

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010年

課題番号：21790668

研究課題名(和文) 微細構造からみた骨髄幹細胞の非アルコール性脂肪肝炎と肝硬変に対する修復機構の研究

研究課題名(英文) THE ELECTRON MICROSCOPICAL ANALYSIS FOR CELL LINEAGE AND REPAIR FUNCTION OF BONE MARROW CELL IN CIRRHOSIS MICE AND NASH MICE

研究代表者

山本 直樹(YAMAMOTO NAOKI)

山口大学・大学教育機構・講師

研究者番号：90448283

研究成果の概要(和文)：

免疫電顕法を用いた肝硬変での検討では骨髄細胞は類円形の大型細胞と核 N/C 比の高い小型の細胞の二種類の細胞集団にわかれ、Liv2 陽性細胞・A-6 陽性細胞は N/C 比の高い小型の細胞で肝細胞周囲に存在し、MMP9 陽性細胞・Maid 陽性細胞は類円形の大型細胞で肝線維化領域に入り込んでいた。高脂肪食持続投与による脂肪肝マウスに全骨髄細胞を静脈投与したところ、骨髄細胞は肝臓に定着しなかった。肺・脾臓・小腸に骨髄細胞を多く認め、骨髄細胞投与群の方が生存率は高く、肝機能も改善していた。また肝脂肪沈着も骨髄細胞投与群の方が有意に減少していた。

研究成果の概要(英文)：

We analyzed micro structure and characterization of infused GFP-positive BMC in CCl4 induced liver cirrhosis mice and NASH mice using Electron Microscopy (EM). Some GFP-positive cells were located in hepatic cord. These cells increased lysosome structure in cytoplasm., Some cells co-expressed both GFP and Liv2 expression. All the Liv2 positive cells and A6 positive cells were circular forms and smaller than hepatocyte and located around hepatocytes in liver. We showed the Maid and MMP9 expression was increased with BMC infusion. Maid positive cells and MMP9 positive cells were also located at recipient liver and looked like round cell and were similar to hepatocytes in both size and feature. We analyzed GFP positive BMC were two kind of cell groups. One group cells were similar to hepatocyte in size and located around fiber (MMP9, Maid, Liv8 positive cells). The other group cells were small size and located around hepatocytes (A6, Liv2 positive cells). In EM level, we confirmed that infused GFP positive BMC consisted of two groups and they had several character. They repopulated into hepatic cord and fibrosis area.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：消化器内科学

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, 非アルコール性肝炎

### 1. 研究開始当初の背景

現在, 日本における肝硬変の大半はウイルス肝炎によるものであるが, 近年生活様式の欧米化に伴い, 生活習慣病が増加し肥満に高頻度に合併する脂肪肝, 特に非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) が肝線維化, 肝硬変の原因として注目されている。進展した肝硬変の積極的な根治治療は未だ存在せず, 線維化の進展を阻止・遅延させる消極的な治療法しか存在しない。そのため, わが国では主に生体肝移植が行われている。しかし家族間の関係や倫理的側面, ドナー不足など問題が多い。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。

我々はまず基礎研究でマウス GFP/CC1<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, どのような条件で投与した骨髄細胞は分化するのか, 骨髄細胞投与によるレシピエントに与える効果について検証を開始し, 骨髄投与群の方が肝機能障害改善と生存率の回復を発見し平成 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, 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。しかし骨髄細胞中の肝細胞に分化増殖する必須な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は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線維化状態をどのように改善していくのか, レシピエントに存在する肝細胞や星細胞, クッパー細胞など類洞内細胞に骨髄細胞がどのような作用を示すのか, 細胞間の微細構造の変化など未だにはっきりわかっていない部分が多い。

### 2. 研究の目的

電子顕微鏡を使用した通常電頭と免疫電頭で肝組織中の微小環境内での骨髄細胞の同定と分化する機序, GFP 陽性骨髄細胞と肝芽細胞マーカーである Liv2 抗体との関連, 肝臓の線維化の改善の機序, 肝脂肪化状態における骨髄細胞の動態の解明などを明らかにしていく。

### 3. 研究の方法

#### GFP/CC14 モデルにおける電子顕微鏡での骨髄幹細胞の検討

FEI 社製透過型電子顕微鏡 Tecnai12BT を使用して GFP/CC14 モデルの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った。この装置と免疫電頭法を用いて 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について検討していく

#### 脂肪環境下における骨髄細胞の動態と形態変化の検討

高脂肪食または CDAA 食の持続投与により作成された脂肪肝・NAFLD モデルマウスに GFP Tg mice から分離した GFP 陽性全骨髄細胞を尾静脈より投与し, GFP/CC1<sub>4</sub> モデル同様 GFP 染色で経時的变化を解析する。

H-E, Azan, Sirius Red, Oil Red O 染色や血清肝機能・Albumin で骨髄細胞投与による効果を評価する。

#### 骨髄細胞との共培養による形態学的変化と因子の解析

持続肝障害 (CC1<sub>4</sub>) モデルから分離した肝細胞, 肝星細胞, Kupffer 細胞, または高脂肪食, CDAA 食モデルから分離した脂肪細胞を, GFP Tg マウスより分離した GFP 陽性骨髄細胞と二重構造の培養プレートにそれぞれ培養し, 共培養することで骨髄細胞にどのような形態学的変化があるかを電頭で骨髄細胞の構造や細胞内器官などを比較する。

### 4. 研究成果

肝芽細胞マーカーの Liv2 抗体陽性細胞や幹細胞 marker といわれる A-6, EpCAM-1 陽性細胞, Maid 陽性細胞や MMP9 陽性細胞を免疫電頭でとらえることに成功し, 各陽性細胞の形態の解析と GFP 陽性骨髄細胞の形態・細胞内器官の変化の解析を行い, GFP 陽性細胞には類円形の大型細胞と核 N/C 比の高い小型の細胞の二種類の細胞集団にわかれることを判明させた。また Liv2 陽性細胞・A-6 陽性細胞は N/C 比の高い小型の細胞で肝細胞周囲と線維化領域に存在し, MMP9 陽性細胞・Maid 陽性細胞は類円形の大型細胞で肝障害領域に入り込んでいた。

高脂肪食または CDAA 食の持続投与により作成された脂肪肝・NAFLD モデルマウスに GFP Tg mice から分離した GFP 陽性全骨髄細胞を尾静脈より投与し, GFP/CC14 モデル同様 GFP 染色で経時的变化を解析したところ, 肝線維

化環境下と比較して脂肪環境下の肝臓には骨髄細胞は定着しにくいことがわかった。またこれらのマウスの様々な臓器を摘出し、GFP による免疫染色で骨髄細胞の動態を解析してみると、肺・脾臓・小腸に GFP 陽性細胞を多く認めた。骨髄細胞投与群の方が非投与群より生存率は高く、血清アルブミン値等肝機能も改善していた。また組織脂肪沈着も骨髄細胞投与群の方が非投与群より有意に減少していた。

#### 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4件)

- ① Oishi T, Terai S, Iwamoto T, Takami T, Yamamoto N, Sakaida I. Splenectomy reduces fibrosis and preneoplastic lesions with increased triglycerides and essential fatty acids in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Hepato1 Res.* 2010 in press.. 査読 有
- ② Matsumoto T, Terai S, Oishi T, Kuwashiro S, Fujisawa K, Yamamoto N, Fujita Y, Hamamoto Y, Furutani-Seiki M, Nishina H, Sakaida I. Medaka as a model for human nonalcoholic steatohepatitis. *Dis Model Mech.* 2010 Jul-Aug;3(7-8):431-40. 査読 有
- ③ 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. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jan 16;378(3):354-9. 査読 有
- ④ 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 CCl4-treated cirrhotic liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Mar 14;367(3):546-52. 査読 有

[学会発表] (計8件)

- ① Naoki Yamamoto THE ELECTRON MICROSCOPICAL ANALYSIS FOR CELL LINEAGE OF BONE MARROW CELL DIFFERENTIATION IN CIRRHOSIS MICE The 3th ISHSR meeting Pasasada USA 2010年8月28日 Pasasada, USA

- ② 山本 直樹 骨髄中の肝幹細胞の動態と微細構造解析-GFP/CC14 モデル- 第9回日本再生医療学会総会 広島・広島国際会議場 2010年3月15日
- ③ 山本 直樹 免疫電顕を用いた骨髄由来肝幹細胞の肝硬変の修復時の各種細胞の動態 第23回肝類洞壁細胞研究会 大阪・ホテル京阪ユニバーサルタワー 2009年12月16日
- ④ Naoki Yamamoto THE ELECTRON MICROSCOPICAL ANALYSIS FOR CELL LINEAGE OF BONE MARROW CELL DIFFERENTIATION IN CIRRHOSIS MICE 第17回 UEGW/Gastro 2009 (United European Gastroenterology Week) London UK 2009年11月24日
- ⑤ Naoki Yamamoto THE ELECTRON MICROSCOPICAL ANALYSIS FOR CELL LINEAGE OF BONE MARROW CELL DIFFERENTIATION IN CIRRHOSIS MICE 第60回 AASLD (The American Association for the Study of Liver Disease) Boston USA 2009年11月3日
- ⑥ 山本 直樹 免疫電顕を用いた骨髄由来細胞の肝硬変修復時の動態と各種特徴 第5回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム 広島・広島広仁会館 2009年9月15日
- ⑦ 山本 直樹 免疫電顕を用いた骨髄由来肝幹細胞の肝硬変の修復時の各種細胞の動態 第16回肝細胞研究会 山形・山形テルサ 2009年6月20日
- ⑧ 山本 直樹 免疫電顕を用いた骨髄由来肝幹細胞の肝硬変の修復時の各種細胞の動態 第45回日本肝臓学会総会 神戸・神戸国際会議場 2009年6月5日

[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

[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・大学教育機構・講師  
研究者番号：90448283

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし