

平成 21 年 3 月 12 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590753
 研究課題名 (和文) 病態肝組織における骨髄間質細胞由来因子活性に着目した
 肝再生療法の開発
 研究課題名 (英文) Manipulating the stromal-derived factor 1 function in
 mouse liver cirrhosis
 研究代表者
 松田 康伸 (MATSUDA YASUNOBU)
 新潟大学・医歯学系・准教授
 研究者番号： 40334669

研究成果の概要：

骨髄幹細胞 (HSC) は、傷害臓器に発現する骨髄間質細胞因子 SDF-1 に誘引され遊走する。近年、セリンプロテアーゼ CD26 が SDF-1 を切断・不活化することが報告された。そこで本研究ではマウス肝障害モデルを用いて、CD26 が骨髄幹細胞の傷害肝への遊走に関する可能性を検討した。マウス肝硬変モデルに G-CSF や CD26 阻害剤 (diprotin A) を投与して、HSC の肝細胞分化頻度・治療効果を観察した結果、傷害肝は SDF-1 を発現する一方で CD26 活性も上昇しており、SDF-1 活性緩衝機構が存在することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：肝臓病学

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、骨髄幹細胞の末梢組織生着を司るケモカイン SDF-1/CXCL12 が幹細胞を誘引 (homing) して傷害部位選択的に幹細胞を生着させる作用をもつことが明らかにされた。

(2) これまで研究代表者らが過去論文を再現し、各実験モデルで使用されたマウス肝内の SDF-1 発現量を解析した結果、幹細胞の肝細胞分化に肯定的な報告で用いられた実験

モデルの肝内 SDF-1 発現量は著明な増加が認められた。この解析結果は、幹細胞による肝再生を高効率で促進するためには SDF-1 生体内機構を考慮すべきと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス肝硬変モデルに G-CSF と CD26/エラスターゼ阻害剤を様々なプロトコルで投与し、肝組織の SDF-1 活性を制御することがどの程度にまで病態を改

善しえるか解析することによって、ヒト肝疾患に奏功しうる可能性をもつ新しい肝再生治療の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 各動物モデルにおける肝内 SDF-1 発現レベルの解析： 主な野生型マウス肝障害モデルを再現して肝 SDF-1 を免疫組織染色・Western blotting 解析した。

(2) 各系統マウス肝障害における肝内 SDF-1 発現レベルの検討： 同週齢(6wk) 雌マウスに等量 CC14 を週 2 回・4 週間にわたり投与して、肝内 SDF-1 量を ELISA 測定した。

(3) G-CSF による肝内 SDF-1 の検討： G-CSF が SDF-1 を介して HSC homing・分化可塑性を促進するか検討する為に、正常マウスに G-CSF を投与した後、肝内 SDF-1 発現を免疫組織染色・Western blotting した。

(4) G-CSF による肝内への HSC homing の解析： G-CSF による肝内 SDF-1 誘導現象が HSC homing を惹起させるポテンシャルを有するかを検討する目的で、正常マウスに G-CSF 投与した後に、LacZ 陽性同系マウスの骨髄細胞を静脈投与した。

(5) 末期期肝硬変モデルにおける肝 SDF-1・HSC homing の観察： 病態が著しく進展した場合の G-CSF による骨髄幹細胞 homing 誘導作用を検討する目的で、LacZ 陽性細胞を骨髄移植したマウスに四塩化炭素 (CC14) を 12 週間投与して末期肝硬変を作製し、一定期間 G-CSF 投与した。

4. 研究成果

(1) 各動物モデルにおける肝内 SDF-1 発現レベルの解析：

組織染色： 各モデルにおける胆管上皮は生理的に SDF-1 を発現しており、組織染色の内部コントロールになり得た (矢印)。SDF-1 の肝組織内発現パターンは各動物モデルで様々に異なっており、129SVJ 系統は一部の肝細胞が発現する一方、B6 系は類洞に優位に発現しており、しかも四塩化炭素 (CC14) 量の違いにより SDF-1 染色度が異なっていた。

Western blotting： HSC 肝細胞分化頻度が高いと報告した実験における動物モデルの SDF-1 発現量は、HSC 分化頻度が低いと報告しているモデルの 4-10 倍であった。

