

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5月28日現在

機関番号：32202
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591498
 研究課題名（和文）大量肝切除限界超越のための自家骨髄細胞移植による肝再生療法の研究と開発
 研究課題名（英文） Research and development of liver regeneration with autologous bone marrow cell transplantation against the limitation of major hepatectomy
 研究代表者
 カ山 敏樹（ Rikiyama Toshiki ）
 自治医科大学・医学部・教授
 研究者番号：80343060

研究成果の概要（和文）：免疫不全マウス(NOG マウス)に対して四塩化炭素(CCl₄)の腹腔内投与を行い、肝障害モデルおよび慢性肝障害モデルの作成し、GFP陽性NOGマウスの骨髄細胞を尾静脈より移植すると、少量ながら肝臓内でのGFP陽性細胞を認め、肝細胞への分化が確認された。骨髄細胞移植群と非移植群では若干移植群での体重増加が多い傾向にあったが、肝機能などのパラメーターでは両者に差を認めなかった。

NOGマウスにおける門脈塞栓モデルを作成し、結紮後4週時での結紮肝の萎縮ならびに非結紮肝の増大を確認することができた。このモデルに対して骨髄細胞の移植を行う予定であったが、時間的制約があり、未施行である。

研究成果の概要（英文）：We intraperitoneally-administered carbon tetrachloride (CCl₄) to severe immunodeficient mouse (NOG mouse) and created chronic liver injury model and hepatic failure model. We transplanted bone marrow cells of GFP-positive NOG mice into tail vein, small number of GFP-positive cells in differentiation into hepatocytes was confirmed. The weight gain in the bone marrow cell transplantation group is slightly higher than the non-transplant group, but there was no difference between the two groups in the liver function parameters.

We were able to create a portal vein embolization model in NOG mice, and confirmed an increase in the non-ligated hepatic lobe and atrophy of the ligated lobe in 4 weeks after ligation. It was scheduled to perform a bone marrow transplantation to this model, it is still ongoing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,500,000	450,000	1,950,000
23年度	1,000,000	300,000	1,300,000
24年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：消化器外科学・肝臓外科学

キーワード：骨髄幹細胞，肝再生，大量肝切除

1. 研究開始当初の背景

肝臓外科の進歩により、広範囲肝切除が安全に行なわれるようになってきたが、肝予備

能不良による肝切除断念や大量肝切除後肝不全の発生は完全には克服されていない。増殖因子や転写因子、胚性幹細胞や成人幹細胞

を用いた再生医療研究など、様々な面から肝再生促進が試みられているが、自己骨髄細胞を細胞源とする再生療法は、細胞の分離・確保が容易であり、拒絶反応や倫理面、安全面での問題も殆どなく、最も現実的に臨床応用可能な肝臓再生療法と考えられる。

2. 研究の目的

基礎実験として新しい動物モデルを確立、移植細胞の肝細胞への分化・定着を証明し、骨髄細胞移植の有用性を証明するとともに、臨床応用として術前または切除直後の自己骨髄移植により、最終的に現時点での切除限界や耐術基準を超越した安全な大量肝切除の確立を目指す。

3. 研究の方法

1) ドナーマウスの作製

GFP 遺伝子ユビキタスに発現する NOG-EGFP マウスのオスを実中研から供与を受け、通常の NOG マウスとの間で戻し交配を続け、免疫不全マウス (NOG マウス) に GFP 遺伝子を発現する NOG マウスを作製した。このマウスから骨髄細胞を抽出し、移植細胞とする。

2) 肝障害マウスの作製

GFP を発現しない通常の NOG マウスに四塩化炭素 (CC14) 投与を行い作製した慢性肝炎モデル、急性肝炎モデルを作製し、尾静脈より GFP/NOG マウスの骨髄細胞を投与し、肝細胞への分化を確認する。

3) 大量肝切除モデルマウスの作製

NOG マウスを開腹し、左葉および中葉と呼ばれる領域を結紮して切除することにより、70%の肝切除モデルを作製する。これらのマウスの尾静脈より GFP/NOG マウスの骨髄細胞を投与し、肝細胞への分化を確認する。さらに右上葉の結紮を加えることで 90%肝切除モデルを作製し、同様の検討を行なう。

4) 門脈塞栓モデルマウスの作製

マウス門脈の左葉および中葉の門脈枝を選択的に結紮し、門脈塞栓モデルを作製する。このマウスにも同様に尾静脈より GFP/NOG マウスの骨髄細胞を投与し、肝細胞への分化、肝増大への寄与を確認する。

