

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5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659152

研究課題名（和文） 間葉系幹細胞および造血幹細胞による肝線維症の病態形成

研究課題名（英文） Pathophysiological Roles of Mesenchymal Stem Cells and Hematopoietic Stem Cells in Hepatic Fibrosis

研究代表者

稲垣 豊 (INAGAKI YUTAKA)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：80193548

研究成果の概要（和文）：骨髄には、全血球系細胞へ分化しうる造血幹細胞と、骨・軟骨・脂肪細胞などに分化する間葉系幹細胞とが存在する。造血幹細胞については研究が進み、臨床的にも骨髄移植に用いられているが、間葉系幹細胞が生体内で果たす役割は依然として不明の点が多い。今回の研究では、線維肝に流れ着いた血球系細胞がコラーゲン線維を分解するコラゲナーゼ酵素を産生することで線維化改善に寄与すること、一方で間葉系幹細胞の線維肝への生着は認められないことを証明した。

研究成果の概要（英文）：There are two types of stem cells, hematopoietic stem cells (HSC) and mesenchymal stem cells (MSC), present in bone marrow (BM). While HSC have been well characterized and applied for BM transplantation, little is known about the physiological roles of MSC. In this study, we have revealed that hematopoietic cells derived from HSC migrate into fibrotic liver and contribute the regression of fibrosis by expressing collagenases. In contrast, MSC or its derivatives are not mobilized from BM into fibrotic liver tissue during hepatic fibrogenesis.

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	0	1,700,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	360,000	3,260,000

研究分野：医歯薬学

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：肝線維化、骨髄幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨髄細胞が肝線維化の進展あるいは改

善に関わるという、近年の相反する研究結果のために、肝硬変患者に対する自家骨髄細胞

療法の功罪については未だ結論が得られていない。その一因は、線維肝組織に生着した骨髄由来細胞が不均一で、その由来や細胞系譜も不明な点にある。

(2) 骨髄の中には、血球系細胞へ分化しうる造血幹細胞と、骨・軟骨・脂肪細胞などに分化する間葉系幹細胞が存在する。造血幹細胞については研究が進み、臨床的にも骨髄移植に用いられている一方、間葉系幹細胞が生体内で果たす役割は依然として不明の点が多い。その原因は、これまでの間葉系幹細胞は骨髄細胞を培養皿に撒いて接着した細胞として採取された不均一な細胞集団であること、また培養を経ているので生体内での本来のはたらきを反映していないという点にあった。本研究の連携研究者によって近年新たに分離・同定された間葉系幹細胞は、培養を経ないで直接骨髄から採取できるところに最大の特徴がある。

2. 研究の目的

本研究では、最近新たに分離同定された骨髄間葉系幹細胞と造血幹細胞をそれぞれ緑色蛍光で個別に標識し、肝線維化過程における両幹細胞に由来する細胞の肝組織への生着や分化動態を詳細に解析することを、目的とする。これにより、間葉系幹細胞によるコラーゲン産生が肝線維化をむしろ悪化させるという報告の真偽を検証し、難治性肝硬変症に対する細胞治療法開発に向けての理論的裏付けを行うものである。

3. 研究の方法

(1) 骨髄間葉系幹細胞および造血幹細胞の移植

① Enhanced green fluorescent protein (EGFP) を恒常的に発現するトランスジェニック・レポーターマウス (EGFP Tg) の骨髄から、Fluorescence-activated cell sorter (FACS) を用いてマウスの間葉系幹細胞を高頻度に含有する CD45⁻ Ter119⁻ PDGFR α ⁺ Sca1⁺ (P α S) 細胞分画、もしくは造血幹細胞である CD34⁻ c-Kit⁺ Sca1⁺ Lin⁻ (34KSL) 細胞を採取した。両幹細胞を個別に放射線照射後の野生型マウスの静脈内に投与して、骨髄を置換した。対照として、EGFP Tg から採取した全骨髄細胞を、同様に放射線照射後の野生型マウスに移植した。

② 骨髄を置換した6週間後に、レシピエントマウスにおける末梢血単核球中の EGFP 陽性率 (キメリズム) を、FACS を用いて確認した。また、EGFP 陽性の P α S 細胞分画、もしくは全骨髄細胞を移植したレシピエントマウスに

おける骨髄 P α S 細胞分画中の EGFP キメリズムを、解剖時に採取・染色した骨髄細胞の FACS 解析により確認した。

(2) 実験的肝線維症の作製

骨髄置換後8週目より、レシピエントマウスに四塩化炭素を3日毎に計30回皮下投与して、実験的肝線維症を作製した。肝線維化の程度を、四塩化炭素の最終投与後から経時的に摘出した肝臓標本の Sirius red 染色により評価した。

