

平成22年5月24日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790511

研究課題名（和文） 骨髄幹細胞の動員と分化誘導に基づく線維化改善・肝再生療法の試み

研究課題名（英文） Induction of mobilization and differentiation of bone marrow stem cells for the treatment of fibrosis and liver regeneration

研究代表者

東山 礼一（HIGASHIYAMA REIICHI）

東海大学・医学部・奨励研究員

研究者番号：80459495

研究成果の概要（和文）：マトリックス分解酵素 MMP-13 の強制発現により骨髄由来細胞の線維肝組織への生着と肝類洞壁細胞への分化促進が認められた。また骨髄由来細胞のみ MMP-13/-9 を産生する肝線維症マウスの解析では、肝組織中に骨髄由来の MMP-13/-9 遺伝子発現と線維吸収部の MMP 酵素活性を認めた。この過程における増殖因子の活性化と肝類洞構造の修復機序を明らかにすることで、骨髄幹細胞の動員と分化誘導に基づく線維化改善と肝再生促進治療法の開発を目指している。

研究成果の概要（英文）：Overexpression of matrix metalloproteinase (MMP)-13 enhanced the migration of bone marrow (BM)-derived cells and their differentiation into sinusoidal cells in fibrotic liver. Expression of MMP-13/-9 mRNA and enzymatic activity of MMPs was detected in the regression of liver fibrosis in the model mice that produce MMP-13/-9 only by BM-derived cells. These results may suggest the therapeutic implications of MMPs in the repair and regeneration of fibrotic liver.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：肝線維症、骨髄細胞、コラーゲン、マトリックス分解酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝線維症は肝炎ウイルスの持続感染やアルコールの過剰摂取などを原因として引き起こされる疾患であり、放置すれば終末像である肝硬変、さらに肝臓癌へと高率に進展する。コラーゲンをはじめとする細胞外基質

(マトリックス) は生体組織の維持・修復に関わっているが、その含有量は合成系と分解系のバランスの上に維持されており、この調節機構が破綻するとマトリックス成分が過剰に蓄積され、臓器の線維症をきたす。このため、線維症治療ではこれら合成系の抑制ま

たは分解系の促進によりコラーゲン量を制御することが重要となる。

(2) 最近さまざまな臓器に対する再生療法が数多く試みられ、線維肝組織においては骨髄由来細胞がコラーゲン合成を促進するという報告と、分解を促進するという一見相反する報告がある。しかしより重要であるのは、これらの細胞に対する適切な分化誘導を行い効果的な線維化改善と肝再生を得ることと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、実験的肝線維症において骨髄から肝内に生着した細胞がコラーゲン分解酵素である Matrix metalloproteinase (MMP)-13 や MMP-9 を順次発現して線維化改善に寄与するという本研究者自身の知見に基づき、骨髄細胞の線維肝組織への動員と MMP 産生細胞への分化誘導を促進する物質の探索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

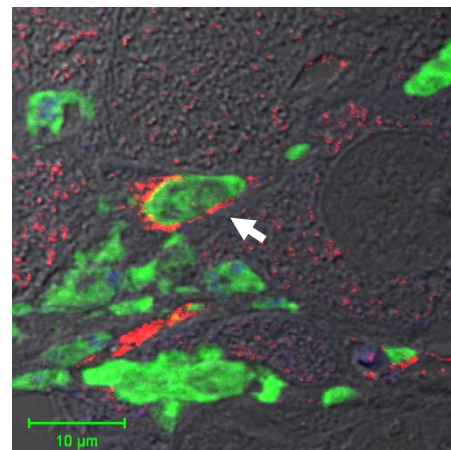
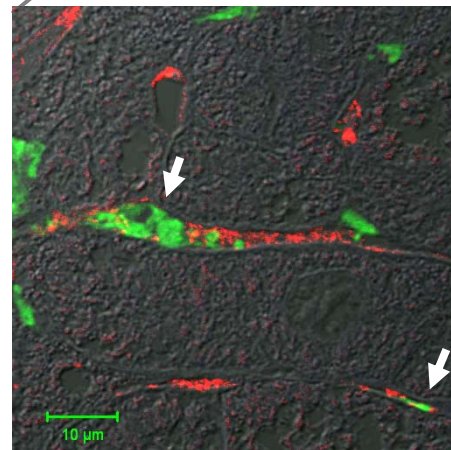
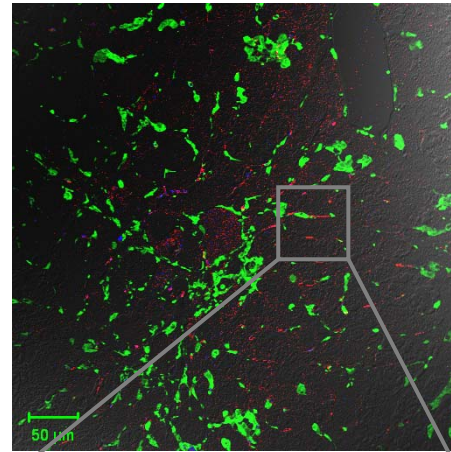
(1) 野生型マウスの骨髄を Enhanced green fluorescent protein (EGFP) トランスジェニックマウスより得た骨髄細胞で置換し、四塩化炭素の反復投与により肝線維症を作製した。四塩化炭素最終投与の14日前に MMP-13 発現アデノウイルスを静脈内投与後、経時的に肝組織を採取して Sirius red 染色により肝線維化の程度を評価するとともに、共焦点レーザー顕微鏡観察により肝内へ生着した骨髄由来細胞の局在と発現形質を解析した。また MMP-13 強制発現後の肝組織から RNA を抽出して Gene Chip による発現遺伝子の網羅的解析を行った。

(2) 骨髄由来細胞の MMP-13/-9 産生能の有無による肝線維化改善への影響を比較検討するため、MMP-13/-9 ダブルノックアウトマウス (MMP-13/-9KO) の骨髄を上記と同様の骨髄置換を行い、骨髄由来細胞のみが MMP-13/-9 を産生するマウスを作製した。四塩化炭素の反復投与により肝線維症を作製後、Sirius red 染色により肝線維化の程度を評価し、RT-PCR、*In situ* zymography により MMPs の発現と酵素活性を解析した。

4. 研究成果

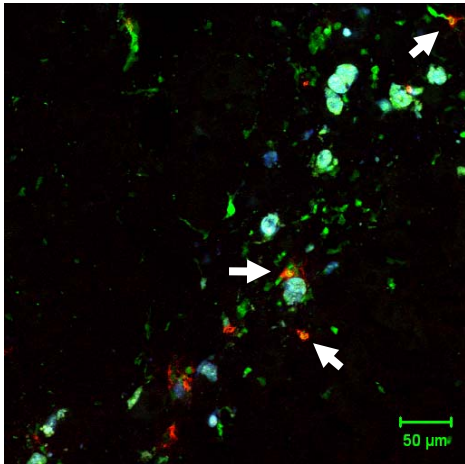
(1) MMP-13 の強制発現後、肝組織を採取し、Sirius red 染色により線維化の程度を検討したところ、空ウイルス投与群と比して有意な線維化の減弱が認められた。共焦点レーザー顕微鏡観察により線維肝内へ流入・生着した BMC の局在と形態変化を解析したところ、MMP-13 の強制発現により線維肝組織、とりわけ肝小葉内への骨髄由来細胞の流入・生着の

増強が認められ、一部は Stabilin-2 (ヒアルロン酸受容体) 陽性の類洞内皮細胞への機能的分化が確認された (下図)。また Gene Chip による解析では、MMP-13 の強制発現により肝内 MMP-8, MMP-9 遺伝子の発現促進と I, IV ならびに V 型コラーゲン遺伝子の発現低下が認められた。

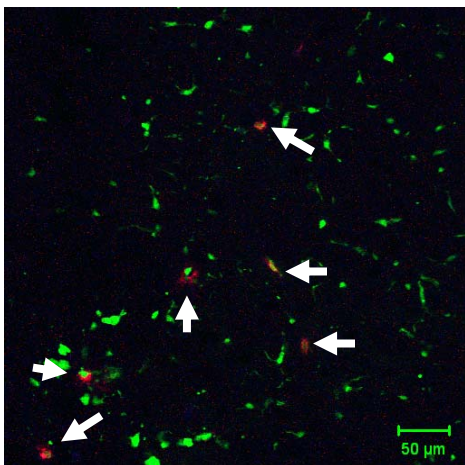


(上図：骨髄由来 EGFP 陽性細胞の一部は Stabilin-2 陽性の類洞内皮細胞であると示唆された。矢印：EGFP (緑) と Stabilin-2 (赤) の共発現を示す。)

