

## 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 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591506

研究課題名（和文）脂肪組織由来幹細胞による肝再生調節機構の解明に関する研究

研究課題名（英文）The possibility of hepatic regenerative medicine using adipose tissue-derived mesenchymal stem cell (ADRC)

研究代表者

森根 裕二 (MORINE YUJI)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：60398021

研究成果の概要（和文）：

脂肪組織由来幹細胞 (ADRC) が肝再生過程における調節機構としての役割について検討した。ADRC は *in vitro* で肝細胞様細胞へ分化誘導するとともにラット肝切除後投与（脾臓内）により 4 週間後、アルブミン産生細胞へと分化した。さらにマウス肝細胞と ADRC との細胞接触(-)共培養による肝細胞生存時間改善効果を確認し、ADRC の肝細胞分化による再生補助以外にも ADRC の産生する液性因子による肝障害保護効果があることを確認した (trophic 効果)。また肝切除+虚血再灌流モデルにおける全身投与（尾静脈）により ADRC が傷害臓器（再生肝）への集積 (homing 効果) も確認し、SDF-1/CXCR4 axis の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Adipose tissue represents an abundant source of adult stem cells, termed 'adipose-derived regenerative cells (ADRC)', with the ability to differentiate along multiple lineage pathways.

In this study, we demonstrated that ADRCs could be differentiated into hepatocyte like cells, as well as protected hepatocytes by a trophic effect and a homing effect through CXCR4 / SDF1 axis *in vitro* and *in vivo* 70% hepatectomy following ischemia reperfusion rat model.

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	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝不全、幹細胞、肝再生制御因子、肝切除、肝移植

## 1. 研究開始当初の背景

肝再生のメカニズムには多くの再生制御因子が関与するとともに、大きく肝細胞と他の間葉系細胞の再生により構成され、初期の肝細胞増殖に引き続き類洞内皮細胞が増殖

し肝血流が保たれている。

自己複製能および多分化能をもつ幹細胞を用いた再生医療の研究も進行し、特に体性幹細胞に属する間葉系幹細胞：MSC (mesenchymal stem cell) が臨床導入されつつ

ある。MSCは骨髄、脂肪組織や臍帯血などに存在し、自己細胞を利用すればiPS細胞やES細胞のように倫理面・発癌の問題や免疫拒絶がなく生着もよいという利点を持つ。現在、MSCは虚血性疾患では血管新生・心筋細胞分化、Crohn病の上皮形成、脊髄損傷の神経細胞分化、炎症部位におけるTNF- $\alpha$ の低下や制御性T細胞発現などの免疫寛容など多分化能（作用）を示す。しかし肝疾患領域においては、肝硬変に対して臨床試験が施行されているものの、肝再生急性期（肝切除術後）におけるMSCの役割については動物実験においても依然検討されていない。また骨髄幹細胞は細胞採取の侵襲が大きい上、幹細胞様細胞の回収は $5 \times 10^7$ 個にとどまるが脂肪組織由来幹細胞：adipose tissue-derived mesenchymal stem cell (ADRC)は皮下脂肪から低侵襲な手法により採取でき、骨髄に比べ1mlあたり数百倍の幹細胞が含まれている。現在、この豊富な細胞資源にから得られるADRCによる細胞治療法が注目され、肝再生においても肝細胞分化や間葉系細胞（類洞内皮細胞、形質細胞など）へ分化のみならず、ADRCの持つ潜在的な肝傷害保護作用が期待される。

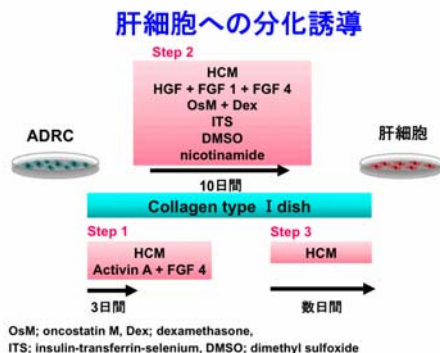
## 2. 研究の目的

脂肪組織由来組織細胞 (ADRC)が肝再生過程における調節機構としての役割について検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) ADRCの肝細胞分化能

サイトリ・セラピューティクス社のCelution System<sup>®</sup>により、ヒト皮下脂肪組織からADRCを抽出し、ADRCの肝細胞分化能を*in vitro*、*in vivo*で検討する。*In vitro*ではADRCをHGF、FGF1、FGF4などのサイトカイン・カクテルで処理し、さらに肝細胞への成熟を促すとされるオンコスタチンMやデキサメサゾンで刺激する。



