

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790703

研究課題名(和文) 骨髄由来レドックス制御細胞による新規肝発癌予防療法開発のための基盤研究

研究課題名(英文) Basic studies into development of novel preventive and regenerative therapy for hepatocarcinogenic cirrhosis using bone marrow-derived cells having redox-regulatory capacity

研究代表者

高見 太郎 (TAKAMI, Taro)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60511251

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)：我々は「肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法(ABMi療法)」の臨床的有効性及び安全性を明らかにし、先進医療Bに認可された。またこれまでに、高発癌肝硬変マウスへの骨髄細胞頻回投与により肝線維化と肝発癌が抑制されることを論文報告している。さらに今回、酸化ストレス誘導下において骨髄間葉系幹細胞を肝細胞と共培養したところ、これらの酸化ストレス障害は抑制され、培養骨髄間葉系幹細胞の肝硬変モデルマウスへの投与でも肝線維化の抑制、血清抗酸化能の亢進、肝脂質過酸化の抑制を確認した。以上の結果より、培養骨髄間葉系幹細胞は肝硬変症に対する肝再生修復療法の細胞源となり得ることが示された。

研究成果の概要(英文)：We previously developed autologous bone marrow cell infusion (ABMi) therapy, which is a method of liver regeneration for liver cirrhotic patients using non-cultured autologous whole bone marrow cells, and reported the efficacy and safety of this approach. This ABMi therapy was officially approved as an "Advanced Medical Technology B" in Japan. We also reported that frequent bone marrow cell infusion contributed to suppressed tumor initiation during hepatocarcinogenesis. In these studies, we confirmed that hepatocytes co-cultured with bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) had lower levels of oxidative stress, and that cirrhotic mice treated with MSCs showed lower levels of liver fibrosis, higher serum antioxidant activity, and lower levels of hepatic malondialdehyde content. These results strongly indicate that cultured BMCs are a stem cell source in liver regeneration therapy for cirrhotic patients.

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：肝硬変症 肝再生療法 骨髄細胞 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

非代償性肝硬変症の根治療法は肝移植であるが、慢性的ドナー不足、手術侵襲や免疫拒絶などの諸問題は依然として解決されていない。その一方で我々の教室では、非代償性肝硬変患者に対する肝再生修復療法として、患者自身から自己骨髄液を 400mL 採取して洗浄後に骨髄単核球分画を分離濃縮し同じ患者に末梢静脈から再投与する方法 (ABMi 療法: Autologous bone marrow cell infusion therapy) の臨床的有効性と安全性を論文報告してきた (Terai S. et al., *Stem Cells*. 2006)。しかし、骨髄細胞投与が肝発癌を促進させる懸念があるため肝細胞癌合併例には ABMi 療法の適応はない。そこで骨髄細胞投与の肝発癌への影響を評価するため、生後 2 週オスマウス腹腔内への DEN 単回投与と四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 週 2 回反復投与による「マウス高発癌肝硬変 (DEN/GFP-CCl<sub>4</sub>) モデル」を確立し、これに DEN 投与後 2 ヶ月から同種同系マウス GFP 陽性骨髄細胞を尾静脈投与し、DEN 投与 4.5 ヶ月後の肝発癌動態を、組織学的に foci および腫瘍 (腺腫+肝細胞癌) の発生率、個数とサイズで評価した (骨髄細胞は 2 週間毎、5x10<sup>5</sup> 個/回、計 5 回投与した)。その結果、骨髄細胞投与群では foci および腫瘍の発生率と個数は有意に低くサイズは同等であったことから、骨髄細胞投与は肝発癌を抑制し腫瘍増殖を促進させないことが明らかとなった。さらに骨髄細胞投与群では、背景肝の線維化は少なく、肝 8-OHdG 量も有意に低値である等、酸化ストレスが抑制されていることが示唆された。また背景肝には抗酸化作用のある SOD (superoxide dismutase) 3 発現細胞が生着し、その多くが GFP 陽性であることを蛍光二重染色で確認する等、投与骨髄細胞が直接的に酸化ストレス抑制 (レドックス制御) に働くことが示唆された (Maeda M, et al., *J Gastroenterol Hepatol*. 2012)。