(2) 四塩化炭素の投与中止後, Sirius red 染色により線維化の程度を評価したところ, MMP-13/-9KO レシピエントマウスにおいても対照の野生型レシピエントマウスと同様に線維化の改善が認められた。また RT-PCR 解析にて MMP-13/-9KO レシピエントマウスの肝組織中に、骨髄由来と考えられる MMP-13 および MMP-9 の遺伝子発現が確認された。さらに、免疫蛍光染色および *In situ* zymography による解析でも、線維吸収部位に一致して MMP の発現と酵素活性が認められた (下図)。



野生型レシピエントマウス



MMP-13/-9KO レシピエントマウス

(上図: MMP-13/-9KO レシピエントマウスの肝組織中に、線維吸収部位に一致して骨髄由来 EGFP 陽性 MMP-9 発現細胞が認められた。矢印: EGFP (緑) と MMP-9 (赤) の共発現を示す。)

(3) 以上より、MMP-13 の強制発現は、線維化改善とともに肝類洞構造の修復を促進する可能性が示唆された。また骨髄由来 MMP-13/-9 の肝線維化改善への関与が示唆さ

れた。この過程における増殖因子の活性化と肝類洞構造の修復機序を明らかにすることで、骨髄幹細胞の動員と分化誘導に基づく線維化改善と肝再生促進治療法の開発を目指している。

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 5 件)

① Reiichi Higashiyama, Tadashi Moro, Sachie Nakao, Kenichiro Mikami, Hiroshi Fukumitsu, Yoshitaka Ueda, Kazuo Ikeda, Eijiro Adachi, George Bou-Gharios, Isao Okazaki, and Yutaka Inagaki: Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. *Gastroenterology*, 査読有, 137: 1459-1466, 2009

② Tadashi Moro, Yoshihito Shimoyama, Miwa Kushida, Yun Yu Hong, Sachie Nakao, Reiichi Higashiyama, Yoshihiko Sugioka, Hideo Inoue, Isao Okazaki and Yutaka Inagaki. Glycyrrhizin and its metabolite inhibit Smad3-mediated type I collagen gene transcription and suppress experimental murine liver fibrosis. *Life Sciences*, 査読有, 83: 531-539, 2008

③ Yutaka Inagaki, Kiyoshi Higashi, Miwa Kushida, Yun Yu Hong, Sachie Nakao, Reiichi Higashiyama, Tadashi Moro, Johbu Itoh, Toshiyuki Mikami, Toru Kimura, Goshi Shiota, Ichiro Kuwabara and Isao Okazaki. Hepatocyte growth factor suppresses profibrogenic signal transduction via nuclear export of Smad3 with galectin-7. *Gastroenterology*, 査読有, 134: 1180-1190, 2008

[学会発表] (計 16 件)

① 東山礼一、骨髄細胞由来 Matrix metalloproteinases (MMPs) による肝線維化改善機序の解明、第 9 回再生医療学会総会、2010 年 3 月 18 日、広島

② Yutaka Inagaki, A Comprehensive Analysis of Collagen Production and Degradation by Using Transgenic Dual Reporter Mice, 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2009. 11. 02, Boston, MA

③ Reiichi Higashiyama, Role of Bone Marrow in Pathophysiology of Hepatic Fibrosis and

Regeneration, Symposium VI "Molecular and Cellular Mechanisms of Tissue Remodeling and Fibrosis-Their Therapeutic Implications" Yokosuka Science Festa 2009, 2009. 06. 06, Yokosuka

研究者番号：

④ 東山礼一、骨髄細胞由来 Matrix metalloproteinases (MMPs) による肝線維化改善機序の解明、第 22 回肝類洞壁細胞研究会 ワークショップ 2 「肝再生と肝類洞壁細胞」、2008 年 11 月 29 日、久留米

⑤ Reiichi Higashiyama, Matrix metalloproteinases enhance migration of bone marrow-derived cells and contribute to the regression of experimental liver fibrosis. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2008. 11. 3, San Francisco, CA

⑥ Yutaka Inagaki, Little contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2008. 11. 3, San Francisco, CA

⑦ 東山礼一、骨髄由来細胞の動員と Matrix metalloproteinases (MMPs) 発現による肝線維化改善機序の解明、第 44 回日本肝臓学会総会 ワークショップ (8) 「肝障害と修復に関する研究の展開」、2008 年 6 月 6 日、松山

⑧ 稲垣 豊、骨髄由来細胞は肝線維化の進展に関与するか、第 44 回日本肝臓学会総会、2008 年 6 月 6 日、松山

[その他]

ホームページ等

<http://health.med.u-tokai.ac.jp/staff/inagaki/paper.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東山 礼一 (HIGASHIYAMA REIICHI)

東海大学・医学部・奨励研究員

研究者番号：80459495

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()