

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04162

研究課題名(和文) 中大型動物を用いた肝線維化評価モデルによる高効率肝臓再生療法の開発と機序解明

研究課題名(英文) The development of liver regeneration therapy with higher therapeutic effects on liver cirrhosis using a middle-large size liver cirrhosis model.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、培養自己骨髄間葉系幹細胞(骨髄MSC)を肝動脈から投与する肝臓再生療法を実施している。今回の研究により、1) 選定された凍結法であれば凍結保存骨髄MSCは非凍結細胞と同等の肝機能改善効果があること、2) マウス高発癌肝硬変モデル系への骨髄MSC頻回投与で肝発癌が促進されないこと、3) ルシフェラーゼ陽性骨髄MSCを末梢静脈または脾臓投与し、肝臓直接投与がより有効であること、4) マウス改良コリン欠乏食モデル(非アルコール性脂肪肝炎モデル)で、培養骨髄MSC投与が有効であることを確認した。今後、これらの成果を肝臓再生療法の開発に活かしていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで非代償性肝硬変に対する抗線維化や再生療法の開発が多く実施されているが、肝移植が根治療法であることに変わりはない。これまで我々は「培養自己骨髄間葉系幹細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法」を開発し、安全性評価目的の臨床研究を実施している。今回の研究成果は、より治療効果を高めた肝臓再生療法の開発につながることから、肝硬変治療の実現に寄与するだけでなく、他の臓器線維症にも波及効果がある。

研究成果の概要(英文)：To develop liver regeneration therapy with higher therapeutic effects using cultured autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) on decompensated liver cirrhosis, we have been conducting translational research. In this study, we have revealed follows; 1) the hepatic arterial infusion of cryopreserved cultured autologous BM-MSCs have equivalent effects on liver cirrhosis model, 2) although BM-MSCs have an immunosuppressive effect, the frequent infusion of cultured autologous BM-MSCs did not accelerate the early stages of hepatocarcinogenesis in highly oncogenic liver cirrhotic murine model, 3) using luciferase-positive BM-MSCs, direct infusion into the liver via portal vein was more effective than peripheral intravenous infusion, 4) the infusion of BM-MSCs showed effects on liver fibrosis and steatosis in a modified murine non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model. Therefore, we will develop the next liver regeneration therapy based on these findings.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝硬変症 再生療法 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) B型肝炎ウイルスに対する核酸アナログ製剤や、C型肝炎ウイルス排除を目的とした直接作用型抗ウイルス薬が開発され、これらの医療費は公的助成されている。このように国の肝炎対策事業の整備は進んでおり、B型またはC型肝炎においては、その後の肝硬変や肝癌といった重篤な病態への進展を防ぐことができるようになった。しかし、すでに進行した非代償性肝硬変の現時点における根治療法は肝移植しかないのが現状であり、ドナー不足や手術侵襲、医療経済面などの問題から対症療法で対応せざるをえない症例も多く存在するため、肝臓再生療法の開発は社会的にも急務といえる。

(2) 当科では、肝硬変に対する再生療法として自己骨髄細胞(非培養・全骨髄単核球分画)を末梢静脈から投与する「自己骨髄細胞投与療法」を世界に先駆けて開発し、国内外でその安全性と有効性を確認した。しかし、この療法は全身麻酔下に自己骨髄液を約400mL採取するため、全身麻酔可能例に適応が制限される。そこで、より重症な肝硬変患者を救命するため、これまでこの療法で証明した自己骨髄細胞単核球分画を用いた肝臓再生療法を低侵襲なものへと発展させ、局所麻酔下に採取した少量の自己骨髄液から肝機能改善効果のある骨髄間葉系幹細胞(骨髄MSC)を体外で培養して再投与する「低侵襲肝臓再生療法」をAMED「再生医療の実現化プロジェクト・再生医療の実現化ハイウェイ」プログラムとして開発した。そしてAMED再生医療実用化研究事業として「非代償性肝硬変に対する培養自己骨髄MSCを用いた低侵襲肝臓再生療法」を安全性評価目的に開始した。

(3) 中大型動物による肝線維化評価モデルで培養自己骨髄MSCを肝動脈投与した結果、末梢静脈投与と比べて、より高い治療効果を認めた(引用文献)。

2. 研究の目的

(1) 中大型動物による肝線維化評価モデルで、培養自己骨髄MSCを肝動脈投与した方が末梢静脈投与よりも有効であったことを踏まえて、「凍結保存した培養自己骨髄MSC肝動脈投与による肝臓再生療法」を臨床応用するための非臨床Proof of Concept(POC)を取得する。