*In vivo*ではbalb/c nu-nuマウスに70%肝切除(Hx)施行後、ADRC ( $1.5 \times 10^6$ 個)を脾注し、術後4週間の残肝におけるADRCの分化状況を確認する。

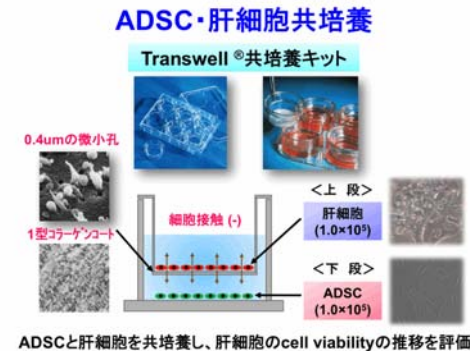
### (2) ADRCのTrophic効果 (*in vitro* 実験)

ADRCの産生する液性因子 (Trophic 効果)による肝障害保護効果を検討する。ADRCとしてStem Pro<sup>®</sup>ADSC (Life Technologies Japan Ltd.)を使用。

マウス初代肝細胞培養により、肝細胞単体で抽出する。



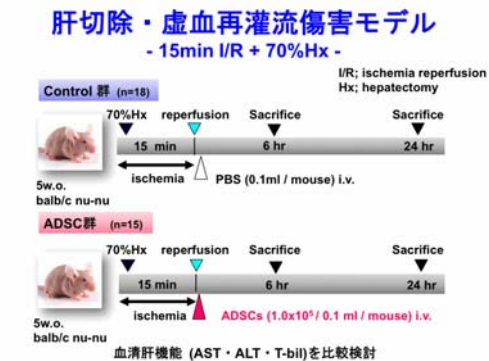
ADRCと肝細胞をcell-cell contact (-)共培養し、肝細胞のviabilityを評価する。



さらに液性因子の評価のため各種肝再生増殖因子をreal time PCRにて測定する。

### (3) ADRCのTrophic効果 (*in vivo* 実験)

Balb/c nu-nuマウス (5週齢)を用いて70%Hx+15min虚血再灌流(I/R)を作成。術後、尾静脈からADRC ( $1.0 \times 10^5$ /0.1ml)投与し、術後肝機能評価を行う。さらに虚血再灌流傷害を20minに延長した致死モデルでは生存率とともに、肝再生率を比較検討する。



研究(3)で用いた70%Hx+15min I/RモデルにXenolight Dir<sup>®</sup>にてLabelしたADRCを尾錠右脈より投与する。IVIS imaging system<sup>®</sup>によ

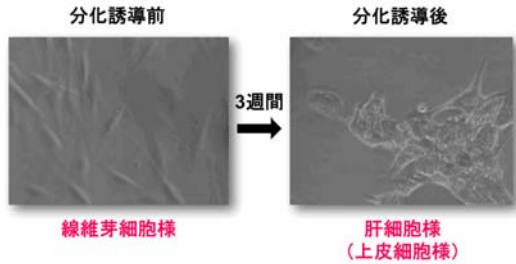
り ADRC の集積臓器を追跡する。さらに homing 効果に必須とされる SDF-1/CXCR4 発現について RNA・蛋白レベルで解析する。

#### 4. 研究成果

##### (1)ADRC の肝細胞分化能

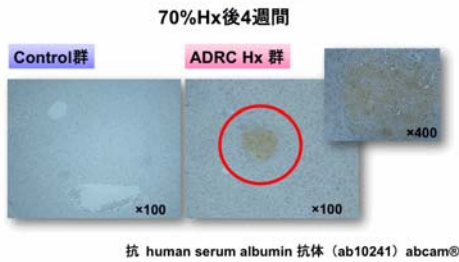
In vitro において ADRC は約 4 週間で肝細胞様の形態を呈した細胞へ分化した。

##### 肝細胞様細胞への分化

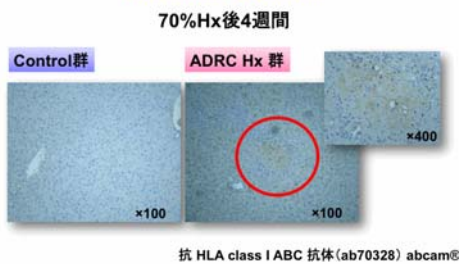


In vivo においては 70%Hx 施行後、ADRC (1.5×10<sup>6</sup> 個) 脾注により術後 4 週間の残肝の免疫組織学的染色にて、抗 HLA-1 抗体及び抗 human albumin 抗体陽性細胞を認めた。

