

イヌの肝疾患に対する自己骨髄間質細胞
(BMSCs) を用いた新規治療法の検討

原 口 友 也

2011

目次

序論	・・・5頁
第一章 四塩化炭素 (CCl ₄) 誘発性慢性肝障害モデルを用いたイヌ骨髄間質細胞 (BMSCs) 移植治療の効果	
要約	・・・8頁
諸論	・・・9頁
材料と方法	
・ BMSCs の採取および培養	・・・11頁
・ 免疫染色による性状解析	・・・11頁
・ 慢性肝障害モデル動物の作製およびイヌ BMSCs 移植	・・・12頁
・ PCR によるイヌ <i>SRY</i> 遺伝子の検出	・・・13頁
・ 血液生化学検査による肝パネルの評価	・・・14頁
・ 肝臓の病理組織学的検査と肝線維化領域の定量解析	・・・14頁
・ 統計学的処理	・・・15頁
結果	
・ イヌ BMSCs の性状解析	・・・15頁
・ イヌ <i>SRY</i> 遺伝子の検出	・・・15頁
・ BMSCs 移植による肝パネルへの影響	・・・15頁

・ CCl ₄ 誘発性慢性肝障害マウスに対する BMSCs 移植の効果	・・・ 16 頁
・ 肝線維化領域の定量解析	・・・ 16 頁
考察	・・・ 16 頁
引用文献	・・・ 20 頁
図および表	
・ 表 1. イヌ BMSCs 移植による肝パネルへの影響	・・・ 28 頁
・ 図 1. イヌ BMSCs の免疫染色による性状解析	・・・ 29 頁
・ 図 2. PCR によるイヌ <i>SRY</i> 遺伝子の検出	・・・ 30 頁
・ 図 3. 肝炎の重症度の比較	・・・ 31 頁
・ 図 4. CCl ₄ /CSA マウスにおけるイヌ BMSCs 移植効果の病理組織学的評価	・・・ 32 頁
・ 図 5. 肝線維化領域の定量解析	・・・ 33 頁
第二章 培養イヌ骨髄間質細胞 (BMSCs) のマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)	
活性に関する研究	
要約	・・・ 34 頁
諸論	・・・ 35 頁
材料と方法	
・ BMSCs の採取および培養	・・・ 36 頁

・ゼラチンザイモグラフィー	・・・ 37 頁
・IV型 コラゲナーゼ活性測定	・・・ 38 頁
・定量 RT-PCR	・・・ 39 頁
・統計学的処理	・・・ 39 頁
結果	
・ゼラチンザイモグラフィー	・・・ 40 頁
・IV型 コラゲナーゼ活性測定	・・・ 40 頁
・定量 RT-PCR	・・・ 40 頁
考察	・・・ 41 頁
引用文献	・・・ 45 頁
図および表	
・表 1. 定量 RT-PCR に用いたイヌ特異的プライマー	・・・ 51 頁
・図 1. イヌ BMSCs におけるゼラチンザイモグラフィー	・・・ 52 頁
・図 2. イヌ BMSCs におけるIV型コラゲナーゼ活性測定	・・・ 53 頁
・図 3. イヌ BMSCs における MMP の mRNA の発現	・・・ 54 頁
総括	・・・ 55 頁
謝辞	・・・ 59 頁

序論

肝臓は内胚葉由来の肝細胞と胆管，中胚葉由来のグリソン鞘・類洞および血管系からなる最大の実質臓器である。肝臓の主な機能は，胆汁の産生，蛋白代謝，糖質代謝，脂肪代謝，解毒作用，排泄作用であり，生命維持において非常に重要な働きを担っている。また，肝臓は血液の保有能力も大きいことから寄生虫や細菌，ウイルスなどの侵襲のターゲットにされやすい反面，腸管からの異物に対して抗原認識器官として寄与している。血流は肝動脈と門脈から供給され，グリソン鞘で複雑に吻合し，類洞には動脈血と静脈血が流入する。また肝小葉の間でも類洞間の交通が発達しているため血液は実質内を自由に移動する事が出来る。このために，肝臓では拘束性病変は生じにくいものの，外来毒異物は容易に実質内に拡散し肝機能を障害する。このように，肝臓は容易に障害を受けやすい臓器であるが旺盛な再生能力を持ち，正常な肝臓であれば70%切除しても肝機能に影響を与えないとされている。しかし，その再生能力を上回る持続的な障害が加わった時，不可逆的な変化として肝硬変や肝線維症を生じ肝不全となり生命を脅かす。

現在，小動物獣医療において血液生化学検査やX線検査，超音波検査，X線CT検査やより詳細な肝胆道系の局所解剖が描出可能な点滴静脈胆道造影CT検査（DIC-CT検査）などといった非侵襲性の画像診断法や盲経皮法，キーホール法，超音波ガイド法，腹腔鏡ガイド法といった低侵襲性の肝生検法の進歩により，肝胆道系疾患を診断する機会が増加し

てきている。イヌの肝疾患で、最も一般的に認められる疾患として肝炎が挙げられる。肝炎の原因は、家族性、薬物性、感染性、特発性など様々である。薬物や感染による軽度の肝炎であれば内科治療に良好に反応し治癒が可能であるが、家族性や特発性の慢性肝炎では、進行し最終的には肝硬変や肝線維症を引き起こし、死に至るケースがある。このような末期の肝疾患に対する治療法として、現在有効とされている治療法は肝移植のみである。しかし、肝移植にはドナー不足、移植の拒絶反応、高額な治療費、施術施設の不足といった深刻な問題点があり、その実施は限られている。獣医療においては、肝移植は一般的な治療法ではない。その為、肝移植に代わる有用な治療法の開発が望まれている。

近年、肝移植の代替療法として自己骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cells : BMSCs) 移植による肝再生医療が注目されている。BMSCs は肝細胞を含む様々な細胞への多分化能を有しており、採取・培養が容易なうえ自己細胞である為、移植による拒絶反応を心配する必要がなく一部の大学病院などでは既に臨床応用されており、その有用性が確認されている。

現在、イヌの肝疾患に対する BMSCs 移植治療の報告は少ない。本論文の第一章ではイヌ BMSCs 移植の治療効果の確認を目的とし、四塩化炭素 (CCl₄) を用いて作製した慢性肝障害免疫抑制マウスに対してイヌ BMSCs を経脾的に門脈から異種移植し、その治療効果を評価した。

BMSCs 移植治療の機序は不明であるが、仮説として線維化の融解による肝臓の修復が考

えられている。肝線維症の線維化のステップとして、星細胞の増殖と活性化・筋線維芽細胞におけるマトリックス産生の増加・マトリックス分解系の発現の減少の 3 つが挙げられる。肝線維症・肝硬変の肝臓においては、正常肝組織において殆ど発現が認められない Matrix metalloproteinase (MMP) の阻害因子である Tissue inhibitor matrix metalloproteinase (TIMP) の発現が増強する。それに対し、肝線維症モデル動物に移植された BMSCs は、活性化した星細胞のアポトーシスを促進するといった報告や、MMP を発現し線維化を溶解させたという報告がなされている。これらの報告からも、移植された BMSCs が障害を受けた肝臓の MMP と TIMP の動態に直接もしくは間接的に関与していることが示唆されている。

現在、イヌ BMSCs の MMP 産生能に関する報告は少ない。そこで本論文の第二章では、イヌ BMSCs の MMP 発現能の確認および、炎症性サイトカイン刺激に対する反応について評価を行った。本研究では、BMSCs 移植治療における基礎的データの集積を目的として、移植細胞源としてのイヌ BMSCs の有用性を評価した。本研究はイヌの肝疾患に対する新規治療法の確立の為の一助となりうると考えられた。

第一章 四塩化炭素 (CCl₄) 誘発性慢性肝障害モデルを用いたイヌ骨髄間質細胞 (BMSCs) 移植治療の効果

要約

末期の肝疾患である肝硬変や肝線維症などに対する新規治療法として、骨髄間質細胞 (BMSCs) を用いた再生医療が注目されている。本研究では、四塩化炭素 (CCl₄) 誘発性慢性肝障害マウスに対してイヌ BMSCs を移植し、その治療効果を評価した。異種移植である為、ヌード (CCl₄/nude) マウスおよびシクロスポリン A (CSA) 免疫抑制 (CCl₄/CSA) マウスを用い、2種類のモデル動物を作製した。CCl₄/nude マウスと比較して CCl₄/CSA マウスでは、より重度な肝障害モデルの作製が可能であった。血液生化学検査では、BMSCs 移植による肝パネルの改善は認められなかった。しかし、病理組織学的検査において、重度肝障害モデルである CCl₄/CSA マウスの BMSCs 移植群で炎症細胞と肝線維化領域の有意な減少が認められた。移植された BMSCs の肝臓への遊走・生着と治療効果の発現には、重度で持続的な肝障害が必要である可能性が示唆された。本研究より、イヌ BMSCs は肝臓の再生医療において、有用な細胞源となりうる可能性があると考えられた。

緒論

慢性肝炎は、家族性・特発性・薬物性・感染性といった様々な原因から起こる原発性肝炎に続発して起こる病態である。慢性肝炎は、イヌの肝疾患の中で最も多く認められる疾患であり、肝硬変は慢性肝炎の終末像としてイヌにおいてもしばしば認められる[16,24]。肝硬変に対する唯一の有効な治療法は肝移植のみである。しかし、肝移植にはドナー不足・手術侵襲・移植に対する拒絶反応といった様々な問題点があり、その実施は限られている。イヌにおいて肝移植は肝硬変の治療法として一般的ではない。現在、肝硬変のイヌに対する治療法は、現状維持を目的とした対症療法が中心となっている。その為、肝硬変に対して、獣医療においても実施が可能な新規治療法の開発が望まれている。

近年、自己幹細胞を用いた再生医療が肝硬変に対する肝移植の代替療法として注目されている。幹細胞は、胚芽や胎児、成人などから採取される未分化細胞であり、*in vitro* および *in vivo* の特殊な条件下において多分化能を示す細胞であると定義されている [3,4]。

その中でも、骨髄間質細胞 (BMSCs) 中に含まれる間葉系幹細胞は、組織特異的幹細胞と比較して容易に採取でき、培養による増殖が可能である事から再生医療における有用な細胞源として注目されている。さらに、BMSCs は肝細胞への分化能を有する事が報告されている [2,10-12,23]。

BMSCs 移植の有用性に関しても多くの報告があり、肝硬変モデルマウスの尾静脈より移

植された BMSCs は線維化した肝臓に遊走・生着し、その場で MMP-9 を発現し線維化を退縮させたという報告[18]や、肝線維症マウスに移植された BMSCs が肝常在細胞と同様に MMP-13 および MMP-9 を発現し、肝線維化を退縮させたなどという報告[8]がある。

BMSCs 移植による肝機能改善の機序は、まだ完全には解明されていないが、移植された BMSCs は肝線維症の融解による肝臓の修復と肝細胞への分化による肝臓の再生に関与していると予想されている。現在、人医療においては既に一部の大学病院で肝硬変に対する自己 BMSCs 移植治療の臨床治験が実施されており、その有用性が証明されている[20]。

これらの報告からも、肝硬変のイヌにおいて BMSCs 移植は治療の選択肢の一つとなりうる可能性があると考えられた。

本研究では、イヌへの自己 BMSCs 移植の基礎的データの集積を目的として、イヌ BMSCs 移植治療の慢性肝障害に対する効果を評価する為、イヌ - マウス間の異種移植実験を計画した。実験モデルとして重症度の異なる 2 種類の四塩化炭素 (CCl₄) 誘発性慢性肝障害マウスを作製し、イヌ BMSCs 移植を行いその効果を血液生化学検査および病理組織学的検査を用いて評価した。

材料と方法

BMSCs の採取および培養: BMSCs は、2 歳齢の健常ビーグル犬 (♂) の上腕骨および大

腿骨から全身麻酔下での骨髓穿刺にて採取した。供試犬は、山口大学の実験動物ガイドラインに従って管理されている健常ビーグル犬を用いた。採取した BMSCs は、Nunclon™ Δ surface (NUNC, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) に播種し、FBS (5%), ストレプトマイシン (50 μ g/ml), アンホテリシン B (2.5 μ g/ml) を添加した Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) にて、37°Cに設定した 5% CO₂ インキュベーター内で培養した。2 日後に、浮遊細胞を培養液と共に除去し、接着細胞のみを BMSCs として継続で培養した。週に 2 回培地交換を行い、2 継代目の BMSCs を移植に用いた。

免疫染色による性状解析: BMSCs (7.1 x 10⁵ cells/cm²)を 8-well Chamber slide (Lab-Tek™ Chamber Slide™ System, NUNC, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA)に播種し、37°Cに設定した 5% CO₂ インキュベーター内で 24 時間静置培養した。その後、培養したスライドをリン酸緩衝液 (PBS, Wako pure chemical Ind, LTD, Osaka, Japan)で 5 分間・3 回洗浄し浮遊細胞を除去した。洗浄後、スライドを PBS 加 4% パラホルムアルデヒドで、30 分間室温で固定した。その後、再度洗浄し、非特異反応を阻害する為、PBS 加 3%スキムミルクを加え、30 分間室温で反応させた。その後、1 次抗体を浸漬させ 4°Cで 24 時間反応させた。1 次抗体は、それぞれマウス抗イヌ CD90 モノクローナル抗体 (VMRD Inc, WA, USA; 40 倍希釈), ラット抗イヌ CD44 モノクローナル抗体 (AbD Serotec, Oxford, UK; 40 倍希釈), マウス抗イヌ CD45 モノクローナル抗体(VMRD Inc, WA,

USA; 20 倍希釈)を用いた。静置後, PBS で 5 分間, 3 回洗浄を行い, 室温にて 1 時間 2 次抗体を反応させた。2 次抗体は, それぞれ Fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC) ウサギ抗マウス IgM 抗体 (Rockland inc, Gilbertsville, PA; 120 倍希釈), Tetramethylrhodamine isothiocyanate-conjugated (RITC) ヤギ抗ラット IgG2a 抗体 (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Netherland;120 倍希釈) , FITC ロバ抗マウス IgG1 抗体 (Cosmo Bio Co, LTD, Tokyo, Japan;100 倍希釈)を用いた[4,6,28]。その後, PBS で 5 分間, 3 回洗浄を行った後, 0.0002% Hoechst 33258 solution (Dojindo, Kumamoto, Japan)を用い 15 分間室温で対比染色を行った。スライドは, 70%グリセリンにて封入し蛍光顕微鏡 (Nicon ECLIPSE, TE2000-U, Tokyo, Japan) を用いて観察した。

慢性肝障害モデル動物の作製およびイヌ BMSCs 移植 : イヌ BMSCs のマウスへの異種移植実験の為, 重症度の異なる 2 種類の CCl₄ 誘発性慢性肝障害免疫抑制マウスを作製した。前実験として, 重症免疫不全 (SCID) マウスを用いた CCl₄ 誘発性慢性肝障害モデルの作製を試みたが, SCID マウスは長期的な CCl₄ 投与に耐える事が出来ず, 本実験のモデル動物としては不適切であった (未発表データ)。その為, ヌード (CCl₄/nude) マウスおよびシクロスポリン A (CSA) 免疫抑制 (CCl₄/CSA) マウスを本実験のモデル動物として用いた。CCl₄/nude マウスは, ヌードマウス (6-7-weeks-old female nude mice ;BALB/cAJc1-nu/nu, Kyudo, Co., LTD, Saga, Japan) に, コーンオイルで 1:4 に希釈した CCl₄ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) を 0.6ml/kg で週 2 回, 計 4 週間腹腔内投与し作製した。

CCL₄/CSA マウスは、ICR マウス (6-7-weeks-old female ICR mice ;Sea:ICR, Kyudo Co., LTD, Saga, Japan) に移植前日からサンプル採取日までシクロスポリン A (CSA; Sandimmun, Novartis Farma LTD, Tokyo, Japan) を 10mg/kg/day で皮下投与し、免疫抑制を行った[19]。慢性肝障害は、コーンオイルで 1:4 に希釈した CCL₄ を 1.0ml/kg で週 2 回、計 4 週間腹腔内投与し作製した。

CCL₄/nude マウスおよび CCL₄/CSA マウスは、8 回目の CCL₄ 投与翌日にイヌ BMSCs (1×10⁶ 個/頭) を、経脾臓門脈移植した。移植は全身麻酔下で左側最後肋骨の尾側に小切開を加え、脾臓を牽引しながら脾臓実質内へ直接注入するかたちで実施した。対照群にも同様の手技で同量の DMEM を脾臓内に注入した。血液生化学検査・遺伝子検査・病理組織学的検査に用いるサンプルは、移植 2 週後に安楽死して採取した。BMSCs 移植後、安楽死までの 2 週間は週 2 回の CCL₄ 投与を継続し、肝障害を持続させた。

PCR によるイヌ *SRY* 遺伝子の検出: 採取したマウスの肝臓組織からのゲノム DNA 採取は、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用い、企業のプロトコルに従って行った。PCR では、レシピエントである雌マウスの肝臓組織からドナーである雄イヌ由来の *SRY* 遺伝子の検出を行った。イヌ *SRY* 遺伝子特異的プライマーは、Gen bank に登録されたイヌの塩基配列 (Accession number, AF107021) を基にデザイン (forward primer, caagatggctctagagaatccc ; reverse primer, agctgtccgtgtaggtga) し、その増幅産物は 284bp であった。増幅は、以下の条件 (incubation at 94 °C for 2 min; 40 cycles of

incubation at 94 °C for 30 s, 57 °C for 30 s, and 72 °C for 30s) で実施した。増幅産物は、2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色した。陽性対照として雄イヌの末梢血単核球のゲノム DNA を用い、陰性対照として雌イヌの末梢血単核球のゲノム DNA を用いた。

血液生化学検査による肝パネルの評価：血液サンプルは、全身麻酔下での心採血にて採取し、血漿中の総蛋白(TP)、アルブミン(ALB)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アンモニア (NH₃)、アルカリホスファターゼ (ALP)、総ビリルビン (T-Bil) を FUJI-DRY-CHEM (Fuji Photofilm, Co., LTD, Kanagawa, Japan) にて測定した。

肝臓の病理組織学的検査と肝線維化領域の定量解析：肝臓の炎症および線維化領域の評価の為、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色およびマッソン・トリクローム (MT) 染色を実施した。肝線維化領域の定量化の為、マッソン・トリクローム染色した肝組織を CCD color camera CS6921 (Tokyo Electronic Industry Co., Ltd. Tokyo, Japan) 搭載の Nikon ECLIPSE E600 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) を用いて記録した。MT 染色で認められた線維化領域(青色に染色)を、画像解析ソフト (Image J software ; Image Processing and analysis in Java) を用いて定量化した。画像解析は、対物レンズの倍率を 40 倍に統一し、各群から無作為に選択した 21 視野に対して評価した。

統計学的処理：血液生化学検査および定量化した線維化領域に対して、統計学的処理を

行った。統計にはパラメトリックな手法として *Student-t* 検定を用い、有意差水準を 0.05 としてそれ未満であれば有意差ありと認定した。

結果

イヌ BMSCs の免疫染色による性状解析：接着細胞は多形性で線維芽細胞様の形態を示していた。これらの細胞は、間葉系間質細胞 (MSC) 特異的マーカーである CD90 (図 1-A) および CD44 (図 1-B) 陽性であり、造血系幹細胞の特異的マーカーである CD45 (図 1-C) は陰性であった。二重染色の Marge 画像では、ほぼ全ての細胞 (>95%) が CD90 と CD44 がダブルポジティブである事が確認された (図 1-D)。

イヌ *SRY* 遺伝子の検出：イヌ *SRY* 遺伝子は、*CCL4/CSA* マウスの肝門部および肝中心部において検出されたが、肝辺縁部においては検出されなかった (図 2)。

しかし、BMSCs 移植 2 週間後の *CCL4/nude* マウスの肝臓組織からはイヌ *SRY* 遺伝子は検出されなかった。

BMSCs 移植による肝パネルへの影響：*CCL4/nude* マウスおよび *CCL4/CSA* マウスの移植群・対照群ともに肝パネル (TP, ALB, ALT, AST, NH₃, ALP, T-Bil) の改善は認められなかった ($p>0.05$) (表 1)。

CCL4* 誘発性慢性肝障害マウスに対する BMSCs 移植の効果：CCL4/nude* マウスの肝臓組織

の HE 染色では、軽度の炎症細胞浸潤が確認された。それに対して、CCl₄/CSA マウスの肝臓組織の HE 染色では、より重度な炎症細胞の浸潤が確認された (図 3)。CCl₄/CSA マウスにおいて、脈管周囲の肝細胞の重度な変性が認められた。

CCl₄/nude マウスの肝臓組織の MT 染色では、軽度の線維化が確認された。それに対して、CCl₄/CSA マウスの肝臓組織では、軽度～中等度の線維化が確認されたが両群間の線維化領域に有意差は認められなかった。

CCl₄/CSA マウスでは、BMSCs 移植群の炎症領域が対照群と比較し僅かに減少しているのが確認され (図 4-A, B)、MT 染色において BMSCs 移植群に明らかな線維化領域の減少が確認され、肝細胞が占める領域の増加が認められた (図 4-C, D)。

肝線維化領域の定量解析: MT 染色で認められた肝線維化領域 (青色に染色) において、画像解析ソフトを用いて定量解析を行った。CCl₄/nude マウスの移植群・対照群間において、線維化領域に有意差は認められなかったが、CCl₄/CSA マウスでは BMSCs 移植群の線維化領域が対照群と比較して有意に減少している事が確認された (図 5)。

考察

本研究において、移植されたイヌ BMSCs は CCl₄ 誘発性慢性肝障害マウスの肝線維化の融解を促進する事が確認された。移植された BMSCs は、CCl₄/CSA マウスにおいてのみ

炎症および線維化の改善といった治療効果を示した。PCRにおいても、BMSCs 移植 2 週間後の CCl₄/CSA マウスの肝臓組織から採取したゲノム DNA にのみ、イヌ特異的 *SRY* 遺伝子が確認された。移植されたマウスの BMSCs は、肝芽細胞に分化した後にアルブミン産生能を持つ肝細胞様細胞に変化する事が報告されており、移植治療後の血清アルブミン濃度の増加が確認されている[21]。しかし、今回の我々の研究においては、BMSCs 移植による肝パネルの改善は認められなかった (TP, ALB, ALT, AST, NH₃, ALP, T-Bil)。この原因として、移植細胞数や移植経路、実験期間などの要因が関与していると考えられた。Sato らは、異種移植された BMSCs の肝細胞への分化は不確定であり、移植後の肝細胞への分化効率は 0.5%以下であると報告している[19]。我々は今回、レシピエント肝でのイヌ BMSCs の肝細胞への分化は確認していないが、肝細胞への分化とは異なったメカニズムで移植された BMSCs は肝線維化を改善させたのかも知れない。Sakaida らは、移植された BMSCs が MMP-9 を強く発現し、コラーゲン線維の減少と肝線維化領域を改善させる事を *in situ zymography*, Green Fluorescent Protein (GFP) と MMP-9 の免疫二重染色を行い証明したが、MMP-9 発現のメカニズムに関しては不明であると報告[19]している。他にも、移植された BMSCs が慢性肝障害を起こしている肝臓において MMP-9 を発現し、細胞外基質 (ECM) の分解に重要な役割を果たしていると考える研究者は多く、Heissing らは、BMSCs からの MMP-9 発現には可溶性 kit リガンドが関与しており、可溶性 kit リガンドは炎症を起こした肝臓における BMSCs の増殖および分化に関連して放出されると報告し

ている[7].

本研究では、異種移植実験モデルとして2種類の CCl₄ 誘発性慢性肝障害マウスを作製した。前実験で、SCID マウスを用いたモデルの作製を試みたが、SCID マウスは長期間の CCl₄ 投与に耐える事が出来ず、実験モデルには適さなかった(未発表データ)。そこで、ヌードマウスを用いて作製した CCl₄/nude マウスと CSA で免疫抑制状態にした ICR マウスを用いて作製した CCl₄/CSA マウスを実験モデルとして用いる事とした。CCl₄/nude マウスおよび CCl₄/CSA マウスは、長期間の CCl₄ 投与に耐え用量依存的な肝障害を作製する事が可能であった。さらに、CCl₄/CSA マウスにおいては CCl₄/nude マウスと比較してより重度な肝炎および線維化を作製する事が出来た。本研究で、イヌ BMSCs 移植の効果として肝線維化および炎症領域の減少が認められたのは CCl₄/CSA マウスのみであった。過去の文献において、移植された BMSCs が肝臓へ遊走・生着し、肝線維化領域を改善させるには、肝臓での持続的な炎症が重要な因子であると報告されている[1,9,17,26]。本研究の結果からも、肝線維化領域の減少には、より重度な肝臓の炎症が必要である事が示唆された。

また、*in vitro* において BMSCs は肝細胞への分化能を有している事が確認されており[11,14,22]、さらに、肝細胞様に分化させた BMSCs を CCl₄ 誘発性肝線維症ラットに移植したところ、未分化の BMSCs 移植時よりも肝機能が改善した[13,25]という報告がある。本研究では、肝細胞への分化誘導を行っていない BMSCs を移植している為、分化誘導した BMSCs を移植に用いていけば、より有用な移植効果が得られていたのかも知れない。

本研究において、移植されたイヌ BMSCs は肝臓の重度な炎症および線維化を起こしている部位に遊走・生着する事が確認された。そして、イヌ BMSCs を移植した CCl₄/CSA マウスにおいて、有意な肝線維化領域の減少が確認された。この事から、イヌ BMSCs は肝臓の再生を促すのに有用な細胞源であったことが示唆された。本研究より、BMSCs 移植治療は、将来的にイヌの肝硬変に対する治療法の選択肢の 1 つとなりうる可能性が考えられた。

引用文献

1. Abdel Aziz , M., Atta, H., Mahfouz, S., Fouad, H., Roshdy, N., Ahmed, H., Rashed, L., Sabry, D., Hassouna, A. and Hasan, N. 2007. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem.* **40**: 893-899.
2. Alison, M., Poulson, R., Jeffery, R., Dhillon, A., Quaglia, A., Jacob, J., Novelli, M., Prentice, G., Williamson, J. and Wright, N. 2000. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature.* **406**: 257.
3. Caplan, A. Mesenchymal stem cells. 1991. *J Orthop Res.* **9**: 641-650.
4. Caplan, A. and Bruder, S. 2001. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med.* **7**: 259-264.
5. Csaki, C., Matis, U., Mobasheri, A., Ye, H. and Shakibaei, M. 2007. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical,

- morphological and ultrastructural study. *Histochem Cell Biol.* **128**: 507-520.
6. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J. and Horwits, E. M. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* **8**: 315-317.
 7. Heissig, B., Ohki, Y., Sato, Y., Rafii, S., Werb, Z. and Hattori, K. 2005. A role for niches in hematopoietic cell development. *Hematology.* **10**: 247-253.
 8. Higashiyama, R., Inagaki, Y., Hong, Y., Kushida, M., Nakao, S., Niioka, M., Watanabe, T., Okano, H., Matsuzaki, Y., Shiota, G. and Okazaki, I. 2007. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology.* **45**: 213-222.
 9. Kollet, O., Shivtiel, S., Chen, Y., Suriawinata, J., Thung, S., Dabeva, M., Kahn, J., Spiegel, A., Dar, A., Samira, S., Goichberg, P., Kalinkovich, A., Arenzana-Seisdedos, F., Nagler, A., Hardman, I., Revel, M., Shafritz, D. and Rapidot, T. 2003. HGF, SDF-1, and

MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver.

J Clin Invest. **112**: 160-169.

10. Körbling, M., Katz, R., Khanna, A., Ruifrok, A., Rondon, G., Albitar, M., Champlin, R.

and Estrov, Z. 2002. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of

peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med.* **346**: 738-746.

11. Neo, S., Ishikawa, T., Ogiwara, K., Kansaku, N., Nakamura, M., Watanabe, M.,

Hisasue, M., Tsuchiya, R. and Yamada T. 2009. Canine bone marrow cells differentiate into hepatocyte-like cells and placental hydrolysate is a potential inducer. *Res Vet Sci*

87: 1-6.

12. Okamoto, R., Yajima, T., Yamazaki, M., Kanai, T., Mukai, M., Okamoto, S., Ikeda, Y.,

Hibi, T., Inazawa, J. and Watanabe, M. 2002. Damaged epithelia regenerated by bone

marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med.* **8**: 1011-1017.

13. Oyagi, S., Hirose, M., Kojima, M., Okuyama, M., Kawase, M., Nakamura, T., Ohgushi,

H. and Yagi, K. 2006. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow

- mesenchymal cells into CCl₄-injured rats. *J Hepatol.* **44**: 742-748.
14. Petersen, B., Bowen, W., Patrene, K., Mars, W., Sullivan, A., Murase, N., Boggs, S., Greenberger, J. and Goff, J. 1999. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science.* **284**: 1168-1170.
15. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* **284**: 143-147.
16. Poldervaart, J., Favier, R., Penning, L., van den Ingh, T. and Rothuizen, J. 2009. Primary hepatitis in dogs: a retrospective review (2002-2006). *J Vet Intern Med.* **23**: 72-80.
17. Rabani, V., Shahsavani, M., Gharavi, M., Piryaee, A., Azhdari, Z. and Baharvand, H. Mesenchymal stem cell infusion therapy in a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model affects matrix metalloproteinase expression. *Cell Biol Int.* **34**: 601-605.

18. Sakaida, I., Terai, S., Yamamoto, N., Aoyama, K., Ishikawa, T., Nishina, H. and Okita, K. 2004. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology*. **40**: 1304-1311.
19. Sato, Y., Araki, H., Kato, J., Nakamura, K., Kawano, Y., Kobune, M., Sato, T., Miyanishi, K., Takayama, T., Takahashi, M., Takimoto, R., Iyama, S., Matsunaga, T., Ohtani, S., Matsuura, A., Hamada, H. and Niitsu, Y. 2005. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*. **106**: 756-763.
20. Terai, S., Ishikawa, T., Omori, K., Aoyama, K., Marumoto, Y., Urata, Y., Yokoyama, Y., Uchida, K., Yamasaki, T., Fujii, Y., Okita, K. and Sakaida, I. 2006. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells*. **24**: 2292-2298.
21. Terai, S., Sakaida, I., Nishina, H. and Okita, K. 2005. Lesson from the GFP/CCl₄ model-translational research project: the development of cell therapy using autologous bone marrow cells in patients with liver cirrhosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. **12**:

203-207.

22. Theise, N., Lapook, J. and Thung, S. 1993. A macroregenerative nodule containing multiple foci of hepatocellular carcinoma in a noncirrhotic liver. *Hepatology*. **17**: 993-996.
23. Theise, N., Nimmakayalu, M., Gardner, R., Illei, P., Morgan, G., Teperman, L., Henegariu, O. and Krause, D. 2000. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*. **32**: 11-16.
24. Watson, P. 2004. Chronic hepatitis in dogs: a review of current understanding of the aetiology, progression, and treatment. *Vet J*. **167**: 228-241.
25. Zhao, D., Lei, J., Chen, R., Yu, W., Zhang, X., Li, S. and Xiang, P. 2005. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol*. **11**: 3431-3440.
26. Zheng, J. F. and Liang, L. J. 2008. Intra-portal transplantation of bone marrow stromal

cells ameliorates liver fibrosis in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 7: 264-270.

図および表

表 1. イヌ BMSCs 移植による肝パネルへの影響

CCL4/nude マウスおよび CCL4/CSA マウスの移植群・対照群間において、肝パネルの数値に有意差は認められなかった. ($p < 0.05$)

A:CCl₄/nude

	TP(g/dl)	ALT(IU/l)	AST(IU/l)	ALP(IU/l)	Alb(g/dl)	T.Bil(mg/dl)	NH3(ug/dl)
Control (n=12)	4.89	88.0	93.2	235.3	2.43	0.60	252.9
Mean±SD	±0.76	±54.9	±34.6	±87.8	±0.42	±0.08	±84.3
Transplantation (n=11)	4.97	148.0	121.8	261.7	2.52	0.57	217
Mean±SD	±0.46	±156.0	±84.5	±57.3	±0.21	±0.05	±49.2

B:CCl₄/CSA

	TP(g/dl)	ALT(IU/l)	AST(IU/l)	ALP(IU/l)	Alb(g/dl)	T.Bil(mg/dl)	NH3(ug/dl)
Control (n=11)	4.62	1812.3	708.1	119.3	2.29	0.58	231.5
Mean±SD	±0.64	±3005.0	±1157.0	±53.6	±0.26	±0.13	±83.2
Transplantation (n=11)	4.54	2208.0	836.1	152.7	2.29	0.57	209.1
Mean±SD	±0.59	±4104.0	±1403.0	±61.6	±0.27	±0.13	±67.3

表.1

図 1. イヌ BMSCs の免疫染色による性状解析

イヌ BMSCs は、MSC 特異的マーカーである CD90 (A) と CD44 (B) が陽性であり、HSC 特異的マーカーである CD44 (C) は陰性であった。2重染色の Marge 画像では、接着細胞の 95%以上が CD90 と CD44 (D) のダブルポジティブ細胞である事が確認された。

Magnification ; 400×.

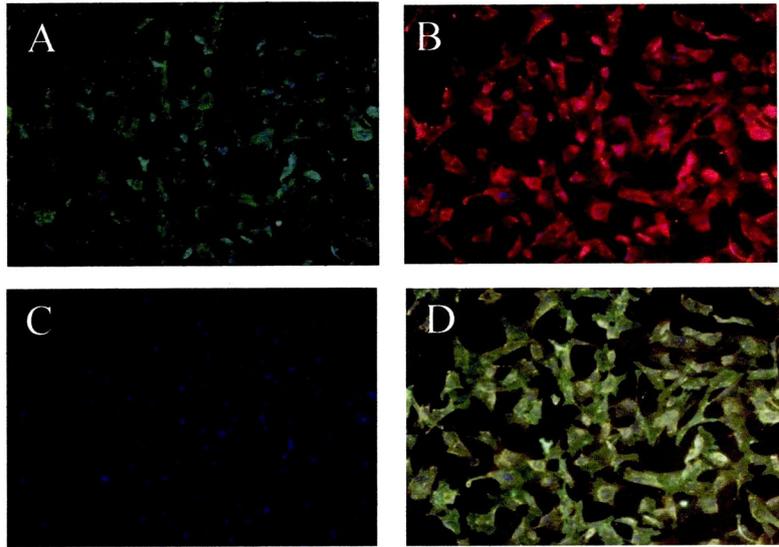


图.1

図 2. PCR によるイヌ *SRY* 遺伝子の検出

イヌ *SRY* 遺伝子は, BMSCs 移植を行った CCl₄/CSA マウスのみで確認された.

イヌ *SRY* 遺伝子の発現部位には局在性が認められた.

HPR : 肝門部

HCR : 肝中心部

HMR : 肝辺縁部

PC : 陽性対照 (雄イヌのゲノム DNA)

LM : マーカー

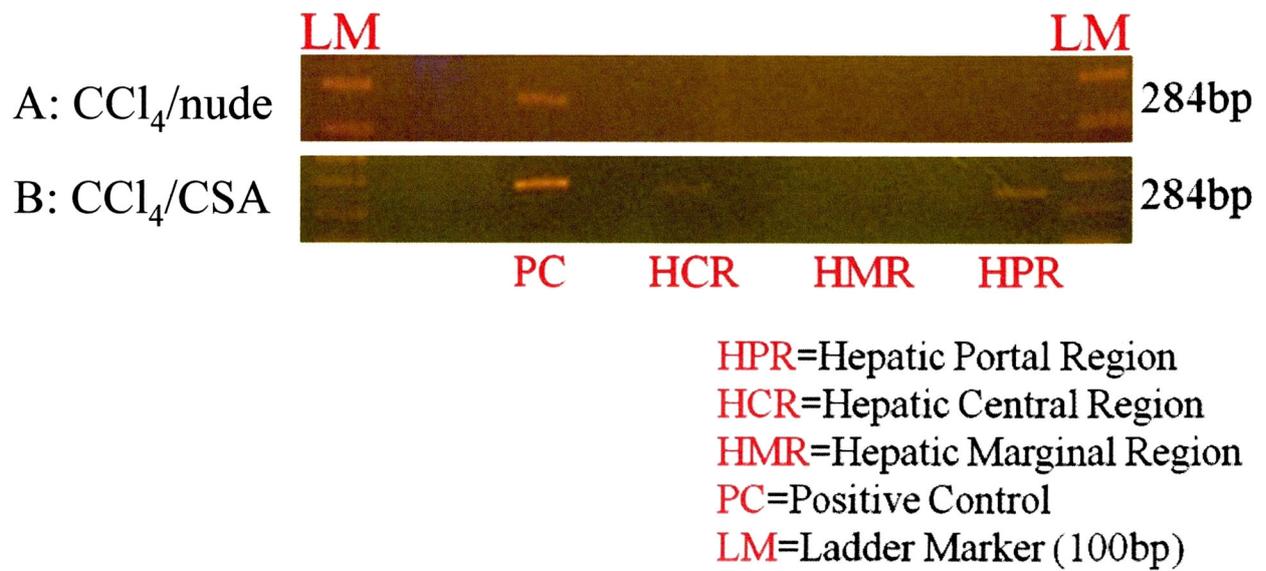


图.2

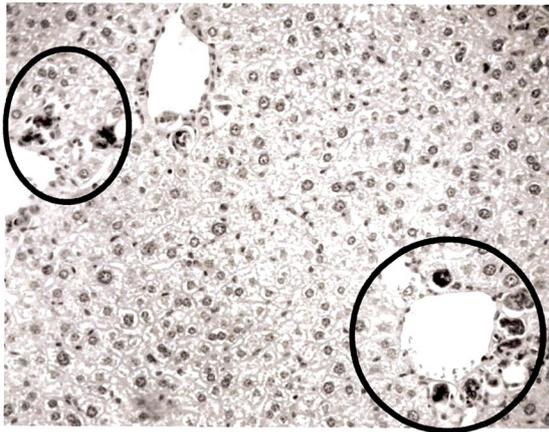
図 3. 肝炎の重症度の比較 (HE 染色)

CCl₄/CSA マウス (B) における肝臓の炎症は, CCl₄/nude マウス (A) と比較してより重
度であった.

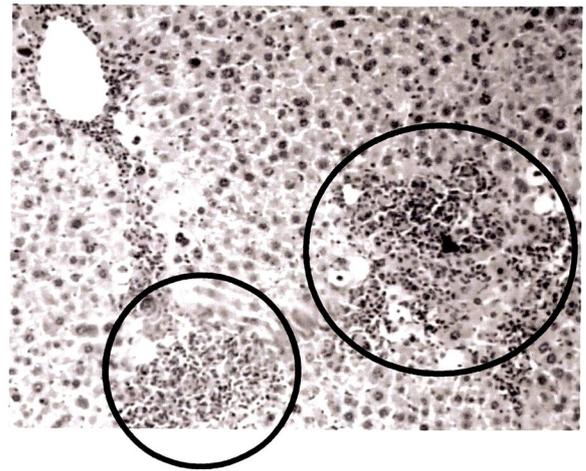
Magnification ; 400×.

表は, 1 視野における細胞の総数に対する炎症細胞の占める割合を示す (±標準偏差)

A: CCl₄/nude



B: CCl₄/CSA



Inflammatory cells (% of nuclear cells)

A:CCl ₄ /nude	B:CCl ₄ /ICR
25.8 ± 6.1	38.0 ± 9.7

○ : 炎症細胞浸潤部位

図.3

図 4. CCl₄/CSA マウスにおけるイヌ BMSCs 移植効果の病理組織学的評価

CCl₄投与による肝臓への炎症細胞の浸潤 (A) は, イヌ BMSCs 移植群 (B) で減少した.

CCl₄投与により生じた肝線維化領域 (C) は, イヌ BMSCs 移植群 (D) で減少した.

A・B : HE 染色.

C・D : MT 染色.

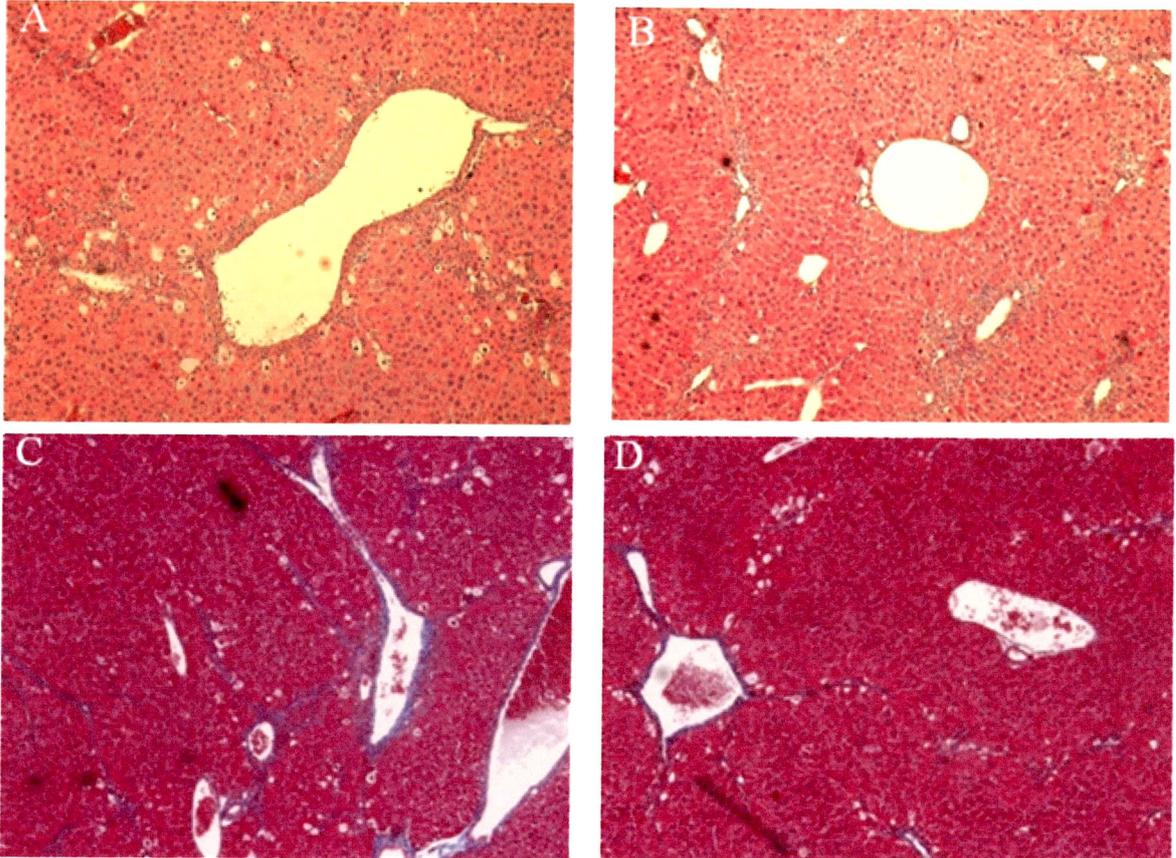


图.4

図 5. 肝線維化領域の定量解析

MT 染色で認められた線維化領域を定量化し解析したところ、CCl₄/CSA マウスのイヌ
BMSCs 移植群において肝線維化領域の有意な減少が認められた。

Cont: 対照群

Trans: 移植群

Bar は、標準偏差を示す (±SD)

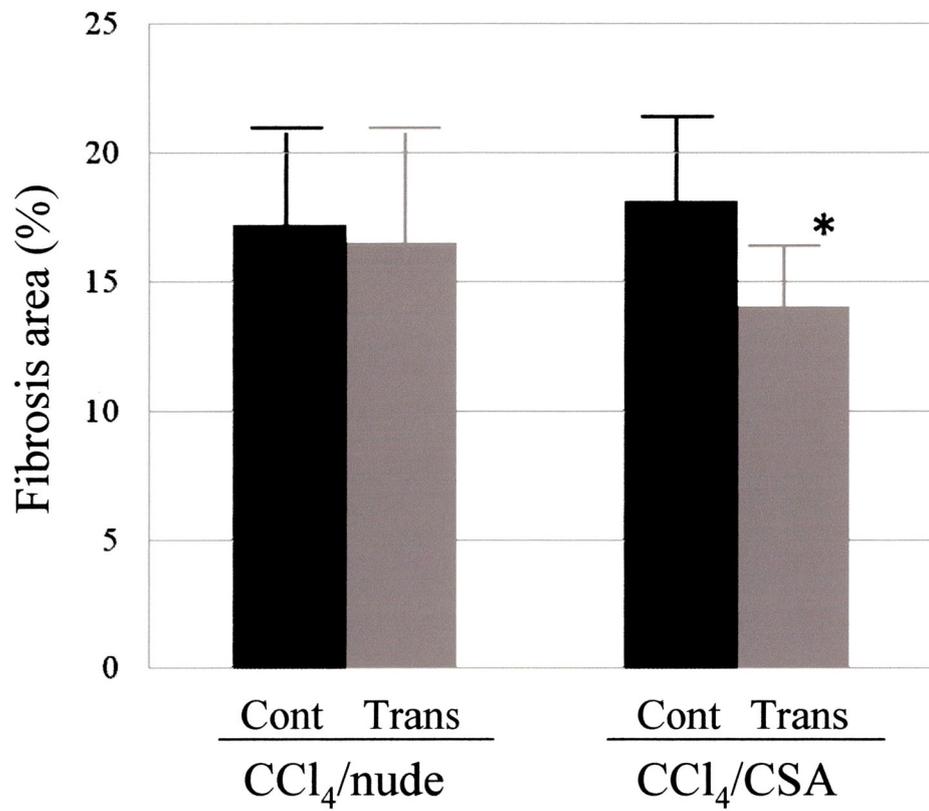


図.5

第二章 培養イヌ骨髄間質細胞 (BMSCs) のマトリックスメタロプロテアーゼ

(MMP) 活性に関する研究

要約

本論文における第一章の研究により、肝臓に注入されたイヌ骨髄間質細胞 (BMSCs) は、肝線維症を改善させる事が確認された。その機序は不明であるが、移植された BMSCs は線維化を起こした部位に生着し、Matrix metalloproteinase (MMP) を産生し線維化を溶解するという仮説が報告されている。現在、イヌ BMSCs の MMP 発現能に関する報告は少ない。その為、本研究ではイヌ BMSCs の MMP 産生能および炎症性サイトカイン刺激に対する反応を評価した。ゼラチンザイモグラフィーでは、pro-MMP-2 および pro-MMP-9 の発現が確認された。IV型コラゲナーゼ活性測定では、MMP-2,-9 の発現が確認された。定量 RT-PCR では、MMP-2,-9mRNA の発現が確認された。さらに、各実験で炎症性サイトカイン刺激により MMP 活性が増強される事が確認された。特に、MMP-9mRNA においては TNF- α および IL-6 刺激時に対照群と比較して有意に発現が増強されていた。本研究より、イヌ BMSCs の MMP 産生能が確認され、炎症性サイトカイン刺激により MMP 発現が増強される事が確認された。本研究より、イヌ BMSCs 移植による肝線維症の改善には、BMSCs による MMP 産生が直接的もしくは間接的に関与している可能性が考えられた。

緒論

イヌの肝不全は小動物臨床において一般的に認められる疾患である。その原因として、先天性疾患である門脈体循環短絡症や後天性疾患である肝リピドーシス、肝炎などが挙げられ、その終末像が肝硬変であり肝線維症である[15]。現在、肝不全に対する唯一の有効な治療法は肝移植である。しかし、肝移植にはドナー不足・手術侵襲・拒絶反応など様々な問題があり実施は限られおり、現状では肝不全症例に対する治療は現状維持を目的とした対症療法が中心となっている。その為、肝移植に代わる身近で有用な代替療法の開発が望まれている。

近年、肝移植の代替療法として自己細胞を用いた再生医療が注目されている。その中でも有用な細胞源として期待されているのが、骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cells: BMSCs) である。現在、マウスやラットなどの肝線維症モデル動物を用いた研究において、BMSCs 移植治療の有用性が確認されている。しかし、その機序については未だ不明な点が多い。予想される機序の1つとして、Matrix metalloproteinase (MMP) が関与した肝線維化の溶解が挙げられる[2,17,20]。MMP は、血管新生のような細胞外基質 (ECM) の変性やリモデリングに関与するタンパク分解酵素である[10,11]。また、MMP は腫瘍の浸潤や転移にも関与している事が腫瘍の実験モデルやヒトの悪性腫瘍において確認されている[6,14]。腫瘍壊死因子 - α (TNF- α) やインターロイキン- 1β (IL- 1β) などの炎症性サイト

カインは様々な細胞種において、ゼラチナーゼ遺伝子の発現や増強に関与している。MMPの活性を抑制的に調節する阻害因子として、Tissue inhibitor matrix metalloproteinase (TIMP) の存在が知られており、これらの阻害因子は MMP と複合体を作る事で MMP 活性を抑制し ECM 分解を調節している。生体における ECM は、MMP/TIMP のバランスによって動的に保たれており、バランスの破綻は ECM 産生過剰による臓器線維症、分解過剰による腫瘍の転移・リウマチといった病的な状態を引き起こす。例えば肝線維症は、炎症細胞浸潤が起こり、時間の経過とともに進行し肝硬変へと至り不可逆的な肝不全となる。MMP が肝線維症の進行の抑制に効果を示す事や[4, 5]、MMP の阻害因子である TIMP は正常肝組織では認められないが、肝線維症・肝硬変では発現が増強される事が知られており[1,18]、MMP, TIMP は肝線維症・肝硬変の治療において重要な因子であると考えられている。

現在、イヌ BMSCs の MMP 産生能に関する報告は少ない。本研究では、ゼラチンザイモグラフィー、IV 型コラゲナーゼ活性測定、定量 RT-PCR を行いイヌ BMSCs の MMP 産生能と炎症性サイトカイン刺激に対する反応を評価した。

材料と方法

BMSCs の採取および培養: BMSCs は、2 歳齢の健常ビーグル犬 (♂) の上腕骨および大腿

骨から全身麻酔下での骨髓穿刺にて採取した。供試犬は、山口大学の実験動物ガイドラインに従って管理されている健常ビーグル犬を用いた。採取した BMSCs は、Nunclon™Δsurface (NUNC, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) に播種し、FBS (5%), ストレプトマイシン (50μg/ml), アンホテリシン B (2.5μg/ml)を添加した Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)にて、37°Cに設定した 5% CO₂ インキュベーター内で培養した。2 日後に、浮遊細胞を培養液と共に除去し、接着細胞のみを BMSCs として継続で培養した。週に 2 回培地交換を行い、2-3 継代目の BMSCs を実験に用いた。

ゼラチンザイモグラフィー:BMSCs (1.5 x 10⁵ cells/cm²)を 8well plate (IWAKI Tissue Culture Treated Dish, Tokyo, Japan)に播種し、24 時間培養した後、細胞を PBS で洗浄し無刺激 (DMEM 培地のみ), TNF-α (human recombinant TNF-α, SIGMA-aldrich, Japan), IL-1β (human recombinant IL-1β, SIGMA-aldrich, Japan), IL-6 (human recombinant IL-6, SIGMA-aldrich, Japan) の各炎症性サイトカイン 100ng/ml ずつを合計 2ml になるように添加し 24 時間培養後に上清を回収し、測定まで -80°C で冷凍保存した。残りの接着細胞は、定量 RT-PCR 用のサンプルとして Total RNA 抽出まで -80°C で保存した。保存した上清は、ゼラチンザイモグラフィーの泳動時に氷上で解凍した。ゼラチンザイモグラフィーは、Gelatin-zymography kit (Primarycell, Hokkaido, Japan) を用い、企業のプロトコルに従い実施した。可視化されたバンドは proMMP-2,

proMMP-9の活性をはかるために Image J software (Image Processing and analysis in Java)を用いてバンドの輝度を測定し比較を行った。各バンドの輝度解析の結果は、対照群を 100%と換算しグラフに表した。

なお、陽性コントロールはヒトの精製 proMMP-2, MMP-2, MMP-9 マーカー (Primarycell, Hokkaido, Japan)を使用した。また、セリンプロテアーゼ (MSP) との鑑別の為に、MSP インヒビターとして phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) と diisopropyl fluorophosphate (DFP) を使用した。陰性コントロールはプロテアーゼ活性に必要な Ca^{2+} を除いた状態で反応させた。

IV 型 コラゲナーゼ活性測定: BMSCs (7.5×10^4 cells/cm²)を 48-well plate に播種し、DMEM で 12 時間インキュベートした。炎症性サイトカインである TNF- α , IL-1 β and IL-6 (Sigma, Steinheim, Germany)をそれぞれ 100ng/ml になるように調整し各 well に添加し、1-48 時間 (1, 3, 6, 12, 24, 48 時間) までの上清をサンプルとして採取し、IV 型コラゲナーゼ活性測定まで-20°Cで保存した。IV 型コラゲナーゼ活性測定は、Type-IV Collagenase Activity Assay kit (Life Laboratory Com, Yamagata, Japan) を用い企業のプロトコルに従い実施した。また、IV 型コラゲナーゼ活性測定前に MMP を活性化させるためサンプルに p-aminophenylmercuric acetate (APMA) を添加し 37°Cで 24 時間反応させた。APMA を添加しないグループにおいても IV 型コラゲナーゼ活性測定を行った。

蛍光測定は GENios Pro Microplate Reader (Tecan Instruments, Reading, United Kingdom) にて実施し, LS-PLATE manager 2004 (Wako, Osaka, Japan) で処理した。

定量 RT-PCR: Total RNA の抽出は, FastPure™ RNA kit (TaKaRa Bio., Otsu, Shiga, Japan) を用いて企業のプロトコルに従って実施した。回収した RNA は, 吸光度計 (GeneQuant pro RNA/DNA Calculator™, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England) を用いて 260/280nm の条件で RNA 濃度を測定した。逆転写反応 (Reverse transcription : RT) は, Superscript™ first strand synthesis for RT-PCR (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を用いて, 企業のプロトコルに従い実施した。イヌ特異的 MMP-2 および MMP-9 のプライマーは, タカラバイオ株式会社 (TaKaRa Bio) より購入した。GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) プライマーは, Genbank より得た塩基配列の情報を基に作製した。本研究で用いたイヌ特異的プライマーの塩基配列を表 1 に記載した (表 1)。定量 RT-PCR は, 試薬として SYBR® Premix™ *Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) を用いて Thermal Cycler Dice® Real time system (TaKaRa Bio) に附属のプロトコルに従い実施した。PCR 反応は, 以下の条件で実施した (30sec at 95°C, 40-50cycles of 95°C for 5sec, and 60°C for 30sec)。各サンプルの定量解析の結果は, 対照群を 100% と換算しグラフに表した。

統計学的処理: IV 型コラゲナーゼ活性測定および定量 RT-PCR のデータに対して, パラメ

トリックな手法として Student-t 検定を用いて評価した。有意差水準を 0.05 として、それ未満であれば有意差ありと認定した。

結果

ゼラチンザイモグラフィー：ゼラチンザイモグラフィーによって、ゼラチン分解領域として明瞭に認められた分子量は、ヒト精製 MMP マーカーを利用した陽性対照における proMMP-2 および proMMP-9 領域と一致していた (図 1-A)。プロテアーゼの種類の確認の為、セリンプロテアーゼの阻害剤として PMSF, DFP を加えたところバンドに変化は認められず、さらに Ca²⁺ 不含条件下では、ゼラチン分解作用が阻害されバンドが消失していた (未発表データ)。したがって、本実験において認められたゼラチン分解領域はすべて MMP の作用によることが示唆された。次いで、炎症性サイトカイン刺激後 24 時間のサンプルにおいて、明瞭に認められた proMMP-2 および proMMP-9 領域のバンドの輝度解析を行った。proMMP-2 領域の輝度は、対照群と比較し IL-1 β 刺激時にのみ増強されていた。一方、proMMP-9 領域では対照群と比較し、TNF- α および IL-6 による刺激時にバンドの輝度が明らかに増強していた。IL-1 β 刺激では、バンドの輝度の増強は認められなかった (図 1-B, -C)。

IV 型コラゲナーゼ活性測定：IV 型コラゲナーゼは MMP-2 および MMP-9 の両方を含

み、測定結果は MMP-2 および MMP-9 の総合の活性を示す。APMA を添加したイヌ BMSCs において、炎症性サイトカイン刺激が無い条件下でも IV 型コラゲナーゼの活性が認められた。炎症性サイトカイン刺激が加わる事で、IV 型コラゲナーゼ活性は増強した。IV 型コラゲナーゼ活性のピークは炎症性サイトカイン刺激後 24 時間であった。IV 型コラゲナーゼ活性は、特に IL-1 β および IL-6 による刺激時に増強される事が確認された (図 2)。APMA を添加しなかった BMSCs では、IV 型コラゲナーゼ活性はわずかにしか認められなかった (未発表データ)。

定量 RT-PCR : 定量 RT-PCR において、MMP-2 および MMP-9 mRNA の発現が確認された。MMP-2 mRNA 発現は、IL-1 β 刺激時に増強される傾向が認められたが対照群と比較して有意な差は確認されなかった。一方、MMP-9 mRNA 発現は、TNF- α および IL-6 刺激時に対照群と比較し、有意に増強される事が確認された (図 3)。

考察

本研究より、イヌ BMSCs は MMP 発現能を有する事が確認された。さらに、炎症性サイトカインによる刺激を加える事で MMP 活性が増強される事が確認された。ゼラチンゼイモグラフィーにおいて、イヌ BMSCs は proMMP-2 および proMMP-9 を発現する事が確認された。ヒトの培養した正常骨髄細胞からは MMP-2 は発現されず、MMP-9 のみが持続

的に発現される[16]のに対して、イヌの正常な皮膚や骨髄細胞を含んだ他の正常組織から、proMMP-2 (73.2%) および proMMP-9 (54.5%) が検出されたと報告されている[9]。このように正常組織からの MMP の発現は動物種により異なる事が知られている。

本研究のゼラチンザイモグラフィーで得られたバンド領域の輝度解析を行ったところ、proMMP-2 領域のバンド輝度は、対照群と比較して IL-1 β 刺激時にのみ増強する事が確認された。それに対して、proMMP-9 領域のバンド輝度は、特に TNF- α および IL-6 刺激時に顕著に増強されており、IL-1 β による刺激時においては、バンド輝度は低下していた。

次いで、MMP-2 および MMP-9 活性の確認の為に、IV 型コラゲナーゼ活性測定を実施した。IV 型コラゲナーゼ活性測定においても、ゼラチンザイモグラフィーと同様に炎症性サイトカイン刺激により活性が増強されていた。IV 型コラゲナーゼ活性は、特に IL-1 β および IL-6 による刺激時に対照群と比較して有意に増強されていた。定量 RT-PCR では、MMP-2 mRNA および MMP-9 mRNA の発現が確認された。MMP-2mRNA 発現は、IL-1 β 刺激時に増強される傾向が認められたが対照群と比較して有意な差は確認されなかった。一方、MMP-9 mRNA 発現は、TNF- α および IL-6 刺激時に対照群と比較し、有意に増強される事が確認された。

肝線維症モデルマウスの尾静脈より移植された BMSCs は線維化した肝臓に遊走・生着し、その場で MMP-9 を発現し線維化を退縮させたという報告[20]や、肝線維症マウスに移植された BMSCs が肝常在細胞と同様に MMP-13 および MMP-9 を発現し、肝線維化を退縮さ

せたという報告[2]があり、いずれも MMP-9 の発現は、BMSCs 移植治療における肝線維症の改善に関与していると考えられている。線維化領域における MMP-9 発現に関して、その機序は不明であるが Heissing らは、BMSCs からの MMP-9 発現には可溶性 kit リガンドが関与しており、可溶性 kit リガンドは炎症を起こした肝臓における BMSCs の増殖および分化に関連して放出されると報告している[17]。

さらに、IL-6 は肝炎[19]やアルコール性肝障害時[3]に多く発現するサイトカインであり、肝臓の再生に深く関与する因子である事が知られている。IL-6 の合成は組織マクロファージに対する TNF- α 刺激により誘発され[12,13]、C3a や C5a といった補体がクッパー細胞表面のレセプターに結合する事で放出される[8]。肝臓での IL-6 レベルの上昇は、STAT-3 を活性化させ、抗アポトーシスタンパク質である FLIP、Bcl-2、Bcl-xL を誘導し直接カスパーゼ活性経路を抑制する。その結果、アポトーシス抑制効果を示し細胞保護に働いていると考えられている [7,21]。STAT-3 は、他にも抗酸化作用や肝細胞における糖代謝・脂肪代謝に関与している事が知られており、肝再生において非常に重要な因子であると考えられている。

本研究より、イヌ BMSCs には MMP 産生能があり、特に TNF- α および IL-6 刺激時において MMP-9 の発現が顕著に増強される事が確認された。肝障害時に発現する IL-6 は、アポトーシス抑制による肝保護作用のみならず、BMSCs 移植治療における MMP-9 発現とも関与している可能性が考えられた。現在、BMSCs 移植治療の機序はまだ不明な点が多

いが、本結果から、MMP-9 発現と関連した肝線維症の改善が機序の 1 つとして関与している可能性が示された。

引用文献

1. Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A. and Chakraborti, T. 2003. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem.* **253**: 269-285.
2. Higashiyama, R., Inagaki, Y., Hong, Y., Kushida, M., Nakao, S., Niioka, M., Watanabe, T., Okano, H., Matsuzaki, Y., Shiota, G. and Okazaki, I. 2007. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology.* **45**: 213-222.
3. Hill, D., Marsano, L., Cohen, D., Allen, J., Shedlofsky, S. and McClain, C. 1992. Increased plasma interleukin-6 concentrations in alcoholic hepatitis. *J Clin Immunol.* **119**:547-552.
4. Iimuro, Y., Nishio, T., Morimoto, T., Nitta, T., Stefanovic, B., Choi, S, K., Brenner, D, A. and Yamaoka, Y.2003. Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat. *Gastroenterology.* **124**: 445-458.

5. Iredale, J, P. 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 43-54.

6. Kleiner, D. and Stetler-Stevenson, W. 1999. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **43 Suppl**: S42-51.

7. Kovalovich, K., Li, W., Deangelis, R., Greenbaum, L. E., Ciliberto, G. and Taub, R. 2001. Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* **276**: 26605-26613.

8. Lindroos, P., Tsai, W., Zarnegar, R. and Michalopoulos, G. 1992. Plasma levels of HGF in rats treated with tumor promoters. *Carcinogenesis.* **13**: 139-141.

9. Loukopoulos, P., Mungall, B., Straw, R., Thornton, J. and Robinson, W. 2003. Matrix metalloproteinase-2 and -9 involvement in canine tumors. *Vet. Pathol.* **40**: 382-394.

10. Matrisian, L. 1992. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays*. **14**: 455-463.
11. McDonell, S., Morgan, M. and Lynch, C. 1999. Role of matrix metalloproteases in normal and disease processes. *Biotech. Soc. Transact.* **27**: 734-740.
12. Michalopoulos, G. 2007. Liver regeneration. *J. Cell Physiol.* **213**: 286-300.
13. Michalopoulos, G. and DeFrances, M. 1997. Liver regeneration. *Science*. **276**: 60-66.
14. Moses, M., Wiederschain, D., Loughlin, K., Zurakowski, D., Lamb, C. and Freeman, M. 1998. Increased incidence of matrix metalloproteinases in urine of cancer patients. *Cancer Res.* **58**: 1395-1399.
15. Poldervaart, J., Favier, R., Penning, L., van den Ingh, T. and Rothuizen, J. 2009. Primary hepatitis in dogs: a retrospective review (2002-2006). *J Vet Intern Med.* **23**: 72-80.

16. Ries, C., Loher, F., Zang, C., Ismail, M. and Petrides, P. 1999. Matrix metalloproteinase production by bone marrow mononuclear cells from normal individuals and patients with acute and chronic myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Clin. Cancer Res.* **5**: 1115-1124.

17. Sakaida, I., Terai, S., Yamamoto, N., Aoyama, K., Ishikawa, T., Nishina, H. and Okita, K. 2004. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology.* **40**: 1304-1311.

18. Siller-López, F., Sandoval, A., Salgado, S., Salazar, A., Bueno, M., Garcia, J., Vera, J., Gálvez, J., Hernández, I., Ramos, M., Aguilar-Cordova, E. and Armendariz-Borunda, J. 2004. Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis. *Gastroenterology.* **126**: 1122-1133.

19. Sun, Y., Tokushige, K., Isano, E., Yamauchi, K. and Ohata, H. 1992. Elevated serum interleukin-6 levels in patients with acute hepatitis. *J Clin Immunol.* **12**:192–200.

20. Terai, S., Sakaida, I., Nishina, H. and Okita, K. 2005. Lesson from the GFP/CC14 model--translational research project: the development of cell therapy using autologous bone marrow cells in patients with liver cirrhosis. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* **12**: 203-207.

21. Taub, R. 2003. Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway. *J Clin Invest.* **112**: 978-980.

図および表

表 1. 定量 RT-PCR に用いたイヌ特異的プライマー

Dog gene	Primer sequence
MMP-2	(F) 5'AACTCTGGGACCTGTCACTCCTG (R) 5'TGTCACTGTCCGCCAAATGAA
MMP-9	(F) 5'GTGAAGACGCAGACCGTGGA (R) 5'CGAGAATTCACACGCCAGTAGAAG
GAPDH	(S) 5'CCACCCCAATGTATCAGTT (AS) 5'TGGAAGAGTGGGTGTCCTG

表.1

図 1. イヌ BMSCs におけるゼラチンザイモグラフィ

- (A) 炎症性サイトカイン刺激後 12 時間のゼラチナーゼ活性. 陽性対照として, ヒト精製 proMMP-9, proMMP-2, MMP-2 マーカーを用いた.
- (B) proMMP-9 領域のバンドの輝度測定. サイトカイン無添加群を対照群として 100% に換算し, 各炎症性サイトカイン刺激時の proMMP-9 領域のバンド輝度を棒グラフに示した. TNF- α および IL-6 刺激時に proMMP-9 活性の増強が確認されたが, IL-1 β による刺激時には増強は確認されなかった.
- (C) proMMP-2 領域のバンドの輝度測定. IL-1 β による刺激時に proMMP-2 活性の増強が確認されたが, TNF- α および IL-6 による刺激時には増強は確認されなかった.

(A)

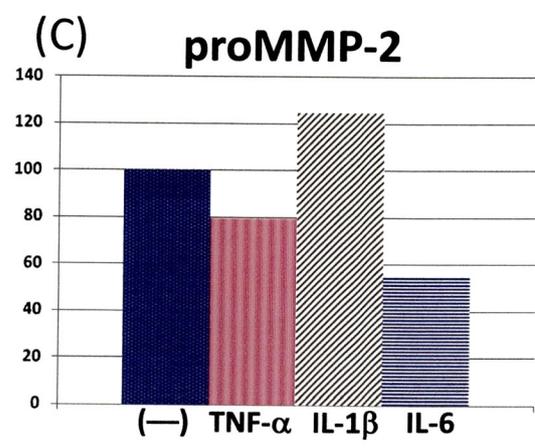
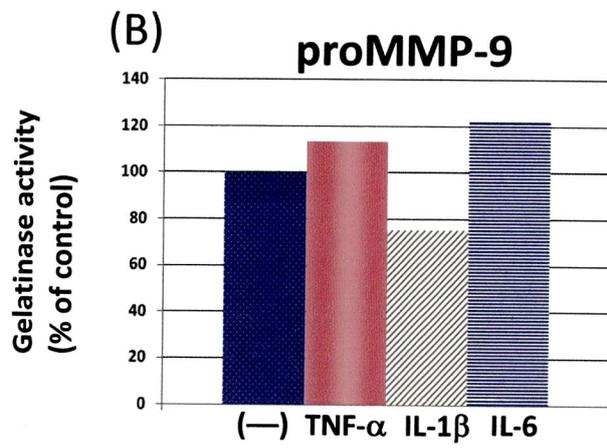
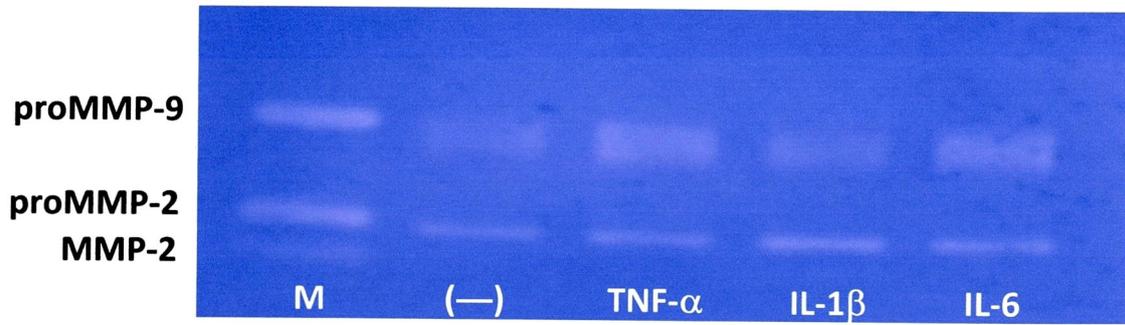


図.1

図 2. イヌ BMSCs における IV 型コラゲナーゼ活性測定

イヌ BMSCs の IV 型コラゲナーゼ (MMP-2 と MMP-9 の総和) 活性は, 炎症性サイトカイン無刺激時においても持続的に確認された. IV 型コラゲナーゼ活性は, 炎症性サイトカイン刺激により増強される事が確認された. 活性のピークは炎症性サイトカイン刺激後 24 時間であり, 特に IL-1 β および IL-6 による刺激時に対照群と比較し有意に活性が増強される事が確認された.

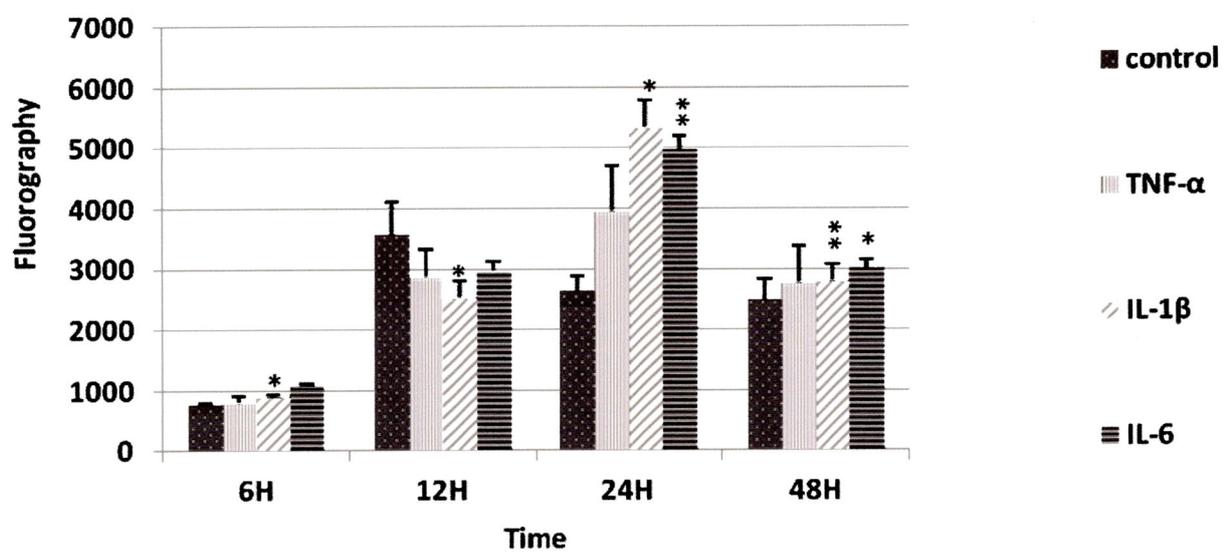


图.2

図 3. イヌ BMSCs における MMP の mRNA の発現

炎症性サイトカイン刺激後 12 時間のイヌ MMP の mRNA 発現を確認した。サイトカイン無添加群を対照群として 100%に換算し、各炎症性サイトカイン刺激時の mRNA 発現量を棒グラフに示した。 ($p < 0.01$ *)

- (A) MMP-9mRNA の発現。MMP-9mRNA は、TNF- α および IL-6 刺激時に対照群と比較して有意に発現が増強した。
- (B) MMP-2mRNA の発現。MMP-2mRNA は、IL-1 β 刺激時に対照群と比較して発現が増強したが、有意差は認められなかった。

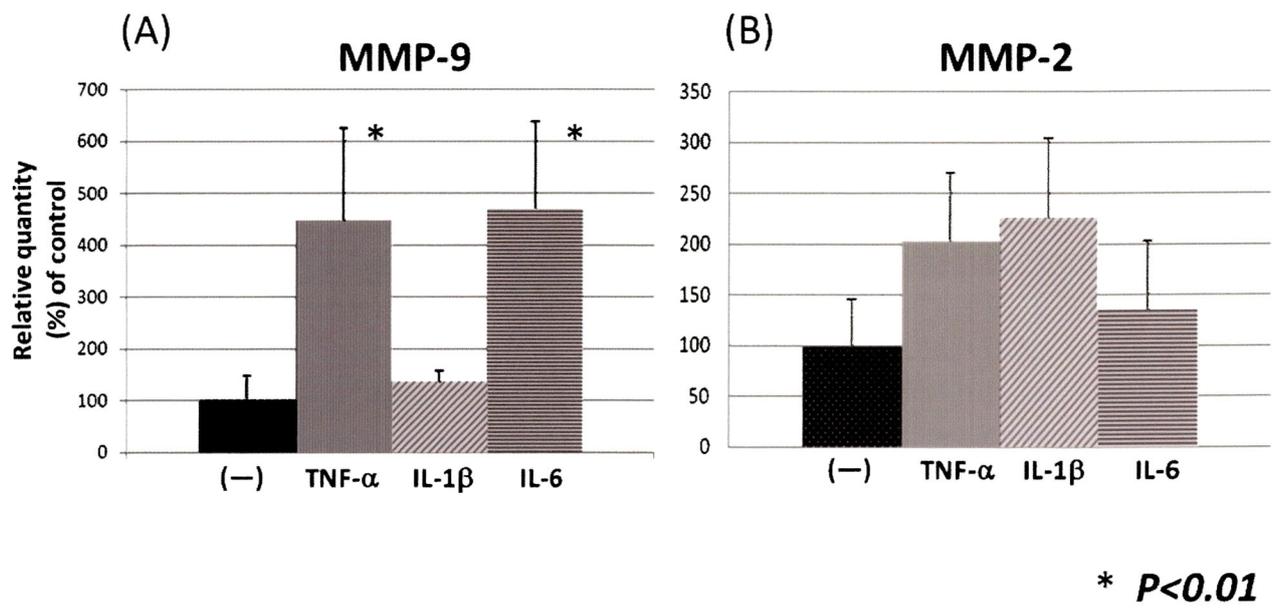


図.3

総括

本論文では、イヌの肝疾患に対する自己骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cells : BMSCs) を用いた新規治療法について検討した。

現在、肝不全に対する唯一の有効な治療法は肝移植である。しかし、小動物臨床において肝移植は現実的な治療法ではなく、肝移植に代わる有用な代替療法の開発が急務とされている。そこで、肝移植の代替療法として注目されているのが BMSCs を用いた再生医療である。

本論文の第一章では、イヌ BMSCs の慢性肝障害モデルへの移植効果を確認する為、四塩化炭素 (CCl₄) 誘発性慢性肝障害マウスへのイヌ BMSCs 異種移植実験を行った。供試動物として、重症免疫不全 (SCID) マウスを用いた CCl₄ 誘発性慢性肝障害モデルの作製を試みたが、SCID マウスは長期的な CCl₄ 投与に耐える事が出来ず、本実験のモデル動物としては不適切であった。その為、ヌード (CCl₄/nude) マウスおよびシクロスポリン A 免疫抑制 (CCl₄/CSA) マウスを用い本実験のモデル動物を作製した。軽度肝障害モデルである CCl₄/nude マウスは、ヌードマウスに、コーンオイルで 1:4 に希釈した CCl₄ を 0.6ml/kg で週 2 回、計 4 週間皮下投与し作製した。

重度肝障害モデルである CCl₄/CSA マウスは、ICR マウスに移植前日からサンプル採取日までシクロスポリン A を 10mg/kg/day で皮下投与し免疫抑制を行い、CCl₄/nude マウス

と同様にコーンオイルで 1:4 に希釈した CCl₄ を 1.0ml/kg に増量し週 2 回、計 4 週間皮下投与して作製した。血液生化学検査では、BMSCs 移植による肝パネル (TP, ALB, ALT, AST, NH₃, ALP, T-Bil) の改善は認められなかったが、病理組織学的検査において重度肝障害モデルである CCl₄/CSA マウスの BMSCs 移植群で炎症細胞と肝線維化領域の有意な減少が確認された。過去の文献において、移植された BMSCs が肝臓へ遊走・生着し、肝線維化領域を改善させるには、肝臓での持続的な炎症が重要な因子であると報告されている。本研究において、軽度肝障害モデルである CCl₄/nude マウスでは、肝線維化領域の減少は認められなかった。また、レシピエントの肝臓組織の PCR において、ドナー由来のイヌ *SRY* 遺伝子は CCl₄/CSA マウスのみで確認された。これらの結果からも過去の報告と同様に、BMSCs の肝臓への遊走・生着と治療効果の発現には、重度で持続的な肝障害が必要である可能性が示唆された。

本論文の第一章において、イヌ BMSCs は肝障害モデルマウスの肝線維化領域を減少させる事が確認された。BMSCs 移植治療の機序は、まだまだ不明な点が多いが仮説の 1 つとして Matrix metalloproteinase (MMP) 発現に関与した線維化の融解が考えられている。MMP が肝線維症の進行の抑制に効果を示す事や、MMP の阻害因子である Tissue inhibitor matrix metalloproteinase (TIMP) が、肝線維症・肝硬変で発現が増強される事が知られている。しかし、イヌ BMSCs の MMP 産生能に関する研究は少ない。そこで本論文の第二章では、イヌ BMSCs の MMP 発現能および炎症性サイトカイン刺激に対する反応を評

価した。ゼラチンザイモグラフィーにおいて、イヌ BMSCs は proMMP-2 および proMMP-9 を発現している事が確認された。proMMP-2 および proMMP-9 領域のバンドの輝度解析を行ったところ、proMMP-2 領域の輝度は、対照群と比較し IL-1 β 刺激時にのみ増強されていた。それに対して、proMMP-9 領域のバンドは TNF- α および IL-6 刺激時に輝度が顕著に増強されており、IL-1 β 刺激時にはバンド輝度の増強は認められなかった。IV型コラゲナーゼ活性測定においても、MMP-2 および MMP-9 が確認された。さらに、定量 RT-PCR において MMP-2 mRNA および MMP-9mRNA 発現が確認された。MMP-2mRNA 発現は、IL-1 β 刺激時に増強される傾向が認められたが対照群と比較して有意な差は確認されなかった。一方、MMP-9 mRNA 発現は、TNF- α および IL-6 刺激時に対照群と比較し、有意に増強される事が確認された。MMP-9 は BMSCs 移植時の肝線維症の改善に関与しているという報告があり、さらに IL-6 は肝臓の再生に深く関与する因子である事が知られている。IL-6 は炎症が存在する肝臓において発現レベルが上昇し、STAT-3 などといった転写因子を活性化させる。活性化した STAT-3 は抗アポトーシスタンパク質である FLIP, Bcl-2, Bcl-xL 遺伝子をターゲットとして直接カスパーゼ活性経路を抑制し、抗アポトーシス効果を示す。さらに、STAT-3 は抗酸化作用や肝細胞における糖代謝・脂肪代謝に関与する事で、肝再生において重要な働きをしている。BMSCs 移植による肝線維症の改善には、線維化領域での IL-6 による刺激および MMP-9 発現が関与している可能性が考えられた。

本研究において、in vivo で重度肝障害モデルマウスに移植されたイヌ BMSCs は、肝線

維化領域を減少させる事が確認された。さらに、*in vitro*においてイヌ BMSCs は MMP 産生能を有しており、その発現は炎症性サイトカイン刺激により増強される事が確認された。この結果から、イヌ BMSCs の肝臓への遊走・生着には重度の炎症が関与しており、さらに肝臓に生着した BMSCs に対する持続的な炎症性の刺激が線維化領域での MMP 産生を増強させ線維化を減少させたという過程が推測された。今後は、*vivo*における MMP 発現の確認が必要と考えられるが、本研究よりイヌ BMSCs は肝線維症治療において有用な細胞源となりうる可能性が示唆された。

謝辞

本論文を製作するにあたり，多大なご指導と御高閲を賜りました山口大学農学部獣医学科獣医外科学教室の田浦保穂教授に深い謝意を表します。また，実験計画から論文の製作まで終始にわたり，懇切なる研究の御指導，御助言をいただきました鹿児島大学農学部獣医学科獣医外科学教室の三角一浩教授および山口大学農学部獣医学科獣医外科学教室の谷健二准教授に謹んで深謝致します。さらに，本論文中の病理組織学的検査に關して的確な御指示と助言を頂きました山口大学獣医病理学教室の林俊春教授および森本将弘教授に深謝致します。

本研究に關して，御指導・御協力頂きました山口大学獣医放射線学教室の中市統三教授および同獣医臨床診断学教室の板本和仁准教授、獣医外科学教室の仲澤宏助教に深く感謝致します。

本研究活動を行うにあたり，御協力・御援助頂きました山口大学大学院連合獣医学研究科の小田康喬先生，獣医外科学教室の黒木曹平君，高岸領君，古賀誠人君および後輩の皆様，支えて頂いた全ての方々に心から感謝致します。