(2) 各系統マウス肝障害における肝内 SDF-1 発現レベルの検討：

CC14 投与による肝内 SDF-1 発現量は、Balb/c >129SVJ>>C57BL/6, DBA/2 の順だった。Balb/c 系統の肝内 SDF-1 発現がこれまでの報

告で多く用いられている B6 系統の約 2 倍近くであったことから、以降の実験では肝臓への HSC homing が最も期待される Balb/c 系統マウスを用いることにした。

(3) G-CSF による肝内 SDF-1 の検討：

G-CSF は、一部の肝細胞と類洞内皮における SDF-1 発現上昇を誘導した。

(4) G-CSF による肝内への HSC homing の解析：

事前検討のドナーマウス皮膚移植ではレシピエントに拒絶反応は認められなかった。しかしながら、G-CSF 投与の有無に関わらず肝内 b-gal 陽性細胞は認められなかった。従って、生理条件下での G-CSF 単独投与による肝 SDF-1 発現だけでは、肝組織への HSC homing を誘導しないことが示唆された。

(5) 末期期肝硬変モデルにおける肝 SDF-1・HSC homing の観察：

免疫染色・Western blotting 共に、初期肝硬変時に比べて肝 SDF-1 発現が増強しており、G-CSF 投与群でさらに 2-5 倍増強した。コントロール群の門脈周囲・胆管上皮は骨髄由来 b-gal 陽性細胞に置換されており、病態が進展すると HSC が肝組織に可塑性分化する事が示唆された。一方 G-CSF 投与群は、さらに 100-400 個レベルの b-gal 陽性肝細胞がクラスター状に出現していた。G-CSF 投与群の collagen type 1 蓄積は約 6-7 割に減少しており、血清アルブミン値の有意な改善を認めた。

(6) 考察および今後の展望：

血液に存在する赤血球・白血球・リンパ球など多様な細胞が共通の骨髄幹細胞に由来することが 1960 年代に証明されて以来、幹細胞の多分化能に関する研究は飛躍的な発展を遂げている。2000 年代には骨髄幹細胞が心筋・血管・神経など非造血系細胞に分化可塑性を有することが発見され、いまや骨髄幹細胞は再生医学の有力なツールとして認識されている。

ところで近年、骨髄幹細胞の末梢組織生着を司るケモカインである、骨髄間質細胞由来因子 (SDF-1/CXCL12) が同定され、末梢臓器に発現した SDF-1 が幹細胞を誘引 (homing) して傷害部位選択的に幹細胞を生着させる作用をもつことが明らかにされた。研究代表者らが骨髄幹細胞の分化誘導と SDF-1 の相互関係を探るために過去論文を忠実に再現し、各実験モデルで使用されたマウス肝内の SDF-1 発現量を免疫組織染色・Western blot・ELISA 法で解析した結果、幹細胞の肝細胞分化に肯定的な報告で用いられた実験モデルの肝内 SDF-1 発現量は著明な増加が認められた一方で、否定的な研究の動物モデルの肝内 SDF-1

は極めて低レベルであることが明らかになった。この解析結果は、幹細胞による肝再生を高効率で促進するためには SDF-1 生体内機構を考慮すべきと考えられた。さらに研究代表者らは、造血因子 G-CSF がマウス肝 SDF-1 を数十倍に増加することを見出し、CD26 阻害剤 (diprotin A) や好中球エラストーゼ阻害剤が骨髄幹細胞の病態肝組織への遊走を著明に促進することを最近見出した。

そこで本研究ではこれまでの基礎的研究の成果を参考にしてマウス肝硬変モデルに G-CSF と CD26/エラストーゼ阻害剤を様々なプロトコルで投与し、肝組織の SDF-1 活性を制御することがどの程度にまで病態を改善しえるか解析することによって、ヒト肝疾患に奏功しうる可能性をもつ新しい肝再生治療の開発を目指した。

本研究による実験の結果、過去報告で使用されたマウス動物モデルの肝内 SDF-1 レベルは多様であり、各報告における骨髄由来 HSC の肝細胞分化の頻度の違いを説明しうる理由のひとつと推測される。

