

A Canine Liver Fibrosis Model to Develop a Therapy for Liver Cirrhosis

Using Cultured Bone Marrow-Derived Cells

培養骨髄由来細胞を用いた肝硬変に対する治療のための

イヌ肝線維化評価モデルの作出

氏名 松田崇史

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

消化器内科学講座

平成 29 年 11 月

目次

1.要旨	1
2.研究の背景	2
3.目的	2
4.方法	3
(1)対象	3
(2)方法	3
(3)解析	9
5.結果	9
6.考察	12
7.結語	14
8.謝辞	15
9.参考文献	15

1.要旨

【目的】我々はこれまでに、肝硬変症に対する「自己骨髄細胞投与 Autologous bone marrow cell infusion (ABMi) 療法」の臨床的有効性と安全性を多施設臨床研究で明らかにしてきた。しかしこの ABMi 療法は全身麻酔可能例に適応が限定されるため、局所麻酔で採取した少量骨髄液から培養自己骨髄間葉系幹細胞(BMSC)を末梢静脈から投与する低侵襲な肝臓再生療法を開発している。そこで今回、ヒト臨床応用にむけて四塩化炭素 (CCl₄) を用いたイヌ肝線維化評価モデルを開発し、培養自己 BMSC 投与の効果を評価した。

【方法】全身麻酔下でイヌ上腕骨より少量骨髄液を採取し、ヒト静脈留置用カテーテルをイヌの胃内に、また穿刺ポートを背中下の皮下に留置した。留置したポート・カテーテルシステムより CCl₄ 反復投与を 10 週間行い肝線維化モデルの作成を行った。10 週時点で BMSC 群とコントロール群に分け、BMSC 群には末梢静脈より $4 \times 10^5/\text{kg}$ の BMSC を投与した。両群とも、さらに 4 週間 CCl₄ 反復投与を継続した。BMSC 投与前、投与後 4 週においてエコーガイド下肝生検、インドシアニングリーン(ICG)試験、血液生化学検査などを行い、比較を行った。

【結果】BMSC 投与後 4 週では、BMSC 群ではコントロール群と比べて線維化の改善と ICG 値半減時間の短縮を認めた。また BMSC 投与後に明らかな合併症は認められなかった。

【結論】 留置したポート・カテーテルシステムを用いた CCl₄ 反復投与によりイヌ肝線維化評価モデルの開発を行った。そして同モデルで、培養自己 BMSC の末梢静脈投与は明らかな合併症なく施行でき、肝線維化に対する有効性を確認した。

2. 研究の背景

肝硬変は進行した肝線維化、再生結節として特徴づけられ、肝線維化のある慢性肝疾患に対する骨髄細胞の治療効果を証明した報告は、これまでに数多く存在している (1-3)。

われわれは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行い、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、投与細胞が MMP-9 等を産生することで肝線維化を改善することが示された (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)。

3. 目的

ABMi 療法は全身麻酔下に自己骨髄液を約 400mL 採取するため、全身麻酔可能例に適応が制限される。そこで、より重症な肝硬変症患者を救命するため、これまでの ABMi

療法を低侵襲なものへと発展させ、局所麻酔下に採取した少量の自己骨髄液から肝線維化改善効果のある骨髄間葉系幹細胞（BMSC）を体外で培養増殖し末梢静脈から投与する「低侵襲肝臓再生療法」を考案した。この培養 BMSC を用いた低侵襲肝臓再生療法のヒト臨床試験を行う前に、中大型動物を用いた培養 BMSC の有効性の評価が必要と考えられたため、本研究において、イヌ肝線維化評価モデルを作出し、培養 BMSC の末梢静脈投与の肝線維化に対する有効性を評価したので報告する。

4.方法

(1)対象

16 頭のビーグル犬（1-2 歳；8 頭雄、8 頭雌）が用いられ、ビーグル犬は山口大学動物舎で飼育された。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（承認番号 21-033）。

(2)方法

カテーテル、ポート留置

カテーテル（6-French P-U catheter; Toray, Tokyo, Japan）留置は人工呼吸管理下で行った。カテーテル先端は胃内に置き、穿刺ポート（P-U Celsite port; Toray）は背中中に作成した皮下ポケットに留置した。

イヌ BMSC 分離、培養

カテーテル留置後に、16G 骨髄穿刺針 (Angiotech, Gainesville, FL) をビーグル犬の上腕骨に刺入し、骨髄液を約 2.0mL 採取した。採取した骨髄液を T-75 フラスコ (NUNC, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) に播種し、10%ウシ胎児血清、ペニシリン (50U/ml) ストレプトマイシン (50µg/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 BMSC として継続で培養した。2 日ごと培地交換を行い、約 3 週間培養を行い、2 または 3 継代目の細胞を本研究に用いた。

フローサイトメトリー分析

BMSC の細胞表面マーカーは既報の通り (7)、フローサイトメトリー (Gallios system: Beckman Coulter, Danvers, MA) で解析した。標識抗体は、CD11b (AbD serotec, Oxford, UK) 、 CD29-PE (Abcam, Cambridge, UK)、CD44-APC (Biolegend, San Diego, CA, USA)、CD45-eFlour (ebioscience, San Diego, CA)、 CD90-APC (ebioscience) を用いた。CD11b に対しては二次抗体として DyLight 488 (Abcam) を用いた。

In vivo での BMSC の分化について

イヌ BMSC の分化能を確認するため、細胞を骨細胞分化誘導培地、脂肪細胞分化誘導培地で培養を行った (cell applications, san diego, CA, USA)。骨細胞への分化誘導のため、10mM β グリセロール (Sigma-Aldrich)、0.05mM アスコルビン酸 (Sigma-Aldrich)、100nM デキサメサゾン (Sigma-Aldrich) を添加した DMEM で BMSC を培養した。脂肪細胞への分化誘導は 60mM インドメタシン (Sigma-Aldrich)、0.5mM ヒドロコルチゾン (Sigma-Aldrich)、0.5mM イソブチルサミン (Sigma-Aldrich) を添加した DMEM で BMSC を培養した。それぞれ、週に 3 回培養液を交換し、2 週間の培養を行った。骨細胞の確認には Arizarin Red 染色 (AppliChem, Darmstadt, Germany)、脂肪細胞の確認には Oil Red O 染色 (Sigma-Aldrich) を行った。

実験モデル (線維化誘導)

四塩化炭素 (CCl_4 , Wako, Osaka, Japan) はコーンオイルと 1 : 1 で希釈し、留置ポート・カテーテルから投与した。(6 週間、高用量期、1.0mL/kg 週 1 回、0.5mL/kg 週 1 回 ; 8 週間、低用量期、0.25mL/kg、週 2 回 (Fig.1))。

実験グループ

10 週間 CCl₄ を投与した後、16 頭を 8 頭ずつ 2 群（コントロール群、BMSC 群）に分け、その時点をも 0W と定義した。コントロール群に対しては 0W からさらに 4 週間 CCl₄ を継続投与した。BMSC 群に対しては 0W に BMSC を末梢静脈から投与し、コントロール群と同様に 4 週間 CCl₄ の投与を続けた。CCl₄ 投与前、CCl₄ 投与後 10 週、CCl₄ 投与後 14 週（つまり、-10W、0W、4W）に血液検査、エコー下肝生検、インドシアニンググリーン（ICG）試験が行われた。安全性評価のために酸素飽和度、脈拍、全身状態の確認を BMSC 投与前後で行い、さらに胸腹部造影 CT（CE-CT）を BMSC 投与 30 分後に行い、肺塞栓の有無、門脈大循環シャント（PSS）の有無を評価した。

血液生化学検査

アルブミン、ALT、AST、ビリルビン、プロトロンビン活性時間、アンチトロンビン活性、FDP の測定を行った。

ICG 試験

ICG は投与直前に準備した。ゼロ値のための血液採取に続いて、0.1 mg/kg の ICG を投与し、投与 5 分、15 分、30 分後に血液採取を行った。ICG 値半減期は ICG 値メーター（Fuchu Giken, Inc., Tokyo, Japan）を用いて測定した。ICG 半減期の変化、つまり Δ ICG (min) は (4W での ICG 半減期) - (0W での ICG 半減期) で計算した。

造影 CT

胸腹部造影 CT 検査は 8 列 CT システム (ECLOS 8 Hitachi Medical Corp., Tokyo, Japan) で行われた。ビーグル犬は全身麻酔下の状態で、2mL/kg の非イオン性血管造影剤イオパミドール (Oiparomin 370; Fuji Pharmaceutical Co., Toyama, Japan) が末梢静脈から投与され、CT 撮影が行われた。

肝生検

ミデトミジン (Dorbene; Kyoritsu Seiyaku Co., Tokyo, Japan) 20 μ g/kg の筋肉注射を行った後、ビーグル犬を左側臥位の姿勢にし、16G 生検針 (Aragon medical Devices, Plano, TX) を用いてエコーガイド下で肝生検を行った。採取したサンプルは、組織染色のため 4%パラホルムアルデヒドでの固定、またマイクロアレイ解析や RT-PCR のために -80°C で凍結保存をした。

肝線維化の定量解析

4%パラホルムアルデヒドで固定した標本を 3 μ m のパラフィン切片に切り出した。肝線維化は Sirius red 染色後に、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) を用いた。Sirius red で染色された血管

は計算から除外され、線維化の面積割合を fibrosis level と定義した。△fibrosis level は (4W での fibrosis level) - (0W での fibrosis level) で計算した。

DNA マイクロアレイ解析

DNA-chip (Agilent Technology, CA, USA)、IPA ソフトウェア (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA) を用いてイヌ肝臓の遺伝子発現プロファイルを解析した。

Real-time RT PCR による mRNA の定量解析

イヌ肝線維化評価モデルの肝生検標本より、RNeasy Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) を用いて、total RNA を抽出し、cDNA は Taqman reverse transcription reagents (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) をマニュアルの通り用いて合成した。Real-time RT PCR は、SYBR Green を用いて、Step One Plus real-time PCR system (Life Technologies) で行った。Primer は以下を用いた: *Canine collagen, type1, alpha2 (COL1A2)* primers: sense (5'-CCCAGCCAAGAAGACTGGTACAGAA-3'), antisense (5'-CGCATGAAGGCGAGTTGAGTAG-3'); *Canine collagen, type3, alpha1 (COL3)* primers: sense (5'-CATCTCGGCACAGCAGCAA-3'), antisense (5'-CAGATCCTGAGTCACAGACGCATA-3'); *Canine tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1)* primers: sense

(5'-TTCACCAAGACCTATGCTGCTGCTG-3'), antisense
(5'-AGTTGCATATCCCTGGCTCTC-3'); *Canine endothelin receptor type A (EDNRA)*
primers: sense (5'-ATCGGTATTAACCTGGCAACCATGA-3'), antisense
(5'-GGACTGGTAACAGCAACAGCAGAG-3'); *Canine endothelin receptor type B*
(*EDNRB*) primers: sense (5'-CATGCGAAACGGCCCTAATATC-3'), antisense
(5'-GGCACCAGCTTACACATCTCCA-3'); and *Canine ribosomal protein 18* primers:
(5'-ATAGCCTTTGCCATCACAGCAATTAA-3'), antisense
(5'-TTGGTGAGATCGATGTCTGCTTTC-3')。

(3) 統計解析

Student's t-test、paired t-test を用いて、 $p < 0.05$ を有意差ありと評価した。データは平均値±標準偏差で示した。

5. 結果

細胞形態

本研究で使用した細胞は、通常培養皿に接着し、線維芽細胞様の形態であった。培養細胞はフローサイトメトリーで、CD29、CD44、CD90 が陽性で CD45、CD11b が陰性であった (Fig.2)。また脂肪細胞、骨芽細胞への分化も認められ、BMSC の特徴に一

致した (Fig.3)。

線維化の評価

0W において線維性の架橋形成や、偽小葉が認められた。コントロール群では fibrosis level は $10.9 \pm 4.2\%$ (0W) から $11.6 \pm 4.1\%$ (4W) へ増加していたが、一方で、BMSC 群では $9.2 \pm 2.9\%$ (0W) から $7.2 \pm 3.5\%$ (4W) へ有意な減少を認め ($p < 0.05$) (Fig.4a,b)。さらに 4W において、BMSC 群ではコントロール群に比べて fibrosis level は有意に低値だった ($p < 0.05$) (Fig.4c)。 Δ fibrosis level はコントロール群では $0.7 \pm 0.8\%$ で、BMSC 群では $-2.1 \pm 1.1\%$ だった ($p < 0.05$) (Fig.4d)。

ICG 試験

ICG 半減期に関しては、コントロール群では 14.9 ± 4.1 分 (0W) から 16.8 ± 5.3 分 (4W) へ延長したが、BMSC 群では 13.4 ± 2.2 分 (0W) から 12.4 ± 2.2 分 (4W) へわずかに短縮を認めた。 Δ ICG はコントロール群で 1.9 ± 0.7 分、BMSC 群で -1.0 ± 0.3 分だった (Fig.4d,f)。

血液生化学検査

4W において、ALT、アンチトロンビン 3 は BMSC 群の方がコントロール群に比べ

て有意に低かった。AST、ビリルビン、プロトロンビン活性時間、FDP は両群間で有意な変化は認められなかった。

肝線維化関連遺伝子の発現

K-means クラスタリング解析で、BMSC 群 (0W、4W) 、コントロール群 (0W、4W) の遺伝子発現量の変動パターンを調べたところ、BMSC 群 4W で発現レベルの低下を示す遺伝子群を認めた。BMSC 群 4W で発現レベルが低下した遺伝子群の中で肝線維化に関わるものとしては、*EDNRA*、*EDNRB*、*COL1A2* などが含まれていた。これらの遺伝子について、BMSC 群、コントロール群それぞれでの変化の推移 (Cont-0W を分母にした発現比 (\log_2 ratio) について Cont-0W、Cont-4W、BMSC-0W、BMSC-4W の順に並べてグラフ化したもの) を Fig.5a に示した。

さらに-10W、0W、4W での *COL1A2*、*COL3*、*TIMP-1*、*EDNRA*、*EDNRB* の mRNA 発現を解析した。両群ともに全ての遺伝子に関して、0W では-10W に比べて著明に高値だった。コントロール群 4W ではコントロール群 0W に比べて、*COL1A2*、*COL3*、*EDNRA* の発現が高値だった ($p < 0.05$)。また BMSC 群 4W ではコントロール 4W に比べて、*COL1A2*、*COL3*、*TIMP-1*、*EDNRA*、*EDNRB* の発現は低値だった ($p < 0.05$) (Fig.5b)。

6. 考察

本研究ではイヌ肝線維化評価モデルを作成し、培養自己 BMSC の末梢静脈投与の有効性を示した。投与した細胞は、細胞形態や分化能の結果から、MSC に矛盾しないものであった (8)。また表面抗原マーカーに関して、イヌの MSC は CD29、CD44、CD90 が陽性で (9-11)、CD34 や CD45 が陰性と報告されており (12)、我々の使用した細胞でも同様の結果が得られた。

当初、我々は CCl₄ の反復経口投与を行うことで、イヌの肝線維化誘導を試みた。しかし、肝線維化の作出には 20 週以上を要することや、CCl₄ の刺激臭によりイヌへの安定した経口投与が難しいことが判明した。これらの問題をクリアするため、カテーテル、ポートを皮下に埋め込み、ポートから CCl₄ を投与する方法を考案した。この方法では、6 週間にわたり高容量の CCl₄ を投与し高度の肝障害を起こし、その後、肝臓の炎症を維持するために低用量の CCl₄ を投与した。CCl₄ を投与し 10 週、つまり 0W の時点で、全てのイヌの肝臓で線維性架橋形成が確認できたが、線維化の程度は個体差が認められた。CCl₄ は肝臓の CYP2E1 で代謝される際に生じるトリクロロメチルラジカルによって肝毒性を生じる。個体差の原因としては、この CYP2E1 の遺伝子の変異が疑われ、Lankford らは、ビーグル犬の 19% で CYP2E1 の遺伝子にアミノ酸変異を伴う塩基配列の置換を認めたと報告している (13)。本研究に用いた犬の中に CYP2E1 の遺伝子の変

異が生じていたため、CCl₄による肝障害が起こりにくい個体が存在したため、線維化の程度に個体差が生じたことが推測された。今後は、個体差を減らすために同腹仔を実験に用いるべきだと考える。

我々は肝機能評価のために ICG 試験を行った。ICG 試験は、1961 年に報告されて以来 (14)、肝機能と肝血流の評価のために行われている。Boothe らは進行した肝疾患をもつイヌで、ICG の体内動態が肝機能の評価に有用であることを証明した (15)。門脈大循環短絡路 (PSS) を持つ症例では、ICG 試験の結果は、本来の肝機能の値よりも増悪する可能性がある (16,17)。イヌにおける造影 CT での PSS の検出感度は 96% と報告され (18)、本研究では CCl₄ 投与後に造影 CT で PSS が存在しないことを確認しており、ICG 半減期の延長は肝機能の低下を表しているといえる。

また、我々の作出したイヌ肝線維化評価モデルでは、血液生化学検査と PT 活性時間については著明な増悪は認められなかった。Boothe らの報告では、dimethylnitrosamine で誘導したイヌの肝障害において、軽度な肝障害の群と重度な肝障害の群の比較では、血液検査では大きな差が認められず、進行した肝障害では ICG 試験が適切な評価法だと提案しており (15)、我々もイヌ肝線維化評価モデルでの肝機能の評価には ICG 試験が有用であると考えている。

本研究で我々が検討した肝線維化関連遺伝子 (COL1A2、COL3、TIMP-1、EDNRA、EDNRB) の発現は、4W の時点でコントロール群に比べて BMSC 群で低値だった。イ

ヌの肝線維化関連遺伝子の発現について、Kanemotoらは、肝組織での線維化の程度と相関することを報告している(19)。また肝硬変ラットでは、EDNRAとEDNRBの高い発現が肝星細胞で認められており(20)、本研究において4Wの時点でコントロール群に比べてBMSC群ではEDNRAとEDNRBの発現は明らかに低く、これは線維化の程度と矛盾しない結果だった。

MSCが線維化を改善するメカニズムはまだ明確になっていないが、MSCの抗線維化作用はMSCから分泌されるtrophic factorsやサイトカインによるとの報告が散見される(21,22)。また多くの報告で、MSCは末梢静脈から投与され、その多くが肺にトラップされていることが認められている(23-26)。肺でのMSCのトラップを回避することが、肝線維化に対してさらなる治療効果をもたらす可能性があり、今回作出したイヌ肝線維化評価モデルを用いて、BMSCの投与経路別(末梢静脈投与、肝動脈投与)に比較することが、今後重要であると考えられる。

7. 結語

我々はビーグル犬にポート、カテーテルを留置し、そのシステムを用いて10週間にわたり CCl_4 を投与し、イヌ肝線維化評価モデルを作出した。さらに同モデルに対して、培養自己BMSCの末梢静脈投与を行い、その肝線維化に対する有効性を確認した。

8.謝辞

本論文の一部は、再生医療の実現化ハイウェイ、科学技術振興機構補助金(JST)、日本医療研究開発機構(AMED)研究費によります。

9.参考文献

1. Cho KA, Ju SY, Cho SJ, Jung YJ, Woo SY, Seoh JY, et al. Mesenchymal stem cells showed the highest potential for the regeneration of injured liver tissue compared with other subpopulations of the bone marrow. *Cell Biol Int* 2009;33:772-777.
2. Hardjo M, Miyazaki M, Sakaguchi M, Masaka T, Ibrahim S, Kataoka K, et al. Suppression of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by transplantation of a clonal mesenchymal stem cell line derived from rat bone marrow. *Cell Transplant* 2009;18:89-99.
3. 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):104-111.
4. Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, et al. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into

- functional hepatocytes. *J Biochem* 2003;134:551-558.
5. Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, et al. 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, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006;24:2292-2298.
 7. Quintanilha LF, Takami T, Hirose Y, Fujisawa K, Murata Y, Yamamoto N, et al. Canine mesenchymal stem cells show antioxidant properties against thioacetamide-induced liver injury in vitro and in vivo. *Hepatol Res* 2014;44:E206-217.
 8. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-317.
 9. Iwata T, Yamato M, Zhang Z, Mukobata S, Washio K, Ando T, et al. Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use. *J Clin Periodontol* 2010;37:1088-1099.

10. Orciani M, Marigliò MA, Morabito C, Di Benedetto G, Di Primio R. Functional characterization of calcium-signaling pathways of human skin-derived mesenchymal stem cells. *Skin Pharmacol Physiol* 2010;23:124-132.
11. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* 2004;19:1450-1456.
12. Takemitsu H, Zhao D, Yamamoto I, Harada Y, Michishita M, Arai T. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Vet Res.* 2012;8
13. Lankford SM, Bai SA, Goldstein JA. Cloning of canine cytochrome P450 2E1 cDNA: identification and characterization of two variant alleles. *Drug Metab Dispos* 200;28:981-986.
14. Caesar J, Shaldon S, Chiandussi L, Guevara L, Sherlock S. The use of indocyanine green in the measurement of hepatic blood flow and as a test of hepatic function. *Clin Sci* 1961;21:43-57.
15. Boothe DM, Brown SA, Jenkins WL, Green RA, Cullen JM, Corrier DE. Indocyanine green disposition in healthy dogs and dogs with mild, moderate, or severe dimethylnitrosamine-induced hepatic disease. *Am J Vet Res*

1992;53:382-388.

16. Nanashima A, Yamaguchi H, Shibasaki S, Morino S, Ide N, Takeshita H, et al. Relationship between indocyanine green test and technetium-99m galactosyl serum albumin scintigraphy in patients scheduled for hepatectomy: Clinical evaluation and patient outcome. *Hepatol Res* 2004;28:184-190.
17. Nagino M, Nimura Y, Kamiya J, Kondo S, Uesaka K, Kin Y, et al. Changes in hepatic lobe volume in biliary tract cancer patients after right portal vein embolization. *Hepatology* 1995;21:434-439.
18. Kim SE, Giglio RF, Reese DJ, Reese SL, Bacon NJ, Ellison GW. Comparison of computed tomographic angiography and ultrasonography for the detection and characterization of portosystemic shunts in dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 2013;54:569-574.
19. Kanemoto H, Ohno K, Sakai M, Takahashi M, Fujino Y, Tsujimoto H. Expression of Fibrosis-related genes in canine chronic hepatitis. *Vet Pathol.* 2011;48:839-845.
20. Yokomori H, Oda M, Ogi M, Kamegaya Y, Tsukada N, Nakamura M, et al. Enhanced expression of endothelin receptor subtypes in cirrhotic rat liver. *Liver.* 2001;21:114-122.

21. Tolar J, Le Blanc K, Keating A, Blazar BR. Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*. 2010;28:1446-1455.
22. Adas G, Arikan S, Karatepe O, Kemik O, Ayhan S, Karaoz E, et al. Mesenchymal stem cells improve the healing of ischemic colonic anastomoses (experimental study). *Langenbecks Arch Surg* 2011;396:115-126.
23. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol*. 2012;3.
24. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev* 2009;18:683-692.
25. Assis AC, Carvalho JL, Jacoby BA, Ferreira RL, Castanheira P, Diniz SO, et al. Time-dependent migration of systemically delivered bone marrow mesenchymal stem cells to the infarcted heart. *Cell Transplant*. 2010;19:219-230.
26. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 2003;108:863-868.

Figure1. 実験プロトコール

留置した皮下ポート・カテーテルシステムから 14 週間、ビーグル犬に四塩化炭素を投与した(6 週間、高用量期、1.0mL/kg 週 1 回、0.5mL/kg 週 1 回 ; 8 週間、低用量期、0.25mL/kg、週 2 回)。四塩化炭素を投与して 10 週(つまり 0W) の時点で、ビーグルをコントロール群と BMSC 群の 2 群に分けた。コントロール群では低用量の四塩化炭素投与をさらに 4 週間継続した。BMSC 群では、10 週の時点で培養した自己 BMSC (4×10^5 /kg) を末梢静脈から投与し、低用量の四塩化炭素投与をさらに 4 週間継続した。両群で血液生化学検査、ICG 試験、エコー下肝生検を四塩化炭素投与前、0W、4W に行った。

Figure2. BMSC の表面抗原マーカー

投与した BMSC の表面抗原マーカーは CD45、CD11b が陰性で CD44、CD29、CD90 が陽性だった。

Figure3. BMSC の形態、分化能

(a) BMSC はプラスチックに接着し、線維芽細胞様の形態を呈していた。分化能の評価は、骨分化誘導培地、脂肪分化誘導培地を用いて、(b) Arizarin Red 染色、(c) Oil-red O 染色で評価した。

Figure4.

(a) コントロール群では fibrosis level は $10.9 \pm 4.2\%$ (0W) から $11.6 \pm 4.1\%$ (4W) へ増加していた。(b) 一方で、BMSC 群では $9.2 \pm 2.9\%$ (0W) から $7.2 \pm 3.5\%$ (4W) へ有意な減少を認めた ($p < 0.05$)。(c) BMSC 群での 4W ($7.2 \pm 3.5\%$) はコントロール群での 4W ($9.2 \pm 2.9\%$) に比べて fibrosis level は有意に低値だった ($p < 0.05$)。(d) Δ fibrosis level はコントロール群では $0.7 \pm 0.8\%$ で、BMSC 群では $-2.1 \pm 1.1\%$ だった ($p < 0.05$)。(e) ICG 半減期に関しては、BMSC 群では 13.4 ± 2.2 分 (0W) から 12.4 ± 2.2 分 (4W) へ有意に短縮を認めた ($p < 0.05$)。また 4W 時点では BMSC 群はコントロール群 (16.8 ± 5.3 分) と比べ、ICG 半減時間は有意に短かった ($p < 0.05$)。(f) Δ ICG はコントロール群で 1.9 ± 0.7 分、BMSC 群で -1.0 ± 0.3 分だった。

Figure5. 肝線維化関連遺伝子

(a) マイクロアレイ解析 (コントロール群 $n=3$ 、BMSC 群 $n=3$)

BMSC 群では *COL1A2*, *EDNRA*, *EDNRB* の発現が 0W に比べて 4W で有意に減少していた。これらの遺伝子について、BMSC 群、コントロール群それぞれでの変化の推移 (Cont-0W を分母にした発現比 (\log_2 ratio) について Cont-0W、Cont-4W、BMSC-0W、BMSC-4W の順に並べてグラフ化したもの) を示した。

(b) RT-qPCR (コントロール群 n= 8、BMSC 群 n=6)

コントロール群 4W ではコントロール群 0W に比べて、*COL1A2*、*COL3*、*EDNRA* の発現が高値だった ($p < 0.05$)。また BMSC 群 4W ではコントロール 4W に比べて、*COL1A2*、*COL3*、*TIMP-1*、*EDNRA*、*EDNRB* の発現は低値だった ($p < 0.05$)。

