

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月19日現在

機関番号：	15501
研究種目：	基盤研究(B)
研究期間：	2010～2012
課題番号：	22390150
研究課題名（和文）	骨髄由来肝臓修復細胞を用いた次世代型細胞遺伝子治療法の開発のための基盤研究
研究課題名（英文）	The basic research of the development of future generation cell therapy used bone marrow derived liver repaid cell
研究代表者	
	寺井 崇二 (TERAI SHUJI)
	山口大学・大学院医学系研究科・准教授
	研究者番号：00332809

研究成果の概要（和文）：我々はこれまで骨髄細胞投与により肝線維化が改善し、骨髄細胞には肝臓を修復する機能があり、治療応用の可能性を示してきた。今回、骨髄由来 Liver Repair cell の特徴を示し、ヒトでは骨髄由来間葉系細胞の有用性、マウスではマクロファージ系細胞の有用性が明らかになった。また TNF type1 receptor KO マウスや Maid KO マウスの解析により骨髄由来細胞を用いた肝修復再生過程において TNF および Maid シグナルの重要性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Our researches showed that autologous bone marrow derived cells (BMCs) were useful for liver regeneration therapy for liver cirrhosis. In these projects, we estimated characterization of bone marrow derived liver repair cells and demonstrated the mechanisms of liver repair by BMCs. We found that macrophage was effective to improve liver fibrosis in mice. In this project, we found that TNF signal is important to induce liver repair by BMC infusions. We found that bone marrow derived mesenchymal cells might be a new candidate-cell-fraction to repair liver fibrosis. Both TNF and Maid signal are important to regulate improvement of liver fibrosis by BMC infusion. These results are important to develop a new cell therapy using BMCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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：再生医療、骨髄細胞、Maid KO、TNFR1 KO、肝臓修復、HTVi 法

1. 研究開始当初の背景

肝線維化の進行には肝星細胞が中心的な役割を果たすと考えられており、従来この細胞をターゲットとした創薬研究が進められてきた。また肝線維化の進行とともに肝発癌が起こる可能性が高いため、この制御は臨床上一極めて重要な問題である。またこの進行の

過程の中で肝癌前駆細胞より起こる肝発癌制御は肝疾患患者の予後を伸ばす上でも重要である。我々は、**骨髄細胞から肝細胞への分化評価モデル(GFP/CC14モデル)**を開発し、骨髄細胞が持続炎症のある硬変肝に遊走され、肝臓内で増殖することを明らかにし（JB 2003、特公 2003-70377）、さらに肝機能と生

存率の回復、肝線維化の改善等骨髄細胞投与により修復されることを明らかにした (Hepatology 2004)。さらに肝硬変症患者に対する肝移植に代わる治療法を実用化するために平成 15 年 11 月 14 日に世界初の臨床研究『肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法 Autologous Bone Marrow Cell infusion (ABMi) therapy』の Phase I 臨床研究を開始した。さらに本治療を行うと、臨床研究においても骨髄細胞投与後に肝線維化が改善していることが明らかになってきている。この結果、従来の薬物ではなく骨髄細胞中に肝臓修復機能を持つ細胞(肝臓修復細胞、Liver Repair cell)が存在し治療応用が可能であることが明らかになった。

また以前より研究代表者は肝細胞の発生を制御する HHM(Human Homologue of Maid, HHM)をクローニングし Maid 分子の肝発生・分化の重要性を明らかにしてきた。この HHM は肝前癌性病変および肝癌のマーカーであり、ヒトと同じ脊椎動物であるゼブラフィッシュでも同様の結果を得た(Hepatology 2000, Gastroenterology 2005)。一方で Maid KO マウスは肝癌を特異的に発生することが報告され(Hepatology 2007)、TGF-beta シグナルの下流のシグナルを制御することが報告されている(EMBO J. 2008)。

2. 研究の目的

本研究では、臨床応用可能な骨髄由来肝臓修復細胞の特徴を明らかにし、培養方法の確立と肝硬変症に対する肝臓修復メカニズム解明を行う。またそのメカニズムにおける TNF-alpha シグナルの関与、Maid(TGF-beta シグナルに関与)シグナルの関与、Kupffer 細胞との相互作用について TNF type1 receptor KO マウスや Maid KO マウスの解析、Hydrodynamic Tail Vein injection (HTVi) 法を用いた遺伝子導入法の併用・解析で新たな次世代型細胞遺伝子治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 骨髄由来肝臓修復細胞(Liver Repair cell)を用いた肝硬変症に対する肝臓修復メカニズムの解析