(3) 線維肝組織へ生着した細胞の局在と分化動態の解析

① 同様に、四塩化炭素最終投与後から経時的に採取した肝組織を用いて、線維肝組織内へと流入・生着した骨髄間葉系幹細胞あるいは造血幹細胞に由来する細胞の局在を、EGFP の共焦点レーザー顕微鏡観察により解析した。
② 両幹細胞に由来する細胞の線維肝組織内における分化動態について、肝細胞 (アルブミン、AFP)、胆管細胞 (CK19)、類洞内皮細胞 (Stabilin-2, CD31)、星細胞 (デスミン、 α -smooth muscle actin, α SMA)、Kupffer 細胞 (F4/80) ならびに Oval 細胞 (OV-6) に対する特異的抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

(1) 骨髄 34KSL 細胞移植による血球系細胞の置換

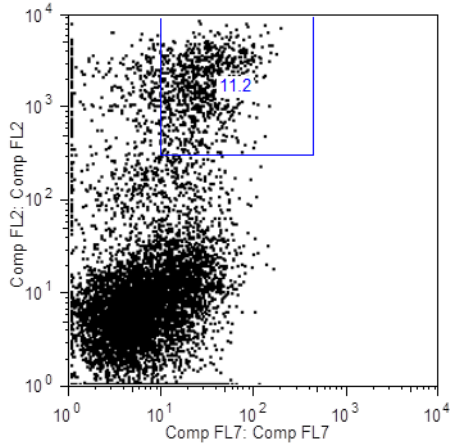
骨髄造血幹細胞を移植したレシピエントマウスにおける6週後の末梢血単核球中の EGFP キメリズムは全例で85%以上、また解剖時の骨髄細胞中の EGFP キメリズムも90%以上であり、全骨髄細胞を移植した場合と同様に良好であった。

(2) P α S 細胞移植による骨髄間葉系幹細胞の置換

① P α S 細胞は、骨髄中の非血球系細胞全体の1%未満に過ぎない、ごく少数の細胞集団である。EGFP 陽性の全骨髄細胞を移植した場合には、そのほとんどが血球系細胞であることからレシピエントマウス骨髄中の間葉系幹細胞の増加はなく、EGFP 陽性細胞による置換も5%以下と低値であった。

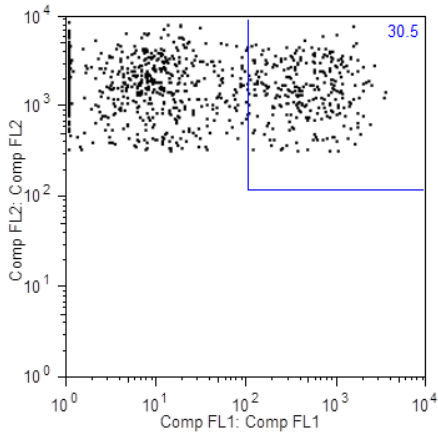
② これに対して、EGFP 陽性の P α S 細胞を移植した場合には、レシピエントマウス骨髄中の非血球系細胞全体に占める P α S 細胞の割合が11.2%と、通常の10倍以上に増加した (下図: 縦軸は Sca1-PE、横軸が PDGFR α -APC)。

13: MoFlo Sample_013ÉComp FL2, Comp FL4 subset

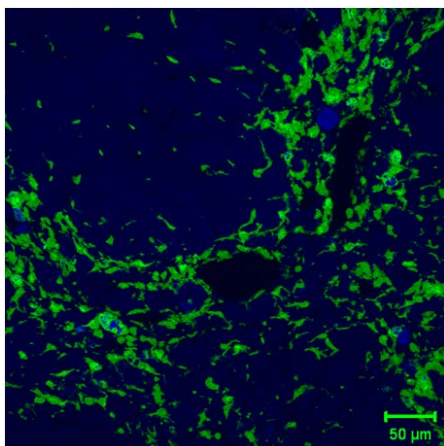


また、骨髄中 PαS 細胞における EGFP のキメリズム（置換率）も、30%以上と著しく増加した（下図：縦軸は Sca1-PE、横軸が EGFP）。

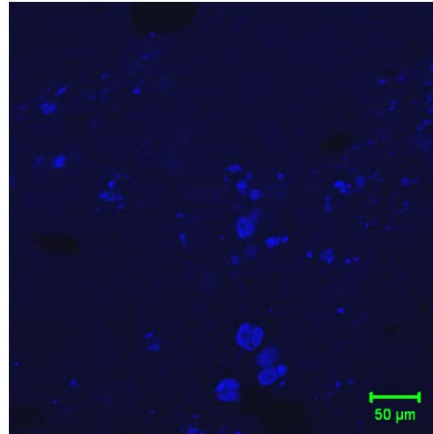
13: MoFlo Sample_013ÉComp FL7, Comp FL2 subset



(3) 骨髄造血幹細胞もしくは間葉系幹細胞に由来する細胞の線維肝組織への生着
 ①骨髄 KSL 細胞を移植したレシピエントマウスにおいては、全骨髄細胞を移植した場合と同様に、門脈域や線維束に沿って多数の EGFP 陽性細胞の生着が認められた（下図）。



②これに対して、EGFP 陽性の PαS 細胞を移植した場合には、レシピエントマウス骨髄中の PαS 細胞における EGFP のキメリズムが 30%以上に増加したにもかかわらず、線維肝組織中に EGFP 陽性の細胞は全く認められなかった（下図；青色の細胞は自家蛍光を発しており、EGFP の特異的蛍光ではない）。



すなわち、骨髄 MSC の線維肝組織への流入や生着は認められず、同細胞によるコラーゲン産生が線維化進展にむしろ悪影響を及ぼすという懸念は払拭された。

(4) 骨髄造血幹細胞に由来する細胞の線維肝組織における分化動態

線維肝組織へ生着した細胞の局在と分化動態の解析

①線維肝組織内へと流入・生着した骨髄造血幹細胞に由来する細胞の分化動態を解析したところ、その一部は F4/80 陽性の Kupffer 細胞や、Stabilin-2 陽性の類洞内皮細胞に分化していた。しかしながら、EGFP を共発現する αSMA 陽性の活性化星細胞（筋線維芽細胞）はごく少数に限られ、EGFP とデスミンとの共発現は認められなかった。

②これらの細胞の一部は、MMP-13 や MMP-9 といったコラーゲン分解酵素を産生しており、線維肝に生着した血球系細胞が肝線維化の改善に寄与している可能性が示された。

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 10 件）

- ① Inagaki Y, Higashiyama R: Interplay between bone marrow and liver in the pathogenesis of hepatic fibrosis. *Hepatol Res* 42: 543-548, 2012（査読あり）
- ② Inagaki Y, Higashiyama R, Higashi K:

Novel anti-fibrotic modalities for liver fibrosis: Molecular targeting and regenerative medicine in fibrosis therapy. J Gastroenterol Hepatol 27: 85-88, 2012 (査読あり)

- ③ Higashi K, Tomigahara Y, Inagaki Y, 他 6名 (8番目): A novel small compound that promotes nuclear translocation of YB-1 ameliorates experimental hepatic fibrosis in mice. J Biol Chem 286: 4485-4492, 2011 (査読あり)
- ④ Higashiyama R, Nakao S, Inagaki Y, 他 9名 (責任著者): Differential contribution of dermal resident and bone marrow-derived cells to collagen production during wound healing and fibrogenesis in mice. J Invest Dermatol 131: 529-536, 2011 (査読あり)

[学会発表] (計23件)

- ① Inagaki Y: Anti-fibrotic modalities for liver fibrosis. 6th International Symposium on ALPD and Cirrhosis, From Stem Cells to Global Health, 2011. 10. 21, Fukuoka, Japan.
- ② Inagaki Y: Pathogenesis of hepatic fibrosis. 17th Annual Meeting of the Korean Association for the Study of the Liver. Symposium 4: Hepatic Fibrosis, 2011. 6. 10, Seoul, Korea
- ③ Inagaki Y: Molecular mechanisms of hepatic stellate cell activation. 9th Japan Society of Hepatology Single Topic Conference: NASH 2010, 2010. 11. 19, Tokyo, Japan.
- ④ 稲垣 豊、東山礼一、三上健一郎: 肝線維化と再生の病態連繋における骨髄と末梢の臓器相関. 第17回肝細胞研究会、シンポジウム2「肝幹細胞と肝再生」、2010年6月19日、秋田アトリオン (秋田)
- ⑤ 東山礼一、三上健一郎、稲垣 豊: Matrix metalloproteinase (MMP)-13による線維化改善と類洞構造の修復を介した肝再生治療戦略. 第46回日本肝臓学会総会、移植・再生医療ワークショップ2「肝再生医学ー臨床応用を目指した研究の新展開」、2010年5月28日、ホテルメトロポリタン山形 (山形)

[図書] (計1件)

- ① 稲垣 豊、東山礼一、茂呂 忠、中尾祥絵、皆川香織、三上健一郎: 肝線維化病態に対する分子形態学的アプローチ. 病気の

分子形態学. (日本臨床分子形態学会編)、学際企画、東京、2011、p. 109-111.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 肝臓線維化抑制剤
発明者: 稲垣 豊、茂呂 忠
権利者: 学校法人 東海大学、
株式会社 ミノファーゲン製薬
種類: 特許
番号: 特願 2011-250746
出願年月日: 2011年11月16日
国内外の別: 国内

名称: 生体組織再生を促進させる薬剤を製造するための加工細胞
発明者: 稲垣 豊、東山 礼一
東 清史、斎藤 幸一
権利者: 学校法人 東海大学、
住友化学工業株式会社

種類: 特許
番号: 特願 2010-122501
出願年月日: 2010年5月28日
国内外の別: 国内・国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-tokai.ac.jp/daigakuin/pdf/inagaki.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 豊 (INAGAKI YUTAKA)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 80193548

(2) 連携研究者

松崎 有未 (MATSUZAKI YUMI)
慶応義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 50338183
東山 礼一 (HIGASHIYAMA REIICHI)
東海大学・医学部・奨励研究員
研究者番号: 80459495