## 2. 研究の目的

骨髄細胞中のレドックス制御能を有する細胞分画を同定し、その作用メカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 通常培養した市販骨髄間葉系幹細胞と初代肝細胞を共培養し、Thioacetamide (TAA) 誘導酸化ストレスに対する抑制効果を解析評価する。

(2) 培養骨髄間葉系幹細胞を TAA 投与免疫不全肝硬変症モデルマウスに尾静脈 (末梢静脈) 投与し、肝線維化及び酸化ストレスに対する制御能を解析評価する。

## 4. 研究成果

(1) 通常法で培養した市販イヌ骨髄細胞は (CD90 陽性かつ CD11b/CD45 陰性) であり、骨・脂肪細胞への分化能を有していたため骨髄間葉系幹細胞を含む細胞群であった。この培養細胞と GFP トランスジェニックマウスから分離した初代肝細胞とを TAA 誘導酸化ストレス下に共培養し、GFP 陽性細胞由来の Reactive oxygen species (ROS) 産生を CellROX 試薬にて定量した。その結果、肝細胞由来 ROS 産生は抑制され、Nuclear erythroid-2 related factor (Nrf2) 発現は亢進していた ( $p < 0.05$ )。

(2) 同様に培養した市販イヌ骨髄間葉系幹細胞を TAA 腹腔内反復投与により作出した免疫不全肝硬変症モデルマウスに尾静脈から計 3 回投与したところ、肝シリウスレッド染色面積の抑制 ( $p < 0.05$ )、血清ヒアルロン酸の低下 ( $p < 0.05$ )、肝 MMP9 発現の亢進 ( $p < 0.05$ )、血清抗酸化能の亢進 ( $p < 0.001$ ) や、肝 Malondialdehyde (MDA) 含有量の低下 ( $p < 0.05$ ) を確認した。

このように「TAA で酸化ストレスを誘導した初代肝細胞との共培養系」で探索したところ、骨髄間葉系幹細胞分画には酸化ストレス

抑制効果があることを確認し、肝硬変モデルマウスへの培養骨髄間葉系幹細胞投与でも肝臓中の脂質過酸化や線維化が抑制されていたことから、骨髄間葉系幹細胞はレドックス制御能があり、肝再生修復療法の有用な細胞源となり得ることが示された。

## 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 7 件)

1. Quintanilha LF, Takami T, Hirose Y, Fujisawa K, Murata Y, Yamamoto N, Goldenberg RC, Terai S, Sakaida I. Canine mesenchymal stem cells show antioxidant properties against thioacetamide-induced liver injury *in vitro* and *in vivo*. *Hepatol Res.*, 査読有, 2013. [Epub ahead of print]
2. Tanimoto H, Terai S, Takami T, Murata Y, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Improvement of liver fibrosis by infusion of cultured cells derived from human bone marrow. *Cell Tissue Res.*, 査読有, 2013. [Epub ahead of print]
3. Iwamoto T, Terai S, Hisanaga T, Takami T, Yamamoto N, Watanabe S, Sakaida I. Bone-marrow-derived cells cultured in serum-free medium reduce liver fibrosis and improve liver function in carbon-tetrachloride-treated cirrhotic mice. *Cell Tissue Res.*, 査読有, 351(3):487-495, 2013.
4. Takami T, Terai S, Sakaida I. Advanced therapies using autologous bone marrow cells for chronic liver disease. *Discov Med.*, 査読有, 14(74):7-12, 2012.
5. Takami T, Terai S, Sakaida I. Stem cell therapy in chronic liver disease. *Curr*

*Opin Gastroenterol.*, 査読有, 28(3):203-208, 2012.

6. Maeda M, Takami T, Terai S, Sakaida I. Autologous bone marrow cell infusions suppress tumor initiation in hepatocarcinogenic mice with liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol.*, 査読有, 27(Suppl2):104-111, 2012.
7. Terai S, Tanimoto H, Maeda M, Zaito J, Hisanaga T, Iwamoto T, Fujisawa K, Mizunaga Y, Matsumoto T, Urata Y, Marumoto Y, Hidaka I, Ishikawa T, Yokoyama Y, Aoyama K, Tsuchiya M, Takami T, Omori K, Yamamoto N, Segawa M, Uchida K, Yamasaki T, Okita K, Sakaida I. Timeline for development of autologous bone marrow infusion (ABMi) therapy and perspective for future stem cell therapy. *J Gastroenterol.*, 査読有, 47(5):491-497, 2012.