Figure 1

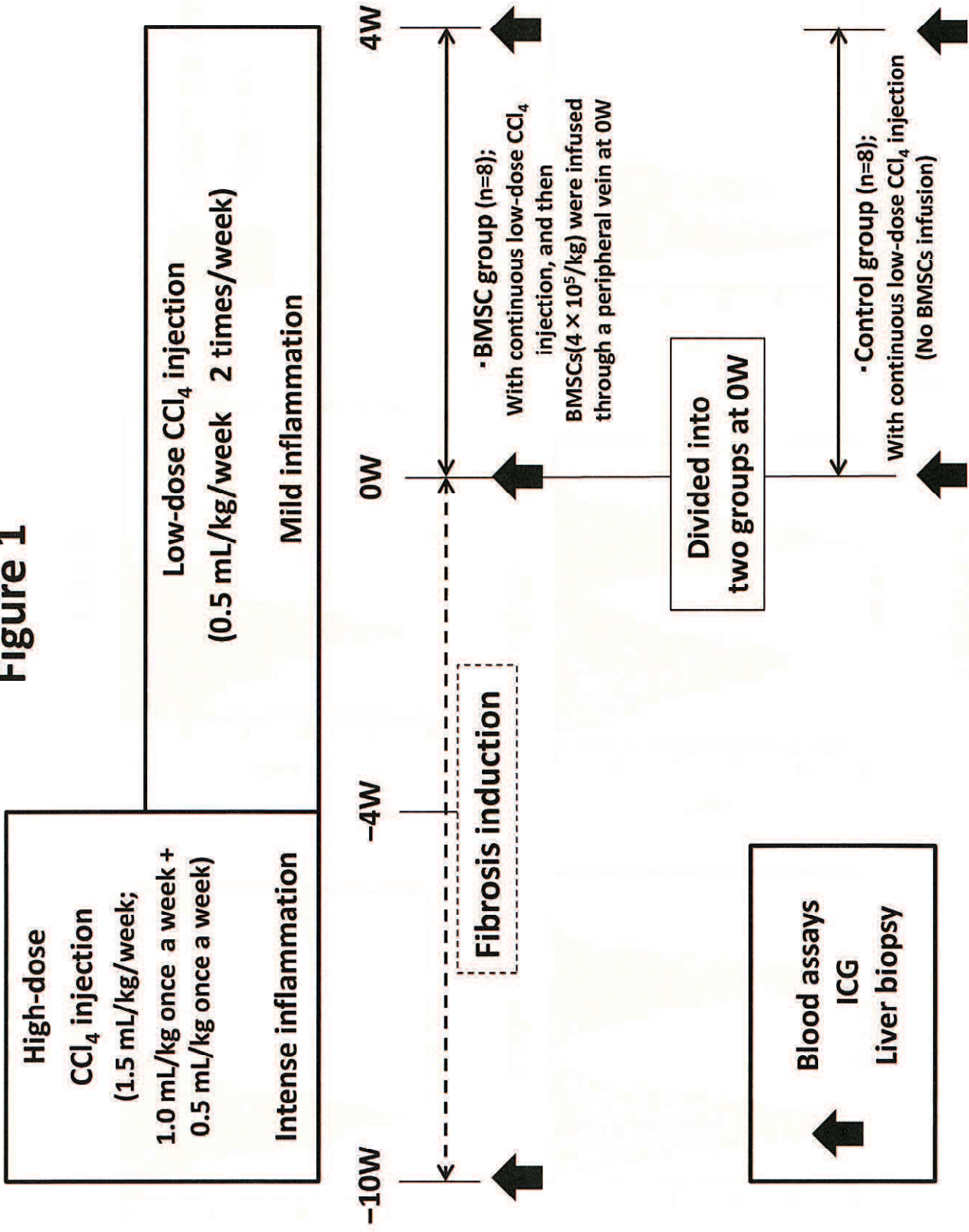


Figure 2

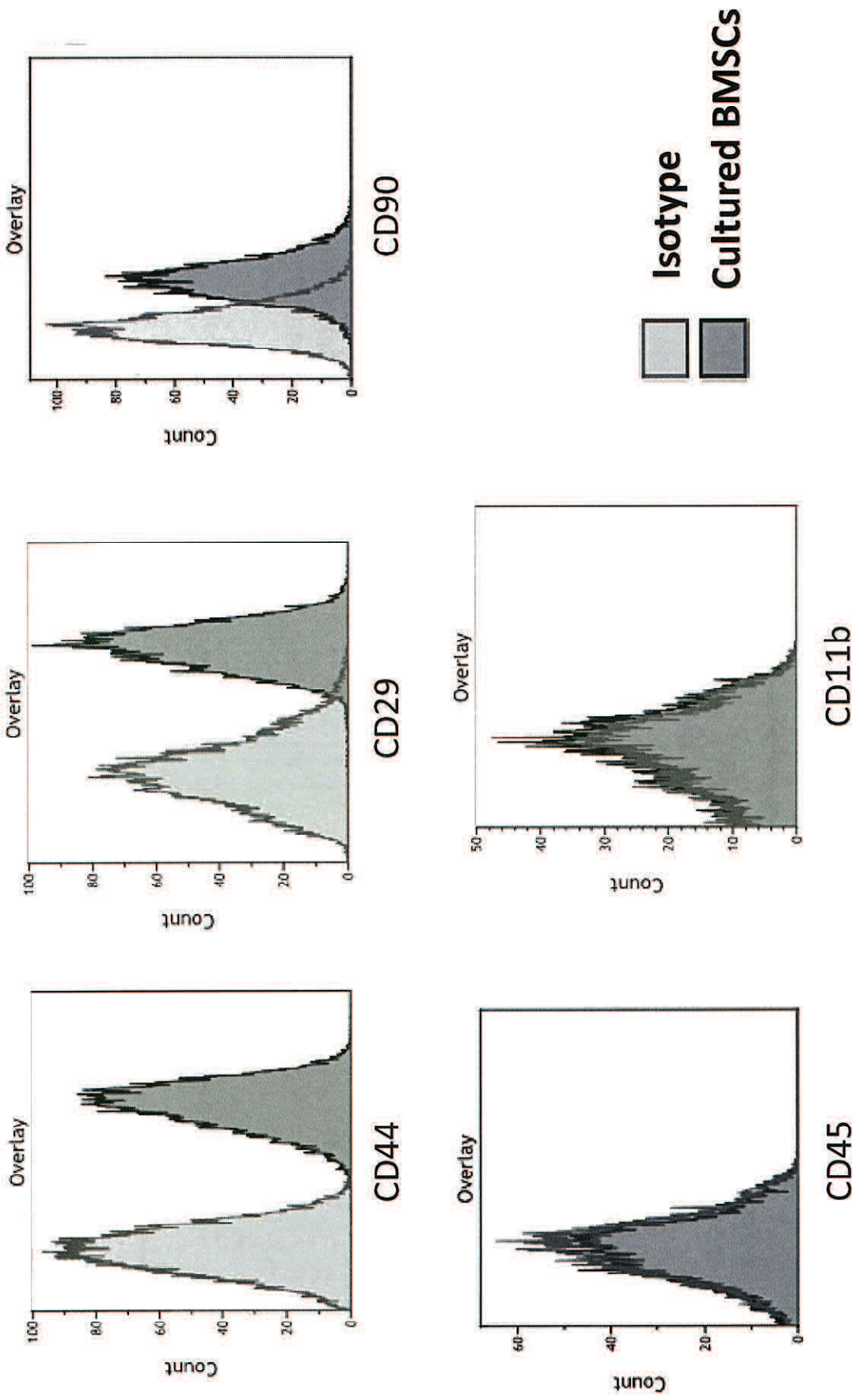


Figure 3

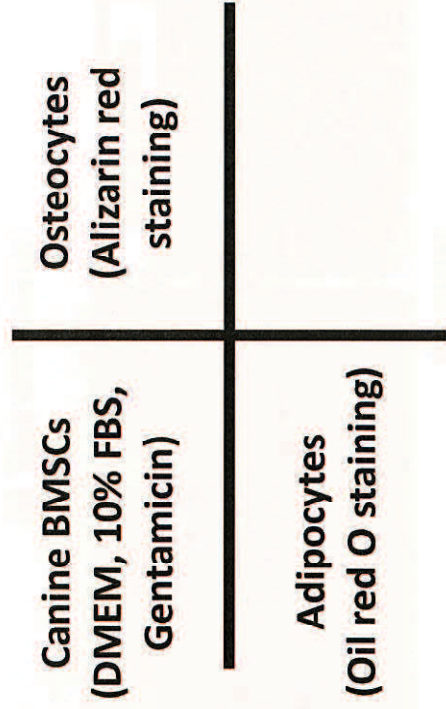
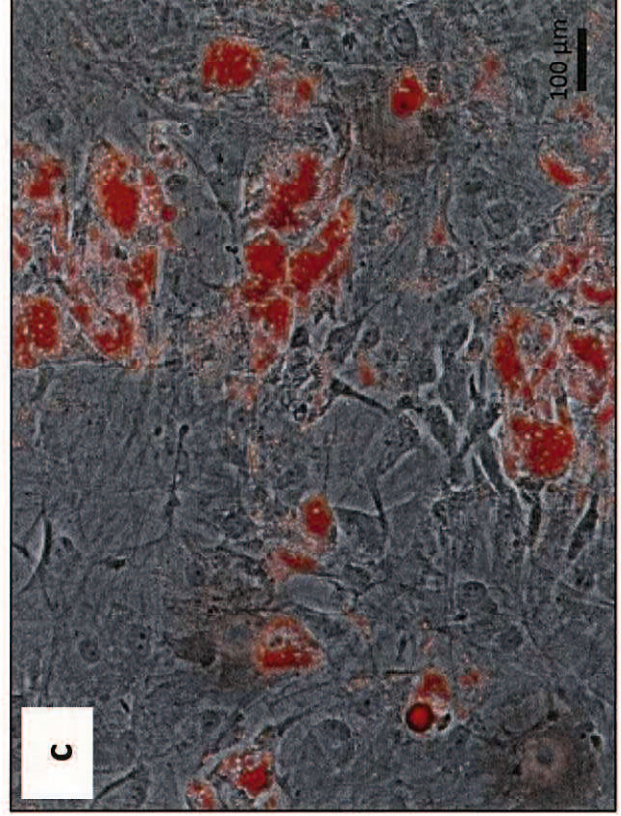
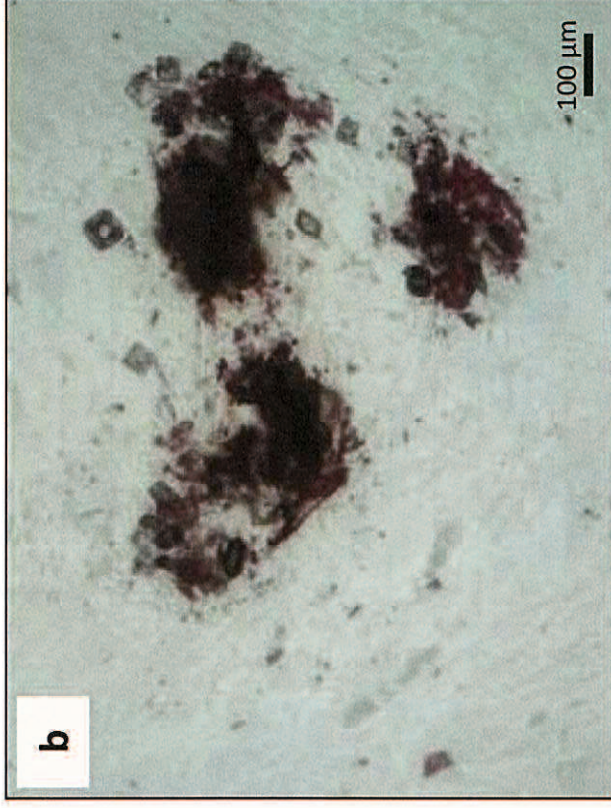


Figure 4

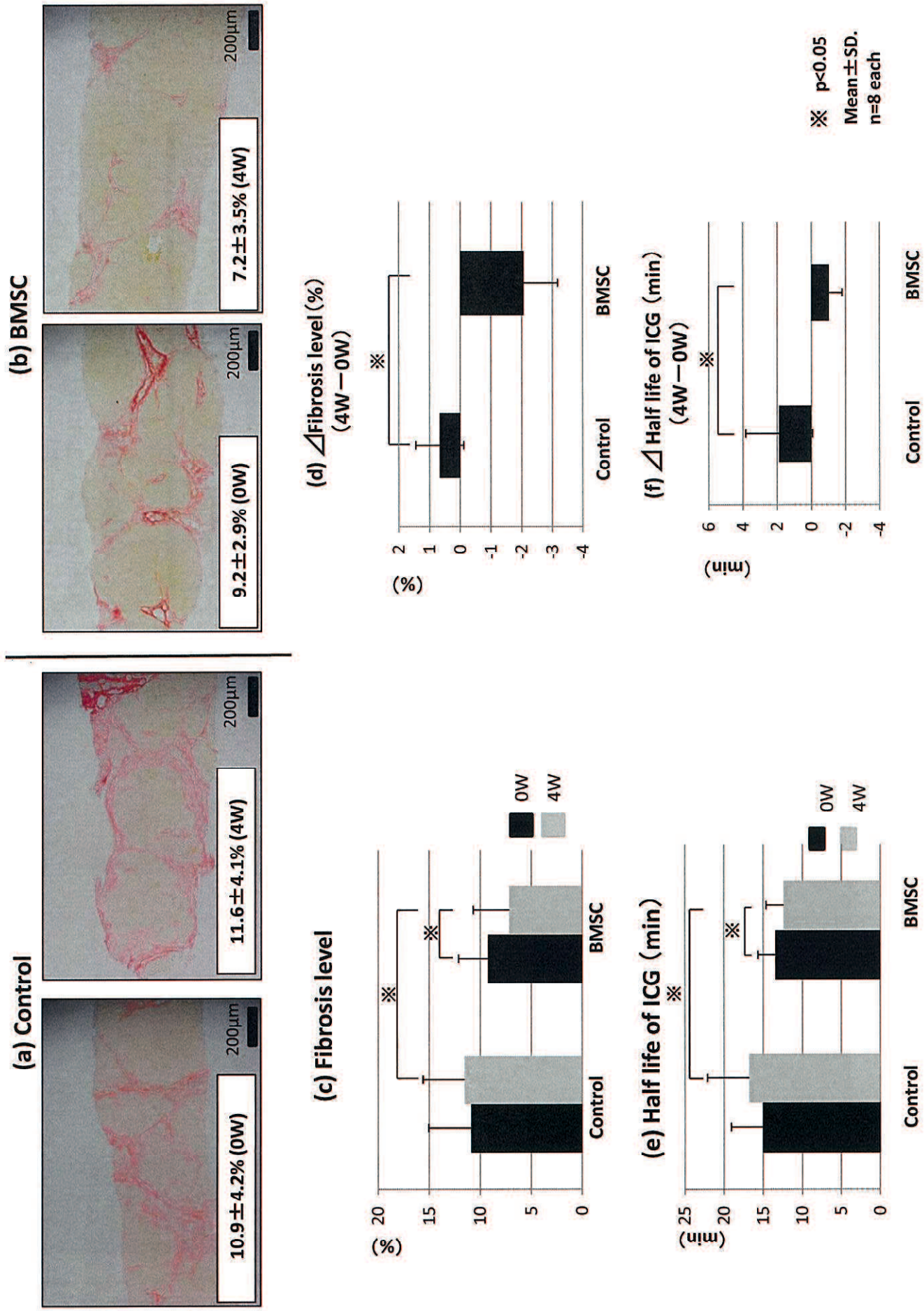
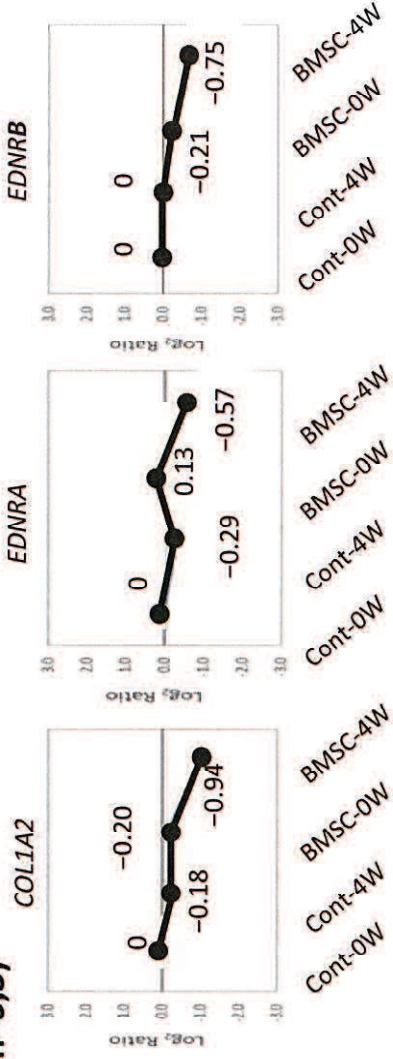


Figure 5

(a) Analyses of microarray data (Control, BMSC; n=3,3)

Gene Name	Log ₂ Ratio	p-value
Collagen, type I, alpha2 (COL1A2)	-0.80	<0.05
Endothelin receptor typeA (EDNRA)	-0.30	<0.01
Endothelin receptor typeB (EDNRB)	-0.60	<0.05



(b) Real time quantitative PCR (Control, BMSC; n=8,6: 2samples from each biopsy tissue)

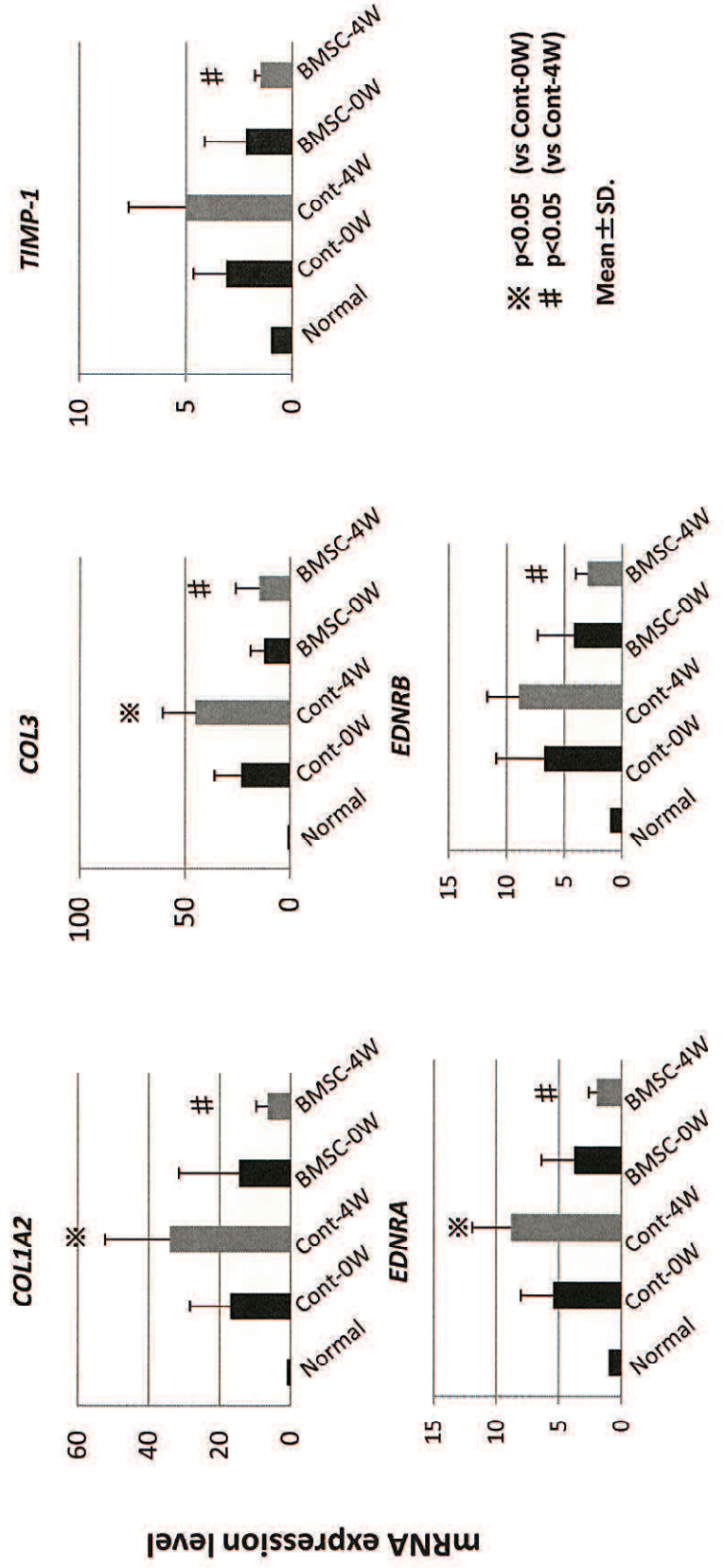


Table 1. Clinical laboratory tests

	Normal range	Control (n=8)		BMSC (n=8)	
		0W	4W	0W	4W
AST (U/L)	18 to 53	49.3 ± 26.0	71.3 ± 36.4	48.0 ± 26.3	39.7 ± 16.3
ALT(U/L)	20 to 109	307.3 ± 197.4	522.3 ± 344.8	134.7 ± 61.2	142.3 ± 89.6*
Bil (mg/dL)	0.0 to 0.1	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1
Alb (g/dL)	2.5 to 3.5	2.5 ± 0.2	2.5 ± 0.2	2.7 ± 0.2	2.8 ± 0.1*
PT (sec)	6.1 to 9.6	8.4 ± 1.0	8.5 ± 1.2	7.5 ± 0.5	7.4 ± 0.9
AT3 (%)	116 to 161	111.0 ± 17.1	102.4 ± 14.0	111.1 ± 12.2	118.6 ± 10.5*
FDP (µg/mL)	<5.0	2.1 ± 1.4	2.9 ± 1.5	2.0 ± 0.7	3.9 ± 4.3

NOTE; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine transaminase; Bil, bilirubin; Alb, albumin; PT, prothrombin time; AT3,

antithrombin3; FDP, fibrin degradation products; BMSC, bone marrow-derived mesenchymal stem cells. データは平均値±標準偏差で示し

た。4W において、ALT、AT3 は BMSC 群の方がコントロール群に比べて有意に低く (*<0.05)、Alb は有意に高かった (*<0.05)。