加え、脂肪組織由来間質細胞群の細胞分画の修復再生効果における特性を解明し、治療効果を促進する細胞群調製法の開発促進に重要である。本研究では、脂肪組織由来間質細胞群の細胞分画を分類し、その細胞群の特徴を解析した。また、マウス肝疾患モデルを用いて生体での治療効果を解析し、肝修復再生療法に有用な細胞分画を同定し、肝修復再生効果向上のための細胞群調製法開発への基盤的知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

C57BL/6JマウスあるいはGFPトランスジェニックマウス (10-12週齢、雄) の鼠径部より脂肪を採取し、Collagenase type I 処理により間質細胞を分離し、非培養脂肪組織由来間質細胞群を獲得した。Flow Cytometryにて細胞表面抗原発現を解析した。獲得した脂肪組織由来間質細胞群のCD45陽性細胞とCD45陰性細胞をセルソーターにて分離し、RNAを抽出、DNAマイクロアレイにより遺伝子発現解析を実施した。獲得した脂肪組織由来間質細胞とマウス脾細胞をConA刺激下に共培養し、脾細胞の遺伝子発現をリアルタイム定量PCRにて評価した。非培養脂肪組織由来間質細胞群について、急性肝炎マウスモデルに対する治療効果を検討した。急性肝炎マウスモデルは、C57Bl/6マウス (10-12週齢、雌) に

Concanavalin A 300 μg を尾静脈投与して作成した。Concanavalin A 投与後 3 時間後に、非培養マウス脂肪組織由来間質細胞を 1×10^5 個投与したマウスについて、Concanavalin A 投与後 24 時間において血清を採取、血清 AST、ALT、LDH 活性を測定した。また、C57Bl/6J マウスの腹腔内に Dimethylnitrosamine を 2 回/週、4 週間投与したマウスへ、 4×10^5 個の獲得した非培養 GFP トランスジェニックマウス脂肪組織由来間質細胞群を、経脾的に投与し、血清 ALT、LDH を経時的に測定した。また、細胞投与 7 日後に肝組織を採取し、GFP に対する免疫染色を行った。

4. 研究成果

獲得した非培養脂肪組織由来間質細胞群において、間葉系幹細胞に関連する抗原 CD105、CD44、CD90、CD73 はそれぞれ 15.4%、6.5%、40.3%、16.1% の細胞が発現、また、白血球全般に発現する CD45 は 14.3%、血管内皮細胞に発現する CD31 は 21.6%、未成熟血液細胞において発現する CD34 は、11.4% の細胞に発現を認めた。Concanavalin A 投与後 3 時間後に、非培養マウス脂肪組織由来間質細胞を投与したマウスにおいて、細胞を投与しないマウスと比較して、血清 AST、ALT、LDH 活性は有意に低値を示した。Dimethylnitrosamine を 4 週間投与したマウスへ、 4×10^5 個の非培養マウス脂肪組織由来間質細胞を投与後 1 日、11 日後において、血清 ALT、LDH 活性値の上昇は認めず、非培養マウス脂肪組織由来細胞群の慢性肝疾患状態での投与の安全性が確認された。細胞投与 7 日後の肝組織において、炎症細胞集簇部位に GFP 陽性細胞を認め、投与非培養マウス脂肪組織由来細胞の炎症部位への集積が示された。非培養脂肪組織間質細胞群の CD45 陽性細胞では、約 50% に CD68 が発現し、さらにその 90% が CD206 を発現し、M2 フェノタイプマクロファージ様特徴が示唆された。リアルタイム定量 PCR による遺伝子発現解析では、非培養脂肪組織間質細胞群の CD45 陽性細胞で、CD45 陰性細胞と比較して、Il1b, Tnf,

Il23a, Cd80, Il6, Nos2, Il12a, Il12b の発現が低下し、CD206、Ccl22, Ccl24 の発現が亢進し M2 マクロファージの遺伝子発現型が示唆された。非培養脂肪組織間質細胞群の CD45 陽性細胞と CD45 陰性細胞での DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析では、CD45 陽性細胞で 2884 遺伝子が発現上昇、3838 遺伝子が発現減弱を示した。発現上昇した遺伝子は、免疫制御に、発現減弱した遺伝子は発生形成に関連を示した。非培養脂肪組織由来間質細胞とマウス脾細胞を ConA 刺激下に共培養したところ、Ccl3, Tnf, Ifng の発現が低下した。ConA 急性肝炎マウスに非培養脂肪組織間質細胞群の CD45 陽性細胞を投与したところ、血清 ALT 値の低下を認めた。

これらの結果より、非培養の脂肪組織由来間質細胞は、炎症部位へ集積し抗炎症作用があること、細胞群中の CD45 陽性細胞は、免疫制御作用のある M2 マクロファージ様の効果があり、本分画の重要性が示唆された。

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 16 件)

1. Sakai Y, Takamura M, Seki A, Sunagozaka H, Terashima T, Komura T, Yamato M, Miyazawa M, Kawaguchi K, Nasti A, Mochida H, Usui S, Otani N, Ochiya T, Wada T, Honda M, Kaneko S. Phase I clinical study of liver regenerative therapy for cirrhosis by intrahepatic arterial infusion of freshly isolated autologous adipose tissue-derived stromal/stem (regenerative) cell. Regenerative Therapy 6C (2017) pp.52-64. 査読有
2. Takegoshi K, Honda M, Okada H, Takabatake R, Matsuzawa-Nagata N, Campbell JS, Nishikawa M, Shimakami T, Shirasaki T, Sakai Y, Yamashita T, Takamura T, Tanaka T, Kaneko S.

Branched-chain amino acids prevent hepatic fibrosis and development of hepatocellular carcinoma in a non-alcoholic steatohepatitis mouse model. *Oncotarget*. 2017 14;8(11):18191-18205. 査読有

3. Adipose-derived regenerative cells exert beneficial effects on systemic responses following myocardial ischemia/reperfusion. Takamura M, Usui S, Inoue O, Ootsuji H, Takashima SI, Nomura A, Kato T, Murai H, Furusho H, Sakai Y, Kaneko S. *Cardiol J*. 2016 ; 23(6) 685-693. 査読有

4. Response to chemotherapy improves hepatic reserve for patients with hepatocellular carcinoma and Child-Pugh B cirrhosis. Terashima T, Yamashita T, Arai K, Kawaguchi K, Kitamura K, Yamashita T, Sakai Y, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. *Cancer Sci*. 2016;107(9):1263-9. 査読有

5. Jagged1 DNA Copy Number Variation Is Associated with Poor Outcome in Liver Cancer. Kawaguchi K, Honda M, Yamashita T, Okada H, Shirasaki T, Nishikawa M, Nio K, Arai K, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. *Am J Pathol*. 2016 ;186(8):2055-67. 査読有

6. Localizatoin of Xenobiotic Transporter OCTN1/SLC22A4 in Hepatic Stellate Cells and Its Protective Role in Liver Fibrosis. Tang Y, Masuo Y, Sakai Y, Wakayama T, Sugiura T, Harada R, Futatsugi A, Komura T, Nakamichi N, Sekiguchi H, Sutoh K, Usumi K, Iseki S, Kaneko S, Kato Y. *J Pharm Sci*. 2016;105(5):1779-89. 査読有

7. Hepatitis B Virus (HBV) Core-Related

Antigen During Nucleos(t)ide Analog Therapy Is Related to Intra-hepatic HBV Replication and Development of Hepatocellular Carcinoma. Honda M, Shirasaki T, Terashima T, Kawaguchi K, Nakamura M, Oishi N, Wang X, Shimakami T, Okada H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. *J Infect Dis*. 2016 ;213(7):1096-106. 査読有

8. Altered gene expression in T-cell receptor signalling in peripheral blood leucocytes in acute coronary syndrome predicts secondary coronary events. Takashima S, Usui S, Kurokawa K, Kitano T, Kato T, Murai H, Furusho H, Oda H, Maruyama M, Nagata Y, Usuda K, Kubota K, Takeshita Y, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Takamura M. *Open Heart*. 2016 Jun 30;3(1):e000400. 査読有

9. Terashima T, Yamashita T, Takata N, Nakagawa H, Toyama T, Arai K, Kitamura K, Yamashita T, Sakai Y, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. carcinoma treated by sorafenib. *Hepatol Res*. 2016 ;46(7):650-6. 査読有

10. Okada H, Honda M, Campbell JS, Takegoshi K, Sakai Y, Yamashita T, Shirasaki T, Takabatake R, Nakamura M, Tanaka T, Kaneko S. Inhibition of microRNA-214 ameliorates hepatic fibrosis and tumor incidence in platelet-derived growth factor C transgenic mice. *Cancer Sci*. 2015 ;106(9):1143-52. 査読有

11. Komura T, Sakai Y, Harada K, Kawaguchi K, Takabatake H, Kitagawa H, Wada T, Honda M, Ohta T, Nakanuma Y, Kaneko S. Inflammatory features of pancreatic cancer highlighted by monocytes/macrophages and CD4+ T

cells with clinical impact. *Cancer Sci.* 2015 ;106(6):672-686. 査読有

12. Terashima T, Yamashita T, Iida N, Yamashita T, Nakagawa H, Arai K, Kitamura K, Kagaya T, Sakai Y, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. Blood neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with hepatic arterial infusion chemotherapy. *Hepatol Res.* 2015;45: 949-959. 査読有

13. Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Impaired interferon signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the transforming growth factor beta signaling pathway. *Hepatology.* 2014;60(5):1519-30. 査読有

14. Nakade Y, Toyama T, Furuichi K, Kitajima S, Ohkura N, Sagara A, Shinozaki Y, Hara A, Kitagawa K, Shimizu M, Iwata Y, Oe H, Nagahara M, Horita H, Sakai Y, Kaneko S, Wada T. Impact of kidney function and urinary protein excretion on pulmonary function in Japanese patients with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 2014 ;18(5):763-9. 査読有

