

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790822

研究課題名(和文) CD34陽性細胞移植による肝硬変症に対する効率的な肝再生促進法の開発

研究課題名(英文) Development of an effective hepatic regenerative promotion therapy for liver cirrhosis using CD34+ cell therapy

研究代表者

中村 徹 (NAKAMURA, TORU)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30341332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：これまで私たちは血管内皮前駆細胞(EPC)を用いた肝硬変症に対する治療効果を報告してきた。ヒト臨床応用を考慮しEPCの表面マーカーのひとつであるCD34に注目し、CD34+細胞を用いた肝硬変症モデルラットに対する治療効果を検証した。ラット肝硬変症モデルにおいて移植したCD34+細胞は肝内で血管内皮細胞、肝類洞内皮細胞、血管平滑筋細胞へ分化し、移植細胞数依存性に肝線維化の抑制のみならず、肝再生の促進、予後の改善を認めた。増幅EPCを用いた実験では肝線維化率は増幅EPC投与群で有意に低値であり、線維化の進展が阻止できた。肝再生率は増幅前EPC移植群と比較し増幅後EPC投与群で明らかに増加していた。

研究成果の概要(英文)：We already reported that transplantation of rat endothelial progenitor cells (EPCs) markedly improve hepatic regeneration and promotion of fibrolysis in state of established liver fibrosis enhancing liver function and survival rate. Recently, human peripheral CD34+ cells were reported to contain a population enriched in EPCs. We investigated whether transplantation of purified human peripheral CD34+ cells could reduce established liver fibrosis and up-regulate therapeutic regeneration. The transplanted cells differentiated into vascular and sinusoidal endothelial cells, and vascular smooth muscle cells. CD34+ cell transplantation reduced liver fibrosis in a dose-dependent fashion. Expanded CD34+ cell transplantation reduced liver fibrosis. The transplantation of expanded CD34+ cells significantly up-regulated the number of Ki67-positive hepatocyte compared with the transplantation of freshly isolated CD34+ cells in a dose dependent manner.

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：CD34陽性細胞 血管内皮前駆細胞 肝硬変 肝再生 細胞療法

## 1. 研究開始当初の背景

肝線維症は、コラーゲンを中心とした細胞外マトリックスが肝臓に異常に沈着した状態であり、肝線維化が進行すると肝硬変症へと進む。B型肝炎ウイルスやC型肝炎ウイルス(HCV)に起因する肝硬変症患者の多くは肝細胞癌を発症する。日本のウイルス性肝炎の多くを占めるHCV感染による肝硬変症例では年率7%前後と高率に肝細胞癌が発症する。2001年国民衛生の動向をみると年間約5万人の肝疾患死亡者があり、その約3分の2が肝細胞癌で、残りの大半が肝硬変による死亡という現状である。また、肝硬変症は肝細胞癌の発生母地となるだけでなく、肝予備能の低下から手術や化学療法を行う際に十分な治療を行うことができない場合が多い。さらに進行した肝硬変症/肝不全に対する治療法は肝移植以外に有効な治療法がない。しかし、その肝移植も絶対的なドナー不足であり、外科的侵襲など克服すべき課題は多く、慢性肝不全患者に対する有効な治療法といえるまで普及していない。

近年、骨髄由来細胞の一部に赤血球・白血球などの血球系細胞以外に、筋肉細胞・脂肪細胞・線維芽細胞・骨芽細胞など他の種類の細胞へも分化することが可能であることが明らかとなったが、それ以降、骨髄由来細胞を用いた再生医療の基礎的研究が精力的になされ、その一部はすでに臨床応用されている。

骨髄に由来する血管内皮前駆細胞(EPC)は1997年、浅原らにより末梢血中の単核球成分の一部(CD34陽性細胞分画)として存在することが証明され、この細胞の特徴として炎症、虚血、障害部位へ特異的に取り込まれることが証明された。さらに血管内皮前駆細胞は、既存隣接血管の血管内皮細胞による増殖、遊走により成立する血管新生のみならず、胎児期のみならず存在するとされた血管発生の機序が成人でも成立していることが証明された。