GFP TG マウスの骨髄細胞中の様々な細胞分画を評価し、四塩化炭素障害肝硬変マウスモデルに細胞投与し、肝臓線維化の修復について評価、骨髄由来肝臓修復細胞の同定を行う。また骨髄由来肝臓修復細胞の新たな培養方法の開発を行う。

(2) TNF-receptor type 1 KO マウス (TNF-R1 KO mouse), Maid KO マウスの解析

TNF-R1 KO マウスおよび Maid KO マウスをレシピエントにした場合で評価し、それにより TNF-alpha シグナル、Maid シグナルが、骨髄由来肝臓修復細胞による肝硬変症の修復

に關与しているのかを評価、細胞投与後の肝細胞、胆管細胞、Kupffer 細胞、星細胞、類洞内皮細胞などの動態変化も評価する。また共培養系を利用し、その遺伝子発現、動態の変化を検討していく。

(3) Hydrodynamic Tail Vein injection (HTVi) 法を用いた遺伝子導入法および Liver Repair cell の併用療法の基礎的検討

この方法により Maid, MMP9, 骨髄細胞の定着分化を促進する FGF2 を肝臓に強制発現させ骨髄細胞の肝臓への定着、修復の違いについて検討する。

4. 研究成果

(1) GFP 陽性骨髄由来 Liver Repair cell の培養方法の確立と解析

Lonza 社より購入したヒト骨髄単核球細胞 (2M-125A) の効率的な培養方法を検討するため、ウシ血清含有培地による通常培養と、無血清培地培養法を比較検討した。その結果、マウス培養結果とは異なり、少なくともヒト骨髄由来細胞の培養初期(培養皿への細胞接着)には血清が必要であることが明らかとなった。またウシ血清含有培地で 2 継代培養したヒト骨髄由来細胞は、FACS 解析で「CD73/CD90/CD105 陽性かつ CD45/CD11b 陰性細胞(間葉系マーカー陽性かつ血球性マーカー陰性細胞)」であることを確認した。

(2) 骨髄由来培養 Liver Repair cell 投与実験

四塩化炭素腹腔内反復投与により作成したマウス免疫不全肝硬変モデル (SCID-CC14 モデル) に、Lonza ヒト骨髄単核球細胞をウシ血清含有培地で培養した「ヒト骨髄由来細胞 (CD73/CD90/CD105 陽性かつ CD45/CD11b 陰性細胞)」を 4.5×10^5 個/匹で尾静脈投与し、その後の肝線維化の改善をシリウスレッド染色により評価した。その結果、細胞投与 4 週後において肝線維化は有意に抑制され、血清アルブミン値も投与後 4 週において有意に上昇し、肝臓線維化に一致して MMP-9 陽性細胞と間葉系マーカーである Vimentin 陽性細胞の増加を確認した。

(3) 共培養による線維化改善効果の解析

線維化との関係を解析するために、培養骨髄細胞と肝星細胞 LI90 を用いた解析を行った。LI90 細胞は不死化していないため、まず TERT を発現するレトロウィルスを感染させ不死化細胞の作製を試みた。LI90 不死化細胞は不死化しても活性化星細胞の性質を保持していた。不死化 LI90 細胞を用いてヒト MSC との共培養を行い、コラーゲン (col1a1)、サイクリン D1、 α SMA、HGF などの遺伝子発現を検討した。上層に 1000 から 5 万個の hMSC を播種し、下層に LI90 細胞を播種し 2 日目および 5 日目の発現を調べたが、有意な変化は認められなかった。

(4) TNF-R1 KO マウス、Maid KO マウスによる肝線維化モデルへの骨髄細胞投与による肝機能・線維化改善の検討

TNF-R1 KO マウスをレシピエントにした場合で CC14 を従来の方法と同じように 4 週間 TNF-R1 KO マウスに投与、GFP 陽性骨髄細胞を尾静脈投与する。その後 1, 2, 3, 4 週目に肝臓組織を摘出し、GFP 抗体による免疫染色・蛍光二重染色で骨髄細胞の定着率を評価したところ、Azan 染色、Sirius-red 染色で肝線維化の改善効果が減弱していることが明らかになった。一方で骨髄細胞の投与時に肝線維化改善過程での骨髄由来細胞の Maid の共発現を確認した。一方で MaidKO マウスにおいて、肝線維化の亢進を確認した。

(5) Hydrodynamic Tail Vein injection (HTVi) 法を用いた遺伝子導入法による肝臓修復メカニズムの解析

野生型マウスに四塩化炭素を腹腔内へ反復投与し肝硬変モデルの肝臓に HTVi 法を用いて Maid を強制発現させるためのベクターを作成した。

(6) マウス骨髄由来培養細胞による線維化改善効果の解析

マウス骨髄細胞を培養したところ、マクロファージ系細胞の増加を認めた。マウス系においては培養した場合マクロファージ系細胞が増殖しやすく、これらの細胞を四塩化炭素障害肝硬変マウスモデルに静脈投与したところ、Azan 染色、Sirius-red 染色で肝線維化の改善が確認できた。