##### 免疫組織染色 human albumin



##### 免疫組織染色 human HLA class I

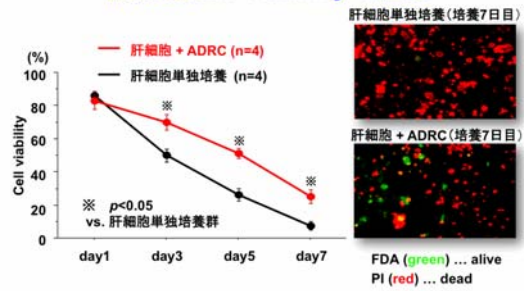


これらの検討により、ADRC は肝切除後肝再生において、機能的肝細胞へ分化することが確認された。しかしながら ADRC が肝細胞へ分化するためには 4 週間必要とされるが、大量肝切除後急性期は術後 1 週間以内であり、術後早期の肝再生補助 (肝傷害改善・肝不全の離脱) には ADRC の肝細胞分化能以外にも、潜在的な機能の存在が期待された。

##### (2) ADRC の Trophic 効果 (in vitro 実験)

肝細胞単独培養では、通常培養 7 日後、肝細胞は死滅するが、ADRC との共培養により cell viability は改善した。さらに FDA と PI により Viability を測定した際の蛍光顕微鏡写真においても、ADRC との共培養群で、green の viable な肝細胞が多く残存していた。これらのことは ADRC の分泌する液性因子 (trophic molecules) による細胞保護効果が考えられた。

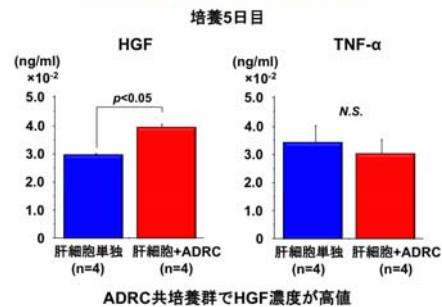
##### 肝細胞 cell viability の推移



ADRC が細胞接触なく肝細胞 viability の低下を抑制

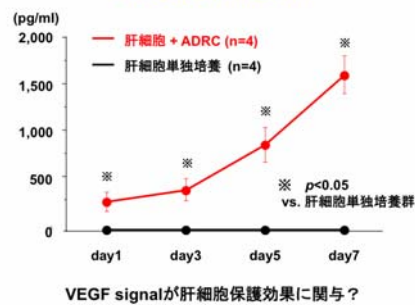
Real time PCR により培養液中サイトカイン (HGF、TNF- $\alpha$ ) を解析では、培養 5 日目の TNF- $\alpha$  に変化は認められないものの、HGF は有意に ADRC 共培養群で有意に上昇していた。

##### 培養液中サイトカイン



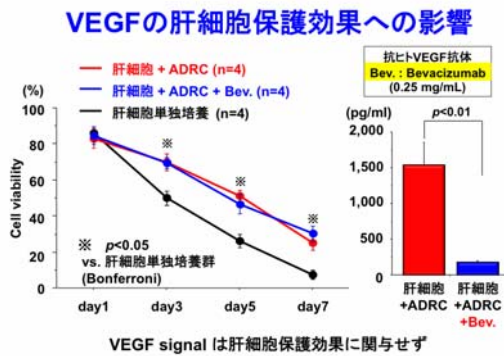
さらに VEGF に関しては共培養後経時的に上昇しており、ADRC の trophic 効果による肝細胞保護作用に VEGF が関与していることが示唆された。

##### 培養液中 VEGF



次に ADRC の trophic 効果が VEGF によるものかどうか、抗 VEGF 抗体である Bevacizumab (Bev) を用いて検討したところ、

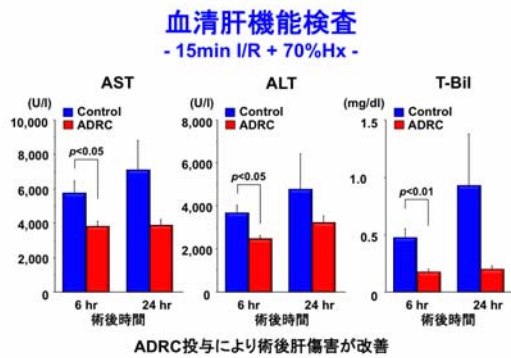
ADRC の肝保護効果は Bev による VEGF signal block によりキャンセルされなかった。



