

機関番号：13601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591604

研究課題名 (和文) 遺伝性肝疾患に対する骨髄細胞移植療法の開発

研究課題名 (英文) New therapeutic approach with bone marrow cell for hereditary liver diseases

研究代表者

中田 岳成 (NAKATA TAKENARI)

信州大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70377638

研究成果の概要 (和文) : GFP発現骨髄細胞 (BMCs) を脾臓経路でウィルソン病モデル新生児ラットに注入・移植し、BMCからの肝細胞 (BMDHs) 発現、機能を検討した。注入後18ヶ月にてBMDHsが肝臓に生着していること、障害肝モデルでは低下しているはずのセルロプラスミンの酸性活性が上昇していること、BMDHsは細胞融合によって発生していることが確認され、出現したBMDsから新生物形成病変は確認されなかった。我々の実験結果は、この新しい戦略がBMDHsをつくるために効果的で安全なことを示唆すると思われた。

研究成果の概要 (英文) : We used Long Evans Cinnamon (LEC) rats as recipients, a model of Wilson disease and liver carcinogenesis. GFP-expressing BMCs were injected into newborn LEC rats through the spleen.

At 18 months after injection, we found some green fluorescent protein-expressing areas macroscopically in the liver of treated LEC rats. The oxidative activity of ceruloplasmin increased. Moreover, we confirmed that the BMDHs were generated by cell fusion and was not detected in any of the neoplastic lesions or cholangiofibrotic regions.

Our results suggest that this novel strategy for creating BMDHs is effective and safe.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：移植医療、再生医療、骨髄移植

## 1. 研究開始当初の背景

現在、肝移植は、肝硬変症、劇症肝炎、先天性肝疾患、肝細胞癌症例に対する治療法の一つとして確立されている。しかし、その適応の拡大と相反して、年々増加する移植レシ

ピエントに対するドナー不足がこの治療法の大きな課題の一つである。本邦においては生体肝移植がその大半を占め、脳死患者からの肝移植は極めて少なく、ドナーに対する手術侵襲もこの治療法の問題点であった。近年、こうしたドナー不足の解消、またはドナーに

対する侵襲の軽減を目的に、再生医学分野において、幹細胞から臓器または細胞を構築しようとする研究が盛んになされている。細胞ソースとして、胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いる実験も数多く施行され、魅力的な成果を数多く挙げている。しかしながら、倫理的問題、細胞採取の問題、扱いやすさ、Teratoma 形成などの malignant potential など臨床応用までには超えなければならない課題も多いのが現状である。一方、骨髄幹細胞も様々な組織の細胞に分化または融合することが知られており、その扱いやすさや、細胞採取の観点から我々は骨髄幹細胞に着目した。肝臓においては、骨髄幹細胞が肝細胞に分化するとして報告もあるが、現在のところ、様々な障害をうけた肝細胞と骨髄幹細胞が細胞融合すると考えられている。分化であっても細胞融合であってもその機序は問わず、肝細胞としての機能を有するとされており、肝疾患の治療において臨床上有用であることに変わりはない。実際、本邦においても、肝硬変症の患者に骨髄細胞を投与する治療も試みられている。しかしながら、様々な種類の肝障害モデルを用いた実験においては、まだまだ治療として応用できるほどの結果は得られていないのが現状である。様々な肝障害モデルを用いた実験が報告されているが数%の肝細胞のみが骨髄細胞と融合するものがほとんどである。以前我々も Long-Evans Cinnamon (LEC) ラット (Wilson 病モデル) において、骨髄細胞と肝細胞が細胞融合することを報告した。今回我々は、LEC ラットに骨髄細胞を投与し、より効率よく骨髄細胞を肝臓に集約させる方法を開発し、骨髄細胞を用いた遺伝性肝代謝疾患に対する細胞移植療法の臨床応用を目指す。

## 2. 研究の目的

骨髄細胞を用いた細胞移植療法を臨床応用する場合、

(1) より効率よく骨髄を肝臓に集約させること。

(2) 骨髄細胞移植の安全性。

の2点が解明すべき命題である。現在、我々は、出生直後は免疫寛容であることに着目し、出産直後に骨髄細胞を移植することによって、より効率よく肝臓に骨髄細胞が集約する結果を確認している。今回の研究期間内に

