

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390199

研究課題名 (和文) 肝硬変に対する自己骨髄細胞の線維化溶解メカニズムの解明と癌病変への影響について

研究課題名 (英文) Mechanism of fibrolysis and effect on cancer by autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis

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

研究成果の概要 (和文)：

我々は肝硬変状態にしたマウスに GFP 陽性骨髄細胞を投与し、肝線維化と肝機能が改善する GFP/CCl₄ モデルを開発し、関与するサイトカインの同定のため、BioPlex サスペンションアレイシステムを用いて検討した。その結果 G-CSF と IL1b の発現の関与が骨髄細胞投与後の肝機能改善に重要であることがわかった。また GFP 陽性骨髄由来細胞の定着・細胞の形態的变化をとらえ、小型の Liv2 陽性細胞・A6 陽性細胞と類円形の CD44/Liv8 陽性細胞・MMP9 陽性細胞・Maid 陽性細胞の二つの骨髄細胞集団を検出することができた。また持続肝障害での骨髄細胞増殖に ER stress である XBP1, GRP78 の発現が関わっていることも明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

We have previously reported the effects of autologous bone marrow cell (BMC) infusion (ABMi) therapy in liver cirrhosis patients. The results showed that cell therapy using autologous BMC has the potential to become an effective treatment for patients with liver failure due to advanced liver cirrhosis. To analyze the cellular phenomena of involved in this process and the mechanism of dissolve in fibrosis, we checked the damaged liver using electron microscopy and estimated some kind of serum cytokines. We showed that G-CSF and IL1b is important and concerned about the proliferation of BMC in damage liver. We showed continuous high XBP1 and GRP78 expression might be essential for the survival and proliferation of BMC in liver damage environment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

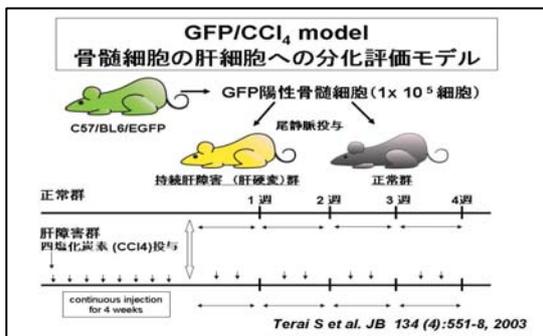
研究分野：肝臓病学

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：再生医学 肝線維化 肝発癌 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

わが国における肝疾患の大半はウイルス肝炎によるものであり、現在数百万人に及ぶとされる。インターフェロンによるウイルス排除は多く見積もっても50%であり、肝炎はやがて肝硬変と進展してゆき、現在30万人を超えている。また、毎年、約4万人近い人が肝癌で亡くなっているが、大半は肝硬変を合併している。進展した非代償性硬変では、肝性脳症・腹水・食道胃静脈瘤破裂といったことが起こり極度にQOLも低下する。一旦肝硬変に至り線維化で硬化した肝臓の線維溶解剤は現在存在せず、いかに線維化の進展を阻止・遅延させるかといった消極的な治療法しか存在しない。このような患者には生体・脳死肝移植しか根本的な治療法はなく、生体・脳死肝移植が保険適応になったとは言え、ドナー不足の問題は解決から程遠い。このような観点からも、細胞移植は臓器移植とともにその研究・臨床応用が重要である。我々は臨床的には肝線維化抑制・肝線維化溶解・肝再生の3つが同時に起こることが重要と考えており、証明するために、マウスに四塩化炭素(CCl₄)を週に2回4週間投与し、肝硬変を作成し、同種同系の Green Fluorescent Protein(GFP)トランスジェニックマウスの骨髄細胞(全分画ないし間葉系分画)を肝硬変マウスに尾静脈より移植し、そしてCCl₄をさらに4週間投与すると、炎症のある肝内にも移植した骨髄細胞が浸潤し肝機能を改善することを報告した。



肝硬変内に浸潤した骨髄細胞が既存の線維を溶解し、線維化の改善がもたらされるということを世界で初めて報告した (Sakaida I, et al. Hepatology. 2004;40:1304-11.) また16症例の肝硬変患者に自己骨髄細胞を移植し、基礎実験と同様に肝機能改善により血清アルブミン値が上昇することや肝線維化マーカー低下による線維化改善効果を確認している (Terai S. et al. Stem Cells. 2006 Oct;24(10):2292-8.)

