

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09005

研究課題名(和文) 骨髄由来肝臓修復細胞の同定

研究課題名(英文) The analysis and identification of 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・准教授

研究者番号：90448283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：GFP/CC14モデルでの骨髄細胞投与後の肝組織を浮遊切片法高感度免疫電顕法と透過型電子顕微鏡と走査型電子顕微鏡の解析を行ったところ、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認め、小型細胞群中にCXCR4陽性細胞群とEpCAM陽性細胞群が含まれることがわかった。また肝組織を還流し、EpCAM陽性GFP陽性・CXCR4陽性GFP陽性骨髄由来細胞の分離培養を試みた。またGFP陽性全骨髄細胞をCXCR4陽性・陰性群に分離し、GFP/CC14モデルで解析したところ、CXCR4陽性細胞群の割合は非常に少なかったが、肝線維化抑制効果を陰性群より認めた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the characterization of the infused GFP-positive BMC using both EM and Immuno EM(IEM). We analyzed the image of IEM, comparing with the character of positive cells by immunohistochemistry and fluorescence staining(Antibody:GFP,MMP9, hepatoblastmarker-Liv2,CD44,A6, EpCAM,CXCR4,transcription regulator-maternal of inhibitor of differentiation-Maid).

We had two kinds of GFP positive BMCs. One group of GFP positive BMCs(MMP9 positive cells,CXCR4 positive cells) were similar to hepatocyte in size and located around fiber. These cells were round forms and had the increase of lysosome structure in cytoplasm and located on fiber in hepatic cord and repaired fibrosis. The other group cells(A6 positive cells, Liv2 positive cells, EpCAM positive cells) were small size and located in destructive area. These cells had high N/C ratio and smaller than hepatocyte and migrated into damaged cell area and had the phagocytic capacity. We detected that CXCR4 positive BMCs repaired liver fibrosis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：再生医療 電子顕微鏡 骨髄細胞 幹細胞 免疫電顕 肝線維化 GFP/CC14モデル MMP9

## 1. 研究開始当初の背景

肝硬変症は難治性腹水・肝不全・肝性脳症・食道胃静脈瘤破裂等を引き起こす難治性疾患であり、治療方法は未だに肝移植以外は対処療法しかない。肝線維化の要因は、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し、肝臓修復に働き、matrix metalloproteinase-9 (MMP9)など産生し、肝機能や生存率、肝線維化の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を明らかにした。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部分が基礎研究だけでなく、臨床研究でも解明されていないのが現状である。

## 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と CXCR4 陽性細胞に着目し、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・遊走・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を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。
- ・CXCR4 陽性と CXCR4 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、aSMA、CD90、MAC-1、Sca-1、MMP9、CD34、EpCAM、E-cadherin 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求する。

### 小型骨髄由来 EpCAM 陽性細胞分離と機能解析

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を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、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 CXCR4 による骨髄細胞分離投与解析

GFP 陽性全骨髄細胞を CXCR4 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 CXCR4 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 CXCR4 陽性細胞と同じかどうか、CXCR4 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 システムでの 3D 構築システムを用いて、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的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 CXCR4 陽性細胞群と EpCAM 陽性細胞群が含まれることがわかった。そこで肝組織をコラゲナーゼ還流し、EpCAM 抗体、GFP 抗体、CXCR4 抗体を使用した FACS 解析で EpCAM 陽性 GFP 陽性と CXCR4 陽性 GFP 陽性骨髄由来細胞の割合を評価し、分離 sorting して培養を試みた。だが、殆どが死細胞となり、培養による詳細な解析が困難だった。また別に AutoMACS を使用した様々な細胞分離方法を試してみたが、継代培養細胞の確立は困難であった。また GFP 陽性全骨髄細胞を CXCR4 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。骨髄細胞内では CXCR4 陽性群の割合が非常に少なく、同じ細胞量による投与肝組織の比較では、CXCR4 陽性群投与群の方が軽度肝線維化抑制効果を認めた。現在も CXCR4 陽性を発現する細胞の同定と特徴を行っている。

#### 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 10 件)

- ① Fujisawa K, Takami T, Matsuzaki A, Matsumoto T, Yamamoto N, Terai S, Sakaida I.  
Evaluation of the effects of L-carnitine on medaka (*Oryzias latipes*) fatty liver. **Sci Rep.** 査読有 2017 Jun 5;7(1):2749. doi: 10.1038/s41598-017-02924-5.
- ② Fujisawa K, Takami T, Fukui Y, Quintanilha LF, Matsumoto T, Yamamoto N, Sakaida I.  
Evaluating effects of L-carnitine on human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. **Cell Tissue Res.** 査読有 2017 May;368(2):301-310. doi: 10.1007/s00441-017-2569-0.
- ③ Yamamoto N, Saeki I, Yamasaki T, Takami T, Maeda M, Fujisawa K, Iwamoto T, Matsumoto T, Hidaka I,

- Ishikawa T, Uchida K, Tani K, Sakaida I. Effects of an oral iron chelator, DFX, on advanced hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol.** 査読有 2016 Oct 28;22(40):8967-8977. doi: 10.3748/wjg.v22.i40.8967
- ④ Yamamoto N, Yamasaki T, Takami T, Uchida K, Fujisawa K, Matsumoto T, Saeki I, Terai S, Sakaida I.  
Deferasirox, an oral iron chelator, prevents hepatocarcinogenesis and adverse effects of sorafenib. **J Clin Biochem Nutr.** 査読有 2016 May; 58(3):202-9. doi: 10.3164/jcbrn.15-127.
  - ⑤ Fujisawa K, Terai S, Takami T, Yamamoto N, Yamasaki T, Matsumoto T, Yamaguchi K, Owada Y, Nishina H, Noma T, Sakaida I.  
Modulation of anti-cancer drug sensitivity through the regulation of mitochondrial activity by adenylate kinase 4. **J Exp Clin Cancer Res.** 査読有 2016 Mar 16;35:48. doi:10.1186/s13046-016-0322-2
  - ⑥ Fujisawa K, Takami T, Kimoto Y, Matsumoto T, Yamamoto N, Terai S, Sakaida I.  
Circadian variations in the liver metabolites of medaka (*Oryzias latipes*). **Sci Rep.** 査読有 2016 Feb 10;6:20916. doi: 10.1038/srep20916.
  - ⑦ Matsumoto T, Takami T, Sakaida I.  
Cell transplantation as a non-invasive strategy for treating liver fibrosis. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol.** 査読有 2016;10(5):639-48. doi: 10.1586/17474124.2016.1134313.
  - ⑧ Fujisawa K, Terai S, Matsumoto T, Takami T, Yamamoto N, Nishina H, Furutani-Seiki M, Sakaida I.  
Evidence for a Role of the Transcriptional Regulator Maf in Tumorigenesis and Aging. **PLoS One.** 査読有 2015 Jun 24;10(6):e0129950. doi:10.1371/journal.pone.0129950.
  - ⑨ Saeki I, Yamasaki T, Tanabe N, Iwamoto T, Matsumoto T, Urata Y, Hidaka I, Ishikawa T, Takami T, Yamamoto N, Uchida K, Terai S, Sakaida I.  
A new therapeutic assessment score for advanced hepatocellular carcinoma patients receiving hepatic arterial infusion chemotherapy. **PLoS One.** 査読有 2015 May 20;10(5):e0126649. doi:10.1371/journal.pone.0126649.
  - ⑩ Shiratsuki S, Terai S, Murata Y, Takami T, Yamamoto N, Fujisawa K, Burganova G, Quintanilha LF, Sakaida I.  
Enhanced survival of mice infused with bone marrow-derived as compared with

adipose-derived mesenchymal stem cells.  
**Hepatol Res.** 査読有 2015 Dec;45(13):135  
3-9. doi: 10.1111/hepr.12507.

[学会発表] (計 23 件)

- ①高見 太郎  
非代償性肝硬変症に対する培養自己骨髄  
間葉系幹細胞を末梢静脈投与する低侵襲  
再生療法の臨床実施  
第 17 回日本再生医療学会総会  
2018 年 3 月 21~23 日  
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- ②仁志 麻衣子  
骨髄間葉系幹細胞による microRNA を  
介した肝線維化改善機序の検討  
第 17 回日本再生医療学会総会  
2018 年 3 月 21~23 日  
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- ③Nishimura Tatsuro  
Nonclinical proof-of-concept for "hepatic  
artery infusion of cultured autologous  
bone marrow mesenchymal stem cells"  
in a canine liver fibrosis model  
68th The liver meeting AASLD  
2017 年 10 月 20~24 日  
Washington USA
- ④高見 太郎  
当科における非代償性肝硬変に対する自  
己骨髄細胞を用いた再生療法  
JDDW 2017  
2017 年 10 月 12~15 日  
福岡国際会議場(福岡県福岡市)
- ⑤Naoki Yamamoto  
Infused bone marrow derived cells have  
two capacities that repair of fibrosis and  
phagocytosis of damaged cells  
14th ISSCR annual meeting  
2017 年 6 月 14~17 日  
Boston USA
- ⑥高見 太郎  
非代償性肝硬変症に対する自己骨髄細胞  
を用いた再生療法の臨床実施と機序解明  
第 53 回日本肝臓学会総会  
2017 年 6 月 8 日~9 日  
広島国際会議場(広島県広島市)
- ⑦山本 直樹  
BCAA 製剤による Sorafenib の治療効果増強  
と副作用軽減作用の解析 第 53 回日本肝  
臓学会総会  
2017 年 6 月 8 日~9 日  
広島国際会議場(広島県広島市)
- ⑧高見 太郎  
肝硬変症に対する自己骨髄細胞による再  
生療法の開発状況と展望  
第 103 回日本消化器病学会総会  
2017 年 4 月 20~22 日  
京王プラザホテル(東京都新宿区)
- ⑨高見 太郎  
肝硬変に対する培養骨髄間葉系幹細胞の  
肝臓再生機序の検討

- 第 16 回日本再生医療学会総会  
2017 年 3 月 7~9 日  
仙台国際センター(宮城県仙台市)
- ⑩Toshihiko Matsumoto  
Rho family GTPases regulate MMPs  
expression and pro-inflammatory  
phenotype of macrophages in fibrotic  
liver.  
67th The liver meeting AASLD  
2016 年 11 月 11~15 日  
Boston USA
  - ⑪Taro Takami  
Cultured bone marrow-derived  
mesenchymal stem cells contributed to  
improving liver cirrhosis through both  
the direct stabilization of redox  
homeostasis and cell-cell interaction  
with macrophages  
67th The liver meeting AASLD  
2016 年 11 月 11~15 日  
Boston USA
  - ⑫高見 太郎  
肝硬変症に対する自己骨髄細胞を用いた  
肝臓再生療法  
JDDW 2016  
2016 年 11 月 3~6 日  
神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
  - ⑬Taro Takami  
Hepatic arterial infusion of cultured  
autologous bone marrow mesenchymal  
stem cells has a stronger therapeutic  
effect on liver cirrhosis in our established  
canine model  
13th ISSCR annual meeting  
2016 年 6 月 22~25 日  
San Francisco USA
  - ⑭Naoki Yamamoto  
Infused bone marrow derived cells have  
two capacities that phagocytosis of  
damaged cells and repair of fibrosis in  
mice.  
13th ISSCR annual meeting  
2016 年 6 月 22~25 日  
San Francisco USA
  - ⑮高見 太郎  
当科における非代償性肝硬変症に対する  
先進的医療の現状と展開  
第 52 回日本肝臓学会総会  
2016 年 5 月 19~20 日  
ホテルニューオータニ幕張(千葉県千葉市)
  - ⑯山本 直樹  
肝硬変症に対する新規 SGLT2(Sodium-  
Glucose Co-Transporter2) 阻害剤の治療効  
果の基礎的検証と機序解明  
第 53 回日本肝臓学会総会  
2016 年 5 月 19~20 日  
ホテルニューオータニ幕張(千葉県千葉市)
  - ⑰Toshihiko Matsumoto  
Interaction with collagen matrix  
modulates macrophage expression of

MMPs in part by controlling cell shape.  
66th The liver meeting AASLD  
2015年11月13～17日  
San Francisco USA

⑱ 高見 太郎

肝炎ウイルス排除後を見据えた骨髄細胞  
を用いた肝臓再生療法の開発  
JDDW 2015  
2015年10月8～11日  
東京国際フォーラム(東京都港区)

⑲ Taro Takami

Less invasive liver regeneration therapy  
for liver cirrhosis patients using cultured  
autologous bone marrow-derived  
mesenchymal stem cells  
12th ISSCR annual meeting  
2015年6月24～27日  
Stockholm Sweden

⑳ Naoki Yamamoto

Infused bone marrow derived cells have  
two capacities that phagocytosis of  
damaged cells and repair of fibrosis in  
mice  
12th ISSCR annual meeting  
2015年6月24～27日  
Stockholm Sweden

㉑ 高見 太郎

自己骨髄細胞による肝臓再生療法の臨床  
実施とそのメカニズム解析  
第51回日本肝臓学会総会  
2015年5月21～22日  
ホテルニューオータニ熊本(熊本県熊本市)

㉒ 山本 直樹

新規 SGLT2 阻害剤の肝線維化抑制効果の基  
礎的検討  
第51回日本肝臓学会総会  
2015年5月21～22日  
ホテルニューオータニ熊本(熊本県熊本市)

㉓ 高見 太郎

骨髄細胞を用いた線維化と発癌を標的と  
した肝臓再生療法の開発と展望  
第101回日本消化器病学会総会  
2015年4月23～25日  
仙台国際センター(宮城県仙台市)

[図書] (計 0 件)

[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.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・准教授  
研究者番号：90448283

(2) 研究分担者

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

松本 俊彦 (MATSUMOTO, Toshihiko)  
山口大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：70634723