(2) 投与経路の違いによる骨髄MSC体内動態を肝硬変モデルマウス*in vivo*イメージングで評価する。また骨髄MSCの肝発癌動態への影響や、骨髄MSCの肝臓再生機構をmicroRNA含めて解明する。

3. 研究の方法

(1) 中大型動物による肝線維化評価モデルによる凍結保存培養自己骨髄MSC肝動脈投与
中大型動物による肝線維化評価モデルは、全身麻酔下に留置したポート付き中心静脈留置カテーテル(先端:胃内,ポート:背中皮下に埋込)から四塩化炭素(CCl₄)を反復投与して作出した(引用文献)。このモデルに対して、培養自己骨髄MSCを非凍結または生物由来原料基準に準拠した細胞凍結液で凍結保存したものを肝動脈から投与し、経時的にインドシアニングリーン試験と肝組織生検を実施した。

(2) 投与経路の違いによる培養自己骨髄MSC体内動態評価
CCl₄反復投与により作出した肝線維化モデルマウスに、Luciferase陽性同種同系培養骨髄MSCを、尾静脈投与(末梢静脈投与)または脾臓投与(経門脈経由で肝臓へ移行することを想定)を行い、IVIS Spectrum BLを用いて投与細胞の発光を経時的に検出することで体内動態を比較した。

(3) 培養自己骨髄MSC頻回投与による肝硬変合併肝発癌モデルによる肝発癌機構への影響評価
生後2週オスマウスに*N*-nitrosodiethylamine(DEN)を腹腔内単回投与し、生後6週よりCCl₄反復投与することで高発癌肝硬変マウスモデルを作成し、10週からマウス同種同系培養GFP陽性骨髄MSCを2週に1回、計5回投与し、培養自己骨髄MSC頻回投与が肝発癌に与える影響を組織学的に評価した。

(4) マウス非アルコール性脂肪肝炎モデルにおける培養自己骨髄MSC投与評価
マウス改良コリン欠乏食アミノ酸置換(CDAA)食モデルを作出し、CDAA食飼育3ヶ月の時点で、Luciferase陽性同種同系培養骨髄MSCを脾臓投与し、IVIS Spectrum BLで培養自己骨髄MSC

が肝臓に生着したことを確認する。これらのマウスに対して細胞投与後 1 ヶ月における肝線維化、肝予備能、肝脂肪化を組織学的および血液生化学的に、細胞非投与群と比較した。

(5) 培養骨髄 MSC と肝星細胞の細胞間相互作用評価

ヒト培養骨髄 MSC とヒト活性化肝星細胞 (HHStcC) を非接着共培養し、HHStcC 培養上清中型プロコラーゲン N 末端ペプチド (P- α 1(I)-P) の濃度変化を ELISA で検討した。また、特定 microRNA 投与後の HHStcC 肝線維化関連遺伝子の変化をリアルタイム PCR およびウエスタンブロッティングにより評価した。

4. 研究成果

(1) 凍結保存培養自己骨髄 MSC 肝動脈投与の肝機能改善効果は非凍結細胞と遜色ない

非凍結および凍結保存のいずれも培養自己骨髄 MSC 肝動脈投与後は、肝線維化 (シリウスレッド染色陽性面積) および血中インドシアニンググリーン値半減時間の改善を認め、これらの効果は投与 12 週間にわたって持続していた。また凍結保存細胞の治療効果は、非凍結細胞と同等であった。

(2) 培養自己骨髄 MSC は肝臓へ直接投与すると生着率が高く生存期間が長い

尾静脈投与群では、直後から肺に補足され、肝臓への分布はほとんど確認されることなく、投与約 2 日で肺の発光も消失した。一方、脾臓投与群では、肺に補足されることなく経門脈的に肝臓に直接集積し、投与 1 週間後でも肝臓での発光は持続していた。

(3) 培養自己骨髄 MSC 頻回投与はマウス肝発癌を促進させることはない

培養自己骨髄 MSC 頻回投与群には、GFP 陽性腫瘍は認めなかった。培養自己骨髄 MSC 頻回投与群は非投与群と比べて、組織学的な担癌率、平均腫瘍サイズ、単位面積当たりの腫瘍数、単位面積当たりの腫瘍面積、いずれにも有意差を認めなかった。また、両群間の AFP に有意差を認めなかった (引用文献)。

(4) 培養自己骨髄 MSC 投与はマウス非アルコール性脂肪肝炎モデルを改善させる

培養自己骨髄 MSC 脾臓投与後に肝臓に生着したマウスでは、有意に血清総ビリルビンは低下し血清アルブミン値は上昇した。また有意に、シリウスレッド染色で定量した肝線維化面積も低値で、肝脂肪化も改善していた。