また G-CSF は肝内 SDF-1 を誘導することを見出した (G-CSF receptor は肝細胞に存在しないので、パラクリン機構による可能性が示唆される)。しかし、生理条件下では骨髄 HSC を肝臓へ誘導できない。G-CSF はマウス初期肝硬変の SDF-1 発現を上昇して、骨髄 HSC の非実質細胞分化を促す。しかしながら骨髄 HSC の肝細胞分化を誘導することはできない。しかも、G-CSF を長期に投与すると、かえって肝内浸潤リンパ球が増加するので、安易な臨床応用は控えるべきと思われる。G-CSF はマウス末期肝硬変の SDF-1 発現を上昇して、骨髄 HSC 肝細胞分化を促進する。この場合、肝繊維化の進行・血清アルブミン低下を抑制する治療効果が期待される。

以上総括すると、骨髄 HSC は、肝内 SDF-1 上昇に加えて病態進行に伴う homing 誘導環境においてのみ、肝細胞に分化できる可能性が推測される。臨床応用の点から考えると、骨髄 HSC を効率よく肝細胞に分化できる生理条件を探索することが今後重要と思われる。

本研究によって、G-CSF が病態肝組織の SDF-1 発現を促進して、骨髄幹細胞の遊走・生着に役立っていることが明らかになった。そこで今後は、G-CSF 投与マウスに CD 26 やエラストーゼ各阻害剤を投与して、G-CSF により上昇した SDF-1 の不活化を最も回避し得る投与方法を検討して、将来的に臨床応用可能な肝再生治療法をみいだしたい。

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 8 件)

- ① Matsuda Y. Molecular mechanism underlying the functional loss of cyclindependent kinase inhibitors p16 and p27 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 14(11):1734-1740 (2008) 査読あり
- ② Yamazaki K, Suzuki K, Ohkoshi S, Yano M, Kurita S, Aoki YH, Toba K, Takamura MA, Yamagiwa S, Matsuda Y, Aoyagi Y. Temporal treatment with interferon-beta prevents hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus X gene transgenic mice. *J Hepatol* 48(2):255-265 (2008) 査読あり
- ③ Tsuchiya A, Heike T, Baba S, Fujino H, Umeda K, Matsuda Y, Nomoto M, Ichida T, Aoyagi Y, Nakahata T. Sca-1+ endothelial cells (SPECs) reside in the portal area of the liver and contribute to rapid recovery from acute liver disease. *Biochem Biophys Res Commun* 365(3):595-601 (2008) 査読あり
- ④ Hokari M, Matsuda Y, Wakai T, Shirai Y, Sato M, Tsuchiya A, Takamura M, Yamagiwa S, Suzuki K, Ohkoshi S, Ichida T, Kawachi H, Aoyagi Y. Tumor suppressor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 potentates the anchorage-independent growth of human hepatoma HepG2 cells. *Life Sci* 81(4):336-345 (2007) 査読あり
- ⑤ Yamazaki K, Ohkoshi S, Maruyama M, Aoki YH, Yano M, Kurita S, Suzuki K, Matsuda Y, Sugimura K, Aoyagi Y. Early upsurge in anti-HBs titer possibly caused by the immunomodulative, not by the mutagenetic effect of interferon and ribavirin. *Hepatol Res* 37(6):477-81 (2007) 査読あり
- ⑥ Honda Y, Yamagiwa S, Matsuda Y, Takamura M, Ichida T, Aoyagi Y. Altered expression of TLR homolog RP105 on monocytes hypersensitive to LPS in patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 47(3):404-411 (2007) 査読あり
- ⑦ Takamura M, Matsuda Y, Yamagiwa S, Tamura Y, Honda Y, Suzuki K, Ichida T, Aoyagi Y. An inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase, SP600125, protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatic failure by modulating BH3-only proteins. *Life Sci* 80(14):1335-1344

(2007) 査読あり

- ⑧ Tsuchiya A, Heike T, Baba S, Fujino H, Umeda K, Matsuda Y, Nomoto M, Ichida T, Aoyagi Y, Nakahata T. Long-term culture of postnatal mouse hepatic stem/progenitor cells and their relative developmental hierarchy. *Stem Cells* 2007;25(4):895-902 (2007) 査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

なし

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 康伸 (MATSUDA YASUNOBU)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40334669

(2) 研究分担者

山際 訓

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：10419327

高村 昌昭

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：20422602

(3) 連携研究者

なし