4. 研究成果

ドナーマウスを作製に成功したところで、東日本大震災に遭遇した。辛うじて作製したマウスは無事であったが、その後マウスの体長不良などにより思うように交配が進まない時期があったが、最終的には安定的に NOG/GFP マウスを作製し、維持することに成功した。

次いで、肝炎モデルの作製をおこなった。

0.5, 1.0, 1.5ml/kg の CC14 単回投与を行い、マウス急性肝障害モデルを作成した。いずれのマウスも早期に肝障害を認めるものの、1ヶ月後には回復し、CC14 投与量と肝障害の程度は相関しないことが判った。また、死亡マウスは認めなかったため、1.5ml/kg を急性肝障害モデルの投与量として設定した。急性肝障害モデルマウスの尾静脈より GFP 陽性 NOG マウスの骨髄細胞を移植すると少量ながら肝臓内での GFP 陽性細胞を認め、肝細胞への分化が確認された。骨髄細胞移植群と非移植群では若干移植群での体重増加が多い傾向にあったが、肝機能などのパラメーターでは両者に差を認めなかった。

CC14 を週に 2 度、2ヶ月にわたり投与することで慢性肝障害モデルを作製し、同様に GFP/NOG マウスの骨髄細胞を投与した。同様に少数ながら肝細胞への分化が確認されたが、急性モデルとの間に差を認めなかった。

次いで、NOG マウスにおける門脈塞栓モデルの作成を行った。実際にはマウスの門脈を塞栓することは困難であり、マウスの左葉・中葉への門脈枝を胆管、動脈より分離し、結紮することで門脈結紮モデルの作成を試みた。最終的にこのモデルマウスの作成に成功し、結紮後 4 週時での結紮肝の萎縮ならびに非結紮肝の増大を確認することができた。このモデルに対して骨髄細胞の移植を行なったが、解析の前に本研究期間が終了してしまい、詳細な解析は行なえておらず、今後引き続き検討を行なう予定である。

多種多様な幹細胞の集まりの骨髄中の間葉系幹細胞は胚葉を超えて内胚葉や外胚葉への分化が報告されているが、骨髄細胞内には muse 細胞 (Multilineage-differentiating Stress Enduring Cell) と呼ばれる多能性幹細胞が存在していることが、東北大学 細胞組織学分野 出澤らによって報告されており、骨髄細胞の肝細胞への分化のメカニズムについては muse 細胞が肝細胞・肝組織に分化した可能性について今後の研究課題とした。

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)

Shima K, Mizuma M, Hayashi H, Nakagawa K, Okada T, Sakata N, Omura N, Kitamura Y, Motoi F, Naito T, Rikiyama T, Katayose Y, Egawa S, Ishii N, Horii A, Unno M

: Potential Utility of NOG Mice with Ubiquitous eGFP Expression (NOG-EGFP) as a High Quality Cancer Sampling System

J Exp Clin Cancer Res. ; 31 (1) : (2012年6月)

[学会発表] (計 3件)

嶋健太郎, 水間正道, 大村範幸, 林 洋毅, 中川 圭, 岡田恭穂, 元井冬彦, 力山敏樹, 片寄 友, 江川新一, 石井直人, 堀井 明, 海野倫明: An attempt to establish a high quality sampling system of cancer cells using a xenograft model of NOG-EGFP mice.. 第70回日本癌学会学術集会(名古屋)(平成23年10月)

Shima K, Mizuma M, Rikiyama T, Katayose Y, Egawa S, Ishii N, Horii A, Unno M: Utility of xenograft models using NOG-eGFP mice for a high quality sampling system of Pancreato-Biliary cancer cells. IHPBA 2012 (Paris) (平成24年7月)

嶋健太郎, 水間正道, 林 洋毅, 中川 圭, 岡田恭穂, 坂田直昭, 大村範幸, 北村 洋, 吉田 寛, 元井冬彦, 力山敏樹, 片寄 友, 江川新一, 石井直人, 堀井 明, 海野倫明: 蛍光NOGマウスの異種移植モデルを用いた高純度癌細胞サンプリングシステム. 第113回日本外科学会定期学術集会(福岡)(平成25年5月),

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

力山敏樹 (RIKIYAMA TOSHIKI)

研究者番号: 80343060

(2) 研究分担者

林 洋毅 (HAYASHI HIROKI)

研究者番号: 30422124

海野倫明 (UNNO MICHIAKI)

研究者番号: 70282043

(3) 連携研究者

()

研究者番号: