

## 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25年 6月 1日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580361

研究課題名（和文） 犬の慢性肝障害に対する自己骨髄細胞移植治療の基礎的研究

研究課題名（英文） Basic study on auto-transplantation of canine bone marrow stromal cells for dogs with chronic liver disease.

研究代表者

谷 健二 (TANI KENJI)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：00365420

研究成果の概要（和文）：ヌード（CCl<sub>4</sub>/nude）マウスおよびシクロスポリン A 免疫抑制（CCl<sub>4</sub>/CSA）マウスを用いて四塩化炭素（CCl<sub>4</sub>）誘発性慢性肝障害に対するイヌ BMSCs 異種移植効果を検討した。重度肝障害モデルである CCl<sub>4</sub>/CSA マウスの BMSCs 移植群で炎症細胞と肝線維化領域の有意な減少が認められたが、CCl<sub>4</sub>/nude での効果は軽微であった。培養イヌ BMSCs は MMP 産生能を有し、炎症性サイトカイン刺激に対して発現増強することから、BMSCs 移植による肝線維症の改善には、線維化領域における炎症性サイトカイン刺激および MMP-9 発現が関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：To evaluate canine BMSCs transplantation for regenerative liver therapy, we used two different models; nude mice and cyclospoline A (CSA) immunosuppressive mice for xenotransplantation. Transplanted canine BMSCs migrate effectively only into a persistently injured liver of CCl<sub>4</sub>/CSA mice, which in turn canine BMSCs may be effective to resolve inflammatory fibrosis lesions. Since cultured canine BMSCs produce matrix metalloproteinases (MMPs), therapeutic potential of canine BMSCs therapy may be associated with MMPs expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：獣医外科学

科研費の分科・細目： 畜産学・獣医学、臨床獣医学  
キーワード： 犬、骨髄間質細胞、肝障害、再生医療

### 1. 研究開始当初の背景

難治性疾患である肝不全罹患犬に対する有効な治療法はなく、臓器の再生が期待できる再生医療の確立が望まれている。骨髄間質細胞 (BMSC) は、肝細胞に分化する能力を持つだけでなく、障害を受けた肝臓臓器内の肝線維化を改善する能力を持つことが示唆されている。自己の BMSC 移植治療は、生命倫理やドナー不足などの問題が無く、人の肝硬変の有効な治療法であると期待されている。しかしながら、獣医領域における利用可能な情報は乏しく、障害を受けた肝臓に対する犬 BMSC 移植の効果についての情報は皆無である。申請者は、マウス肝炎モデルに対する犬 BMSC 移植の効果を検討し、肝不全罹患犬に対する自己骨髄細胞を用いた治療法の可能性を検討した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス肝炎モデルに対する犬骨髄間質細胞移植の治療効果を検討し、有効細胞数および移植経路を決定し、肝不全罹患犬に対する自己骨髄細胞を用いた治療法の基礎的データを蓄積することである。

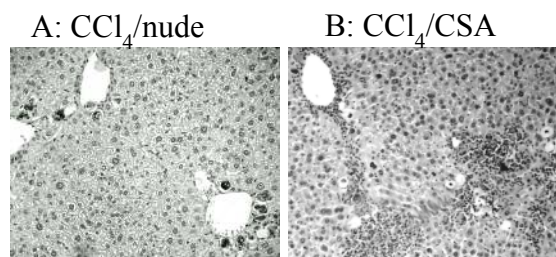
### 3. 研究の方法

イヌ BMSCs の慢性肝障害モデルへの移植効果を確認するため、四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 誘発性慢性肝障害マウスへのイヌ BMSCs 異種移植実験を行った。供試動物として、重症免疫不全 (SCID) マウスを用いた CCl<sub>4</sub> 誘発性慢性肝障害モデルの作製を試みたが、SCID マウスは長期的な CCl<sub>4</sub> 投与に耐えることが出来ず、本実験のモデル動物としては不適切であった。そのため、ヌード (CCl<sub>4</sub>/nude) マウスおよびシクロスポリン A 免疫抑制 (CCl<sub>4</sub>/CSA) マウスを用いモデル動物を作製した。軽度肝障害モデルである CCl<sub>4</sub>/nude マウスは、ヌードマウスに、コーンオイルで 1:4 に希釈した CCl<sub>4</sub> を 0.6ml/kg で週 2 回、計 4 週間皮下投与し作製した。重度肝障害モデルである CCl<sub>4</sub>/CSA マウスは、ICR マウスに移植前日からサンプル採取日までシクロスポリン A を 10mg/kg/日 で皮下投与し免疫抑制を行い、CCl<sub>4</sub>/nude マウスと同様にコーンオイルで 1:4 に希釈した CCl<sub>4</sub> を 1.0ml/kg に増量し週 2 回、計 4 週間皮下投与して作製した。8 回目の CCl<sub>4</sub> 投与翌日に、イヌ BMSCs (1×10<sup>6</sup> 個/頭) を経脾的門脈移植し、移植 2 週間後に安楽死してサンプルを採取し、移植から安楽死までの期間は、週 2 回の CCl<sub>4</sub> 投与を継続し肝障害を持続させた。

次に、イヌ BMSCs の Matrix metalloproteinase (MMP) 発現能力および炎症性サイトカイン刺激に対する反応を評価した。イヌ BMSCs を培養し、上澄中の MMP についてゼラチンザイモグラフィを実施し、残された細胞から total RNA を抽出し、定量的 RT-PCR を実施し、炎症性サイトカインに対する MMP 発現を評価した。

### 4. 研究成果

血液生化学検査では、BMSCs 移植による肝パネル (TP, ALB, ALT, AST, NH<sub>3</sub>, ALP, T-Bil) の改善は認められなかったが、病理組織学的検査において重度肝障害モデルである CCl<sub>4</sub>/CSA マウスの BMSCs 移植群で顕著な炎症細胞 (図 1) と肝線維化領域の有意な減少が確認された (図 2)。



Inflammatory cells (% of nuclear cells)

A: CCl <sub>4</sub> /nude	B: CCl <sub>4</sub> /CSA
25.8±6.1	38.0±9.7

(図 1) 炎症細胞は CCl<sub>4</sub>/CSA において顕著に認められた。

軽度肝障害モデルである CCl<sub>4</sub>/nude マウスでは、肝線維化領域の減少は認められなかった。また、レシピエントの肝臓組織の PCR において、ドナー由来のイヌ *SRY* 遺伝子は CCl<sub>4</sub>/CSA マウスのみで確認された。これらの結果からも過去の報告と同様に、BMSCs の肝臓への遊走・生着と治療効果の発現には、重度で持続的な肝障害が必要である可能性が示唆された。

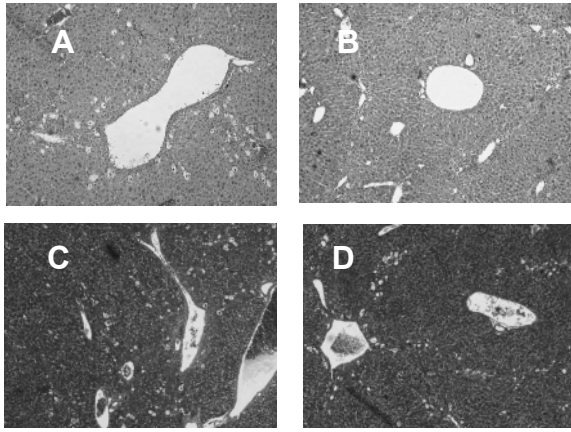


図2 CCl<sub>4</sub> 誘導肝障害を起こした免疫抑制マウスにおける肝線維化のHE染色 (AとB) およびマッソントリクローム染色 (CとD)。イヌ骨髄間質細胞 (BMSCs) 投与前 (A) に比べて投与後 (B) では炎症細胞が減少していた。肝線維化の範囲は投与前 (C) に比べて投与後 (D) で減少していた。

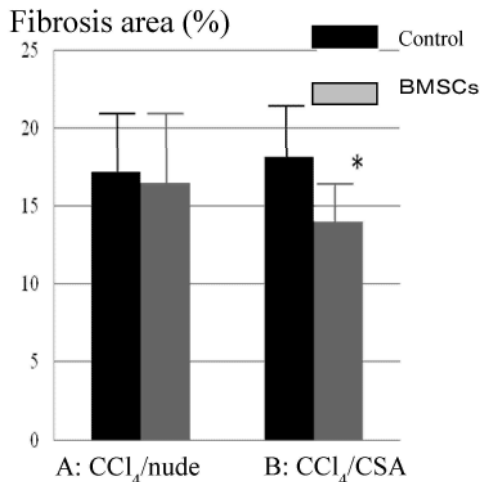


図3 肝線維化領域の数値化。マッソントリクローム染色標本を用いて定量化した。CCl<sub>4</sub>/CSA マウスにおいてのみイヌ BMSC 移植治療の効果が認められた。

ゼラチンザイモグラフィにおいて、イヌ BMSCs は proMMP-2 および proMMP-9 を発現していることが確認された。proMMP-2 および proMMP-9 領域のバンドの輝度解析を行ったところ、proMMP-2 領域の輝度は対照群と比較し IL-1 $\beta$  刺激時にのみ増強されていた。それに対して、proMMP-9 領域のバンドは TNF- $\alpha$  および IL-6 刺激時に輝度が顕著に増強されており、IL-1 $\beta$  刺激時にはバンド輝度の増強は認められなかった。

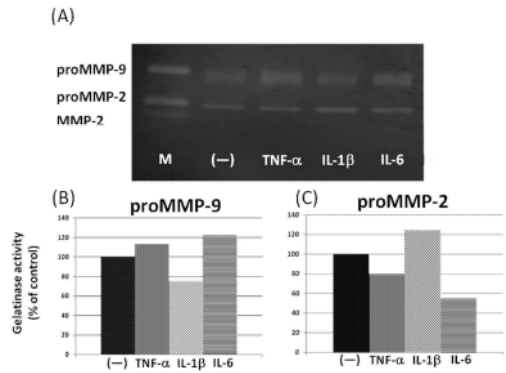


図4 ゼラチンザイモグラフィ。C a イオン除去によってバンドは消失せず、MS P 阻害剤によってもバンドの輝度に変化は認められなかったことから、ゼラチンを溶出した物質は Matrix metalloproteinase (MMP) であることが確認された。

IV 型コラゲナーゼ活性測定においても、MMP-2 および MMP-9 発現が確認された。さらに、定量 RT-PCR において MMP-2 mRNA および MMP-9 mRNA 発現が確認された。MMP-2 mRNA 発現は、IL-1 $\beta$  刺激時に増強される傾向が認められたが対照群と比較して有意な差は確認されなかった。一方、MMP-9 mRNA 発現は、TNF- $\alpha$  および IL-6 刺激時に対照群と比較し、有意に増強されることが確認された。

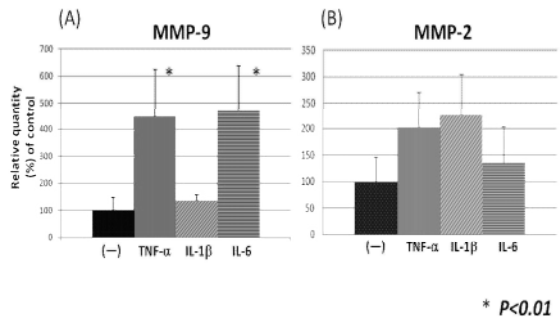


図5 イヌ BMSC における Matrix metalloproteinase (MMP) mRNA の定量。炎症性サイトカイン刺激によって、発現量に変化している。

MMP-9 は BMSCs 移植時の肝線維症の改善に関与しているという報告があり、さらに IL-6 は肝臓の再生に深く関与する因子であることが知られている。IL-6 は炎症が存在する肝臓において発現レベルが上昇し、STAT-3 などといった転写因子を活性化させる。STAT-3 は、抗アポトーシス効果、抗酸化作用を有し、肝再生において重要な働きをしている。BMSCs

移植による肝線維症の改善には、線維化領域での IL-6 による刺激および MMP-9 発現が関与している可能性が考えられた。

以上の結果から、*in vivo* で重度肝障害モデルマウスに移植されたイヌ BMSCs は、肝線維化領域を減少させることが確認された。さらに、*in vitro* においてイヌ BMSCs は MMP 産生能を有しており、その発現は炎症性サイトカイン刺激により増強されることが確認された。本結果より、イヌ BMSCs の肝臓への遊走・生着には重度の炎症が関与しており、さらに肝臓に生着した BMSCs に対する持続的な炎症性の刺激が線維化領域での MMP 産生を増強させ線維化を減少させたという過程が推測された。これらのことから、イヌ BMSCs は肝線維症治療において有用な細胞源となりう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 2 件)

- ① Haraguchi T, Tani K (correspondence author), Koga M, Oda Y, Itamoto K, Yamamoto N, Terai S, Sakaida I, Nakazawa H, Taura Y (2012) Matrix metalloproteinases (MMPs) activity in cultured canine bone marrow stromal cells (BMSCs). J. Vet. Med. Sci. 74. 633-636. 査読有
- ② Haraguchi T, Tani K (correspondence author), Takagishi R, Oda Y, Itamoto K, Yamamoto N, Terai S, Sakaida I, Nakazawa H, Taura Y (2012) Therapeutic potential of canine bone marrow stromal cells (BMSCs) in the carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) induced chronic liver dysfunction mouse model. J. Vet. Med. Sci. 74. 607-611. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 原口友也、谷 健二、小田康喬、高岸 領、山本直樹、寺井崇二、坂井田功、仲澤宏、板本和仁、中市統三、田浦保穂 四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 誘発性慢性肝障害モデルマウスに対するイヌ骨髄細胞移植の効果。第 152 回日本獣医学会学術集会、大阪府立大学 2011 年 9 月 19-21 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷 健二 (TANI KENJI)

山口大学共同獣医学部・准教授

研究者番号：00365420

### (2) 研究分担者

田浦保穂 (TAURA YASUHO)

山口大学共同獣医学部・教授

研究者番号：80163153

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：