しかし炎症を察知して肝内にどのような機序で骨髄細胞が浸潤してくるのか、肝臓内に定着するのに必要な因子(接着因子など)の解明や線維化溶解に必要な詳しい分子の解明(何種類のコラゲナーゼやマトリックスメ

タロプロテイナーゼの発現が必要か、またその発現順序など)等解明されていないことが多い。

2. 研究の目的

- 骨髄細胞がどうして壊死・炎症のある肝内のみの特異的に浸潤してくるのか。(骨髄細胞を引き寄せる分子の解明と肝内接着機構の解明)
- 癌細胞の肝内浸潤転移機構との相違点
- 既存の線維溶解メカニズムの解明。
- 肝硬変に合併する前癌性病変と肝細胞癌に対する移植骨髄細胞の影響と内因性骨髄細胞の影響。
- 移植骨髄細胞の Epithelial Mesenchymal transition(EMT)発生の解明と線維肝からの発癌における Epithelial Mesenchymal transition(EMT)発生の解明。

3. 研究の方法

GFP/CCl₄モデルにおける移植骨髄細胞遊走因子と定着因子の解析と線維溶解機序の解明

GFP/CCl₄モデルを作成し、肝障害持続群と正常群と肝障害持続群に骨髄細胞投与群の三群の解析を行う。採取した血清・肝組織をBioPlex サスペンションアレイシステムを用いて、網羅的に骨髄細胞の肝内浸潤・定着に重要なサイトカインなどの因子を測定する。また骨髄細胞投与後1,2,3,4週後の肝組織中のMMP2,9,13,14などのタンパクの発現を検討する。

GFP/CCl₄モデルにおける骨髄細胞中の肝幹細胞の同定

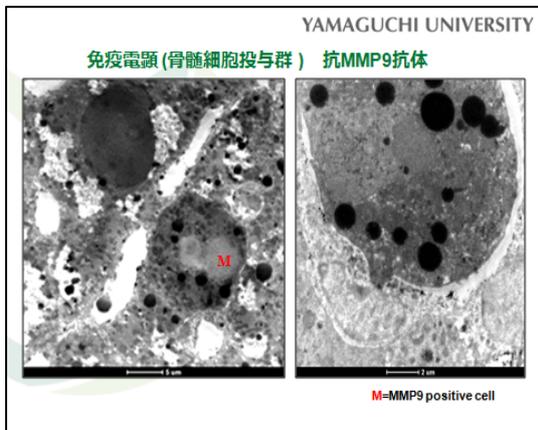
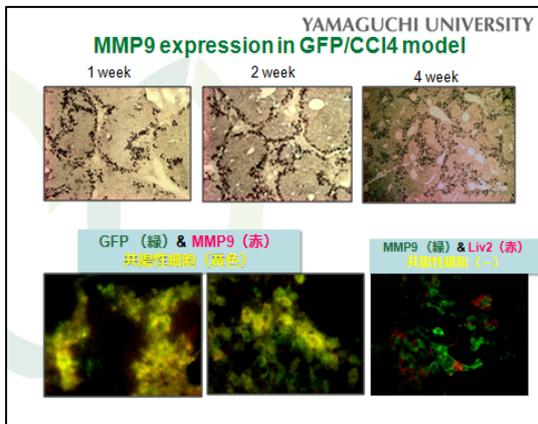
FEI社製透過型電子顕微鏡Tecnai12BTを使用して、実際の骨髄細胞からLiv2抗体陽性細胞への分化の経時的变化・関連を検証する。またαSMA抗体やMMP9抗体を使用した免疫電顕を行い肝星(伊東)細胞を同定し、GFP陽性骨髄細胞との関連やMMP9の発現、線維との関連を明らかにする。

肝硬変からの発癌における Mesenchymal Epithelial transition(MET)発生の解明

コリン欠乏アミノ酸置換食モデルは肝障害・脂肪肝から、線維化の強い肝硬変を経て肝細胞癌を発生する。線維化を引き起こす細胞は間葉系の伊東(星)細胞であり、肝硬変時には著明に増加している。コリン欠乏アミノ酸置換食でラットを6ヶ月飼育し、進行した肝硬変を作成する。その後、毎月ラットを犠牲死させ、beta-catenin及びE-cadherinと伊東細胞のマーカーである平滑筋アクチン染色と肝細胞癌のマーカーであるAFP染色を行い、間葉系の伊東細胞からの発癌が実際に存在するかを検討する。グルタチオン-Sトランスフェラーゼ(GSTP)免疫染色にて、陽性領域として認識できる前癌性病変の数や大きさに変化が起こるかを検討する

4. 研究成果

我々が開発した GFP/CC14 モデルの解析では、免疫電顕法を用いて GFP 陽性骨髄由来細胞の持続炎症下の定着、形態的变化について検討したところ投与した骨髄細胞は類円形の大型細胞と核 N/C 比の高い小型の細胞の二種類の細胞集団にわかれていることを証明した。また肝芽細胞マーカーの Liv2 抗体陽性細胞や幹細胞 marker といわれる A-6, EpCAM-1 陽性細胞, 研究協力者の寺井がクローニングした (Gastroenterology 2005) Maid 陽性細胞や MMP9 陽性細胞を免疫電顕でとらえることに成功し、各陽性細胞の形態の解析と GFP 陽性骨髄細胞の形態・細胞内器官の変化の解析を行った。また Liv2 陽性細胞・A-6 陽性細胞は N/C 比の高い小型の細胞で肝細胞周囲と線維化領域に存在し、MMP9 陽性細胞・Maid 陽性細胞は類円形の大型細胞で肝障害領域に入り込んでいた。



またこの GFP/CC14 モデルの解析で、持続肝障害環境での骨髄細胞の増殖において ER stress である XBPI1, GRP78 の発現が関わっていることも明らかにした

また肝硬変症が改善する際に関与するサイトカイン群の同定と細胞外マトリックスとの接着分子の同定のため、骨髄細胞投与後に変化する血清サイトカイン群を、骨髄細胞投与群と非投与群で比較検討した。サイトカインは BioPlex サスペンションアレイシステム

を用い、網羅的に変動するサイトカインを測定した。その結果多数のサイトカイン群の中で G-CSF と IL1b の発現の関与が骨髄細胞投与後の肝硬変状態の肝機能の改善に重要であることが明らかになった。

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 20 件)

- ① Segawa M, Sakaida I. Diagnosis and treatment of portal hypertension. *Hepatol Res.* Oct;39(10):1039-43 2009. 査読有
- ② Korenaga K, Korenaga M, Furukawa M, Yamasaki T, Sakaida I. Usefulness of Sonazoid contrast-enhanced ultrasonography for hepatocellular carcinoma: comparison with pathological diagnosis and superparamagnetic iron oxide magnetic resonance images. *J Gastroenterol.* 44(7):733-41. 2009 査読有
- ③ Terai S, Sakaida I. Current status of autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *Hepatol Res.* 2009 Nov;38 S72-75 査読有
- ④ Ohata S, Nawa M, Kasama T, Yamasaki T, Sawanobori K, Hata S, Nakamura T, Asaoka Y, Watanabe T, Okamoto H, Hara T, Terai S, Sakaida I, Katada T, Nishina H. Hematopoiesis-dependent expression of CD44 in murine hepatic progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb 20;379(4):817-23 2009. 査読有
- ⑤ Takaki-Hamabe S, Yamasaki T, Saeki I, Harima Y, Okita K, Terai S, Sakaida I. Hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma: Is the addition of subcutaneous interferon-alpha-2b beneficial? *Hepatol Res.* Mar;39(3):223-30 2009. 査読有
- ⑥ Ishigaki N, Yamamoto N, Jin H, Uchida K, Terai S, Sakaida I. Continuous intravenous infusion of atrial natriuretic peptide (ANP) prevented liver fibrosis in rat. *Hepatol Res.* 378(3):354-9 2009 査読有
- ⑦ Shiraishi R, Yamasaki T, Saeki I, Okita K, Yamaguchi Y, Uchida K, Terai S, Sakaida I. Pilot study of combination therapy with transcatheter arterial infusion chemotherapy using iodized oil and percutaneous radiofrequency ablation during occlusion of hepatic blood flow for hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Oncol.* Aug;31(4):311-6 2008. 査読有
- ⑧ Korenaga K, Korenaga M, Uchida K, Yamasaki T, Sakaida I. Effects of a late