(5) 特定 microRNA は肝星細胞の細胞外基質産生抑制作用を有する

ヒト培養骨髄 MSC とヒト HHStcC の非接着共培養で、培養上清中 P- α 1(I)-P 濃度は有意に低下した。また特定 miR-A 導入 HHStcC では、細胞増殖は有意に低下し、Collagens および Elastin の発現減少を確認した。

以上のように、培養自己骨髄 MSC 投与経路としては標的臓器である肝臓へ直接移行できる経路がよく、凍結保存培養自己骨髄 MSC であっても非凍結細胞と同等の治療効果があることが確認された。また培養自己骨髄 MSC には免疫抑制効果があるものの肝発癌を促進させることはないこともマウスモデルで確認された。さらには今後増加することが懸念されている非アルコール性脂肪肝炎に対する培養自己骨髄 MSC 治療効果も確認された。今後は、これらの研究成果を治療効果の高い肝臓再生療法の開発に活かしていく。

<引用文献>

Nishimura T, Takami T, Sasaki R, et al. Liver regeneration therapy through the hepatic artery-infusion of cultured bone marrow cells in a canine liver fibrosis model. *PLoS One*. 2019 Jan 23;14(1):e0210588.

Takami T, Tani K, Taura Y, Sakaida I. Canine liver fibrosis model to assess the functions of infused autologous bone marrow-derived cells. *Methods Mol Biol*. 2019;1905:201-209.

Matsuura K, Takami T, Maeda M, et al. Evaluation of the effects of cultured bone marrow mesenchymal stem cell infusion on hepatocarcinogenesis in hepatocarcinogenic mice with liver cirrhosis. *Transplant Proc*. 2019 Apr;51(3):925-935.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 19件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Miyaji Takashi, Takami Taro, Fujisawa Koichi, Matsumoto Toshihiko, Yamamoto Naoki, Sakaida Isao	4. 巻 66(3)
2. 論文標題 Bone marrow-derived humoral factors suppress oxidative phosphorylation, upregulate TSG-6, and improve therapeutic effects on liver injury of mesenchymal stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 213-223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbn.19-125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuura Keiji, Takami Taro, Maeda Masaki, Hisanaga Takuro, Fujisawa Koichi, Saeki Issei, Matsumoto Toshihiko, Hidaka Isao, Yamamoto Naoki, Sakaida Isao	4. 巻 51(3)
2. 論文標題 Evaluation of the effects of cultured bone marrow mesenchymal stem cell infusion on hepatocarcinogenesis in hepatocarcinogenic mice with liver cirrhosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 925-935
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2019.03.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takami Taro, Tani Kenji, Taura Yasuho, Sakaida Isao	4. 巻 1905
2. 論文標題 Canine liver fibrosis model to assess the functions of infused autologous bone marrow-derived cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 201-209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-8961-4_18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsunaga Kazuhito, Fujisawa Koichi, Takami Taro, Burganova Guzel, Sasai Nanami, Matsumoto Toshihiko, Yamamoto Naoki, Sakaida Isao	4. 巻 64(3)
2. 論文標題 NUPR1 acts as a pro-survival factor in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and is induced by the hypoxia mimetic reagent deferoxamine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 209-216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000487858.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura T, Takami T, Sasaki R, Aibe Y, Matsuda T, Fujisawa K, Matsumoto T, Yamamoto N, Tani K, Taura Y, Sakaida I.	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 Liver regeneration therapy through the hepatic artery-infusion of cultured bone marrow cells in a canine liver fibrosis model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0210588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0210588.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujisawa K, Takami T, Nagatomo T, Fukui Y, Hoshida H, Saeki I, Matsumoto T, Hidaka I, Yamamoto N, Sakaida I.	4. 巻 77
2. 論文標題 Usefulness of Adult Medaka Fish as a Model for the Evaluation of Alcoholic Fatty Liver.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Alcohol.	6. 最初と最後の頁 147-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alcohol.2019.01.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takami T, Tani K, Taura Y, Sakaida I.	4. 巻 1905
2. 論文標題 Canine Liver Fibrosis Model to Assess the Functions of Infused Autologous Bone Marrow-Derived Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 201-209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8961-4_18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujisawa K, Takami T, Fukui Y, Nagatomo T, Saeki I, Matsumoto T, Hidaka I, Yamamoto N, Okamoto T, Furutani-Seiki M, Sakaida I.	4. 巻 7(11)
2. 論文標題 Assessment of high-fat-diet-induced fatty liver in medaka.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biol Open.	6. 最初と最後の頁 bio031534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.031534.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujisawa K, Hara K, Takami T, Okada S, Matsumoto T, Yamamoto N, Sakaida I.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Evaluation of the effects of ascorbic acid on metabolism of human mesenchymal stem cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Res Ther.	6. 最初と最後の頁 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-018-0825-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujisawa K, Takami T, Okada S, Hara K, Matsumoto T, Yamamoto N, Yamasaki T, Sakaida I.	4. 巻 36(8)
2. 論文標題 Analysis of Metabolomic Changes in Mesenchymal Stem Cells on Treatment with Desferrioxamine as a Hypoxia Mimetic Compared to Hypoxic Conditions.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells.	6. 最初と最後の頁 1226-1236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0.1002/stem.2826.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujisawa K, Takami T, Matsumoto T, Yamamoto N, Sakaida I.	4. 巻 1(7)
2. 論文標題 Profiling of the circadian metabolome in thioacetamide-induced liver cirrhosis in mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hepatol Commun.	6. 最初と最後の頁 704-718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1075.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda T, Takami T, Sasaki R, Nishimura T, Aibe Y, Paredes BD, Quintanilha LF, Matsumoto T, Ishikawa T, Yamamoto N, Tani K, Terai S, Taura Y, Sakaida I.	4. 巻 1(7)
2. 論文標題 A canine liver fibrosis model to develop a therapy for liver cirrhosis using cultured bone marrow-derived cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hepatol Commun.	6. 最初と最後の頁 691-703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1071.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takami T, Sasaki R, Nishimura T, Matsuda T, Fujisawa K, Matsumoto T, Yamamoto N, Sakaida I.
2. 発表標題 Direct infusion of cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells offers higher therapeutic efficacy than conventional peripheral infusion in liver fibrosis animal models
3. 学会等名 6th Annual Midwest Conference on Cell Therapy and Regenerative Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高見 太郎、松本 俊彦、坂井田 功
2. 発表標題 抗線維化療法としての自己骨髄細胞を用いた非代償性肝硬変症に対する再生療法の臨床実施と展開
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高見 太郎、松本 俊彦、坂井田 功
2. 発表標題 非代償性肝硬変症に対する自己骨髄由来細胞を用いた再生療法の臨床実施
3. 学会等名 第53回日本アルコール・アディクション医学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高見 太郎、松本 俊彦、坂井田 功
2. 発表標題 非代償性肝硬変症に対する培養自己骨髄間葉系幹細胞肝動脈投与療法の開発
3. 学会等名 JDDW 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高見 太郎、松本 俊彦、坂井田 功
2. 発表標題 非代償性肝硬変に対する自己骨髄由来細胞を用いた再生療法の臨床実施
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高見 太郎、松本 俊彦、久永 拓郎、藤澤 浩一、石川 剛、坂井田 功
2. 発表標題 非代償性肝硬変に対する自己骨髄由来細胞を用いた肝臓再生療法の臨床実施
3. 学会等名 第115回日本内科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高見 太郎、野島 順三、坂井田 功
2. 発表標題 当科における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用いた再生治療
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taro Takami, and Isao Sakaida
2. 発表標題 Our liver regeneration therapies using autologous bone marrow-derived cells for decompensated liver cirrhosis
3. 学会等名 第54回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Taro Takami, and Isao Sakaida
2. 発表標題 The development of liver regeneration therapies using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高見 太郎、松本 俊彦、坂井田 功
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第103回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高見 太郎、松本 俊彦、坂井田 功
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第53回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高見 太郎、松本 俊彦、坂井田 功
2. 発表標題 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
3. 学会等名 JDDW2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高見 太郎、坂井田 功
2. 発表標題 培養自己骨髄間葉系幹細胞を用いた肝臓再生療法における細胞投与経路の検討
3. 学会等名 第114回日本内科学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>山口大学研究推進機構 再生・細胞治療研究センター http://rcasi.kenkyu.yamaguchi-u.ac.jp/saisei.php 非代償性肝硬変患者に対する培養自己骨髄細胞肝動脈投与療法について http://www.hosp.yamaguchi-u.ac.jp/news/news/post_252.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高見 太郎 (TAKAMI Taro) (60511251)	山口大学・大学院医学系研究科・講師 (15501)	
研究分担者	山本 直樹 (YAMAMOTO Naoki) (90448283)	山口大学・大学教育機構・准教授 (15501)	
研究分担者	松本 俊彦 (MATSUMOTO Toshihiko) (70634723)	山口大学・大学院医学系研究科・助教 (15501)	