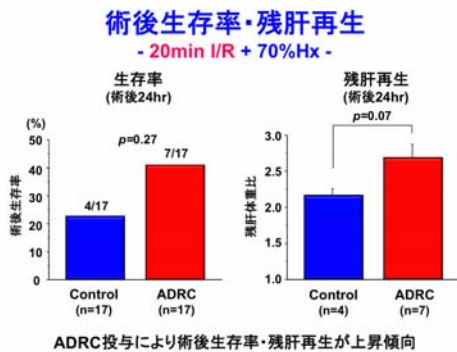
これらの結果により、ADRC 自身が産生する液性因子により肝細胞保護効果を有するが、VEGF 以外の trophic molecule を探索する必要があると思われた。

### (3) ADRC の Trophic 効果 (in vivo 実験)

15min I/R + 70%Hx モデルにおける術後肝傷害は、術後 6 時間における ADRC 投与群の血清 AST、ALT、T-Bil は control 群と比較して有意に改善されていた。術後 24 時間では有意差は認めないものの改善傾向を認めた。



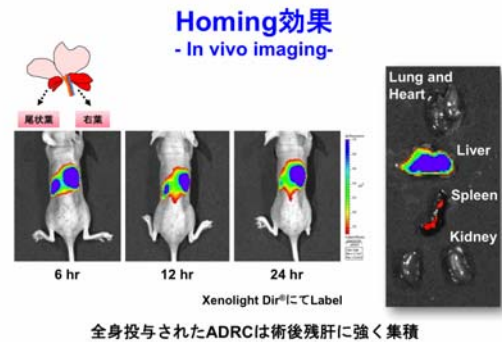
さらに 20min I/R + 70%Hx 致死モデルでは術後 24 時間における生存率は改善傾向を認め、残肝再生率も ADRC 投与群で改善傾向を認めた。



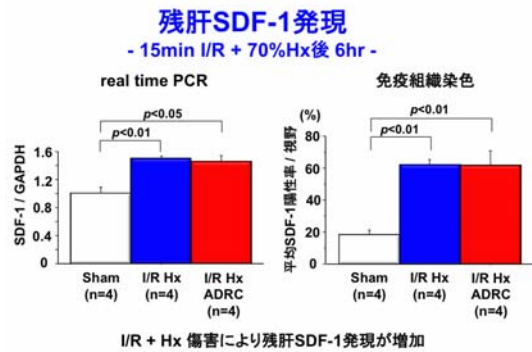
### (4) ADRC の homing 効果 (in vivo 実験)

生体内 in vivo imaging により、やはり尾静脈から全身投与された ADSC は、残肝 (再生

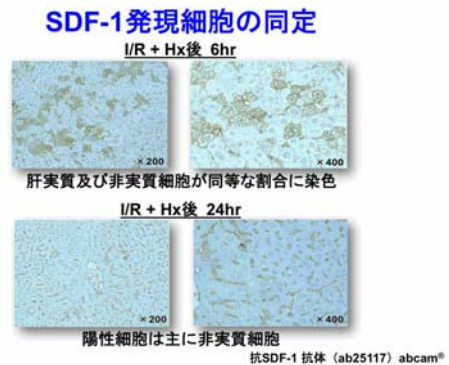
肝) である尾状葉及び右葉に術後 6hr の時点ですでに集積を認め、少なくとも 24hr までは集積を描出可能であり、homing 効果を確認できた。その他、脾臓にも少数描出可能であった。



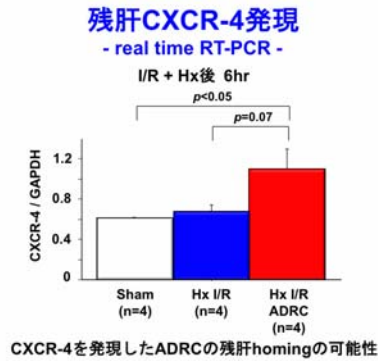
また残肝組織中の SDF-1 発現を real time PCR・免疫染色にて確認したところ、肝切除 + 虚血再灌流傷害が加わると、術後残肝の SDF-1 発現が有意に増加していた。一方で、ADRC の投与の有無では、SDF-1 発現に増減を認めなかった。



SDF-1 陽性細胞を同定したところ、術後 6hr の時点では、肝実質細胞及び非実質細胞が同等な割合で染色されるものの術後 24hr においては、非実質細胞が中心に染色されていた。



さらに残肝組織中の CXCR-4 発現を real time RT-PCR を用いて解析、ADRC 投与群において残肝 CXCR-4 発現が増加しており、CXCR-4 を発現した ADRC の残肝への homing の可能性が間接的ではあるが考えられた。



以上、これらの研究成果により ADRC の肝細胞分化能とともに肝障害急性期（再生肝）における ADRC の trophic 効果・homing 効果を確認することができた。しかしながら trophic 効果の中心となる molecule の同定には至らず、それらを増強させるような治療戦略の構築まではできなかった。今後はさらにこれらの trophic molecule とともに homing 効果増強のための molecule についても探索を継続していく方針である。

#### 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. Saito Y, Mori H, Takasu C, Komatsu M, Hanaoka J, Yamada S, Asanoma M, Ikemoto T, Imura S, Morine Y, Utsunomiya T, Shimada M. Beneficial effects of green tea catechin on massive hepatectomy model in rats. J Gastroenterol. 2013 Mar 30. [Epub ahead of print]
2. Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Morine Y, Imura S, Mori H, Sugimoto K, Iwahashi S, Asanoma M. The protective effect of adipose-derived stem cells against liver injury by trophic molecules. J Surg Res. 2013;180(1):162-168.
3. Hanaoka J, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H. Significance of sonic hedgehog signaling after massive hepatectomy in a rat. Surg Today. 2013;43(3):300-307.
4. Kanamoto M, Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Mori H, Hanaoka J. Impact of a new refrigerator on the preservation of hepatic grafts. Hepatol Res. 2012;42(8):798-805.
5. Utsunomiya T, Shimada M, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Mori H, Hanaoka J, Iwahashi S, Saito Y, Iwaguro H. Human adipose-derived stem cells: potential clinical applications in surgery. Surg Today.

〔学会発表〕（計 7 件）

1. 池本 哲也, 他 11 名, 5 番目. 森根 裕二. ヒト脂肪由来幹細胞を用いた障害臓器修復に関する研究. 第 112 回日本外科学会定期学術集会 2012 年 4 月 12 日-14 日 幕張メッセ(千葉県).
2. 斎藤 裕, 他 14 名, 12 番目. 森根 裕二. ヒト脂肪由来幹細胞の傷害肝への homing 効果に関する研究 第 112 回日本外科学会定期学術集会 2012 年 4 月 12 日-14 日幕張メッセ(千葉県).
3. 小笠原 卓, 他 15 名, 13 番目. 森根 裕二. ヒト脂肪由来幹細胞は VEGF シグナルとは異なる経路で肝細胞傷害を軽減する. 第 112 回日本外科学会定期学術集会 2012 年 4 月 12 日-14 日幕張メッセ(千葉県).
4. 斎藤 裕, 他 12 名, 11 番目. 森根 裕二. ヒト脂肪由来幹細胞による肝再生療法に関する基礎的検討. 第 23 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2011 年 6 月 8 日-10 日 京王プラザホテル(東京都).
5. Yu Saito, et al. 4<sup>th</sup>, Yuji Morine. Ischemia reperfusion injury enhances SDF1 expressions and homing of adipose derived regenerative cells in the liver. 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer (ISMRC2011) 2011 9/21-23 Grand Cube Osaka(大阪府)
6. 斎藤 裕, 他 11 名, 5 番目. 森根 裕二. 肝虚血再灌流傷害におけるヒト脂肪由来幹細胞ホーミング効果の機序解明. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3 日-5 日名古屋国際会議場(愛知県).
7. 斎藤 裕, 他 11 名, 10 番目. 森根 裕二. ヒト脂肪由来幹細胞による肝虚血再灌流障害軽減効果に関する基礎的検討. 第 47 回日本移植学会総会 2011 年 10 月 4 日-6 日 仙台国際センター(宮城県).

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

森根 裕二 (MORINE YUJI)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号：60398021

##### (2)研究分担者

島田 光生 (SHIMADA MITSUO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号：10216070

宇都宮 徹 (UTSUNOMIYA TOHRU)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・准教授  
研究者番号：30304801

居村 暁 (IMURA SATORU)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号：90380021

池本 哲也 (IKEMOTO TETSUYA)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号：20398019