

Improvement of liver fibrosis
by infusion of cultured cells derived from human bone marrow
ヒト骨髄由来培養細胞投与療法による肝線維化の改善

氏名 谷本 治子

所属 山口大学大学院医学系研究科
応用分子生命科学系 専攻

平成 25 年 10 月

目次

1. 要旨
2. 研究の背景
3. 目的
4. 方法
 - (1) 対象
 - (2) 方法
 - (3) 解析
5. 結果
6. 考察
7. 結語
8. 謝辞
9. 参考文献

1. 要旨

【目的】我々は、ヒト非代償性肝硬変症に対する「自己骨髄細胞投与 Autologous bone marrow cell infusion (ABMi) 療法」を開発し、その有効性および安全性を多施設臨床研究で明らかにした。今回、適応拡大を目指してヒト骨髄細胞を培養し、肝線維化改善効果のある細胞分画の増幅を試みた。

【方法】ヒト骨髄単核球細胞 bone marrow-mono nuclear cell (BM-MNC) を 10%FBS 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地で培養し、培地交換のみ行った細胞 (P0) と 2 回継代した細胞 (P2) を回収し、細胞表面マーカー (fluorescence activated cell sorter (FACS) 解析)、遺伝子発現 (DNA-Chip 解析) を評価した。更に nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD-SCID) マウス四塩化炭素 Carbene tetrachloride (CCl₄) 肝硬変モデルを作成し、P2 細胞 5×10⁵ 個を尾静脈投与した。細胞投与 4 週後の肝線維化を Sirius-red 染色で、matrix metalloproteinase (MMP) -9 および alpha smooth muscle actin (α SMA)、tumor necrosis factor alpha (TNF α)、transforming growth factor beta (TGF β) 発現を、Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) や免疫組織化学 Immunohistochemistry (IHC) で評価した。

【結果】P2 細胞の FACS 解析では 94%前後が間葉系幹細胞 Mesenchymal stem cell (MSC) であり、骨髄細胞 3.8×10⁸ 個から、22 日間の培養で 2.8×10⁸ 個の MSC の増幅が可能であった。P2 細胞の DNA-Chip 解析では、P0 細胞に多く含まれたマクロファージの遺伝子発現が減少した。SCID マウス CCl₄ 肝硬変モデルに P2 細胞 5.0×10⁵ 個を尾静脈投与すると 4 週後の肝線維化は有意に改善され、MMP-9 の発現増強および α SMA、TNF α、TGF β の発現低下を確認した。

【結語】培養ヒト骨髄由来細胞 (P2) は肝線維化を改善し、P2 細胞中に含まれる 94%前後の MSC が、MMP-9 発現を増強し、TNF α や TGF β を介して肝星細胞 Hepatic stellate cell (HSC) 活性を低下させることに由来すると考えられた。P2 細胞中の MSC は、臨床応用に十分な増殖能を有し、骨髄由来培養細胞投与療法は実現可能であると考えた。

略語

ABMi, Autologous bone marrow cell infusion 自己骨髄細胞投与; BM-MNC, bone marrow-mono nuclear cell ヒト骨髄単核球細胞; DMEM, dulbecco's Modified Eagle Medium; NOD-SCID, nonobese diabetic/severe combined immunodeficient; FACS, fluorescence activated cell sorter; CCl₄, Carbene tetrachloride 四塩化炭素; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; α SMA, alpha smooth muscle actin; TNF α, tumor necrosis

factor; TGF β , transforming growth factor beta; IHC, Immunohistochemistry 免疫組織化学; RT-PCR, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; MSC, mesenchymal stem cell 間葉系幹細胞; HSC, Hepatic stellate cell 星細胞; FISH, fluorescence in situ hybridization; GFP, Green Fluorescent Protein; FBS, fetal bovine serum; PBS, Phosphate-Buffered saline

2. 研究の背景

これまでに、骨髄移植(XY)を受けた血液疾患患者(XX)の剖検において、fluorescence in situ hybridization (FISH) により肝臓および消化管組織内に Y 染色体の存在を確認し、骨髄細胞中に多分化能を有する幹細胞の存在が示唆された[1,2]。また、ヒト骨髄液中の接着性細胞は FACS により「CD90+, CD44+/CD14-, CD34-, CD45-」で分離されるため、多分化能を有した間葉系幹細胞であることが示された[3]。

これらの骨髄中の多分化能を有し肝臓に生着する細胞の存在に注目して、当研究室で肝硬変に対する自己骨髄細胞投与療法に関するマウス基礎研究を開始し、肝硬変における骨髄細胞の分化・増殖を評価する「マウス Green Fluorescent Protein (GFP) /CCl₄モデル」を確立した[4]。同肝硬変モデルにおいて、投与骨髄細胞が MMP-9 等を産生することで肝線維化を改善させることが示された[5]。さらに 2003 年より、これらのマウス基礎研究成果を基盤に、臨床研究「非代償性肝硬変症に対する ABMi 療法」を開始し、その有効性と安全性を報告した[6]。最近では、当研究室との ABMi 療法の共同研究において、韓国延世大学から B 型肝硬変患者において ABMi 療法の効果が 1 年以上持続することが示された[7]。また山形大学との共同研究でも、アルコール性肝硬変患者において ABMi 療法後 6 カ月の経過における肝機能の改善が示された[8]。骨髄細胞を用いた細胞療法は、肝硬変に対する有望な治療となりうることが示されてきている[9, 10]。

3. 目的

現在の ABMi 療法は全身麻酔下の骨髄液採取が必要なため、患者の全身状態に厳しい適応基準がある。そこで ABMi 療法の適応拡大のため、局所麻酔で少量の骨髄液を採取し、骨髄細胞を培養することで、肝線維化改善効果のある細胞分画を増幅することができるかまず評価した。その結果、2 回継代培養した P2 細胞がその増殖能および多分化能の点で、より肝硬変症治療に重要な細胞分画であることが明らかになった。そこで、この細胞投与により肝線維化改善を認めたマウス肝臓を用いて、肝線維化改善のメカニズム解析を試みた。本研究において、培養ヒト骨髄由来細胞の肝線維化改善効果を明らかにしたので報告する。

4. 方法

(1) 対象

培養ヒト骨髄単核球細胞およびヒト間葉系幹細胞の培養

Human BM-MNC (Code: 2M-125, male; HIV, HBV, HCV negative) は Lonza (Basel, Switzerland) 社より購入した。Human BM-MNC をノンコートディッシュ (Becton and Dickinson, NJ, USA) 上で、10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO, NY, USA) のみ添加した Penicillin-Streptomycin (GIBCO) 含有 Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地 (GIBCO) を用いて培養した。Human BM-MNCs を 1×10^6 cells/cm² の濃度で播種し、37°C、5% CO₂ で培養した。3 日毎に培地交換のみを行い 20-23 日間培養後に回収した細胞 (P0) と、10-13 日後と更に 5 日後に 2 回継代を行った細胞 (P2) を回収した (Fig. 1a)。継代は Trypsin-EDTA (0.05% Trypsin, 0.53mM EDTA・4Na) (GIBCO) を用いて 37°C、5 分間反応させて行った。Human MSCs は同様の方法で培養され 2-3 回継代が行われた。これらの細胞は、尾静脈投与前にトリプシン処理され 2 回 Phosphate-Buffered saline (PBS) (GIBCO) で洗浄した。