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 15 件)

- ① 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.* 2012;351(3):487-495. 査読有
- ② 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.* 2012;26:1-13. 査読有
- ③ Takami T, Terai S, Sakaida I. Advanced therapies using autologous bone marrow cells for chronic liver disease. *Discov Med.* 2012;14(74):7-12. 査読有

- ④ 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 β are important cytokines in repair of the cirrhotic liver after bone marrow cell infusion: comparison of humans and model mice. *Cell Transplant.* 2012;21(11):2363-2375. 査読有
- ⑤ 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.* 2012;47(5):491-497. 査読有
- ⑥ Takami T, Terai S, Sakaida I. Stem cell therapy in chronic liver disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2012;28(3):203-208. 査読有
- ⑦ 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.* 2012;27Suppl2:104-111. 査読有
- ⑧ 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 (CC14) induced chronic liver dysfunction mouse model. *J Vet Med Sci.* 2012;74(5):607-611. 査読有
- ⑨ 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.* 2012;74(5):633-636. 査読有
- ⑩ 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.* 2012;47(3):300-312. 査読有
- ⑪ Hisanaga T, Terai S, Iwamoto T, Takami T, Yamamoto N, Murata T, Matsuyama T,

Nishina H, Sakaida I. TNFR1-mediated signaling is important to induce the improvement of liver fibrosis by bone marrow cell infusion. *Cell Tissue Res*. 2011;346(1):79-88. 査読有

- ⑫ Saito T, Okumoto K, Haga H, Nishise Y, Ishii R, Sato C, Watanabe H, Okada A, Ikeda M, Togashi H, Ishikawa T, Terai S, Sakaida I, Kawata S. Potential therapeutic application of intravenous autologous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Stem Cells Dev*. 2011;20(9):1503-1510. 査読有
- ⑬ Takami T, Terai S, Sakaida I. Novel findings for the development of drug therapy for various liver diseases: Current state and future prospects for our liver regeneration therapy using autologous bone marrow cells for decompensated liver cirrhosis patients. *J Pharmacol Sci*. 2011;115(3):274-278. 査読有
- ⑭ Terai S, Sakaida I. Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2011;18(1):23-25. 査読有
- ⑮ Kim JK, Park YN, Kim JS, Park MS, Paik YH, Seok JY, Chung YE, Kim HO, Kim KS, Ahn SH, Kim do Y, Kim MJ, Lee KS, Chon CY, Kim SJ, Terai S, Sakaida I, Han KH. Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. *Cell Transplant*. 2010;19(10):1237-1246. 査読有

[学会発表] (計 29 件)

1. Terai Shuji Development of new cell therapy for liver fibrosis The 8th JSGE AGA joint Meeting 2013年3月22日 鹿児島 城山観光ホテル
2. 寺井 崇二 肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法の現状と今後の展望 第12回日本再生医療学会総会 2013年3月21日 横浜 パシフィコ横浜
3. Terai Shuji Development of new cell therapy using bone marrow derived cell for liver fibrosis patient The 16th JCG conference 2013年2月28日 Washington USA
4. Terai Shuji Development of new cell therapy for liver fibrosis LEC seminar 2012年11月13日 Washington USA
5. Terai Shuji Development of new cell therapy for liver fibrosis The 20th

Yousei International Symposium 2012年11月3日 Seoul Korea

6. 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の検討 第20回JDDW 2012年10月10日 神戸 神戸国際会議場
7. Takami Taro Bone marrow cell infusion suppress hepatocarcinogenesis in N-nitrosodiethylamine-and carbon tetrachloride-induced hepatocarcinogenic mice with liver cirrhosis The 10th ISSCR meeting 2012年6月13日 横浜 パシフィコ横浜
8. 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11回日本再生医療学会総会 2012年6月12日 横浜 パシフィコ横浜
9. 高見 太郎 ナノハイブリットシステムによる低侵襲肝再生修復療法の開発のための基礎的検討 第11回日本再生医療学会総会 2012年6月12日 横浜 パシフィコ横浜
10. 高見 太郎 ナノハイブリットシステムによる低侵襲肝再生修復療法の開発のための基礎的検討 第48回日本肝臓学会総会 2012年6月7日 金沢 石川県立音楽堂
11. Maeda Masaki Frequent bone marrow cell infusion promotes liver regeneration and suppresses tumor-initiation in hepatocarcinogenic mouse with liver cirrhosis The 62th AASLD meeting 2011年11月3日 San Francisco USA
12. Tanimoto Haruko Improvement of liver fibrosis and liver function by infusion of cultured cells derived from human bone marrow-Basic research directed toward development of human bone marrow derived cultured cell infusion therapy-The 62th AASLD meeting 2011年11月3日 San Francisco USA
13. Yamamoto Naoki Two kind of bone marrow cells phagocyte damaged hepatocyte and repair fibrosis in cirrhosis mice The 62th AASLD meeting 2011年11月3日 San Francisco USA
14. Takami Taro Thermosensitive organic/inorganic nanocomposite gels-cultured bone marrow derived cells improved liver fibrosis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis mice The 62th AASLD meeting 2011年11月3日 San Francisco USA
15. 高見 太郎 骨髄細胞頻回投与による肝細胞がん合併肝硬変症に対する修復再生・抗腫瘍療法開発のための基礎研究 第19回JDDW 2011年10月8日 福岡 福岡