これまでに申請者らは、急性肝不全モデルマウスに対し、健常人末梢血由来 *ex vivo* 増幅血管内皮前駆細胞を経脾的に投与すると、死亡率が著明に低下することを明らかにし、さらに肝硬変症モデルラットに対しラット骨髄由来 *ex vivo* 増幅血管内皮前駆細胞を経静脈的に投与すると、肝内の血管形成の促進と血管内皮前駆細胞より産生される各種増殖因子の周囲組織への供給により、肝線維化の抑制、肝再生の促進、予後の改善が認められることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

血管内皮前駆細胞投与による肝硬変症を含めた肝疾患への有効性が動物実験レベルで明らかにされたわけだが、申請者らがこれまでに報告してきた *ex vivo* 増幅血管内皮前駆細胞(培養EPC)では動物血清や脳下垂体抽出液を使用していたため、臨床応用に際しては人畜感染症のリスクを有する。臨床応用を考慮するに、今後は無血清培地を用いた培養法の確立が必要になる。血管内皮前駆細胞は、広義ではCD34陽性細胞と定義されていることより、培養せずに早期に実現可能な血管内皮前駆細胞としての細胞材料はCD34陽性細胞と考えられる。そこで、(1)我々は末梢血より採取可能な健常人末梢血由来CD34陽性細胞を用いた肝硬変症モデルラットに対する治療効果を検証することにした。

さらに、臨床応用における技術的な問題点として、十分な数の血管内皮前駆細胞をいかに確保するかを検討する必要がある。(2)前述の研究成果をもとに、さらに発展させた培養CD34陽性細胞(培養EPC)(細胞数を確保し、機能強化されている)を肝硬変症モデルラットに投与し、通常をしのぐ治療効果が確認できるかを明らかにしたい。

## 3. 研究の方法

(1) 健常ヒト末梢血より単核球分画を分

離し、さらに磁気細胞分離システムを用いて CD34 陽性細胞を分離した。肝硬変症モデルは、免疫不全ラット腹腔内に週 2 回 3 週間四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)を投与し作製した。その後、脾臓より生食水あるいは CD34 陽性細胞を低・中・高用量群と 3 群に分けて投与した。その後も CCl<sub>4</sub>は投与し続け、CCl<sub>4</sub>投与開始後 43 日目に屠殺し、肝線維化・再生の評価を行った。

(2) 健常人 CD34 陽性細胞は AllCells 社より購入した。CD34 陽性細胞は VEGF, SCF, IL-6, Flt-3 ligand, TPO を添加した StemSpan-SFEM 培地にて 7 日間培養した。培養前後の EPC の血管再生能の評価を FACS 解析、colony assay 法、real-time PCR 法により評価した。肝硬変症モデルは、上述(1)と同じ動物実験モデルを用いた。増幅前後の EPC を低・中・高用量群と 3 群に分けて投与し、生食水を対照群として用いた。CCl<sub>4</sub>投与開始後 43 日目に屠殺し、肝線維化・再生の評価を行った。

#### 4 . 研究成果

(1) ラット肝硬変症モデルにおいて、移植した CD34 陽性細胞は肝内で血管内皮細胞、肝類洞内皮細胞、血管平滑筋細胞へ分化し、移植細胞数依存性に肝線維化の抑制のみならず、肝再生の促進、予後の改善を認めた。

(2) 増幅により健常人由来 EPC 数は約 12 倍に、血管再生能は約 3 倍に改善(強化)された。FACS 解析では VE-cadherin, KDR, Tie2 の発現が、Real-time PCR 法では VEGF, HGF, Angiopoietin-2 などの増殖因子が増幅後有意に増加した。移植した細胞は生体内で血管内皮細胞、血管平滑筋細胞へ分化した。Azan 染色による肝線維化率は増幅 EPC 投与群で有意に低値であり、線維化の進展が阻止された。Ki67 陽性肝細胞率は増幅後 EPC 投与群で明らかに増加し、増幅前 EPC 移植群と比較しても強い細胞増殖活性作用を示した。