NOD-SCID マウス CCl₄ 肝硬変モデルを用いた実験

全ての動物は愛護的に扱われ、実験は National Institute of Health criteria に従って Animal Experiment Committee of Yamaguchi University School of Medicine の承認を得た。NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J マウス 5 週令(雌)を日本チャールス・リバー株式会社(MA, USA)より購入し、実験はエーテル麻酔下で行われた。

6 週令、雌の NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J マウスは、corn oil (Wako, Japan) で 3:1 に希釈した CCl₄ (Wako) 混合液を、初回のみ 0.5mL/kg body (0.25 μg/g) CCl₄、2 回目からは 1.0mL/kg body weight (0.5 μg/g)、最後の 4 週間は 1.5mL/kg body weight (0.75 μg/g) とし、計 6 週間腹腔内反復投与 (2 回/週) した。これらを NOD-SCID マウス CCl₄ 肝硬変モデルとした。CCl₄ 1.5mL/kg body weight 反復投与は更に 4 週間継続された。P2 細胞投与群 (n=18) および P0 細胞投与群 (n=7) は 5.0×10^5 個づつ、この NOD-SCID マウス CCl₄ 肝硬変モデルに尾静脈投与された。一方、Control 群 (n=13) は PBS のみ投与された。

(2) 方法

培養ヒト骨髄細胞の性状評価

P0, P2 細胞の細胞表面マーカーを、フローサイトメトリー (FACS Calibur; Becton and Dickinson) で解析した。細胞は、以下の標識抗体 : CD45, CD90, CD105 (eBioscience, CA, USA), CD73, CD11b Beckman (Coulter, CA, USA), を用いた。蛍光標識された細胞を分離し、MSC 含有率 (%) を評価した。P2 細胞は、さらに MSC と同定するために以下の抗体で解析した : CD34, CD13, CD45, CD73, CD90, HLA-DR, HLA-ABC, iso IgG (BD Phamingen, CA, USA), CD44, CD105, CD11b (Beckman Coulter), CD117 (Beckton and Dickinson)。

分化誘導および DNA-Chip 解析

P2 細胞を分化誘導培地 (Invitrogen, NY, USA) で培養し、脂肪細胞 (Oil-Red O, anti-mouse FABP-4 antibody)、骨細胞 (Alizarin Red)、軟骨細胞 (anti-human Aggrecan antibody) への分化を確認した。また、DNA-Chip (Agilent Technology, CA, USA) を用いて P0 細胞と P2 細胞の DNA 発現を比較した。

肝線維化の定量解析

培養細胞投与 4 週後の NOD-SCID マウス CCl₄ 肝硬変モデルの肝組織を回収し、4%ホルムアルデヒドで固定し、3 μ m のパラフィン切片を解析に用いた。肝線維化は Sirius red 染色後、解析ソフト (BIOREVO 顕微鏡 BZ-9000, BZ-II 解析アプリケーション ; KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて、倍率 100 倍で染色域の面積比 (%) として評価した。各サンプルにおいて重複しない無作為の 10 視野についての平均値を面積比とした。

MMP-9 および α SMA の免疫組織化学

P2 細胞投与後 2 週および 4 週後の肝組織のパラフィン切片 (3 μ m) を、免疫染色に用いた。MMP-9 および α SMA は、Vector Antigen Unmasking Solution (Vector Laboratories, CA, USA) による抗原賦活化処理後、結合した抗体を avidin-biotin complex method staining kit (Vector Laboratories) を用いて検出した。一次抗体は以下の希釈で用いた : MMP-9 (R and D Systems, MN, USA) は 1:100、 α SMA (Abcam, Cambridge, MA) は 1:300、ビオチン化抗体は二次抗体として用いられた。MMP-9 陽性細胞数は、倍率 200 倍で、標本ごとに重複しない 6 視野の平均値として評価した。 α SMA 染色域の面積比 (%) は、倍率 100 倍で、標本ごとに重複しない 10 視野の平均値として評価した。

Real-time RT-PCR による mRNA の定量解析

P2 細胞投与後 (4 週) の NOD-SCID マウス CCl₄ 肝硬変モデルの肝組織より、RNA 抽出液 (ISOGEN; Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて total RNA を抽出し、cDNA は 500ng の RNA より Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, IN, USA) を用いて合成した。MMP-9、 α SMA、TNF α 、TGF β は real-time PCR 法で解析した。Real-time RT-PCR は、SYBR Green Master Mix (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland) を用いて行った。Primer は、MMP-9 (forward: 5'-tct cta cgg ccg gct ttg ct-3', reverse: 5'-ggc aag tct tca gag tag tt-3'), α SMA (forward: 5'-act ctc ttc cag cca tct ttc a-3', reverse: 5'-ata ggt ggt ttc gtg gat gc-3'), TNF α (forward: 5'-cag gtt ctg tcc ctt tca ctc act-3', reverse: 5'-ggt cag tag aca gaa gag cgt ggt-3'), TGF β 1 (forward: 5'-tgg agc aac atg tgg aac tc-3', reverse: 5'-cag cag ccg gtt acc aag-3'), β -actin (forward: 5'-tga cag gat gca gaa gga ga-3', reverse: 5'-gct gga agg tgg aca gtg ag-3'), β -actin (forward: 5'-tga cag gat gca gaa gga ga-3', reverse: 5'-gct gga agg tgg aca gtg ag-3') を用いた。

(3) 統計解析

データは、平均値±標準誤差で示した。2 群の比較は Student's t test を用いて行った。

5. 結果

P2 細胞の大半は細胞表面マーカーおよび機能面から MSC である

継代せず培地交換のみで培養したヒト骨髄単核球細胞 (P0 細胞) は、およそ 2 つのサブグループ (MSC とマクロファージ) に分けられる。CD45 陽性の血球系細胞が P0 細胞全体の 43.1% で、そのうち CD45/CD11b 陽性かつ CD90 陰性のマクロファージ分画が全体の 34.9% を占めた。これに反して CD45 陰性かつ CD90/CD105/CD73 陽性の MSC 分画は 51.8% を占めた (Fig. 1b-d)。P0 細胞に対して、2 回継代培養をしたヒト骨髄単核球細胞 (P2 細胞) は、MSC が 95.5% で、2.6% が CD45 陽性細胞、わずか 0.2% がマクロファージであった (Fig. 1e-g)。倍率 100 倍の顕微鏡写真では、P0 細胞は球型の血球系細胞を多く含み、一方 P2 細胞は線維芽細胞様の形態をした均質な細胞であった (Fig. 1h-i)。4 人の健康人から得られた P2 細胞中の MSC 含有率 (%) は $94.1 \pm 2.6\%$ で、個人差は認められなかった (Fig. 1j)。ヒト骨髄単核球細胞を、 1×10^6 cells/cm² の濃度 (3.6×10^6 cells/3.8cm²) で播種し、10% FBS 含有 DMEM 培地で 13 日間培養すると、接着性細胞数は $0.7 \pm 0.3 \times 10^5$ cells/3.8cm² (n=5)、2 回継代後の P2 細胞は $28.3 \pm 15.9 \times 10^5$ cells/3.8cm² (n=5) に増加した (Fig. 1k)。P2 細胞

の細胞表面マーカー発現は MSC に矛盾しなかった。また P2 細胞中の造血系幹細胞マーカーである CD34 陽性細胞は、全体の 0.06% に過ぎなかった (Fig.2a)。P2 細胞は、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞 に分化した (Fig.2b-e)。

