

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790633

研究課題名（和文） 脂肪組織由来幹細胞を用いた新しい肝硬変代替医療の開発

研究課題名（英文） Development of novel alternative approach for liver cirrhosis therapy using adipose-derived stem cells

研究代表者

宮崎 照雄（MIYAZAKI TERUO）

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：60532687

研究成果の概要（和文）：本研究は、肝硬変時に低下する肝機能を代償する骨格筋量を脂肪組織由来幹細胞（ADSC）移植にて、維持、増加させ、全身的な蛋白異化状態を改善させる肝硬変の新規代替医療の治療法開発を目指すことを目的とした。ヒト ADSC を骨格筋に移植したヌードマウスに対し、四塩化炭素（CCl₄）を投与して肝障害を生じさせたモデルの肝予備能ならびに骨格筋萎縮に対する効果について検討した。ADSC を移植した腓腹筋重量は有意に増加し、CCl₄ 投与による血清アルブミン・総蛋白濃度の低下は改善傾向を示した。また、ADSC 移植によって、脾臓重量/体重比上昇の有意な抑制と骨格筋重量/体重比の維持傾向を示した。また、CCl₄ 投与による肝組織中 α -smooth muscle actin 蛋白発現増加も、ADSC 移植により抑制され、肝線維化に対する抑制効果もみられた。ADSC の骨格筋中への移植は、肝疾患の栄養不良状態による骨格筋萎縮を抑制し、血中蛋白維持や肝障害度の抑制対策にも有効な手段になる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose in the present study was to investigate the effectiveness of adipose-derived stem cell (ADSC) transplantation into skeletal muscle as novel alternative therapy for liver cirrhosis in mouse. Human ADSC was transplanted into the gastrocnemius muscle in nude mouse, and then, the mouse received the repetitional injections of CCl₄ to induce liver damage and fibrosis. In the ADSC-transplanted mice, serum levels of albumin and total protein were kept at higher than in the control mice. Spleen index (tissue weight/body weight) were significantly lower in the ADSC mice than the control, and other skeletal muscle weights per body weight were also maintained in the ADSC mice. The protein expression of alpha-smooth muscle actin as a parameter of fibrosis was also lower in the ADSC mice than the control. The present study suggested a possibility that the transplantation of ADSC into skeletal muscle would be one of novel strategies for alternative therapy to the patients with liver cirrhosis.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2010 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2011 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| | | | |
| 総計 | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：代替医療

1. 研究開始当初の背景

肝硬変では、肝機能の低下により血中アミノ酸インバランスや低アルブミン血症、蛋白異化亢進、エネルギー消費亢進などの蛋白-エネルギー失調症 (PEM)が生じる。特に、これら栄養代謝不全を骨格筋蛋白異化にて代償するため骨格筋に萎縮が生じ、代償能には限界がある。現在、分岐鎖アミノ酸顆粒製剤や経腸栄養剤、夜間食など内科的栄養療法が施されており、一定の効果は見られているものの、効果的な治療法・予防法には至っていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem cell: ADSC) を肝硬変マウス骨格筋へ移植し、骨格筋への分化を期待し、筋量を増加させることで、肝硬変時の PEM や肝予備能の改善させる新しい治療法を確立する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ADSC 移植法の検討

ヒト ADSC は、サイトリ・セラピューティクス株式会社、もしくは、タカラバイオ株式会社より購入した。一定期間の養で増殖させたヒト ADSC を培養液中に 1×10^7 個/mL で回収し、麻酔下のヌードマウスの下腿骨格筋 (腓腹筋) の計 4 箇所、 1×10^5 個/10 μ L/箇所にてハミルトンシリンジを用いて注入した。非移植 (コントロール) 群には、等量の培養液のみを腓腹筋に同箇所、注入した。

(2) 肝硬変モデルの作成

肝硬変モデルの作成は、四塩化炭素の反復投与によって行った。ヌードマウス購入後、予備飼育 1 週間後に体重を測定し、体重に差が生じない様に、ADSC 移植群とコントロール群の 2 群 (N=8/群) に分けた。上記の方法で、ADSC を骨格筋に移植し、さらに、1 週間飼育を行った。その後、10%CCl₄-オリーブオイル溶液を、50 μ L/100gBW にて、週に 2 回、5 週間の腹腔内投与を行った。

(3) 血液生化学、筋萎縮度、肝線維化の評価

四塩化炭素投与 5 週間後、全てのマウスを過剰麻酔薬による安楽死させ、採血ならびに組織の採取を行った。採取した血液より、血清アルブミン濃度、血清総蛋白濃度を規定の方法にて測定した。また、採取した肝臓、脾臓、下腿骨格筋

(腓腹筋、ヒラメ筋、足底筋、長指伸筋、前頸骨筋) の湿重量を測定し、体重あたりの組織重量を算出した。さらに、肝臓における線維化の進行状態を評価するために、ウエスタンブロット法にて、 α -smooth muscle actin の発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 体重変化と血清生化学検査の結果

