

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目： 若手研究 (B)

研究期間： 2007 ~ 2008

課題番号： 19790486

研究課題名 (和文) 微細構造解析からの骨髄中の肝幹細胞の動態研究

研究課題名 (英文) THE ELECTRON MICROSCOPICAL ANALYSIS FOR CELL LINEAGE OF BONE MARROW STEM CELL DIFFERENTIATION IN CIRRHOSIS MICE

研究代表者

山本 直樹 (YAMAMOTO NAOKI)

山口大学・医学部附属病院・医員

研究者番号： 90448283

研究成果の概要：

我々はマウス GFP/CCl<sub>4</sub>モデル(骨髄細胞から肝細胞への分化・増殖評価モデル)を開発し、そのモデルでの骨髄細胞内の肝細胞に分化増殖する細胞集団の特徴を FEI 社製透過型電子顕微鏡 Tecnai12BT を使用し免疫電顕で微小環境での骨髄細胞の動態を解析した。GFP 陽性骨髄由来細胞の定着、分化の形態的变化、肝細胞索構造の形成をとらえ、また Liv2 陽性細胞・A6 陽性細胞・Liv8 陽性細胞・MMP9 陽性細胞・Maid 陽性細胞など様々な細胞を検出することができた。Liv2 陽性細胞は小型であり、類円形の MMP9, Maid, Liv8 等陽性細胞とは大きさ・形態が異なり、二つの骨髄細胞集団が存在することが確認できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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

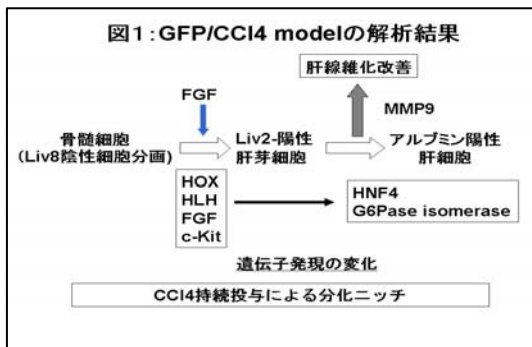
キーワード： 移植・再生医療, 電子顕微鏡, 再生医学, 発生・分化, 肝線維化

### 1. 研究開始当初の背景

近年肝硬変など難治性肝疾患に対しての治療法としてわが国では主として生体肝移植が行われているが、ドナー不足や倫理的な面など依然として問題が多い。一方で幹細胞を用いた細胞移植療法は、免疫拒絶反応もなく、患者の生体組織に適応した新たな臓器再生法として期待されてきている。骨髄細胞から肝細胞への分化を示す幹細胞の発見により、幹細胞を用いた新しい肝臓再生療法が期待された。我々は骨髄中に幹細胞が存在するな

らばどのような条件にて、投与した骨髄細胞は分化するか、また骨髄細胞の投与によりレシピエントに与える効果についてマウス GFP/CCl<sub>4</sub>モデル(骨髄細胞から肝細胞への分化・増殖評価モデル)を開発し、それをを用い基礎研究にて検証してきた。(J Biochemistry 2003) さらに骨髄細胞移植により肝機能と生存率の回復を発見した。そして我々は平成 15 年 11 月 14 日に国内初の(自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法, Autologous Bone Marrow Cell infusion (ABMI) therapy) の臨床研究を

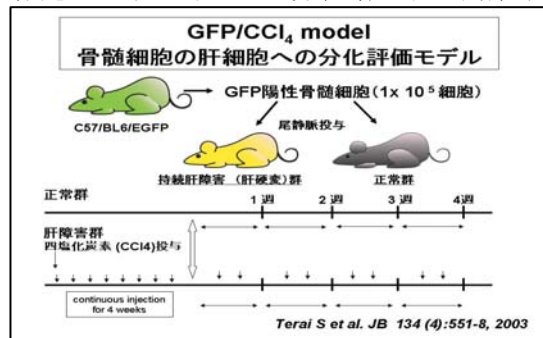
開始し、自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法は安全に施行でき、かつ基礎研究と同様に骨髄移植による肝不全患者の肝機能の改善が明らかになってきた(Stem Cells 2006)。研究代表者の山本は、共同研究者の東京医科歯科大学の仁科らが開発した肝芽細胞マーカーである Liv2 抗体、骨髄中の間葉系幹細胞の分画分離抗体である Liv8 抗体を使用したこのモデルでの解析により Liv8 陰性分画：特に間葉系細胞が効率的に肝硬変肝の門脈域に定着し、Liv2 陽性の肝芽細胞へと表現型が変化し、最終的にアルブミン陽性肝細胞へ分化したことを明らかにした。(BBRC 2004)(Hepatology Review 2006)この骨髄細胞の分化過程において骨髄細胞が matrix metalloproteinase-9 (MMP9)など産生する結果、肝線維化を改善し生存率を改善することが明らかにした。(Hepatology 2004. Hepatology Alert 記事)



しかし、骨髄細胞中の肝細胞に分化増殖する間葉系細胞集団がどんな分画に存在し、どのような特徴を示すのか未だにはっきりわかっていない。さらに実際に肝臓に定着した骨髄幹細胞が肝細胞に分化する際に、肝線維化も含む組織内の周囲の微小環境においてどのように改善していくのか、肝細胞や Liv2 陽性細胞、星細胞やクッパー細胞など類洞内細胞との関連・微細構造の変化なども未だにはっきりわかっていないのが現状である。今回の研究ではこの部分について明らかにしたい。一方過去の基礎研究では、骨髄細胞単回投与より頻回投与の方が生存率で差が生じ、頻回投与の方が予後がよいことが判明している。今後新しい骨髄細胞の保存方法を開発することで、臨床研究において保存後の頻回投与が可能となり、その使用は治療効果の持続期間を長くする可能性がある。また骨髄中の間葉系幹細胞の分画分離抗体である Liv8 抗体を使用した解析を行ってきたが、今回の研究計画では骨髄細胞採取後 Percoll 法での遠心分離される分画との、Liv8 分画との関係、また遠心分離したどの層に肝再生に有用な分画があるか明らかにしたいと考え研究計画を作成した。

## 2. 研究の目的

骨髄細胞中の肝細胞に分化増殖する間葉系



細胞集団がどんな分画に存在し、どのような特徴を示すのか未だにはっきりわかっていない。さらに実際に肝臓に定着した骨髄幹細胞が肝細胞に分化する際に、肝線維化も含む組織内の周囲の微小環境においてどのように改善していくのか、肝細胞や Liv2 陽性細胞、星細胞やクッパー細胞など類洞内細胞との関連・微細構造の変化などを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) GFP/CCl4 モデルにおける電子顕微鏡での検討

GFP/CCl4 モデルを作成し、FEI 社製透過型電子顕微鏡 Tecnai12BT を使用し GFP/CCl4 モデルの肝臓について検討する。すなわち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。免疫電顕法を用いて今まで明らかに出来なかった GFP 陽性骨髄由来細胞の持続炎症下の肝硬変への定着、分化の形態的变化、肝細胞索構造の形成、E-cadherin, VCAM-1 などの接着因子や MMP9 などの産生との関連について検討していく。また実際の骨髄細胞から Liv2 抗体陽性細胞への分化の経時的変化・関連を検証する。また α SMA 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していく。

### (2) 骨髄細胞中の肝幹細胞の同定

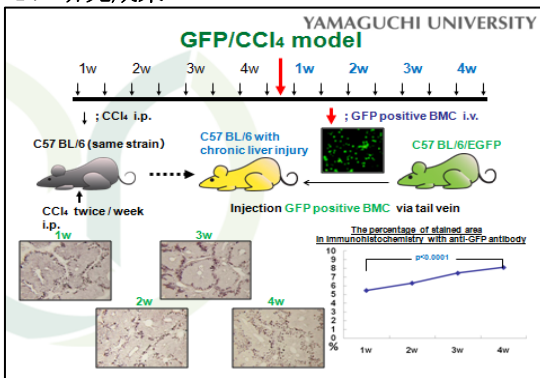
実際の骨髄細胞を用いた治療を行う上で、当院にはガンプロ社の血球分離装置があり、ヒト骨髄細胞をこの装置で各分画・各層に分離することができる。この装置は遠心分離で骨髄細胞を分離することが可能な装置である。マウスにおいてこの装置で分離される分画と Percoll 法での遠心分離される分画との間には相関があることがわかっており、遠心分離の回転数で Percoll のどの分画に相当するかがはっきりしている。そこでどの分画がヒトにおいて有効であるかを探求するために、基礎実験として Percoll を使用して、マウス骨髄細胞を分離し、GFP/CCl4 モデルで移植実験を行い、分離した細胞集団でどの分画が、肝再生に有用であるか？どの分画に過去の基

礎研究から明らかになったように Liv 8 陽性・陰性分画細胞の特徴を示すか比較し探求する。また FACS 解析を行い、この分画中の CD45, CD44, CD34, C-kit, Sca-1 を検討する。実際には細胞投与一週間後,二週間後,四週間後に肝組織を採取し,どの細胞集団に肝再生において重要な骨髄幹細胞が存在するかを解析する。

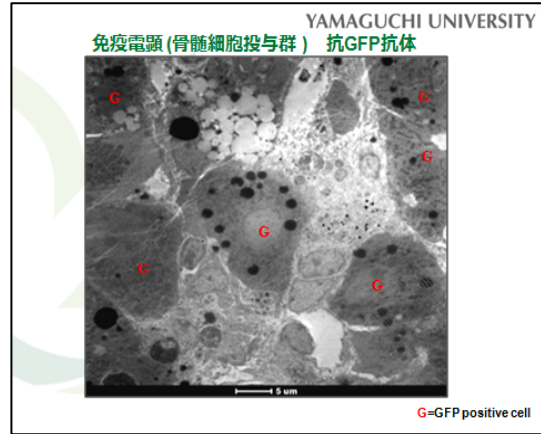
### (3)新しい骨髄細胞保存方法の開発

マウス骨髄細胞を採取し,まずはすでに臨床において使われている CP-1 (細胞凍結用保存液) を使用する群と,様々な培養用溶液を使用する群,それらに DMSO とマウス血清を様々なパーセントで混ぜ合わせる群などで凍結保存する。その後,保存後の細胞を起こし,細胞のバイアビリティや細胞周期などを FACS で確認して保存後の骨髄細胞ができるだけ保存前と同じ状態で機能面で維持されている方法を探索し,確立させる。また Laser Scanning Cytometer を行い,細胞の DNA 量の変化について検討する。まず GFP/CC14 モデルを用い,保存細胞を解冻後,レシピント肝障害マウスに移植し in vivo での検討を行う。実際にはマウス骨髄細胞を採取し,臨床において使われている CP-1 (細胞凍結用保存液) を使用する群と,様々な培養用溶液を使用する群,それらに DMSO とマウス血清を様々なパーセントで混ぜ合わせる群などで凍結保存する。その後,保存後の細胞を起こし,細胞のバイアビリティや細胞周期などを FACS で確認して保存後の骨髄細胞ができるだけ保存前と同じ状態で機能面で維持されている方法を検討する。

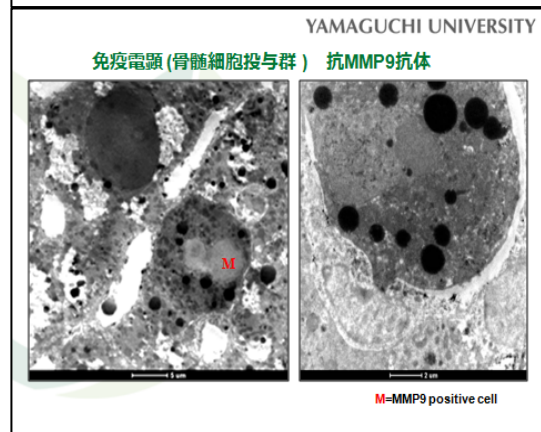
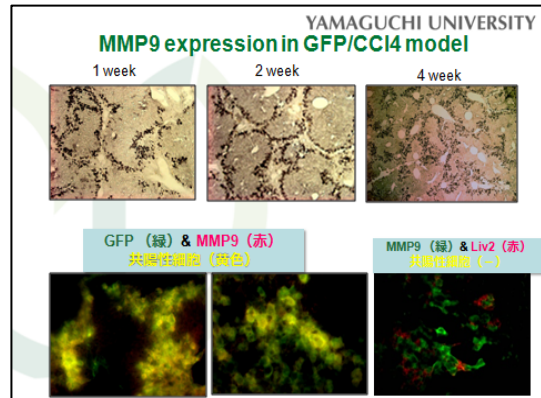
## 4. 研究成果



図のGFP/CC14 modelより投与した骨髄細胞の動態を免疫電顕によって肝障害持続群と正常群と肝障害持続群+骨髄細胞投与群の三群の解析を行った結果より,まずGFP抗体による免疫電顕によって今まで明らかに出来なかったGFP陽性骨髄由来細胞の定着,分化の形態的变化,肝細胞索構造の形成をとらえることができた。また骨髄細胞投与群では大量lysosomeを含む肝細胞が増加しており,この細胞はGFP抗体での免疫電顕でほぼ一致を示していた。

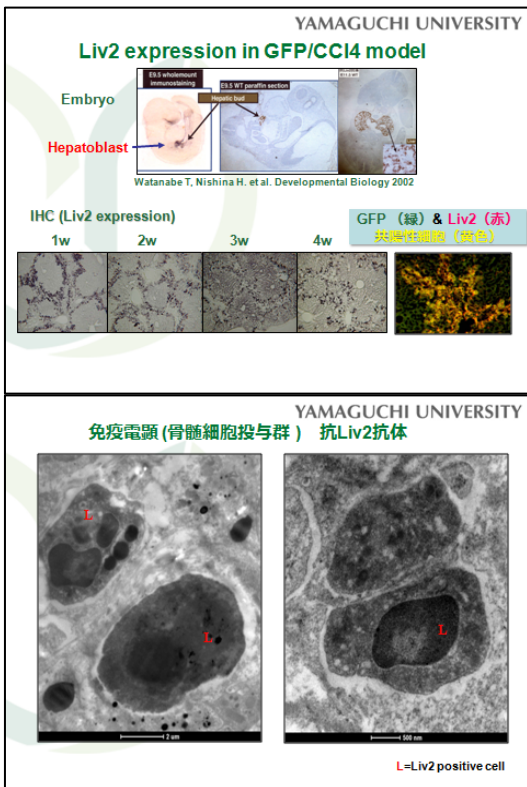


また骨髄細胞投与群でマウス肝芽細胞 marker/Liv2陽性細胞・Oval cell marker/A6陽性細胞・CD44/Liv8陽性細胞・MMP9陽性細胞・肝前癌病変marker/Maid陽性細胞など様々な細胞集団を免疫電顕で検出することができ,それぞれの細胞集団の特徴を電顕と蛍光二重・三重染色と総合して評価した。



またαSMA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,線維との関連を探究中である。現在も解析継続中であるがLiv2陽性細胞集団は小型の細胞集団であり,類円形のMMP9, Maid, Liv8等陽性細胞集団とは大きさ・形態の異なる細胞集団であることがわかり,投与した骨髄細胞には二つの細胞集団が存在するこ

とが確認できた。



## 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 3件)

- (1) 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. 378(3):354-9 2009 査読有
- (2) 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 CC14-treated cirrhotic liver. Biochem Biophys Res Commun 367(3):546-52 2008 査読有
- (3) 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

[学会発表] (計 5件)

- (1) 山本 直樹 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

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

(2) 山本 直樹 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

(3) 山本 直樹 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

(4) 山本 直樹 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

(5) 山本 直樹 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/content\\_s4/?categoryId=7](http://www.ichinai-yamaguchi.jp/content_s4/?categoryId=7)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 直樹 (Yamamoto Naoki)

山口大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 90448283

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし