

平成30年4月6日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461009

研究課題名(和文) 高機能培養骨髄間葉系幹細胞による高効率な実践的肝臓再生療法の開発研究

研究課題名(英文) Research and development for liver regeneration therapy with higher-therapeutic effects using the higher-functioning cultured bone marrow mesenchymal stem cells

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：非代償性肝硬変症になると、たとえ肝炎ウイルスが制御できたとしても肝線維化や肝臓がん等のため十分な生命予後の改善が得られないことが報告されている。そこで我々は、非代償性肝硬変に対する培養自己骨髄間葉系幹細胞(MSC)を用いた低侵襲肝臓再生療法を開発し、安全性評価目的の臨床研究を実施している。今回、コラゲナーゼ活性とレドックス制御能を有する高機能骨髄MSCの安定培養法を開発するため、高コラゲナーゼ活性を有するナノマテリアル培養骨髄MSCを用いて骨髄MSC増殖促進因子を同定した。

研究成果の概要(英文)：For many liver cirrhosis (LC) patients, anti-viral therapy has enabled control and elimination of hepatitis virus, but substantial improvements in vital prognosis for decompensated LC have been prevented by liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. To overcome these issues, we have been conducting clinical research to assess the safety of a less-invasive liver regeneration therapy that uses cultured autologous bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) for decompensated LC. In this project, to develop a culture method for higher-functioning BMSCs that show both collagenase activity and the regulation of redox homeostasis, we finally identified specific factors to promote the proliferation of BMSCs through the analysis of cultured BMSCs that showed higher collagenase activity on a nanomaterial-coated dish that we developed.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝硬変 骨髄細胞 酸化ストレス コラゲナーゼ活性

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝硬変症に対する再生療法として自己骨髄液から分離濃縮した非培養骨髄単核球細胞を末梢静脈から点滴投与する「自己骨髄細胞投与療法」を開発し、これは先進医療Bとして認可された。この治療法で明らかとなった作用機序は、硬変肝に生着した投与骨髄細胞からの Matrix metalloproteinase-9 (MMP9)等のコラゲナーゼが肝線維化を溶解し、それに引き続く肝前駆細胞の活性化や肝細胞の増殖が肝機能を改善し、肝再生を誘導することである。また次世代型の肝臓再生療法として、局所麻酔下に採取した少量骨髄液中の肝線維化改善効果のある骨髄間葉系幹細胞(MSC)を培養して点滴投与する「培養ヒト骨髄MSCを用いた低侵襲肝臓再生療法」を開発し、安全性評価目的の臨床研究を開始する段階であった。

(2) 投与骨髄細胞による MMPs 発現と肝内レドックス制御により肝線維化と肝発癌は抑制されること、「Thioacetamide(TAA)添加肝細胞と骨髄間葉系幹細胞(MSC)の共培養実験」で骨髄MSCには肝細胞由来 Reactive oxygen species 抑制作用があること、肝硬変モデルマウスへの培養骨髄MSC投与により肝 Malondialdehyde 量や肝線維化が抑制されることから、骨髄MSCがレドックス制御に寄与していることを論文報告した。

(3) ヒト全骨髄細胞から効率よくMSC分画(CD73/CD105陽性かつCD45陰性)を選択培養できる「ナノマテリアル培養皿」を開発し(特許第5935477号)この培養皿で選択培養されたヒト骨髄MSCには高MMPs活性があることを確認した(図1)。

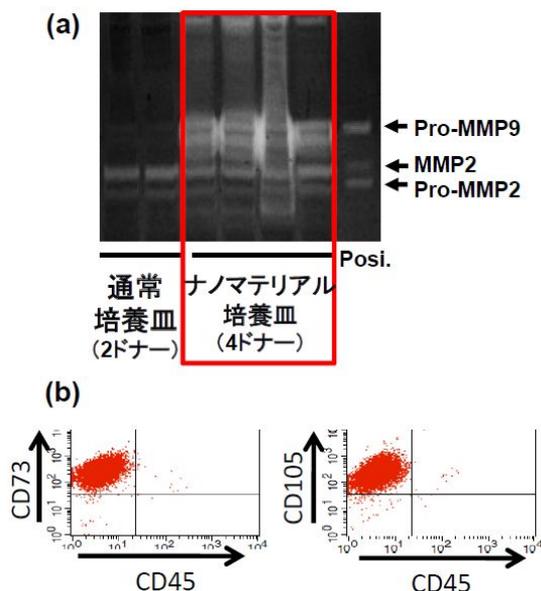


図1 ナノマテリアル培養皿で培養した骨髄由来細胞 (a) ゼイモグラフィ-MMPs 活性 (b) 細胞性状

2. 研究の目的

ナノマテリアル培養骨髄MSCの細胞増殖亢進メカニズムを明らかにすることにより、「高MMPs活性とレドックス制御能を併せ持つ高機能骨髄MSC」の安定培養法を確立する。

3. 研究の方法

(1) ナノマテリアル培養骨髄MSCの培養上清に骨髄MSC増殖促進作用を評価するため、市販骨髄MSCに培養上清を添加し、培養細胞数を比較評価する。ナノマテリアル培養骨髄MSCの培養上清に高濃度で含まれる蛋白質を解析し、それらの骨髄MSC増殖促進作用を評価する。

(2) 培養骨髄MSC投与肝硬変モデルマウスの解析から肝硬変改善機序を解明する。

4. 研究成果

(1) ナノマテリアル培養皿と通常培養皿で市販ヒト骨髄細胞を通常培養したところ、培養13日目の培養骨髄由来細胞数はナノマテリアル培養皿で有意に多かった(図2a)。またナノマテリアル培養皿の培養上清のみでも骨髄MSC増殖が亢進することを確認したことから、骨髄MSC増殖を促進させる因子が培養上清中に存在することが明らかとなった。そこで培養上清の蛋白質解析により19因子を同定し、これら19因子添加培地でも骨髄MSC増殖を亢進させることを確認した(図2b)。さらに19因子から最重要の2因子を絞り込んだ。なお、これら2因子添加培地培養骨髄MSCの脂肪細胞への分化能が維持されていることも確認した。

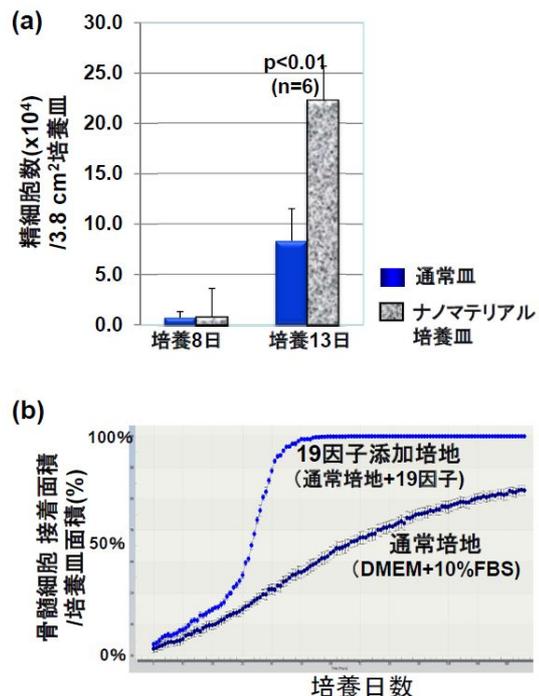


図2 (a) ナノマテリアル培養骨髄由来細胞数 (b) 19因子添加培地による骨髄MSC増殖亢進

(2) 培養骨髄 MSC 投与肝硬変モデルマウスの肝組織中には貪食したマクロファージが多く観察され、これらマクロファージには MMP9 発現が亢進していることを免疫組織学検査により確認した。そのため骨髄 MSC は、直接的な骨髄 MSC 由来 MMPs 発現だけでなく、間接的なマクロファージに対する MMPs 発現誘導作用により肝線維化改善に寄与していることが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Takami T, Yamasaki T, Saeki I, Matsumoto T, Suehiro Y, Sakaida I. Supportive therapies for prevention of hepatocellular carcinoma recurrence and preservation of liver function. *World J Gastroenterol.*, 査読有, 22(32), 2016, 7252-7263.

DOI:10.3748/wjg.v22.i32.7252.

Fujisawa K, Terai S, Takami T, Yamamoto N, Yamasaki T, Matsumoto T, Yamaguchi K, Owada Y, Nishina H, Noma T, Sakaida I. Modulation of anti-cancer drug sensitivity through the regulation of mitochondrial activity by adenylate kinase 4. *J Exp Clin Cancer Res.*, 査読有, 16;35, 2016, 48.

DOI:10.1186/s13046-016-0322-2.

Fujisawa K, Takami T, Kimoto Y, Matsumoto T, Yamamoto N, Terai S, Sakaida I. Circadian variations in the liver metabolites of medaka (*Oryzias latipes*). *Sci Rep.*, 査読有, 10;6, 2016, 20916.

DOI:10.1038/srep20916.

Matsumoto T, Takami T, Sakaida I. Cell transplantation as a non-invasive strategy for treating liver fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.*, 査読有, 10(5), 2016, 639-648.

DOI:10.1586/17474124.2016.1134313.

Urata Y, Yamasaki T, Saeki I, Iwai S, Kitahara M, Sawai Y, Tanaka K, Aoki T, Iwadou S, Fujita N, Nakayama Y, Maeshiro T, Takami T, Sakaida I. Clinical characteristics and prognosis of non-B non-C hepatocellular carcinoma patients with modest alcohol consumption. *Hepatol Res.*, 査読有, 46(5), 2016, 434-442.

DOI:10.1111/hepr.12572.

Fujisawa K, Terai S, Matsumoto

T, Takami T, Yamamoto N, Nishina H, Furutani-Seiki M, Sakaida I. Evidence for a Role of the Transcriptional Regulator Maid in Tumorigenesis and Aging. *PLoS One.*, 査読有, 10(6), 2015, e0129950.

DOI:10.1371/journal.pone.0129950.

Erratum in: *PLoS One.*

2015;10(8):e0137156.

Saeki I, Yamasaki T, Tanabe N, Iwamoto T, Matsumoto T, Urata Y, Hidaka I, Ishikawa T, Takami T, Yamamoto N, Uchida K, Terai S, Sakaida I. A new therapeutic assessment score for advanced hepatocellular carcinoma patients receiving hepatic arterial infusion chemotherapy. *PLoS One.*, 査読有, 10(5), 2015, e0126649.

DOI:10.1371/journal.pone.0126649.

Shiratsuki S, Terai S, Murata Y, Takami T, Yamamoto N, Fujisawa K, Burganova G, Quintanilha LF, Sakaida I. Enhanced survival of mice infused with bone marrow-derived as compared with adipose-derived mesenchymal stem cells. *Hepatol Res.*, 査読有, 45(13), 2015, 1353-1359.

DOI:10.1111/hepr.12507.

Terai S, Takami T, Yamamoto N, Fujisawa K, Ishikawa T, Urata Y, Tanimoto H, Iwamoto T, Mizunaga Y, Matsuda T, Oono T, Marumoto M, Burganova G, Quintanilha LF, Hidaka I, Marumoto Y, Saeki I, Uchida K, Yamasaki T, Tani K, Taura Y, Fujii Y, Nishina H, Okita K, Sakaida I. Status and prospects of liver cirrhosis treatment by using bone marrow-derived cells and mesenchymal cells. *Tissue Eng Part B Rev.*, 査読有, 20(3), 2014, 206-210.

DOI:10.1089/ten.TEB.2013.0527.

Ishikawa T, Shiratsuki S, Matsuda T, Iwamoto T, Takami T, Uchida K, Terai S, Yamasaki T, Sakaida I. Occlusion of portosystemic shunts improves hyperinsulinemia due to insulin resistance in cirrhotic patients with portal hypertension. *J Gastroenterol.*, 査読有, 49(9), 2014, 1333-1341.

DOI:10.1007/s00535-013-0893-z.

Oono T, Yamasaki T, Zaitzu J, Saeki I, Iwamoto T, Harima Y, Marumoto Y, Hidaka I, Urata Y, Ishikawa T, Takami T, Segawa M, Uchida K, Terai S, Kunitugu I, Tanabe T, Sakaida I. Association of

tyrosine with insulin resistance in hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Hepatol Res.*, 査読有, 44(10), 2014, E54-62.

DOI:10.1111/hepr.12213.

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, 44(10), 2014, E206-17.

DOI:10.1111/hepr.12204.

Zaitu J, Yamasaki T, Saeki I, Harima Y, Iwamoto T, Harima Y, Matsumoto T, Urata Y, Hidaka I, Marumoto Y, Ishikawa T, Takami T, Yamamoto N, Kaino S, Uchida K, Terai S, Sakaida I. Serum transferrin as a predictor of prognosis for hepatic arterial infusion chemotherapy in advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.*, 査読有, 44(5), 2014, 481-490.

DOI:10.1111/hepr.12141.

高見 太郎, 坂井田 功, 急性肝不全に対する骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の現状, *Hepatology Practice*, 査読無, 4巻, 2014, pp.244-246

[学会発表](計 23 件)

高見 太郎, 松本 俊彦, 坂井田 功, 肝硬変に対する培養骨髄間葉系幹細胞の肝臓再生機序の検討, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017 年 3 月 8 日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

Takami T, Sakaida I, Hepatic arterial infusion of cultured autologous bone marrow mesenchymal stem cells has a stronger therapeutic effect on liver cirrhosis in our established canine model, APDW2016, 4 Nov. 2016, 神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市)

高見 太郎, 松本 俊彦, 坂井田 功, 肝硬変症に対する自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法, JDDW2016, 2016 年 11 月 4 日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

Takami T, Matsumoto T, Nishi M, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I, Cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells contributed to improving liver cirrhosis through both the direct stabilization of redox homeostasis and cell-cell interaction with macrophages, The Liver meeting

2016 (AASLD), 11 Nov.-14 Nov. 2016, Boston (USA)

Takami T, Sakaida I, Our liver regeneration therapies using autologous bone marrow-derived cells for liver cirrhosis: current status and prospects, 16th ESBR Congress, 2 Sep.-4 Sep. 2016, Berlin (Germany)

高見 太郎, 松本 俊彦, 坂井田 功, 肝硬変症に対する自己骨髄細胞による肝再生機序の検討, 第 23 回肝細胞研究会, 2016 年 7 月 7 日, 大阪大学中之島センター(大阪府・大阪市)

Takami T, Aibe Y, Nishimura T, Matsuda T, Matsumoto T, Fujisawa K, Yamamoto N, Tani K, Taura Y, Sakaida I, Hepatic arterial infusion of cultured autologous bone marrow mesenchymal stem cells has a stronger therapeutic effect on liver cirrhosis in our established canine model, ISSCR2016, 26 Jun. 2016, San Francisco (USA)

高見 太郎, 石川 剛, 坂井田 功, 当科における非代償性肝硬変症に対する先進的医療の現状と展開, 第 52 回日本肝臓学会総会, 2016 年 5 月 19 日, ホテルニューオータニ幕張(千葉県・千葉市)

高見 太郎, 松本 俊彦, 坂井田 功, 非代償性肝硬変症に対する培養自己骨髄間葉系幹細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法, 第 113 回日本内科学会総会, 2016 年 4 月 15 日, 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

高見 太郎, 西村 達朗, 相部 祐希, 白築 祥吾, 松永 一仁, 久永 拓郎, 藤澤 浩二, 松本 俊彦, 丸本 芳雄, 山本 直樹, 寺井 崇二, 坂井田 功, 肝硬変症に対する自己骨髄細胞を用いた再生療法, 第 15 回日本再生医療学会総会, 2016 年 3 月 18 日, 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

高見 太郎, 坂井田 功, 肝硬変症に対する自己骨髄細胞を用いた再生療法, 平成 27 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 2015 年 10 月 13 日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

高見 太郎, 松本 俊彦, 坂井田 功, 肝炎ウイルス排除後を見据えた骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の開発, JDDW2015, 2015 年 10 月 8 日, 新高輪プリンスホテル(東京都・港区)

Takami T, Isao Sakaida. Our developed liver regeneration therapies using autologous bone marrow-derived cells for cirrhotic patients. 15th ESBR Congress, 12 Sep.-15 Sep. 2015, Valencia (Spain)

Takami T, Aibe Y, Matsuda T, Matsumoto T, Fujisawa K, Yamamoto N, Terai S, Sakaida I, Less invasive liver regeneration therapy for liver cirrhosis patients using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells, ISSCR2015, 26 Jun. 2015, Stockholm (Sweden)

高見 太郎、相部 祐希、松田 崇史、久永 拓郎、岩本 拓也、藤澤 浩一、松本 俊彦、丸本 芳雄、石川 剛、山本 直樹、谷 健二、藤井 康彦、田浦 保穂、寺井 崇二、坂井田 功、非代償性肝硬変に対する自己骨髄細胞を用いた肝再生療法、第 22 回肝細胞研究会、2015 年 6 月 5 日、Big Ship (鳥取県・米子市)

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臨床実施とそのメカニズム解析、第 51 回日本肝臓学会総会、2015 年 5 月 22 日、ホテル日航熊本 (熊本県・熊本市)

高見 太郎、寺井 崇二、坂井田 功、骨髄細胞を用いた線維化と発癌を標的とした肝臓再生療法の開発と展望、第 101 回日本消化器病学会総会、2015 年 4 月 24 日、仙台国際センター (宮城県・仙台市)

高見 太郎、寺井 崇二、藤澤 浩一、山本 直樹、坂井田 功、培養骨髄間葉系幹細胞投与による肝臓再生メカニズムの解明、第 14 回日本再生医療学会総会、2015 年 3 月 20 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Takami T, Terai S, Paredes BD, Quintanilha LF, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I, Less invasive liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells with redox-regulatory capacity, The Liver meeting 2014 (AASLD), 7 Nov.-11 Nov., Boston (USA)

Takami T, Terai S, Sakaida I, Our regeneration therapies using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis, JDDW2014, 23 Oct.-26 Oct. 2014, Kobe convention center (Kobe, Hyogo)

- ⑳ Takami T, Terai S, Quintanilha LF, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I, Less invasive liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells, FASEB meeting, 6 Jul.-10 Jul. 2014, Keystone (USA)

㉒ Takami T, Terai S, Sakaida I, Our liver regeneration therapies using autologous bone marrow derived cells for liver cirrhosis, The 29th International College of Neuropsychopharmacology (CINP), 22 Jun. 22-25 Jun. 2014, Vancouver (Canada)

㉓ 高見 太郎、寺井 崇二、坂井田 功、肝硬変に対する培養自己骨髄間葉系幹細胞投与による肝臓再生療法、第 50 回日本肝臓学会総会、2014 年 5 月 29 日、ホテルニューオータニ (東京都・千代田)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：細胞培養用培地、及び細胞培養方法
発明者：坂井田 功、高見 太郎、相部 祐希、米田 健二
権利者：山口大学、澁谷工業株式会社
種類：特許
番号：特願 2016-159015
出願年月日：2016 年 8 月 12 日
国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ichinai-yamaguchi.jp/>

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：6 0 5 1 1 2 5 1

(2) 研究分担者

藤澤 浩一 (FUJISAWA, Koichi)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：0 0 4 4 8 2 8 4

山本 直樹 (YAMAMOTO, Naoki)
山口大学・大学教育機構・准教授
研究者番号：9 0 4 4 8 2 8 3

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

相部 祐希 (AIBE, Yuki)
米田 健二 (YONEDA, Kenji)