肝臓領域において CD34 陽性細胞をヒト肝硬変症治療に用いた報告があり、少人数の肝

線維症あるいはアルコール性肝障害患者に対し G-CSF 動員自己 CD34 陽性細胞を門脈あるいは肝動脈より投与すると、肝機能・肝予備能の改善を認めたと報告された。しかし、その治療効果のメカニズム、移植細胞の生体内評価等は全くなされておらず、移植細胞が癌化する可能性を秘めているだけに十分な研究成果とは言い難い。そのため、我々は将来のヒト臨床応用に沿った CD34 陽性細胞(非培養 EPC)を用いた前臨床研究を行い、2012 年、世界に対し詳細に論文報告できた。(2)の研究についてはまだ完了していないが、現時点で我々が目指している肝硬変症に対する培養 CD34 陽性細胞(培養 EPC)を用いた肝臓再生治療の報告は基礎・臨床ともに国内外にない。

#### 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 6 件)

1. Sakamoto M, Nakamura I, 以下 7 名. 2 番目. Transplantation of endothelial progenitor cells ameliorates vascular dysfunction and portal hypertension in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhotic model. *J Gastroenterol Hepatol*. 査読有, 28, 2013, 168-78. doi:10.1111/j.1440-1746.2012.07238.x.
2. Nakamura I, Torimura T, 以下 10 名. 1 番目. Prevention of liver fibrosis and liver reconstitution of DMN-treated rat liver by transplanted EPCs. *Eur J Clin Invest*. 査読有, 42, 2012, 717-28. doi:10.1111/j.1365-2362.2011.02637.x.

3. Nakamura T, Tsutsumi V, 以下 12 名. 1 番目. Human peripheral blood CD34-positive cells enhance therapeutic regeneration of chronically injured liver in nude rats. *J Cell Physiol*. 査読有, 227, 2012, 1538-52.  
doi: 10.1002/jcp.22873.

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 中村徹、鳥村拓司、他、肝硬変症に対する血管内皮前駆細胞を用いた臨床応用と将来への展望、第 40 回日本肝臓学会西部会、平成 25 年 12 月 6-7 日、岐阜
2. Toru Nakamura et al. Ex vivo cultured human CD34<sup>+</sup> cells promotes hepatic regeneration in chronically injured rat liver. The 64<sup>th</sup> American Association for the Study of Liver Disease (AASLD)、平成 25 年 11 月 1-5 日、ワシントン、アメリカ
3. 中村徹、鳥村拓司、他、肝硬変症モデルラットに対する生体外増幅血管内皮前駆細胞移植による肝臓再生療法、第 49 回日本肝臓学会総会、平成 25 年 6 月 6-7 日、東京
4. Toru Nakamura et al. Ex vivo-expanded peripheral CD34<sup>+</sup> cells for chronically injured liver treatment: in vitro and in vivo studies. The 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL)、平成 25 年 4 月 24-28 日、アムステルダム、オランダ
5. 中村徹、鳥村拓司、他、生体外増幅血管内皮前駆細胞を用いた肝硬変症モデルラットに対する肝再生療法、第 26 回肝臓洞壁細胞研究会学術学会、平成 24 年 11 月 17-18 日、山口
6. Toru Nakamura et al. Ex vivo expanded

CD34<sup>+</sup> cell therapy for chronically injured liver in rats. The 63<sup>th</sup> American Association for the Study of Liver Disease (AASLD)、平成 24 年 11 月 9-13 日、ワシントン、アメリカ

7. 中村徹、鳥村拓司、他、末梢血 CD34 陽性細胞を用いた肝硬変症に対する肝臓再生療法 -基礎研究から臨床研究へ-、第 19 回日本消化器病学会週間、平成 23 年 10 月 20 日、福岡
8. Toru Nakamura et al. Administration of human peripheral blood CD34-positive stem cells contribute to hepatic regeneration via vasculogenesis after carbon tetrachloride-induced chronic liver injury. The 11<sup>th</sup> Interamerican Congress on Microscopy (招待講演)、平成 23 年 9 月 29 日、メリダ、メキシコ
9. 中村徹、鳥村拓司、他、G-CSF 動員自家末梢血 CD34 陽性細胞を用いた肝臓再生療法と今後の課題、第 37 回日本急性肝不全研究会、平成 23 年 6 月 1 日、東京

〔図書〕(計 2 件)

1. 中村徹、佐田通夫、医歯薬出版株式会社、別冊・医学の歩み 肝硬変 Update-肝硬変死の根絶をめざして「血管内皮前駆細胞移植による肝再生治療」-基礎研究から臨床研究へ、2013、126

〔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 0 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〕

特記なし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 徹 (Nakamura Toru)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30341332

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：