国際会議場

16. Takami Taro Frequent autologous bone marrow cell infusions promote liver regeneration and suppress tumor-initiation in hepatocarcinogenic mice with liver cirrhosis
The 16th ISHSR meeting 2011年9月25日 Florence Italy
17. 高見 太郎 骨髄細胞投与による肝硬変合併肝細胞がんに対する新たな抗線維化・抗腫瘍療法開発への基礎研究 第47回日本肝臓学会総会 2011年6月5日 東京 グランパシフィック LE DAIBA
18. 前田 雅喜 肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与は肝発がんを抑制する 第47回日本肝臓学会総会 2011年6月5日 東京 グランパシフィック LE DAIBA
19. 山本 直樹 肝線維化修復時における二種類の骨髄由来細胞の動態と特徴 第47回日本肝臓学会総会 2011年6月5日 東京 グランパシフィック LE DAIBA
20. 高見 太郎 マウス骨髄由来無血清培養細胞投与による肝線維化・肝機能改善効果 第11回日本再生医療学会総会 2011年3月17日 東京 京王プラザホテル
21. Terai Shuji ABMi therapy for liver cirrhosis patient Edinburgh seminar 2011年3月5日 Edinburgh UK
22. Takami Taro Autologous bone marrow cell infusions suppress tumor-initiation and do not promote tumor-proliferation during N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in carbontetrachloride-treated liver cirrhosis mice
The 61th AASLD meeting 2010年11月1日 Boston USA
23. 高見 太郎 肝硬変発癌マウスモデルにおいて自己骨髄細胞投与は肝発癌を促進させない 第18回JDDW 2010年10月14日横浜 パシフィコ横浜
24. Sakaida Isao Effect of the splenectomy on autologous bone marrow cell infusion (ABMi) therapy for liver cirrhosis—basic research and clinical trial—
The 15th ISHSR meeting 2010年8月25日 Pasadena USA
25. Takami Taro Autologous bone marrow cell infusions do not promote N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in carbon tetrachloride-treated liver cirrhosis mice
The 15th ISHSR meeting 2010年8月25日 Pasadena USA
26. Yamamoto Naoki The Electron

Microscopical Analysis for cell lineage of bone marrow cell differentiation in cirrhosis mice

The 15th ISHSR meeting 2010年8月25日 Pasadena USA

27. 寺井 崇二 脾臓摘出術は、肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法の効果を増強する 第47回日本肝臓学会総会 2010年6月4日 山形 ホテルメトロポリタン山形
28. 高見 太郎 マウス肝硬変発癌モデルにおいて自己骨髄細胞投与は肝発癌を促進させない 第47回日本肝臓学会総会 2010年6月4日 山形 ホテルメトロポリタン山形
29. 久永 拓郎 骨髄細胞投与による肝修復機構におけるTNF α シグナルの検討 第47回日本肝臓学会総会 2010年6月4日 山形 ホテルメトロポリタン山形

〔図書〕(計1件)

①Christina M Takiya, Bruno Dias Paredes, Luiz Fernando Quintanilha de Mesquita, Grazielle Suhett Dias, Lanuza Alaby Pinheiro Faccioli, Takami T, Terai S, Sakaida I ELSEVIER, Liver Resident Stem Cell, 2012 :177-203

〔その他〕

ホームページ

http://www.ichinai-yamaguchi.jp/content_s4/?categoryId=7

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺井 崇二 (TERAI SHUJI)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00332809

(2) 研究分担者

石川 剛 (ISHIKAWA TSUYOSHI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20569305

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

坂井田 功 (SAKAIDA ISAO)

山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80263763

内田 耕一 (UCHIDA KOICHI)

山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80397992

山本 直樹 (YAMAMOTO NAOKI)

山口大学・大学教育機構・講師
研究者番号：90448283