### [学会発表] (計 12 件)

1. Takami T, Terai S, Sakaida I. Liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells with stabilization of redox homeostasis. Choshu International Liver Symposium 2014. Jan 25, 2014. Ube, Yamaguchi, Japan (ANA Crowne Plaza Hotel UBE)
2. 高見 太郎、寺井 崇二、坂井田 功. 自己骨髄細胞による肝臓再生療法の取り組み. 第40回日本肝臓学会西部会. 2013年12月6日(長良川国際会議場、岐阜市、岐阜)
3. Takami T, Terai S, Quintanilha LF, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Basic studies for a less invasive liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells with stabilization of redox homeostasis.

The liver meeting 2013, AASLD. Oct 31- Nov 5, 2013. Washington D.C., USA.

4. Takami T, Terai S, Sakaida I. The development of a less-invasive liver regeneration therapy using cultured bone marrow derived cells for cirrhotic patients. JDDW2013. Oct 9-12, 2013. Shinagawa, Tokyo, Japan (Grand Prince Hotel New Takanawa, Pampir)

5. Takami T, Terai S, Quintanilha LF, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Basic studies for a less invasive liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells with stabilization of redox homeostasis. The 20<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells (20th JSRH). Sep 26-27, 2013. Osaka, Japan (Osaka International Convention Center)

6. Takami T, Terai S, Quintanilha LF, Tanimoto H, Murata Y, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Basic studies using human and canine bone marrow derived mesenchymal stem cells for the development of a less invasive liver regeneration therapy for liver cirrhotic patients. The 11<sup>th</sup> Annual meeting of ISSCR. Jun 12-15, 2013. Boston, MA, USA.

7. Takami T, Terai S, Sakaida I. The development of a less-invasive liver regeneration therapy using cultured bone marrow derived cells for cirrhotic patient. The 2<sup>nd</sup> International Conference on Gastroenterology & Urology. Jun 10-12, 2013. Northbrook, IL, USA.

8. 高見太郎、寺井崇二、村田泰彦、坂井田功. ヒト骨髄由来および脂肪組織由来間葉系幹細胞における組織因子および IL-8 の発

現検討. 第 49 回日本肝臓学会総会. 2013 年 6 月 6 日 (京王プラザホテル、新宿区、東京都)

9. 高見太郎、寺井 崇二、村田 泰彦、廣瀬 恵一、藤澤 浩一、山本 直樹、坂井田 功. 肝再生修復療法としての培養ヒト骨髄間葉系細胞投与療法のメカニズム解析. 第 49 回日本肝臓学会総会. 2013 年 6 月 6 日 (京王プラザホテル、新宿区、東京都)

10. 高見太郎、寺井 崇二、村田 泰彦、Quintanilha LF、廣瀬 恵一、藤澤 浩一、山本 直樹、坂井田 功. 肝再生修復療法としての培養ヒト骨髄間葉系細胞投与療法のメカニズム解析. 第 12 回日本再生医療学会総会. 2013 年 3 月 21 日 (パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県)

11. 高見太郎、寺井 崇二、坂井田 功. 自己骨髄細胞による肝硬変に対する再生修復療法の現状と展望. 第 32 回日本画像医学会. 2013 年 2 月 23 日 (ホテルメトロポリタン東京、千代田区、東京都)

12. Takami T, Terai S, Murata Y, Quintanilha LF, Hirose Y, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. The development of a less-invasive liver regeneration therapy using cultured bone marrow derived cells for cirrhotic patients. Chosho International Liver Symposium 2013. Feb 9, 2013. Ube, Yamaguchi, Japan (ANA Crowne Plaza Hotel UBE)

#### 〔図書〕 (計 1 件)

1. Takiya CM, Paredes BD, Quintanilha LF, Dias GS, Pinheiro LA, Takami T, Terai S, Sakaida I, Regina SG. ELSEVIER. Liver Resident Stem Cell. 2012. p177-203

#### 〔産業財産権〕

なし

[その他]

ホームページ等：なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高見 太郎 (TAKAMI, Taro)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60511251

### (2) 研究協力者

Quintanilha Luiz Fernand

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：なし