15. Honda M, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. *Hepatology.* 2014 Mar;59(3):828-38. 査読有

16. Komura T, Taniguchi T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Noda T, Okajima M, Kaneko S. Efficacy of Continuous Plasma Diafiltration Therapy in critical Patients with Acute Liver Failure. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014 Apr;29(4):782-6. 査読有

〔学会発表〕(計10件)

1. AASLD, The Liver Meeting 2016. 11.12. Boston Poster. Clinical study of liver regenerative therapy of cirrhosis using autologous adipose tissue derived stromal cells and the characterization of the obtained stromal cells. ID1194. Y. Sakai, A. Seki, H. Sunagozaka, T. Terashima, K. Kawaguchi, G.B. Buffa, M. Honda, S. Kaneko.

2. APDW 2016 2016.11.4 Kobe. Poster. Clinical study of liver regenerative therapy of cirrhosis using autologous adipose tissue-derived stromal cells and the biological characters of the obtained cells. Yoshio Sakai, Akihiro Seki, Hajime Sunagozaka, Takeshi Terashima, Hatsune Mochida, Alessandro Nasti, Masatoshi Yamato, Kousuke Ishida, Masao Honda, Shuichi Kaneko.

3. JDDW 2016 (神戸) 平成 28 年 11 月 4 日 (金) シンポジウム S4-8 「肝硬変に対する自己脂肪組織由来再生 (幹) 細胞を用いた安全性臨床試験」酒井佳夫、関 晃裕、金子周一

4. 第 102 回日本消化器病学会総会 2016 年 4 月 22 日 (金) (東京) WS2-4 「自己脂肪組織由来間質細胞の経肝動脈投与による肝硬変療法臨床開発」酒井佳夫、関 晃裕、金子周一

5. 25th APASL 2016.2.23 (東京) Clinical trial for liver regenerative therapy of cirrhosis using adipose tissue-derived

stromal/stem cells. Yoshio Sakai, Akihiro Seki, Hajime Sunagozaka, Masayuki Takamura, Soichiro Usui, Masao Honda, Shuichi Kaneko.

6. 第 51 回日本肝臓学会総会 2015 年 5 月 22 日(金)(熊本) WS6-6 「肝疾患マウスモデルを用いた脂肪組織由来間葉系幹細胞による肝再生治療効果と機序の検討」酒井佳夫、関 晃裕、金子 周一。

7. AASLD The Liver Meeting 2015.11.14. San Francisco, CA. CD45+ fraction in murine adipose tissue-derived stromal cells is therapeutical to Concanavalin A-induced murine acute hepatitis model. Akihiro Seki, Yoshio Sakai, Masatoshi Yamato, Kosuke Ishida, Hisashi Takabatake, Alessandro Nasti, Masao Honda, Shuichi Kaneko.

8. AASLD The Liver Meeting 2015 Poster presentation #947, November 15, 2015. Adipose tissue-derived stromal cells preventatively suppressed pathological progression of murine non-alcoholic steatohepatitis model. Masatoshi Yamato, Yoshio Sakai, Hatsune Mochida, Akihiro Seki, Kosuke Ishida, Masao Honda, Shuichi Kaneko.

9. 第 41 回日本肝臓学会西部会 ワークショップ(名古屋)平成 27 年 12 月 3 日「肝硬変に対する自己脂肪組織由来間質細胞の経肝動脈投与による肝再生療法の臨床試験」酒井佳夫、関晃裕、砂子阪 肇、高村雅之、金子周一

10. 第 50 回日本肝臓学会総会(東京) ワークショップ、平成 26 年 5 月 29 日、WS2-6 「前臨床非アルコール性肝炎肝硬変マウスモデルに対する脂肪組織由来間質細胞投与による肝修復再生治療効果の検討」酒井佳夫、関 晃裕、東元真実、吉田佳子、ナスティ・アレッサンドロ、小村卓也、本多政

夫、金子周一

〔図書〕(計 2 件)

1. 酒井佳夫、金子周一. 脂肪組織由来再生(幹)細胞による肝再生治療法の開発. 「再生医療等製品の開発と実用化展望」 p.113-p.122. 2016 年 6 月シーエムシー出版刊

2. 酒井佳夫、関 晃裕、金子周一. 肝硬変に対する自己脂肪組織由来間質細胞の経肝動脈投与による肝再生療法. 日本臨床 2015 年、73 巻増刊号 6 p.492-498.

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

酒井 佳夫(SAKAI, Yoshio)(金沢大学医薬保健研究域医学系准教授)

研究者番号: 80401925

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

関 晃裕(SEKI, Akihiro)(金沢大学附属病院、現 Mount Sinai School of Medicine of New York University)

大和 雅敏(YAMATO, Masatoshi)(金沢大学医薬保健学総合研究科恒常性制御学大学院生)

ナスティ・アレッサンドロ(NASTI, Alessandro)(金沢大学医薬保健学総合研究科恒常性制御学大学院生)

吉田 佳子(YOSHIDA, Keiko)(金沢大学技術補佐員)