P2 細胞と P0 細胞の DNA 発現の比較

IPA system による DNA-Chip 解析を行った。発現増強を認めた遺伝子は 1,569 probe であった。P2 細胞には、細胞周期に関する G2/M DNA damage checkpoint regulated gene の発現が増強されていた。一方、血液細胞の機能、血液細胞の増殖、白血球の遊走に関連する遺伝子発現は抑制されていた (Fig.2f,g)。更に、P2 細胞には単球やリンパ球に関連する多くの CD マーカーの発現が抑制されており、マクロファージの表現型が減少していることに一致することを確認した (Table 1)。

培養ヒト骨髄由来細胞 (P2 細胞) 投与は肝線維化を改善する

P2 細胞 5×10^5 個を投与された NOD-SCID マウス CCl₄ 肝硬変モデルの肝臓は、細胞投与 4 週後に Sirius red 染色による染色域の面積比で線維化を評価すると、著明に線維化が減少していた (Fig.3a)。P2 細胞投与群では、肝硬変モデルの線維化が有意に改善された [P=0.009, **P<0.01, $1.5 \pm 0.5\%$ (n=11) vs. control 群 $2.6 \pm 1.1\%$ (n=7); P=0.048, #P<0.05 vs. P0 細胞投与群 $2.2 \pm 0.9\%$ (n=7)] (Fig.3b-f)。

P2 細胞が投与された硬変肝における MMP-9 発現増強

P2 細胞投与 4 週後の肝線維化改善を認めた肝臓において、細胞外マトリックスを融解する MMP-9 の mRNA 発現は有意に増強された [P=0.003, **P<0.01, MMP-9/ β -actin 0.9 ± 0.5 (n=6) vs. 0.2 ± 0.1 control 群 (n=6)] (Fig.4a)。P2 細胞はまた、細胞投与 2 週および 4 週後の肝臓において MMP-9 蛋白発現を有意に増強した [2w P=0.031, *P<0.05 and 4w P=0.047, *P<0.05, MMP-9(+)細胞数 2w 9.2 ± 6.5 (n=10) vs. 3.9 ± 1.7 control 群 (n=9), 4w 9.2 ± 4.9 (n=12) vs. 4.9 ± 3.5 control (n=8), $\times 200$] (Fig.4b-h)。

P2 細胞が投与された硬変肝における肝星細胞 (HSC) の活性抑制

P2 細胞投与 4 週後の肝線維化改善を認めた肝臓において、活性化 HSC のマーカーであ

る α SMA の mRNA 発現は有意に低下した [$P=0.045$, $*P<0.05$, α SMA/ β -actin 0.6 ± 0.2 ($n=4$) vs. 0.9 ± 0.2 control($n=6$)] (Fig.5a)。P2 細胞投与群の α SMA 染色における陽性細胞の面積比 (%) は有意に減少した [$P=0.048$, $*P<0.05$, $1.0\pm 0.5\%$ ($n=8$) vs. $2.0\pm 1.1\%$ control ($n=6$), $\times 100$](Fig.5b-d)。

P2 細胞投与による TNF α と TGF β 発現低下

P2 細胞投与 4 週後の肝線維化改善を認めた肝臓において、炎症性サイトカインである TNF α の mRNA 発現は、有意に低下した [$P=0.019$, $*P<0.05$, TNF α / β -actin 0.2 ± 0.1 ($n=8$) vs. 2.3 ± 2.3 control ($n=9$)](Fig. 6a)。P2 細胞投与 4 週後の肝線維化改善を認めた肝臓において、HSC を活性化する TGF β の mRNA 発現は有意に低下した [$P=0.049$, $*P<0.05$, TGF β / β -actin 0.9 ± 0.6 ($n=13$) vs. 1.5 ± 1.0 control ($n=12$)](Fig. 6b)。

6. 考察

我々は、CCl₄の反復投与により作成した肝硬変モデルマウスに GFP トランスジェニックマウス由来の全骨髄細胞を投与するという手法により、ドナー由来の骨髄細胞が肝硬変肝の線維化部分に定着し MMP-9 などの線維化分解酵素を産生することで肝線維化が改善したこと、これに伴い肝機能の改善および生存率の改善が得られたことを 2004 年に報告した [5]。臨床研究については、我々は世界に先駆けて 2003 年より ABMi 療法を開始し、重篤な有害事象なく肝硬変症例の肝機能が改善したことを示し、またこのときに骨髄細胞投与後、PCNA 陽性細胞の増加を確認した [6]。更に、我々との共同研究により延世大学の Kim らは、ABMi 療法の効果が 1 年以上にわたり持続すること、経時的な肝生検では Hepatic Progenitor Cells 分画の活性化が確認されたことを報告した [7]。また山形大学の齊藤らも、我々との共同研究によりアルコール性肝硬変患者において、自己骨髄細胞の投与が肝機能の改善に有効であることを報告し、骨髄がこの過程を活性化する可能性を示唆した [8]。

以上のように、ABMi 療法のヒト臨床研究において肝硬変の病態は改善することを示してきた。しかし、この治療効果にどの細胞分画が必要であるのかは明らかではなかった。一方で、ABMi 療法は全身麻酔で 400ml の骨髄液を採取する必要があり、適応は限られる。培養骨髄細胞について他の研究施設から、マウス骨髄細胞を用いた実験において骨髄細胞由来のマクロファージが肝線維化を改善することが示されている [11]。マウス骨髄はマクロファージ含有量が元々多く、また培養骨髄細胞中にも多い。マウス培養骨髄細胞の線維化改善効果は、マクロファージに由来する可能性がある。我々もまた、マウスモデルを用いて解析し、骨髄細胞は容易にマクロファージに分化し、マクロファージ分画を投与すると線維化が改善することを示した [12,13]。マウス骨髄からはマクロファージが容易に培養された [13]。一方 Huang らは、MSC もまた肝線維化を改善することを示した [14]。そこで、

我々は肝線維化改善において、マクロファージと MSC の両者が重要であると考えた。前述の報告はいずれもマウスのデータである。今回我々は、まずヒト骨髄細胞を分析、培養し、そして臨床応用に必要な肝線維化改善効果のある細胞分画を増幅することができるか評価した。

我々はヒトへの臨床応用を考え、増殖因子を添加をせず 10%FBS のみ含有する培地でヒト BM-MNC の培養を行った。2 回継代をすることで約 3 週間後には肝線維化効果を期待できる十分な細胞数を確保できた。P2 細胞は個人差が少なく、安定した細胞集団として回収された。94%前後の MSC を含み、数%がマクロファージを中心とする血球系細胞で、0.1%未満が造血系幹細胞であった (Fig.1b-i)。我々は、培養ヒト骨髄細胞において、P2 細胞の大部分は MSC であり、P2 細胞と P0 細胞間で、MSC 含有率が明らかに異なることを明らかにした。DNA-chip 解析もまた、培養ヒト骨髄由来細胞 (P2) はマクロファージ分画を減少させることを示した。それゆえ、マウスとヒトでは培養骨髄由来細胞の性質が異なると考えられた。

この P2 細胞は尾静脈投与により、今回我々が開発した免疫不全肝硬変マウスモデル (NOD-SCID マウス CCl₄ 肝硬変モデル) において、肝線維化を有意に改善した。また同マウスモデルにおいて、培養 hMSC が有意に肝線維化を改善することを確認した。それゆえ本研究から、培養ヒト骨髄由来細胞中の肝線維化改善効果が MSC に由来することを明らかにした。

ヒト臨床研究において、Mohamadnejad や Kharaziha らが骨髄由来 MSC が、経静脈投与や経門脈投与により肝硬変の病態を改善することを示している[15,16]。また Pai らは骨髄細胞から G-CSF で誘導した CD34 陽性細胞を体外で増幅し、経肝動脈投与すると肝機能が改善したことを示している[17]。これらに対し我々の報告は、ヒト骨髄由来細胞が増殖因子の関与なく、血清の添加のみで 2 回継代することで、個人差の少ないより均一な培養細胞として充分量回収できること、また経静脈投与するにより肝線維化改善効果が期待できる培養細胞投与療法が可能であることを示した。更に、ヒト細胞の機能評価ができる動物モデル (NOD-SCID マウス CCl₄ 肝硬変モデル) を開発したことで、培養ヒト骨髄由来細胞 (P2) 中の MSC の肝線維化改善効果を証明し、かつ簡便で安定した効果を得られる培養細胞回収条件を示した。今後この動物モデルを用いて肝硬変患者の培養骨髄由来細胞の分画評価および肝線維改善効果の評価を行い、より有用な細胞を回収し、投与するとともに、患者の治療効果予測ができるようになると思われる。

本研究では、培養ヒト骨髄由来細胞の肝線維化改善効果のメカニズムとして、肝線維融解に重要である MMP-9 の発現増強と、星細胞の活性低下による肝線維産生低下を介していることを示した。更に、TGF β や TNF α といったサイトカインの産生制御を介していることも示した。Fig6a,b では、TGF β や TNF α 発現低下を示した。投与された MSC が、これらサイトカインを低下させ、肝線維化を改善していると考えられる。これらの結果は、先に報告した我々の解析と一致し、自己骨髄細胞投与後の急激なサイトカイン変化を示している[18]。我々はまた、TNF α シグナリングは骨髄細胞投与後の肝線維化改善の制御に重

要であることを報告した[19]。培養ヒト骨髄細胞投与後のこれらサイトカイン変化が、肝線維化改善に重要であると考えられる。

我々の ABMi療法では、400ml の自己骨髄液を採取 (BM-MNC 分画平均 7.8×10^9 個) し、処理後に平均 5.2×10^9 個投与された[6]。BM-MNC 中に、MSC は 0.001~0.01%存在する[3]。それゆえ ABMi療法で投与された MSC 数は $0.5 \sim 5 \times 10^5$ 個と計算される。本研究からは、約 4×10^6 個の BM-MNC を 2 回継代培養すると、回収細胞は約 3×10^6 個でそのうち 94%が MSC とすると約 2.8×10^6 個の MSC が得られたことになる。例えば局所麻酔で採取可能な骨髄液 10ml 中には、BM-MNC は約 2×10^8 個、MSC は約 $0.2 \sim 2 \times 10^4$ 個と計算されるが、これを 2 回継代培養すると回収細胞数は約 1.5×10^8 個で、その 94%の約 1.4×10^8 個の MSC が回収できることになる。各種の処理ステップに伴うロスを考慮しても充分量の MSC 数と考えられる。言い換えると、本研究により局所麻酔で採取可能な培養自己骨髄由来細胞投与療法が可能であることが示された。

ヒト骨髄細胞の発癌性については、中国の中山大学のグループが、HBV に起因した肝不全患者に骨髄液を肝動脈から投与した場合、192 週までは骨髄細胞投与による肝細胞癌の発生率に変化はないことを示している[20]。臨床応用前までには Nude マウスを用いた腫瘍形成試験等による安全性評価が必要であるが、我々も既に高発癌肝硬変マウス (DEN/GFP-CC14 モデル) において骨髄細胞投与は肝発癌を促進させないばかりか肝発癌を有意に抑制していることを示している[21]。

培養ヒト骨髄由来細胞投与の安全性・危険性を示唆する報告としては、自己骨髄中の培養 MSC の経静脈投与では認めないが、CD34+の HSC を経肝動脈投与した場合、造影剤腎症による死亡例が報告されている[17]。我々が検討した培養ヒト骨髄由来細胞 (P2) の大半は MSC であり、CD34 陽性細胞は僅か 0.06%でほとんど含まれない。また ABMi療法同様に末梢静脈投与を考えており、P2 細胞投与はこの点では安全である。更に、過去の骨髄細胞の長期培養でも、癌化は起こらないと考えられている。今回は P2 細胞の培養時間は 20-22 日であり、品質上癌化は起こりにくいと考えられる[22]。

7. 結語

最後に、今回我々の研究によって、培養ヒト骨髄由来細胞 (P2) 中の MSC による肝線維化改善効果を明らかにした。今後さらなる肝線維化改善メカニズムの解析は必要であるが、今回の知見は培養ヒト骨髄由来細胞 (P2) は、MMP-9 の発現調節や TGF β や TNF α といった液性因子を介して肝星細胞活性化調節を行い、肝線維化を改善していることを明らかにした。更に今回の解析により、外来で行える局所麻酔で可能な培養自己骨髄由来細胞投与療法が十分に臨床応用可能な方法であることを明らかにした。

8. 謝辞

9. 参考文献

1. Alison MR, Poulsom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406:257.
2. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-16.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
4. Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, Katada T, et al. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem (Tokyo)* 2003;134:551-558.
5. Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004;40:1304-1311.
6. Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, Yokoyama Y, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006;24:2292-2298.
7. Kim JK, Park YN, Kim JS, Park MS, Paik YH, Seok JY, Chung YE, et al. Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. *Cell Transplant* 2010;19:1237-1246.
8. Saito T, Okumoto K, Haga H, Nishise Y, Ishii R, Sato C, Watanabe H, et al. Potential therapeutic application of intravenous autologous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Stem Cells Dev* 2011;20:1503-1510.
9. Terai S, Tanimoto H, Maeda M, Zaitso J, Hisanaga T, Iwamoto T, Fujisawa K, et al. Timeline for development of autologous bone marrow infusion (ABMi) therapy and perspective for future stem cell therapy. *J Gastroenterol* 2012;47:491-497.
10. Takami T, Terai S, Sakaida I. Advanced therapies using autologous bone marrow cells for chronic liver disease. *Discov Med* 2012;14:7-12.
11. Thomas JA, Pope C, Wojtacha D, Robson AJ, Gordon-Walker TT, Hartland S, Ramachandran P, et al. Macrophage therapy for murine liver fibrosis recruits host effector cells improving fibrosis, regeneration, and function. *Hepatology* 2011;53:2003-2015.

12. 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* 2013;351:487-495.
13. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* 1999;72:570-585.
14. Huang CK, Lee SO, Lai KP, Ma WL, Lin TH, Tsai MY, Luo J, et al. Targeting androgen receptor in bone marrow mesenchymal stem cells leads to better transplantation therapy efficacy in liver cirrhosis. *Hepatology* 2013;57:1550-1563.
15. Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, Bagheri M, Bashtar M, Ghanaati H, Baharvand H, et al. Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med* 2007;10:459-466.
16. Kharaziha P, Hellstrom PM, Noorinayer B, Farzaneh F, Aghajani K, Jafari F, Telkabadi M, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:1199-1205.
17. Pai M, Zacharoulis D, Milicevic MN, Helmy S, Jiao LR, Levicar N, Tait P, et al. Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34+ cells into patients with alcoholic liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2008;103:1952-1958.
18. Mizunaga Y, Terai S, Yamamoto N, Uchida K, Yamasaki T, Nishina H, Fujita Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-1beta are important cytokine in repair of the cirrhotic liver after bone marrow cell infusion -comparison of humans and model mice. *Cell Transplant* 2012.
19. Hisanaga T, Terai S, Iwamoto T, Takami T, Yamamoto N, Murata T, Matsuyama T, et al. TNFR1-mediated signaling is important to induce the improvement of liver fibrosis by bone marrow cell infusion. *Cell Tissue Res* 2011;346:79-88.
20. Peng L, Xie DY, Lin BL, Liu J, Zhu HP, Xie C, Zheng YB, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: Short-term and long-term outcomes. *Hepatology* 2011.
21. 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* 2012;27 Suppl 2:104-111.
22. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D, et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not

undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 2007;67:9142-9149.

Figure legends

Fig. 1 P2 細胞の大半は細胞表面マーカーおよび機能面から MSC である

a ヒト骨髄単核球細胞 (hBM) を 10% FBS-DMEM 培地を用いて、 1×10^6 cells/cm² の濃度で播種し培養した。3 日毎に培地交換のみを行い 20-23 日間培養後に回収した細胞 (P0) と、10-13 日後と更に 5 日後に 2 回継代を行った細胞 (P2) を回収した。b-d P0 細胞の細胞表面マーカー。フローサイトメトリーによる典型的な結果を示す。P0 細胞はおよそ 2 つのサブグループに分けられた。MSCs とマクロファージである。CD45 陽性の血球系細胞が P0 細胞全体の 43.1% で、そのうち CD45/CD11b 陽性かつ CD90 陰性のマクロファージ分画が全体の 34.9% を占めた。これに反して CD45 陰性かつ CD90/CD105/CD73 陽性の MSC 分画は 51.8% を占めた。e-g P2 細胞の細胞表面マーカー。P0 細胞と異なり、hBM を 2 回継代培養した P2 細胞の大半は MSC (95.5%) であり、2.6% が CD45 陽性細胞、わずか 0.2% がマクロファージであった。h 倍率 100 倍の顕微鏡写真では、P0 細胞は球型の血球系細胞を多く含んだ。i 一方、倍率 100 倍の顕微鏡写真では P2 細胞は線維芽細胞様の形態をした均質な細胞であった。j 4 人の健常人から得られた P2 細胞中の MSC% は $94.1 \pm 2.6\%$ で、個人差は少なかった。k hBM は 1×10^6 cells/cm² の濃度 (3.6×10^6 cells/3.8cm²) で播種し 10% FBS 含有 DMEM 培地で 13 日間培養すると、接着性細胞数は $0.7 \pm 0.3 \times 10^5$ cells/3.8cm² (n=5)、2 回継代後の P2 細胞は $28.3 \pm 15.9 \times 10^5$ cells/3.8cm² (n=5) に増加した。

Fig. 2 P2 細胞は細胞表面マーカー発現および機能的にも間葉系幹細胞 (MSCs) である。

a P2 細胞の細胞表面マーカーは MSCs に一致する。P2 細胞中の造血系幹細胞マーカーである CD34 陽性細胞は、全体の 0.06% に過ぎなかった。b-e P2 細胞 ($\times 200$) (b) 脂肪細胞 ($\times 200$) (c)、骨細胞 ($\times 200$) (d)、軟骨細胞 ($\times 40$) (e) に分化した。コントロール群 (b) は 10% FBS-DMEM のみで培養された。f P0 細胞より P2 細胞で発現増強された遺伝子。g P2 細胞より P0 細胞で発現低下した遺伝子。

Fig. 3 CCl₄、反復投与により NOD.CB17-Prkdcscid/J マウスに肝硬変を作成した (NOD-SCID マウス CCl₄ 肝硬変モデル)。同モデルの肝線維化は P2 細胞投与で改善された。

a 6 週令、雌の NOD.CB17-Prkdcscid/J マウスは、corn oil で 3:1 に希釈した CCl₄ 混合液を、初回のみ 0.5mL/kg body (0.25 μ g/g) CCl₄、2 回目からは 1.0mL/kg body weight (0.5 μ g/g)、最後の 4 週間は 1.5mL/kg body weight (0.75 μ g/g) で投与された。この NOD-SCID マウス CCl₄ 肝硬変モデルに、P0 細胞あるいは P2 細胞が投与された。CCl₄ 1.5mL/kg body weight 投与は、更に 4 週間腹続けられた。b-c P2 細胞 5×10^5 個を投与 4 週後の肝硬変

モデルマウス肝臓の Sirius red 染色の顕微鏡写真 (×100) (c)、PBS 投与のみのコントロール (×100) (b)。d-e 肝右葉の顕微鏡写真 (コントロール群 d と P2 細胞投与群 e) (オリジナル倍率は 100 倍)。f P2 細胞 (5×10⁵ 個) 投与 4 週後の同モデルの肝臓について、Sirius red 染色域の面積比で線維化を評価すると、著明に線維化が減少していた。P2 細胞投与群は、肝硬変モデルの線維化が有意に改善された [P=0.009, **P<0.01, 1.5±0.5%(n=11) vs. control 群は 2.6±1.1% (n=7); P=0.048, #P<0.05 vs.P0 細胞投与群 2.2±0.9%(n=7)]。

Fig.4 P2 細胞投与された硬変肝において MMP-9 発現は増強された。

a P2 細胞投与 4 週後の硬変肝において、MMP-9 の mRNA 発現は有意に増強された [P=0.003, **P<0.01, MMP-9/β-actin 0.9±0.5(n=6) vs. 0.2±0.1 control 群(n=6)]。b P2 細胞は、また投与 2 週および 4 週後の肝臓において MMP-9 蛋白発現を有意に増強した [P=0.031, *P<0.05 and P=0.047, *P<0.05, MMP-9(+)細胞数 9.2±6.5(n=10)vs. 3.9±1.7 control 群(n=9), 9.2±4.9(n=12) vs. 4.9±3.5 control (n=8)]。c-f P2 細胞投与 2 週後の肝臓における MMP-9 陽性細胞の顕微鏡写真(f) (オリジナル倍率は 400 倍)。矢印が示す。コントロール群(c)と P2 細胞投与群(d)の IgG コントロール。g-h P2 細胞投与 4 週後の MMP-9 陽性細胞の顕微鏡写真(h) (オリジナル倍率は 400 倍)。矢印が示す。PBS コントロール群における MMP-9 発現(g)。

Fig.5 P2 細胞投与は α SMA 陽性肝星細胞 (HSC) を減少させる

a P2 細胞投与 4 週後の肝臓において、α SMA mRNA 発現は有意に低下した [P=0.045, *P<0.05, α SMA/β-actin 0.6±0.2 (n=4) vs. 0.9±0.2 control(n=6)]。b P2 細胞投与群の α SMA 染色における陽性細胞の面積比 (%) は有意に減少した [P=0.048, *p<0.05, 1.0±0.5%(n=8) vs. 2.0±1.1% control(n=6)]。c-d P2 細胞投与 4 週後の肝臓における α SMA 陽性 HSC の顕微鏡写真(d)と PBS コントロール(c) (オリジナル倍率は 100 倍)

Fig.6 P2 細胞投与は TNF α と TGF β 発現を低下させる。

a P2 細胞投与 4 週後の肝臓において、炎症性サイトカインである TNF α の mRNA 発現は、有意に低下した [P=0.019, *P<0.05, TNF α/β-actin 0.2±0.1 (n=8) vs. 2.3±2.3 control (n=9)]。b P2 細胞投与 4 週後の肝臓において、HSC を活性化する TGF β の mRNA 発現は有意に低下した [P=0.049, *P<0.05, TGF β/β-actin 0.9±0.6(n=13) vs. 1.5±1.0 control (n=12)]。

Table legends

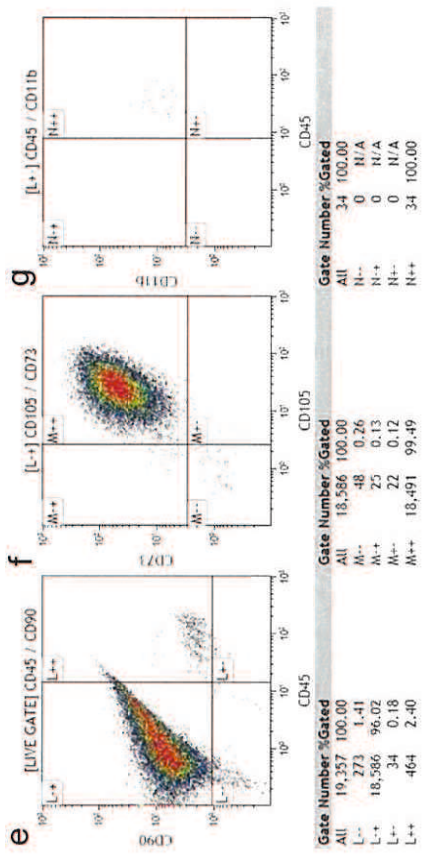
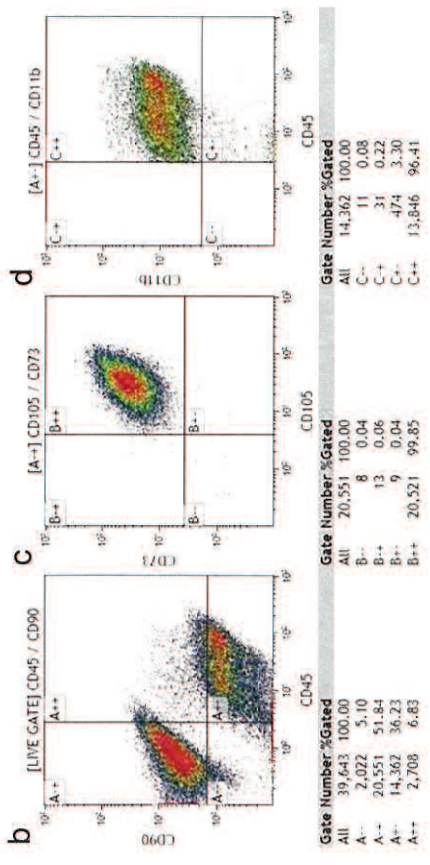
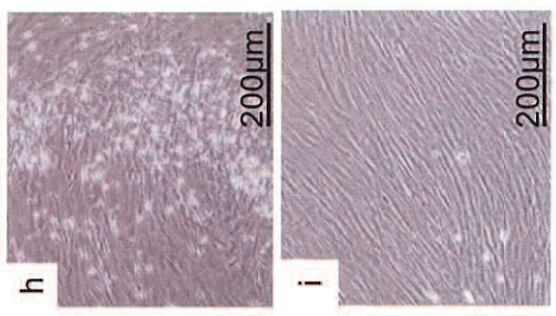
Table 1 P0細胞と比較してP2細胞において発現抑制されたCDマーカー

単球とリンパ球に関連する多くのCDマーカーの発現が抑制された。

Table 1. Down-regulated CD markers in P2 cells versus P0 cells

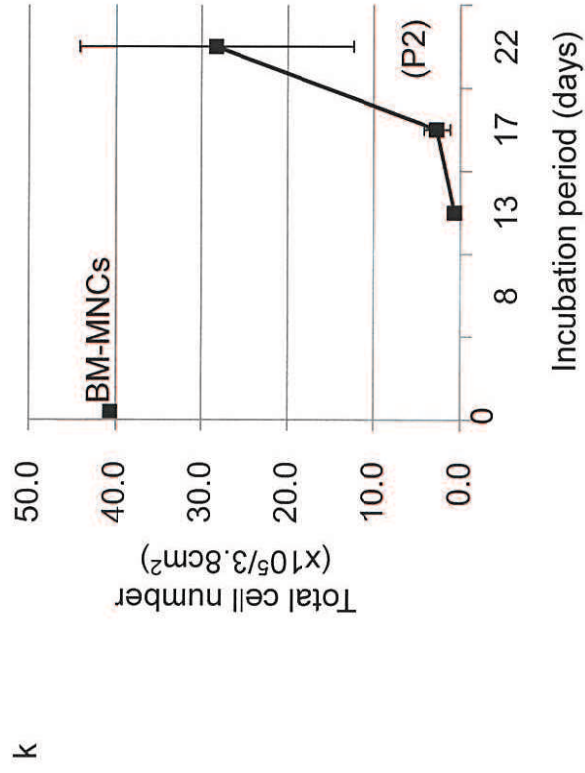
Symbol	Ratio (Log ₂)	P value	Entrez Gene ID	Type of cells
CD2	-2.937	1.63E-02	914	Subcortical/Cortical/Medullary thymocyte
CD9	-1.308	4.31E-02	928	Pre-B cell
CD14	-3.379	9.57E-03	929	Promonocyte
CD19	-2.839	3.72E-02	930	Pro-B cell, Pre-Pre-B cell, Pre-B cell, Early B cell
CD33	-4.022	1.04E-03	945	CFU-GEMM Myeloid stem cell, BFU-E, CFU-M, CFU-G, CFU-Eo, Promonocyte, Myelocyte
CD36	-3.025	1.65E-02	948	CFU-E
CD37	-3.454	2.02E-02	951	Early B cell
CD52	-4.706	3.00E-03	1043	Early B cell, Cortical/ Medullary thymocyte
CD53	-3.348	1.30E-02	963	Monocyte, B cell
CD68	-2.351	1.06E-02	968	Monocyte, DC, Granulocyte, B subset
CD74	-3.092	2.21E-03	972	Pre-B cell, Early B cell
CD82	-0.743	2.35E-02	3732	Many hematopoietic cells except RBC
CD83	-1.762	3.24E-02	9308	MatDC, Langerhans cell
CD84	-3.063	3.07E-02	8832	B cell, Monocyte, Macrophage, Platelet
CD163	-4.059	1.21E-03	9332	Monocyte, Macrophage
CD209	-3.706	6.98E-03	30835	Monocyte, Macrophage
CD302	-1.753	2.05E-02	9936	DC
CD163L1	-3.496	3.04E-02	283316	unknown
CD300A	-3.220	2.20E-02	11314	unknown
CD300C	-2.264	3.00E-03	10871	unknown



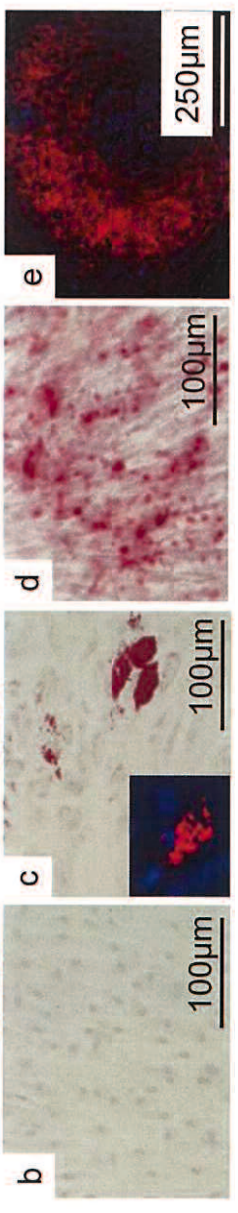
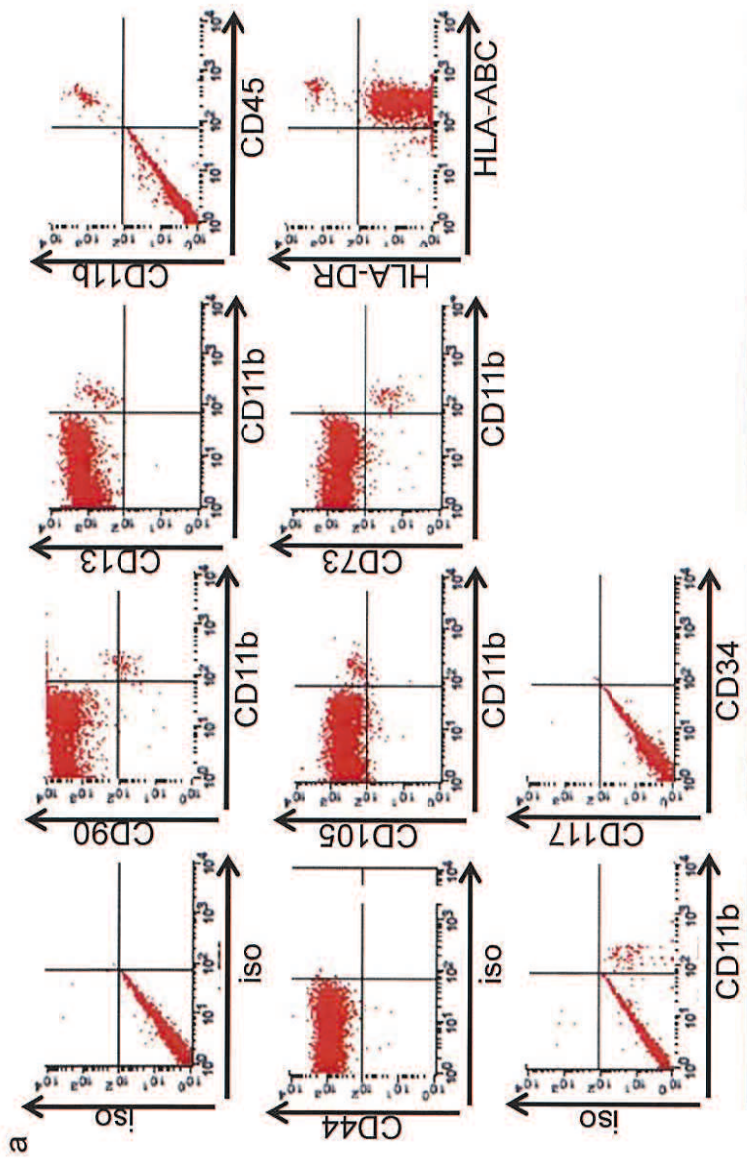


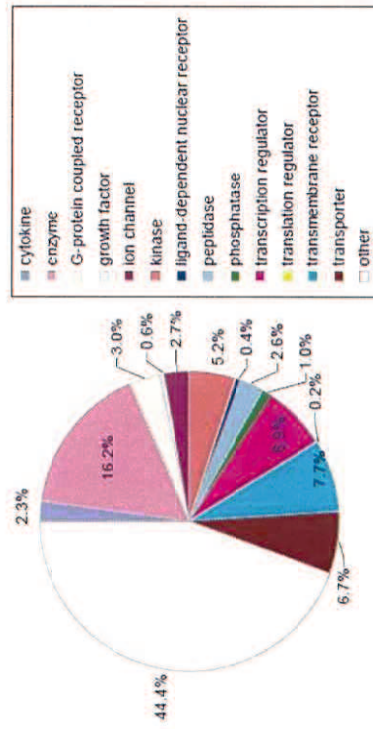
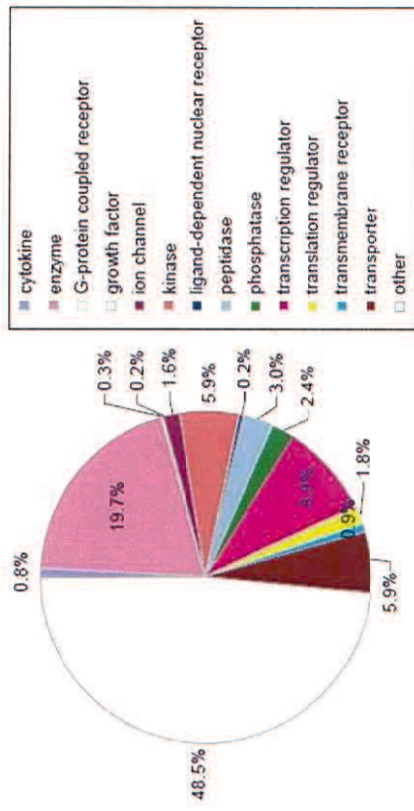
j

	P0	P2
MSC(%) (CD90+/CD105+/CD73+/CD45-) (n=4)	66.2±11.7	94.1±2.6

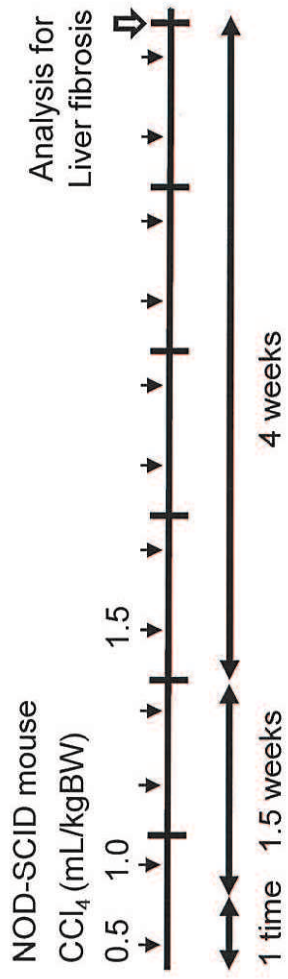


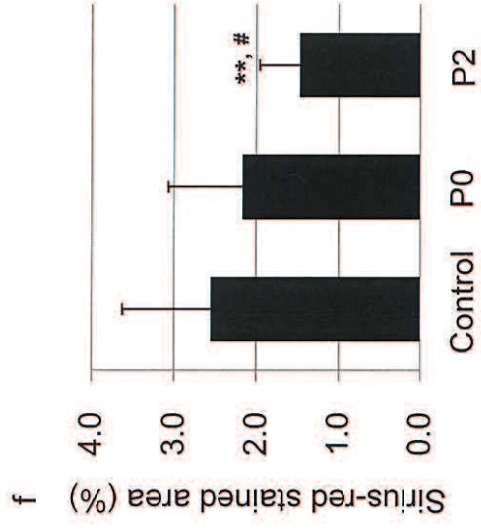
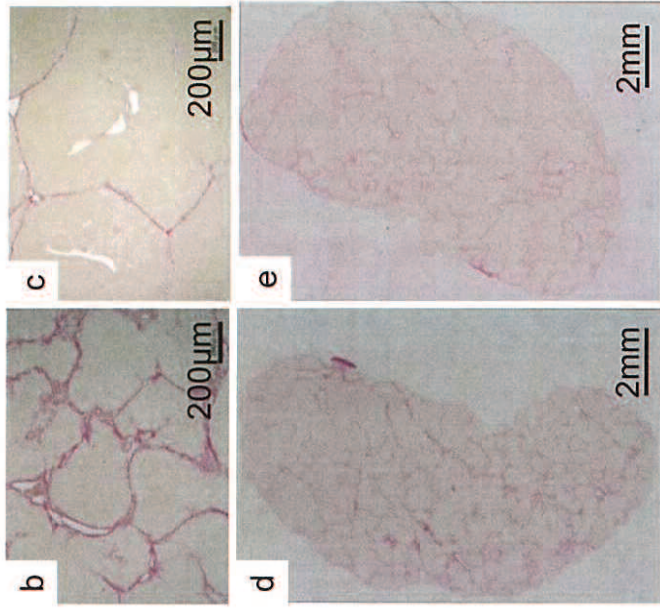
	BM-MNCs	day13 (pre passage)	day17 (1 st passage)	day22 (P2) (2 nd passage)
Alived cell number ($\times 10^5/3.8\text{cm}^2/\text{well}$) (n=5)	38.0	0.66 ± 0.31	2.7 ± 1.5	28.3 ± 15.9

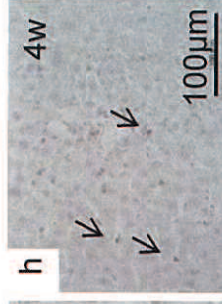
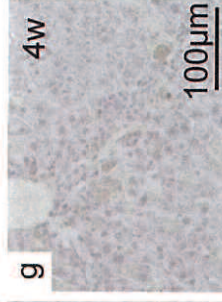
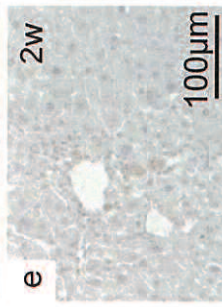
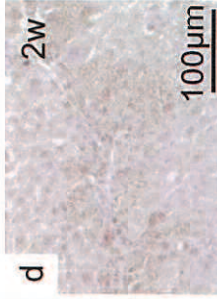
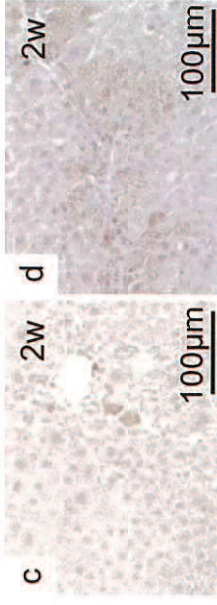
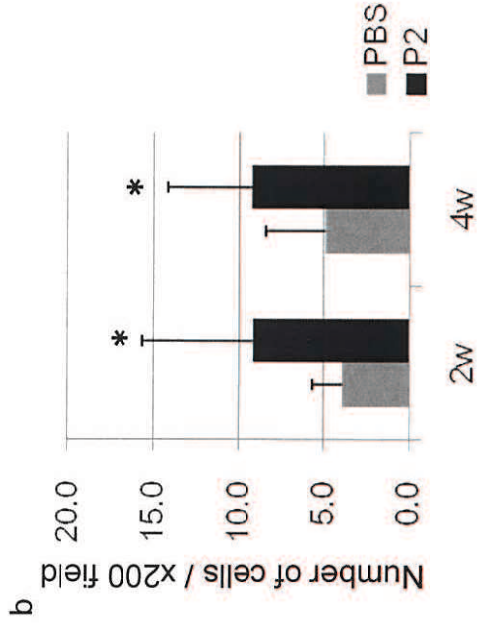
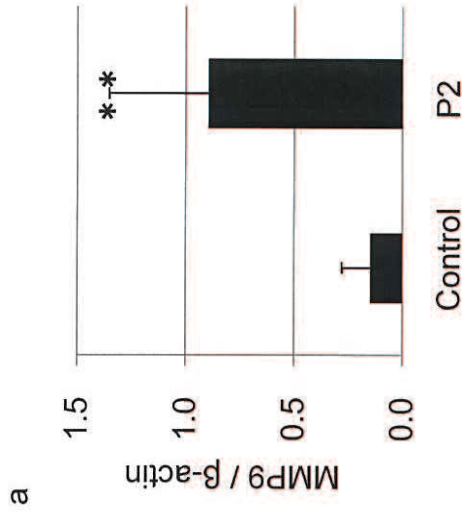


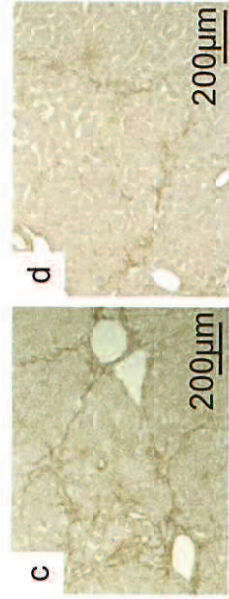
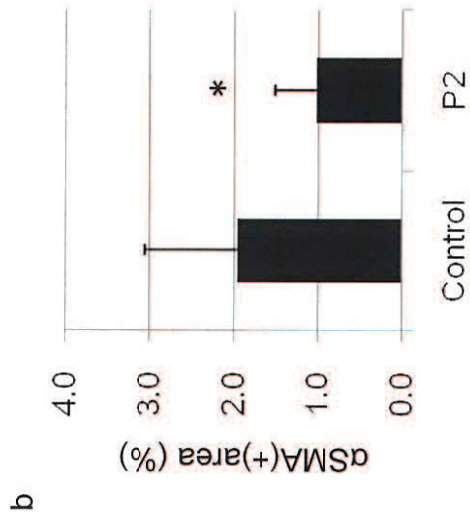
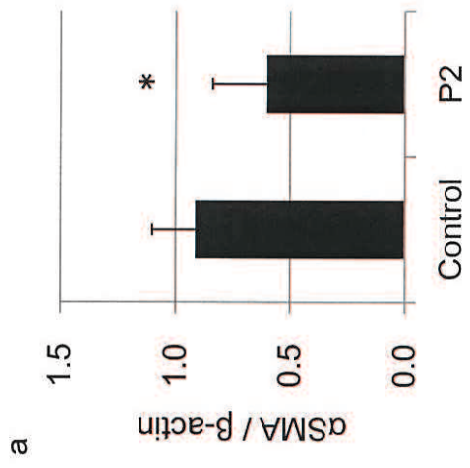


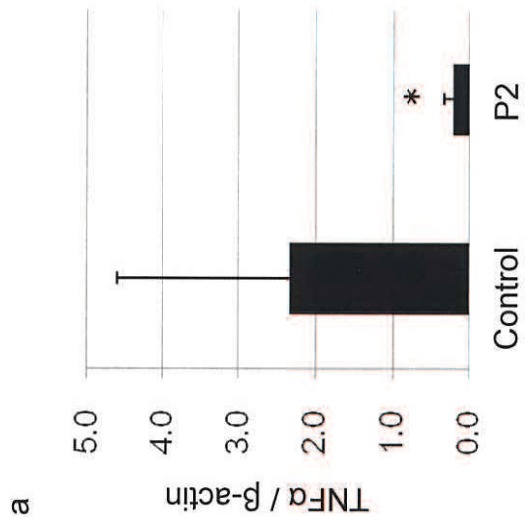
a











a

b