ADSC 移植後ならびに四塩化炭素投与期間中のマウス体重変化を図 1A に示した。四塩化炭素投与後、一旦、体重の減少が両群でみられたが、その後、回復し、実験終了後まで漸増した。ADSC 移植群とコントロール群間には、体重変化に明らかな差は確認されなかった。飼育終了後 (四塩化炭素投与 5 週間後) の血清アルブミン濃度と血清総蛋白濃度を図 1B に示した。血清アルブミン濃度ならびに血清総蛋白濃度は、統計学的有意差はなかったものの、ADSC 移植により、CCl₄ 投与による減少の抑制効果が見られた (アルブミン: コントロール群 3.15 ± 0.04 g/dL, ADSC 群 3.44 ± 0.04 g/dL, 総蛋白: コントロール群 5.15 ± 0.17 g/dL, ADSC 群 5.70 ± 0.23 g/dL)。

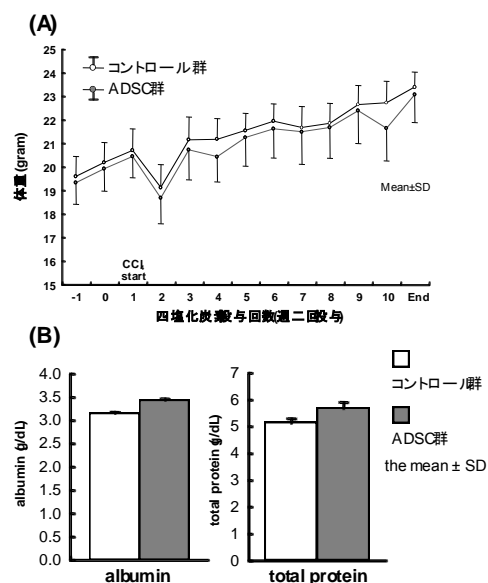


図1 マウス体重変化(A)と血清アルブミン・総蛋白濃度(B)

(2) ADSC 移植による組織重量-体重比

図 2 に体重あたりの各組織重量比を示した。ADSC を移植した腓腹筋の重量比は、コントロール群に比べ、有意に高値を示した。肝重量比には両群間で差は見られなかったが、門脈圧亢進状態の指標である脾臓重量比は、コントロール群と比較し、ADSC 移植群で有意に低値であった。腓腹筋以外の骨格筋では、統計学的有意差は認められなかったが、ADSC

移植群のいずれの部位で、非移植群より高い値を維持した。

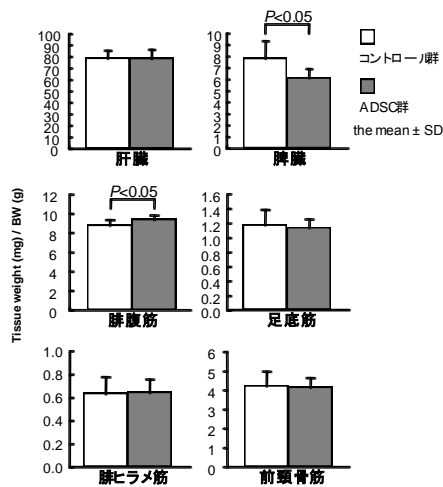


図2 肝臓、脾臓と下腿骨格筋の体重あたりの組織重量比

(3) 肝 α -smooth muscle actin 蛋白発現量の比較

図3に肝組織中の線維化の指標である α -smooth muscle actin 蛋白の発現をウエスタンブロット法にて測定し、定量化した結果を示した。ADSC 移植群における α -smooth muscle actin 蛋白発現量は、コントロール群と比較し、有意差は認められなかったが、約30%の低値を示した。

以上の検討により、ADSCの骨格筋中への移植は、肝疾患の栄養不良状態による骨格筋萎縮を抑制し、血中蛋白維持や肝障害度の抑制対策にも有効な手段である可能性が示唆された。

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1件)

- ① Miyazaki T, Akira Honda A, Ikegami T, Matsuzaki Y. The role of taurine on the skeletal muscle cell differentiation. *Advances in*

Experimental Medicine and Biology. 2012 (in press)

[学会発表] (計5件)

- ① Miyazaki T, Honda A, Ikegami T, Matsuzaki Y. The role of taurine on the skeletal muscle cell differentiation. 18th international taurine meeting (Marrakech, Morocco). April 7-13, 2012.
- ② 宮崎照雄. カルシウムシグナリングを介したタウリンの筋線維芽細胞分化作用. 第66回日本体力医学会大会(下関市). 9月16-18日, 2011年
- ③ Miyazaki T, Honda A, Ikegami T, Shirai M, Miyakawa S, Matsuzaki Y. The effect of taurine treatment on the differentiation of cultured skeletal muscle cell. The 12th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins. (Beijing, China). August 1-5, 2011.
- ④ Miyazaki T, Honda A, Ikegami T, Shirai M, Miyakawa S, Matsuzaki Y. The augmentative action of taurine on the differentiation of C2C12 cells to myotube. *Experimental Biology 2011* (Washington DC, USA). April 9-13, 2011.
- ⑤ 宮崎照雄, 宮川俊平. タウリンの骨格筋細胞分化増強作用. 第65回日本体力医学会大会(市川市). 9月16-18日, 2010年

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 照雄 (TERUO MIYAZAKI)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号: 60532687