①骨髄細胞の投与される時期の検討 (胎児投与も含め投与時期について検討する。)

②骨髄細胞の投与回数の検討。

③骨髄と肝細胞の融合した細胞の malignant potential の検討。

## 3. 研究の方法

(1) 雌の green fluorescence protein (GFP) トランスジェニックラットから骨髄を採取する。採取した骨髄を  $1 \times 10^7$  個、出生直後の LEC ラットをイソフルレンでガス麻酔後、開腹して脾臓から骨髄細胞を投与する。

(2) 骨髄細胞移植後 18 ヶ月における肝臓に占める GFP 陽性範囲の割合を、全割した組織標本上で面積として算出する (NIH image を使用)。さらに、全肝細胞に占める割合 (GFP 陽性肝細胞数/肝細胞数) を算出する。。

(3) 骨髄由来肝細胞の肝機能評価：

LEC ラットは wilson 病のモデルラットで、銅代謝を担う蛋白質であるセルロプラスミンが欠損するため発病する。この骨髄細胞移植モデルにおいてどの程度セルロプラスミン値が改善するのか検討する。

(4) 新生物の発現について、GFP 陽性肝内胆管癌が発生しているのか、または GFP 陽性となる細胞が一部分でも存在するのか検討する。

## 4. 研究成果

(1) LEC ラットは重篤な肝障害をもつため生後 4-5 ヶ月で死亡したが、BMC 移植 LEC ラットは 18 ヶ月まで 8 匹中 7 匹が生存した。

(2) 注射の後の 18 ヶ月に、BMC 移植された LEC ラットの肝臓において、肉眼的に GFP 発現領域を認めた。

(3) セルロプラスミンの酸性活性は、処理された LEC ラット (n=7) で増加して、非処理の LEC ラット (P=0.015) でのそれより有意に高かった。

(4) 肝細胞としての機能性を確認するため、mRNA レベルで atp7b、GFP、albumin を、またタンパクレベルで albumin の発現を確認した。

(5) BMDHs は細胞融合によって発生していることが確認された。

(6) 出現した BMDs から新生物形成病変は確認されなかった。

## 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 15 件)

① COP35, a cholangiocarcinoma-binding oligo-peptide, interacts with the clathrin heavy chain accompanied by GRP78.

Kitahara H, Masumoto J, Parker AL, Maruta F, Kubo N, Shimizu A, Akita N, Miwa S, Kobayashi N, Nakayama J, Miyagawa S. *Mol Cancer Res*. 2011;May;13(in press), 査読有

②Clinicopathological features of hepatitis C virus disease after living donor liver transplantation: relationship with in situ hybridisation data.

Masuda Y, Nakazawa Y, Matsuda K, Sano K, Mita A, Ohno Y, Urata K, Ikegami T, Miwa S, Miyagawa S. *Pathology*. 2011;43:156-160, 査読有

③Noncompliance with medications in pediatric patients after living-donor liver transplantation.

Masuda Y, Mita A, Ohno Y, Urata K, Nakazawa Y, Ikegami T, Masaru T, Miyagawa S. *Transplant Proc*. 2010;42:4191-4192, 査読有

④Isolation and characterization of portal branch ligation-stimulated Hmga2-positive bipotent hepatic progenitor cells.

Sakai H, Tagawa Y, Tamai M, Motoyama H, Ogawa S, Soeda J, Nakata T, Miyagawa S. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;17:403:298-304, 査読有

⑤Induction of high endothelial venule-like vessels expressing GlcNAc6ST-1-mediated L-selectin ligand carbohydrate and mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) in a mouse model of "Candidatus *Helicobacter heilmannii*"-induced gastritis and gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. Suzuki A, Kobayashi M, Matsuda K, Matsumoto T, Kawakubo M, Kumazawa S, Koide N, Miyagawa S, Ota H. *Helicobacter*. 2010;15:538-548, 査読有

⑥Disease recurrence patterns after R0 resection of hilar cholangiocarcinoma. Kobayashi A, Miwa S, Nakata T, Miyagawa S. *Br J Surg*. 2010;Jan;97(1):56-64, 査読有

⑦Adrenomedullin in sinusoidal endothelial cells play protective roles against cold injury of liver.

Iinuma N, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Arai T, Yoshizawa T, Koyama T, Uetake R, Kawate H, Muto S, Tagawa Y, Miyagawa S, Shindo T. *Peptides*. 2010;31:865-871, 査読有

⑧In vitro reprogramming of adult hepatocytes into insulin-producing cells without viral vectors.

Motoyama H, Ogawa S, Kubo A, Miwa S, Nakayama J, Tagawa Y, Miyagawa S.

*Biochem Biophys Res Commun*. 2009;Jul;17:385(1):123-128, 査読有

⑨Potential feasibility of early bone marrow cell injection into the spleen for creating functional hepatocytes.

Misawa R, Soeda J, Ise H, Takahashi M, Kubota K, Mita A, Nakata T, Miyagawa S. *Transplantation*. 2009;87:1147-1154, 査読有

⑩Clinical and pathological features of primary carcinoma of the cystic duct.

Nakata T, Kobayashi A, Miwa S, Soeda J, Uehara T, Miyagawa S. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2009;16:75-82, 査読有

⑪Administration of dalteparin based on the activated clotting time for prophylaxis of hepatic vessel thrombosis in living donor liver transplantation.

Uchikawa Y, Ikegami T, Masuda Y, Ohno Y, Mita A, Urata K, Nakazawa Y, Terada M, Miyagawa S. *Transplant Proc*. 2009;41:3784-3790, 査読有

⑫Prognosis of adult patients transplanted with liver grafts < 35% of their standard liver volume.

Ikegami T, Masuda Y, Ohno Y, Mita A, Kobayashi A, Urata K, Nakazawa Y, Miwa S, Hashikura Y, Miyagawa S. *Liver Transpl*. 2009;15:1622-1630, 査読有

⑬Prognostic impact of anatomical resection on early and late intrahepatic recurrence in patients with hepatocellular carcinoma.

Kobayashi A, Miyagawa S, Miwa S, Nakata T. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2008;15:515-521, 査読有

⑭Identification of genes associated with multiple nodules in hepatocellular carcinoma using cDNA microarray: multicentric occurrence or intrahepatic metastasis?

Nakata T, Seki N, Miwa S, Kobayashi A, Soeda J, Nimura Y, Kawasaki S, Miyagawa S. *Hepatogastroenterology*. 2008;55:865-872, 査読有

⑮Primary liver carcinoma exhibiting dual hepatocellular-biliary epithelial differentiations associated with citrin deficiency.

Soeda J, Yazaki M, Nakata T, Miwa S, Ikeda S, Hosoda W, Iijima M, Kobayashi K, Saheki T, Kojiro M, Miyagawa S. *J Clin Gastroenterol*. 2008;42:855-60, 査読有

〔学会発表〕（計 6 件）

- ①中田岳成, 胆道癌取扱い規約における Calot 三角、胆嚢管の扱いを考える, 第 18 回日本消化器関連学会週間, 2010. 10. 15, 横浜
- ②Hiroaki Motoyama, An excellent non-viral procedure to induce liver-to-pancreas reprogramming to complement post-operative pancreatic endocrine dysfunction, 8th Catholic International Stem Cell Symposium, October, 2, 2010, Korea
- ③中田岳成, 膵癌切除症例に対する術後補助化学療法 (gemcitabine) の課題, 第 65 回日本消化器外科学会総会, 2010. 7. 15, 下関市
- ④中田岳成, 膵癌切除後 GEM 術後補助化学療法施行症例の再発診断, 第 64 回日本消化器外科学会, 2009. 7. 18, 大阪
- ⑤中田岳成, 膵癌切除例に対する術後補助化学療法、再発時 S-1 療法の治療成績, 第 109 回日本外科学会, 2009. 4. 4, 福岡
- ⑥中田岳成, 非閉塞性黄疸胆嚢癌症例に対する胆管切除付加の意義, 第 63 回日本消化器外科学会総会, 2008. 7. 17, 札幌

〔図書〕（計 1 件）

中田岳成, (株) 文光堂, 肝疾患クリニカルスタンダード, 2010, pp212-218

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中田 岳成 (NAKATA TAKENARI)  
信州大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：70377638

### (2) 研究分担者

宮川 眞一 (MIYAGAWA SHINICHI)  
信州大学・医学部・教授  
研究者番号：80229806

本山 博章 (MOTOYAMA HIROAKI)  
信州大学・医学部附属病院・助教（特定雇用）  
研究者番号：20569587