- evening snack combined with alpha-glucosidase inhibitor on liver cirrhosis. *Hepatol Res.*38(11):1087-97 2008.査読有
- ⑨ Sakaida I. Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis. *J GastroenterolHepatol. Sep;*23(9):1349-53 2008.査読有
- ⑩ Marumoto Y, Terai S, Urata Y, Matsumoto T, Mizunaga Y, Yamamoto N, Jin H, Fujisawa K, Murata T, Shinoda K, Nishina H, Sakaida I. Continuous high expression of XBP1 and GRP78 is important for the survival of bone marrow cells in CCl4-treated cirrhotic liver. *Biochem Biophys Res Commun* 367(3):546-52 2008 査読有
- ⑪ Isobe-Harima Y, Terai S, Segawa M, Uchida K, Yamasaki T, Sakaida I. Serum S100b (astrocyte-specific protein) is a useful marker of hepatic encephalopathy in patients with fulminant hepatitis. *Liver Int.*Jan;28(1):146-7 2008.査読有
- ⑫ Nishina S, Hino K, Korenaga M, Vecchi C, Pietrangelo A, Mizukami Y, Furutani T, Sakai A, Okuda M, Hidaka I, Okita K, Sakaida I.Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription.*Gastroenterology.*Jan;134(1):226-38 2008. 査読有
- ⑬ Isobe-Harima Y, Terai S, Miura I, Segawa M, Murata T, Itamoto K, Taura Y, Shinoda K, Sakaida I. A new hepatic encephalopathy model to monitor the change of neural amino acids and astrocytes with behaviour disorder. *Liver Int.*Jan;28(1):117-25 2008.査読有
- ⑭ Jin H, Yamamoto N, Uchida K, Terai S, Sakaida I.Telmisartan prevents hepatic fibrosis and enzyme-altered lesions in liver cirrhosis rat induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Biochem Biophys Res Commun.* Dec 28;364(4):801-7 2007.査読有
- ⑮ Okita K, Kurokawa F, Yamasaki T, Sakaida I.Screening of hepatocellular cancer: Japanese strategy. *Hepatol Res.* Sep;37 Suppl 2:S142-5 2007.査読有
- ⑯ Jin H, Terai S, Sakaida I.The iron chelator deferoxamine causes activated hepatic stellate cells to become quiescent and to undergo apoptosis. *J Gastroenterol.* Jun;42(6):475-84 2007.査読有
- ⑰ Duan Y, Catana A, Meng Y, Yamamoto N, He S, Gupta S, Gambhir SS, Zern MA. Differentiation and enrichment of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells in vitro and in vivo. *Stem cells* 25(12):3058-68 2007.査読有
- ⑱ Tajima K, Terai S, Takami T, Kawaguchi K, Okita K, Sakaida I.Importance of inhibitor of DNA binding/differentiation 2 in hepatic stellate cell differentiation and proliferation.*HepatolRes.*Aug;37(8):647-55 2007.査読有
- ⑲ Urata Y, Okita K, Korenaga K, Uchida K, Yamasaki T, Sakaida I.The effect of supplementation with branched-chain amino acids in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res.* Jul;37(7):510-6 2007.査読有
- ⑳ Aoyama K, Tsuchiya M, Mori K, Kubo Y, Shiraishi K, Sakaguchi E, Yamashita S, Sakaida I. Effect of a late evening snack on outpatients with liver cirrhosis. *Hepatol Res.* Aug;37(8):608-14 2007.査読有
- [学会発表] (計 27 件)
- ① 山本 直樹 寺井 崇二 坂井田 功 GFP/CC14 モデルにおける微細構造解析からの骨髄中の肝幹細胞の動態解析 第9回日本再生医療学会総会 広島 2010年3月18日
- ② 岩本 拓也 山本 直樹 寺井 崇二 坂井田 功 脾臓摘出によるABMI療法の肝線維化、肝再生効果に対する臨床、基礎的検討 第9回日本再生医療学会総会 広島 2010年3月18日
- ③ 久永 拓郎 山本 直樹 寺井 崇二 坂井田 功 骨髄細胞投与による肝修復機構におけるTNF α シグナルの関与についての検討 第9回日本再生医療学会総会 広島 2010年3月18日
- ④ Yamamoto N, Terai S, Sakaida I.THE ELECTRON MICROSCOPICAL ANALYSIS FOR CELL LINEAGE OF BONE MARROW CELL DIFFERENTIATION IN CIRRHOSIS MICE. 第17回 UEGW/Gastro 2009(United European Gastroenterology Week) London UK 2009.11.25
- ⑤ Yamamoto N, Terai S, Sakaida I.THE ELECTRON MICROSCOPICAL ANALYSIS FOR CELL LINEAGE OF BONE MARROW CELL DIFFERENTIATION IN CIRRHOSIS MICE. 第60回 AASLD(The American Association for the Study of Liver Disease) Boston USA 2009.11.2
- ⑥ Hisanaga T, Terai S, Iwamoto T, Takami T, Yamamoto N, Nishina H, Sakaida I TNF-alpha signal is important to repair cirrhotic liver by bone marrow cell

- infusion 第 60 回 AASLD(The American Association for the Study of Liver Disease) Boston USA 2009.11.1
- ⑦ Iwamoto T, Terai S, Yamamoto N, Sakaida I Splenectomy enhances the effect of bone marrow cell infusion on the repair of the microenvironment in mice and patients with liver cirrhosis 第 60 回 AASLD(The American Association for the Study of Liver Disease) Boston USA 2009.10.31
- ⑧ 山本 直樹 寺井 崇二 坂井田 功 免疫電顕を用いた骨髄由来肝幹細胞の肝硬変の修復時の各種細胞の動態 第 16 回肝細胞研究会 山形 2009 年 6 月 26 日
- ⑨ 山本 直樹 寺井 崇二 坂井田 功 免疫電顕を用いた骨髄由来肝幹細胞の肝硬変の修復時の各種細胞の動態 第 45 回日本肝臓学会総会 神戸 2009 年 6 月 5 日
- ⑩ 岩本 拓也 山本 直樹 寺井 崇二 坂井田 功 脾臓摘出術の自己骨髄細胞投与療法に対する臨床、基礎的検討 第 45 回日本肝臓学会総会 神戸 2009 年 6 月 5 日
- ⑪ 久永 拓郎 山本 直樹 寺井 崇二 坂井田 功 骨髄細胞投与による肝修復機構における TNF α シグナルの関与についての検討 第 45 回日本肝臓学会総会 神戸 2009 年 6 月 5 日
- ⑫ 山本 直樹 寺井 崇二 坂井田 功 GFP/CC14 モデルにおける微細構造解析からの骨髄中の肝幹細胞の動態解析 第 8 回日本再生医療学会総会 東京 2009 年 3 月 5 日
- ⑬ 岩本 拓也 山本 直樹 寺井 崇二 坂井田 功 脾臓摘出による ABMI 療法の肝線維化、肝再生効果に対する臨床、基礎的検討 第 8 回日本再生医療学会総会 東京 2009 年 3 月 5 日
- ⑭ 久永 拓郎 山本 直樹 寺井 崇二 坂井田 功 肝硬変症に対するラエンネックの肝機能改善効果に対する検討 第 8 回日本再生医療学会総会 東京 2009 年 3 月 5 日
- ⑮ Iwamoto T, Terai S, Yamamoto N, Sakaida I ABMI therapy combined with splenectomy is an effective for liver cirrhosis 第 59 回 AASLD(The American Association for the Study of Liver Disease) San Francisco USA 2008.11.1
- ⑯ Mizunaga Y, Terai S, Yamamoto N, Sakaida I G-CSF is a candidate serum marker for ABMI therapy for liver cirrhosis patient 第 59 回 AASLD(The American Association for the Study of Liver Disease) San Francisco USA 2008.11.1
- ⑰ 寺井 崇二 藤澤 浩一 坂井田 功 Hepatic stem cell と cancer stem cell 第 12 回日本肝臓学会大会(JDDW) 東京 2008 年 10 月 15 日
- ⑱ 山本 直樹 寺井 崇二 坂井田 功 GFP/CC14 モデルにおける微細構造解析からの骨髄中の肝幹細胞の動態解析 第 44 回日本肝臓学会総会 愛媛 2008 年 6 月 4 日
- ⑲ 岩本 拓也 山本 直樹 寺井 崇二 坂井田 功 脾臓摘出術併用骨髄細胞投与による肝硬変の改善の検討 第 44 回日本肝臓学会総会 愛媛 2008 年 6 月 4 日
- ⑳ Sakaida Isao ABMI therapy for Liver Cirrhosis. 5th Symposium in Stem Cell Repair & Regeneration in Imperial College of London. London UK 2008 年 1 月 15-20 日
- ㉑ Terai S, Ishikawa T, Sakaida I et al Autologous bone marrow cell infusion (ABMI) therapy for liver cirrhosis patient. APASL 2007 Kyoto 2007 年 10 月 16 日
- ㉒ Terai S, Iwamoto T, Mizunaga Y, Omori K, Yamamoto N, Uchida K, Yamasaki T, Sakaida I. 第 58 回 AASLD(The American Association for the Study of Liver Disease) Boston USA 2007.11.1
- ㉓ Terai Shuji Sakaida Isao Current status of ABMI therapy for liver cirrhosis patient Japan Single Topic Conference. H Iwate 2007 年 10 月 5 日
- ㉔ Sakaida Isao Recent advance in nutritional therapy for liver cirrhosis including cell therapy Hong Kong Association for the Study of Liver Disease. Hong Kong 2007 年 9 月 5 日
- ㉕ 山本 直樹 寺井 崇二 坂井田 功 GFP/CC14 モデルにおける微細構造解析からの骨髄中の肝幹細胞の動態解析 第 14 回肝細胞研究会 鹿児島 2007 年 6 月 20 日
- ㉖ 山本 直樹 寺井 崇二 坂井田 功 GFP/CC14 モデルにおける微細構造解析からの骨髄中の肝幹細胞の動態解析 第 43 回日本肝臓学会総会 東京 2007 年 6 月 4 日
- ㉗ 山本 直樹 寺井 崇二 坂井田 功 GFP/CC14 モデルにおける微細構造解析からの骨髄中の肝幹細胞の動態解析 第 6 回日本再生医療学会総会 横浜 2007 年 4 月 4 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称：ナトリウム利尿ペプチドを有効性成分とする肝硬変、前癌病変の抑制剤

発明者：山本 直樹, 寺井 崇二, 坂井田 功

権利者：山口大学

種類：特願 2007-114293

番号：特願 2007-114293

取得年月日：H19年4月24日

国内外の別：国内

[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

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

(2) 研究分担者

山崎 隆弘 (Yamasaki Takahiro)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00334478

寺井 崇二 (Terai Shuji)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：00332809

山本 直樹 (Yamamoto Naoki)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90448283

(3) 連携研究者

なし