

**Evaluation of the Effects of Cultured Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Infusion  
on Hepatocarcinogenesis in Hepatocarcinogenic Mice With Liver Cirrhosis**

(マウス肝発癌肝硬変モデルにおける培養骨髄間葉系幹細胞投与の肝発癌に対する影響評価)

氏名 松浦 桂司

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 消化器内科学分野

令和元年 6 月

## 目次

1. 要旨	1
2. 緒言	2
3. 方法	4
(1) 動物	4
(2) 薬剤投与	4
(3) 細胞	5
(4) 組織学および免疫組織化学的検査	6
(5) 血液検査	7
(6) 統計学的解析	7
4. 結果	8
(1) BMS C投与は肝発癌・増殖機構への影響を与えない	8
(2) BMS C投与には抗線維化作用とALT低下作用がある	9
(3) BMS C投与はTAMへの影響を与えない	9
(4) BMS Cは末梢静脈投与2週間後には肝内に存在しない	10
(5) 実験の再現性の確認	10
5. 考察	11
6. 結語	14
7. 謝辞	15
8. 参考文献	15

## 要旨

【目的】肝移植は非代償性肝硬変症に対する唯一の根治的な治療法とされている。しかしながら、様々な制限のため肝移植を受けることのできない人も多い。そのため、肝移植によらない治療法として肝再生療法が必要とされている。少量の自己骨髄液から骨髄由来間葉系幹細胞(bone marrow mesenchymal stem cell: BMSC)を培養し末梢静脈から投与する「低侵襲肝臓再生療法」を実施し、その肝発癌における影響についてマウスモデルを用いて評価した。

【方法】生後 2 週オス C57BL/6 マウスに *N*-nitrosodiethylamine (DEN)を腹腔内単回投与し、生後 6 週より四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)を週 2 回腹腔内投与することで肝発癌肝硬変マウスモデルを作成し、10 週からマウス同種同系 GFP 陽性 BMSC(1.0×10<sup>6</sup>/body)を 2 週に 1 回、計 5 回投与し、BMSC 頻回投与が肝発癌に与える影響を評価した。

【結果】組織学的評価では foci および腫瘍のいずれも発生率、個数、平均サイズに有意差は認められなかった。その一方で BMSC 投与群では有意な線維化と肝障害の抑制が認められた。

【考案】高発癌肝硬変状態であっても BMSC 投与は発癌を促進させることはなかったことから、ヒト非代償性肝硬変症への自己 BMSC 投与は安全かつ有効な治療法になりうることが示唆された。

## 緒言

非代償性肝硬変症において肝炎ウイルスが制御されたとしても、肝線維化や肝発癌等により十分な生命予後の改善が得られないことが知られている[1]。このため、肝炎ウイルス排除後であっても抗線維化および発癌抑制効果を兼ね備えた肝臓再生療法が必要と考えられる。2000年に Theise らが、男性ドナーから骨髄移植を施行した血液疾患女性患者の剖検例において、慢性炎症があった肝臓及び消化管組織内に Y 染色体陽性細胞を確認したとの報告から、骨髄細胞中には多分化能を有する幹細胞が存在することが示唆された[2]。これ以降、肝臓再生療法に用いる細胞源として骨髄（幹）細胞が注目され、基礎・臨床研究が進められている。この報告に着想を得て、我々は2003年より自己骨髄細胞投与療法 (autologous bone marrow infusion therapy: ABMi therapy)を開発し、肝硬変症に対する有効性を報告してきた[3,4]。しかしながら、ABMi療法では十分量の骨髄(約400mL)の採取に全身麻酔が必要であり、対象が限られることが問題となっている。非代償性肝硬変症患者には全身麻酔が困難な患者も多く、このような治療が実施できない症例も多い。

骨髄単核球分画(Bone marrow mononuclear cell: BMNC)は様々な細胞が混成した集団であり[5]、その中でも間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)、造血幹細胞(hematopoietic stem cell; HSC)、血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: EPC)は様々な臓器で再生に寄与する可能性が報告されている[6-8]。いずれの細胞が肝再生に最も有効であるかは未解明の問題だが、採取した骨髄細胞を培養して増殖させることにより、

局所麻酔で施行可能な程度の少量の骨髄採取で治療が可能となる。培養したヒト骨髄の単核球分画は CD73 および CD90 が強陽性、CD45 および CD11b が陰性となり、ほとんどが MSC であると考えられている[9]。そこで我々は培養自己骨髄 MSC を用いた低侵襲な肝再生療法の研究を進めてきた。骨髄由来 MSC(BMSC)は肝臓再生に寄与すると考えられており、これまでに BMSC 投与の肝硬変症に対する有効性が多数報告されてきた[10]。

我々は肝発癌肝硬変マウスモデルを用いた検討で BMNC が抗線維化・抗炎症作用を有するとともに、superoxide dismutase 3 (SOD3)の分泌を亢進し、酸化ストレスを抑制することで肝発癌を抑制することを報告してきた[11]。一方で MSC は腫瘍組織に遊走することが知られており[12]、様々な腫瘍において腫瘍の成長を促進する可能性や抑制する可能性が報告されている。腫瘍の促進においては、IL-6 や TGF- $\beta$  など MSC が分泌するサイトカインを介した間接作用[13,14]、腫瘍関連マクロファージ(tumor associated macrophage: TAM)を m1 phenotype から m2 phenotype へ誘導する作用[15]、あるいは腫瘍細胞との接着による直接作用により上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition: EMT)を引き起こすこと[16,17]、MSC が腫瘍微小環境を構成する癌関連線維芽細胞(carcinoma-associated fibroblast: CAF)へ分化することで腫瘍を活性化することが報告されてきた[18,19]。腫瘍の抑制に関しては Wnt signal の抑制による腫瘍の増殖抑制や腫瘍細胞のアポトーシスを誘導する作用が報告されている[20,21]。肝細胞癌(hepatocellular carcinoma: HCC)においても同様に、MSC の腫瘍に対する影響は結論が

得られていない [22-39]. 肝硬変症における MSC の投与は短期成績では明らかな合併症の報告はないが, 長期成績に関しては報告が少なく, 肝硬変症のような高発癌状態では肝発癌や腫瘍増殖に対する影響が懸念されている. このため, 我々は肝発癌肝硬変マウスモデルを用いて BMSC の腫瘍に対する影響の評価を行った.

## 方法

### (1) 動物

マウスは 6 週齢の C57/BL6 を Chiyoda SLC (Tokyo, Japan) より購入し, 交配して得られた第一代目の生後 2 週オスを用いた. マウスは山口大学医学部の動物実験施設にある specific-pathogen-free (SPF) 飼育室で飼育し運用した. 全ての実験は実験手順の承認(承認番号 21-S10)を得た後, 山口大学医学部の動物倫理基準に従って行った.

### (2) 薬剤投与

肝発癌肝硬変マウスモデルは既報のとおり作成した[11]. 生後 2 週齢のオスマウスに 10 $\mu$ g/g body weight の *N*-Nitrosodiethylamine (DEN; N0756; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を 1 回腹腔内投与した. Carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>; 032-17016; Wako, Osaka, Japan) を corn oil (0320-17016; Wako, Osaka, Japan) に 1:3 の割合で溶解し, 6 週齢から CCl<sub>4</sub> 1 $\mu$ L/g body weight を週 2 回腹腔内投与した. BMSC 投与群( $n=25$ )は DPBS で希釈

した  $1.0 \times 10^6$  GFP-positive BMSC を 10 週齢より 2 週間に 1 回尾静脈投与した。BMSC は計 5 回投与し、 $\text{CCl}_4$  の最終投与より 5 日目(20 週齢)で頸椎脱臼による安楽死を行い、組織および血液の解析を行った。また、細胞投与開始時(10 週齢), 14.5 週齢, 16 週齢での発癌動態の評価も併せて行った。コントロール群( $n=18$ )では、細胞投与は行わずに尾静脈からは DPBS のみ投与を行った(Fig.1)。

### (3) 細胞

BMSC は Strain C57BL/6 Mouse Mesenchymal Stem Cells with GFP (MUBMX-01101, Cyagen; Santa Clara, CA, USA) を培養して用いた。培地には  $\alpha$ -MEM medium (12571063; Gibco (Thermo Fisher scientific), Waltham, MA, USA) に 10% FBS と 50mg/L の gentamicin を添加したものをを用いた。培養は 15cm dish に  $3.0 \times 10^5$  個の細胞を播種し、細胞培養用インキュベーターを用いて  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2/95\%$  大気下(i.e. 20%  $\text{O}_2$ ), 相対湿度 95% の条件下で 4 日間培養した。培養後に 0.25% Trypsin-EDTA (25200-072; Gibco(Thermo Fisher scientific), Waltham, MA, USA) を  $37^\circ\text{C}$  で 5 分間反応させて、Dish から細胞の剥離を行った。細胞の投与は細胞の濃度を DPBS (14190144; Gibco (Thermo Fisher scientific), Waltham, MA, USA) で  $1.0 \times 10^6$  個/ $100 \mu\text{L}$  に調整して行った。

#### (4) 組織学および免疫組織化学的検査

肝臓を 4% paraformaldehyde に浸漬して室温で 3 日間固定し、3 $\mu$ m の厚さの paraffin 切片を作成した。作成した切片を用いてそれぞれ後述の如く染色を行った。肝発癌については Hematoxylin and eosin (H&E) で切片の染色を行い、foci と腫瘍(adenoma, HCC)を既報[40]のように診断し、肝臓の面積、foci および腫瘍の面積を解析した。肝線維化については Sirius red で切片の染色を行い、肝臓の left lateral lobe に関して 40 倍視野で腫瘍や太い血管の含まれない領域の Sirius red で染色される領域の面積を解析した。免疫染色も同様の paraffin 切片に対して、VECTASTAIN ABC Rabbit IgG Kit (PK-4001; Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) または VECTASTAIN ABC Rat IgG Kit (PK-4004; Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて後述のごとく Avidin-Biotin Complex (ABC) method での染色を行った。いずれも一次抗体反応は 4 $^{\circ}$ C で 16 時間インキュベーションし、その後ビオチン化 2 次抗体を室温で 1 時間反応させ、ABC method で検出を行った。GFP の検出は一次抗体に Anti-GFP rabbit mab (#2956; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を 1:200 に希釈したものをを用いた。マクロファージの検出は pan-macrophage marker として一次抗体に Anti-F4/80 rat mab (ab6640; Abcam, Milton, Cambridge, UK) を 1:100 に希釈して用いた。M2 phenotype のマクロファージの検出には Anti-CD163 rabbit mab (ab182422; Abcam, Milton, Cambridge, UK) を 1:500 に希釈したものをを用いた。組織の撮影と解析は Keyence BIOREVO BZ-9000 microscope



(Keyence, Osaka, Japan)と専用の解析ソフト(BZII viewer and analyzer)を用いて行った。

## (5) 血液検査

血液は BD Microtainer® SST™ blood collection tube for serum separation (REF 365967; Franklin Lakes, NJ, USA)を用いて血清を分離し, albumin (Alb), alanine aminotransaminase (ALT), alpha fetoprotein (AFP)の解析を行った。検査試薬に関して, N-Assay ALB Nittobo (12372114, 9297231; Nittobo, Tokyo, Japan), N-Assay L GPT Nittobo (1231911, 1231921; Nittobo, Tokyo, Japan), Canine alpha-fetoprotein measurement Kit (SHIMA Laboratories Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて試薬のプロトコルに準じて Alb, ALT, AFP をそれぞれ測定した。AFP の測定は多量の検体を安定して測定可能な犬用の AFP 測定法で測定を行っているが, 事前にマウス血清を用いて犬用の AFP 測定法と Mouse alpha-Fetoprotein/AFP Quantikine ELISA Kit (MAFP00; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)の測定値が非常に強く相関することを確認している (data not shown)。AFP ELISA での測定はキットの手順に準じて行った。

## (6) 統計学的解析

統計学的解析は Mann-Whitney U test で行った。ただし, foci および腫瘍の発生率に関

しては Pearson's chi-squared test を用いて解析した。結果は median (25 percentile – 75 percentile) で表記し、*P*-value が 0.05 未満を有意差ありと判定した。

## 結果

### (1) BMSC 投与は肝発癌・増殖機構への影響を与えない

生後 10 週齢の BMSC 投与開始時点ではマウス肝臓内に明らかな病変は認められなかった(data not shown)。生後 14.5 週齢時点でコントロール群、BMSC 投与群のいずれも HCC は認められなかったが、adenoma の形成を認めた。この時点での腫瘍の発生率には有意差は認められなかった(control, 3/7=42.9%; BMSC, 2/5=40%; *p*=0.92)。16 週齢時点でいずれの群も HCC を認めた(control, 2/3, BMSC, 1/3)。20 週齢では肉眼的にも腫瘍の発生が確認された(Fig.2)。

20 週齢時点での組織学的解析は adenoma と HCC の厳密な区別が困難であったため、これらを合わせて腫瘍として解析を行った。foci 発生率(control, 18/18=100.0%; BMSC, 24/25=96%; *p*=0.39, 単位面積あたりの foci 数(control, 2.5 (1.1-4.4) /cm<sup>2</sup>; BMSC, 2.6 (1.7-4.5) /cm<sup>2</sup>; *p*=0.82), 平均 foci サイズ(control, 0.11 (0.07-0.14) mm<sup>2</sup>; BMSC, 0.09 (0.06-0.10) mm<sup>2</sup>; *p*=0.087), 単位面積あたりの foci 面積(control, 0.5 (0.09-0.43) mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>; BMSC, 0.25 (0.11-0.42) mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>; *p*=0.74), 腫瘍発生率(control, 16/18=88.9%; BMSC, 22/25=88.0%; *p*=0.93), 単位面積あたりの腫瘍数(control, 2.01 (1.06-3.76) /cm<sup>2</sup>; BMSC,

2.68 (1.50-3.86) /cm<sup>2</sup>;  $p=0.67$ ), 平均腫瘍サイズ(control, 3.03 (2.12-4.00) mm<sup>2</sup>; BMSC, 2.91 (1.57-4.19) mm<sup>2</sup>;  $p=0.91$ ), 単位面積あたりの腫瘍面積(control, 7.26 (4.49-11.63) mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>; BMSC, 8.62 (4.73-12.29) mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>;  $p=0.70$ )について評価したが, いずれも有意差は認めなかった(Fig.3, Table.1). 腫瘍マーカーについても AFP (control, 64.5 (33.5-119.5) ng/mL; BMSC, 58.0 (29.0-110.0) ng/mL;  $p=0.54$ )と有意差は認めなかった(Fig.4, Table 2).

## (2) BMSC 投与には抗線維化作用と ALT 低下作用がある

Sirius red 陽性面積は control, 3.92 (3.36-4.99) %; BMSC, 3.06 (2.65-3.65) %;  $p=0.01$  と有意差を認め, BMSC 投与群で有意に線維化面積が低かった(Fig.4, Table 2). Alb (control, 2.3 (2.2-2.5) g/dL; BMSC, 2.3 (2.2-2.4) g/dL;  $p=0.46$ )と有意差は認めなかったが, ALT (control, 47 (38-58) IU/L; BMSC, 32 (27-39) IU/L;  $p=0.004$ )と BMSC 投与群で有意に低かった(Fig.5, Table 2).

## (3) BMSC 投与は TAM への影響を与えない

各個体に発生した腫瘍の中で最も大きい腫瘍に関して腫瘍内分に存在する TAM の解析を行った. 腫瘍サイズ(control, 7.77 (2.99-10.33)mm<sup>2</sup>; BMSC, 8.85 (2.35-11.26)mm<sup>2</sup>;  $p=0.74$ ), 単位面積当たりの F4/80 陽性面積(control, 2.56 (1.84-2.95) mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>; BMSC,

1.76 (1.23-3.34) mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>;  $p=0.63$ ), 単位面積当たりの CD163 陽性面積(control, 0.17 (0.11-0.30) mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>; BMSC, 0.10 (0.08-0.18) mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>;  $p=0.25$ ), F4/80 陽性面積に対する CD163 陽性面積の比率(control, 10.03 (5.79-11.11) %; BMSC, 5.94 (3.17-11.14) %;  $p=0.53$ )について評価したが, いずれも有意差は認めなかった(Fig.6, Table 3).

#### (4) BMSC は末梢静脈投与 2 週間後には肝内に存在しない

GFP の免疫染色では肝臓内や腫瘍内に明らかな GFP 陽性細胞は認めず, また GFP 陽性となる腫瘍も認められなかった(Fig.7).

#### (5) 実験の再現性の確認

我々は先の実験とは異なる親マウスを新たに交配して再現実験を行い, BMSC 投与群 (n=10), コントロール群(n=10)において腫瘍の形成に関して解析を行った. foci 発生率 (control, 10/10 = 100.0%; BMSC, 9/10 = 90.0%;  $p = 0.30$ ), 単位面積あたりの foci 数 (control, 2.70 (1.50-3.28)/cm<sup>2</sup>; BMSC, 2.66 (1.51-3.47)/cm<sup>2</sup>;  $p = 0.85$ ), 平均 foci サイズ (control, 0.09 (0.06-0.12) mm<sup>2</sup>; BMSC, 0.08 (0.06-0.08) mm<sup>2</sup>;  $p = 0.39$ ), 単位面積あたりの foci 面積(control, 0.19 (0.11-0.27) mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>; BMSC, 0.20 (0.09-0.32) mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>;  $p=0.97$ ), 腫瘍発生率(control, 9/10 = 90.0%; BMSC, 9/10 = 90.0%;  $p = 1.00$ ), 単位面積あたりの腫瘍数(control 3.51, (2.67-4.69)/cm<sup>2</sup>; BMSC, 3.37 (1.82-6.26)/cm<sup>2</sup>;  $p = 0.94$ ), 平均

腫瘍サイズ(control, 2.82 (2.58-3.79) mm<sup>2</sup>; BMSC, 3.16 (2.29-4.40) mm<sup>2</sup>;  $p = 0.94$ ), 単位面積あたりの腫瘍面積(control, 10.36 (6.62-18.86) mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>; BMSC, 14.82 (3.61-23.03) mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>;  $p = 1.00$ )に関して再評価を行ったが, 有意差は認められなかった(Fig. 8). これらの結果から, 実験の再現性が確認された.

## 考察

BMSC の腫瘍への影響として細胞同士の接着による直接作用とサイトカインなどを介した間接作用が考えられる. 直接作用は肝内の BMSC の存在について, 間接作用としては TAM について検討を行い, 組織学的に発癌への影響の有無について検討を行った.

BMSC は腫瘍への遊走能を有するとされているが[12], 本検討では, 投与 2 週間後の時点で, 腫瘍内や周囲の肝実質には明らかな GFP 陽性細胞は認められなかった. そして, BMSC 投与群とコントロール群で腫瘍発生率, 単位面積当たり腫瘍数, 平均腫瘍サイズ, 単位面積あたりの腫瘍面積に有意差を認めず, 腫瘍に対する直接作用の影響はないと考えられた.

腫瘍内に浸潤する TAM が様々な腫瘍の予後と相関しており, TAM が腫瘍を直接的あるいは間接的に促進するとされている. このため, 多くの腫瘍で TAM の浸潤が多いほど予後不良とされている[41-44]. 特に M2 macrophage は抗炎症性マクロファージとしての働きを有しており, 腫瘍微小環境において重要な役割を有している. HCC においても M2

macrophage が腫瘍に多く浸潤するほど予後不良となるとの報告が複数ある[45-48].

BMSC はマクロファージを M1 phenotype から M2 phenotype へ分化誘導することが知られている[49-51]. とくに炎症刺激下で培養された BMSC は TAM においてもマクロファージを M1 phenotype から M2 phenotype へシフトさせ、腫瘍の増殖を促進するとされている[15]. BMSC 投与が腫瘍内の M2 macrophage を増加すると BMSC 投与は腫瘍を促進すると考えられたが、本検討では BMSC 投与によって TAM の明らかな変化は認められず、BMSC のマクロファージを介した間接作用は否定的と考えられた.

発癌・増殖機構は tumor initiation, promotion, progression の3段階に分類される[52]. Tumor initiation に関して、BMSC の投与開始時点(10 週齢)では adenoma や HCC は認められず、20 週齢時点での前癌病変(foci)の状態にも有意差を認めなかったことから、本検討では、BMSC 投与は tumor initiation を促進しなかった。これに加え、20 週齢時点での単位面積当たりの腫瘍数や腫瘍発生率も変化を認めないことから、BMSC 投与は tumor promotion に影響しなかったと考えられる。コントロール群と BMSC 投与群では肝発癌が同一時期に起こり、最終的な平均腫瘍サイズにも有意差は認められず、GFP 陽性細胞を腫瘍内や周囲肝実質に認めないこと、TAM に変化を認めないことから BMSC は tumor progression への影響はなかったと考えられる。これらの結果から、BMSC は発癌ポテンシャルの高い状態においても、tumor initiation, promotion, progression といった肝発癌・増殖機構への影響を与えないことが示唆された。

Zong らの報告では DEN による肝発癌線維化ラットモデルにおいて、DEN を繰り返し経口投与し、その投与開始より 4 週目から BMSC を投与することで tumor initiation を抑制することが報告されている[53]。我々の今回の検討では BMSC 投与は抗炎症作用や抗線維化作用を示しており、これらの作用からも腫瘍抑制効果が予想されたが、結果として肝発癌・増殖機構への影響は認められなかった。この原因として、①「BMSC の tumor initiation の抑制作用はあっても弱く、短期では発癌抑制に不十分であった」、②「BMSC 投与開始時点で既に foci が形成されていたため、その後の発癌に変化は認めなかった」、③「DEN は遺伝毒性物質、CCl<sub>4</sub> は線維形成促進物質としての働きにより発癌を促進しており[54]、BMSC 投与による抗線維化作用に由来する抗腫瘍作用が弱く、我々の研究で用いた DEN+CCl<sub>4</sub> での発癌誘導モデルでは抗腫瘍効果が確認できなかった」、といった可能性が考えられた。Zong らの報告では我々の検討と同様に腫瘍の発生前より BMSC の投与を行っているが、発癌物質として DEN のみを用いており[53]、DEN に加えて CCl<sub>4</sub> を投与している我々の検討とは発癌モデルが異なっており、その違いが結果に影響した可能性がある[54]。

MSC と tumor promotion, progression との関連については議論的となっており、MSC 投与時点で HCC が存在する場合、MSC の直接作用やサイトカイン(IL-6, TGF- $\beta$  など)を介した間接作用によって肝発癌・増殖機構を促進するという報告[22-31]や抑制するという報告[32-39]がある。これらの研究では MSC の培養条件や由来が様々であり、MSC

は様々な表現型をもった不均一な集団であるため、培養条件や MSC の由来によって増殖した MSC が異なる性質であり、結果として MSC の肝臓や腫瘍への遊走能や腫瘍に与える影響が異なる可能性が考えられる。炎症刺激下での培養を行った MSC は腫瘍の増殖の促進や化学療法への耐性を増強することが知られており [15,23,24]、特に MSC の培養条件が重要と考えられる。

本検討では肝発癌肝硬変マウスモデルに対して、同種同系マウスから採取した BMSC の投与を行った。ヒトにおいて、肝硬変の再生療法に用いる細胞源は自己骨髄を用いる必要がある。更に B 型肝炎、C 型肝炎や非アルコール性脂肪性肝炎などの慢性炎症下にある患者から採取した BMSC を投与することで肝発癌にどのような影響があるかは未解明である。これを検討するためには今後の動物実験において BMSC は疾患モデル動物から採取する必要があると考えられる。

## 結語

本検討の結果、BMSC の投与は高発癌状態であっても腫瘍の存在しない状態であれば肝発癌や腫瘍増殖を促進することはなく、また投与した BMSC そのものから発癌する可能性のないことが確認された。その一方で BMSC を投与したマウスでは抗炎症作用と抗線維化作用を認めた。これらの結果から BMSC 投与は肝発癌・増殖機構を促進せず、非代償性肝硬変の治療のために安全かつ有効に投与できる可能性が示唆された。



## 謝辞

我々は技術補佐員である山田磨理子，大田久美江，望月里紗の支援に感謝する。

## 参考文献

- [1] Jang JW, Choi JY, Kim YS, Woo HY, Choi SK, Lee CH, et al. Long-term effect of antiviral therapy on disease course after decompensation in patients with hepatitis B virus-related cirrhosis. *Hepatology* 2015;61:1809–20.
- [2] Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11–6.
- [3] 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;24:2292–8.
- [4] Kim JK, Park YN, Kim JS, Park MS, Paik YH, Seok JY. Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. *Cell Transplant* 2010;19:1237–46.
- [5] Li Z, Zhang C, Weiner LP, Zhang Y, Zhong JF. Molecular characterization of heterogeneous mesenchymal stem cells with single-cell transcriptomes. *Biotechnol Adv* 2013;31:312–7.

- [6] Cynthia Hamou, Callaghan MJ, Thangarajah H, Chang E, Chang EI, Grogan RH, et al. Mesenchymal stem cells can participate in ischemic neovascularization. *Plast Reconstr Surg* 2009;123:45S–55S.
- [7] Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, Ceradini DJ, Callaghan MJ, Kleinman ME, et al. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood* 2005;105:1068–77.
- [8] Rennert RC, Sorkin M, Garg RK, Gurtner GC. Stem cell recruitment after injury: lessons for regenerative medicine. *Regen Med* 2012;7:833–50.
- [9] Tanimoto H, Terai S, Taro T, Murata Y, Fujisawa K, Yamamoto N, et al. Improvement of liver fibrosis by infusion of cultured cells derived from human bone marrow. *Cell Tissue Res* 2013;354:717–28.
- [10] Eom YW, Shim KY, Baik SK. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *Korean J Intern Med* 2015;30:580–9.
- [11] 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;27:104–11.
- [12] Lazenec G, Jorgensen C. Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells* 2008;26:1387–94.

- [13] Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumor stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007;449:557–63.
- [14] Chaturvedi P, Gilkes DM, Wong CC, Kshitiz, Luo W, Zhang H, et al. Hypoxia-inducible factor-dependent breast cancer-mesenchymal stem cell bidirectional signaling promotes metastasis. *J Clin Invest* 2013;123:189–205.
- [15] Jia XH, Feng GW, Wang ZL, Shen C, Hui H, Peng D, et al. Activation of mesenchymal stem cells by macrophages promotes tumor progression through immune suppressive effects. *Oncotarget* 2016;7:20934–44.
- [16] Cui BG, Campagne A, Bell GW, Lembo A, Orso F, Lien EC, et al. MSC-regulated microRNAs converge on the transcription factor FOXP2 and promote breast cancer metastasis. *Cell Stem Cell* 2014;15:762–74.
- [17] Nishimura K, Semba S, Aoyagi K, Sasaki H, Yokozaki H. Mesenchymal stem cells provide an advantageous tumor microenvironment for the restoration of cancer stem cells. *Pathobiology* 2012;79:290–306.
- [18] Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP, et al. Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2008;68:4331–9.

- [19] Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, et al. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer* 2010;127:2323–33.
- [20] Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, Bian C, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia* 2009;23:925–33.
- [21] Sun B, Roh KH, Park JR, Lee SR, Park SB, Jung JW, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells in a mouse breast cancer metastasis model. *Cytotherapy* 2009;11:289–98.
- [22] Mi F, Gong L. Secretion of interleukin-6 by bone marrow mesenchymal stem cells promotes metastasis in hepatocellular carcinoma. *Biosci Rep* 2017;37:BSR20170181.
- [23] Jing Y, Han Z, Liu Y, Sun K, Zhang S, Jiang G, et al. Mesenchymal stem cells in inflammation microenvironment accelerates hepatocellular carcinoma metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. *PLOS ONE* 2012;7:e43272.
- [24] Han Z, Jing Y, Xia Y, Zhang S, Hou J, Meng Y, et al. Mesenchymal stem cells contribute to the chemoresistance of hepatocellular carcinoma cells in inflammatory environment by inducing autophagy. *Cell Biosci* 2014;4:22.
- [25] Teshima T, Matsumoto H, Koyama H. Soluble factors from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote canine hepatocellular carcinoma cell proliferation and

invasion. PLOS ONE 2018;13:e0191539.

[26] Pelagalli A, Nardelli A, Fontanella R, Zannetti A. Inhibition of AQP1 hampers osteosarcoma and hepatocellular carcinoma progression mediated by bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci* 2016;17:1102.

[27] Li GC, Zhang HW, Zhao QC, Sun LI, Yang JJ, Hong L, et al. Mesenchymal stem cells promote tumor angiogenesis via the action of transforming growth factor  $\beta$ 1. *Oncol Lett* 2016;11:1089–94.

[28] Liu C, Liu Y, Xu XX, Guo X, Sun GW, Ma XJ. Mesenchymal stem cells enhance the metastasis of 3D-cultured hepatocellular carcinoma cells. *BMC Cancer* 2016;16:566.

[29] Li T, Zhao S, Song B, Wei Z, Lu G, Zhou J, et al. Effects of transforming growth factor  $\beta$ -1 infected human bone marrow mesenchymal stem cells on high- and low-metastatic potential hepatocellular carcinoma. *Eur J Med Res* 2015;20:56.

[30] Yan X, Zhang D, Wu W, Wu S, Qian, Hao Y, et al. Mesenchymal stem cells promote hepatocarcinogenesis via lncRNA-MUF interaction with ANXA2 and miR-34a. *Cancer Res* 2017;77:6704–16.

[31] Gong P, Wang Y, Wang Y, Jin S, Luo H, Zhang J, et al. Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on hepatocellular carcinoma in microcirculation. *Tumour Biol* 2013;34:2161–8.

- [32] Tang YM, Bao WM, Yang JH, Ma LK, Yang J, Xu Y, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells inhibit growth and promote apoptosis of HepG2 cells. *Mol Med Rep* 2016;14:2717–24.
- [33] Faidah M, Noorwali A, Atta H, Ahmed N, Habib H, Damiati L. Mesenchymal stem cell therapy of hepatocellular carcinoma in rats: Detection of cell homing and tumor mass by magnetic resonance imaging using iron oxide nanoparticles. *Adv Clin Exp Med* 2017;26:1171–8.
- [34] Qiao L, Xu Z, Zhao T, Zhao Z, Shi M, Zhao RC, et al. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res* 2008;18:500–7.
- [35] Hou L, Wang X, Zhou Y, Ma H, Wang Z, He J, et al. Inhibitory effect and mechanism of mesenchymal stem cells on liver cancer cells. *Tumour Biol* 2014;35:1239–50.
- [36] Abd-Allah SH, Shalaby SM, El-Shal AS, Elkader EA, Hussein S, Emam E, et al. Effect of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on hepatoma. *Cytherapy* 2014;16:1197–206.
- [37] Li T, Song B, Du X, Wei Z, Huo T. Effect of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells on high-potential hepatocellular carcinoma in mouse models: an intervention study. *Eur J Med Res* 2013;18:34.

[38] Ko SF, Yip HK, Zhen YY, Lee CC, Lee CC, Huang CC, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell exosomes suppress hepatocellular carcinoma growth in a rat model: Apparent diffusion coefficient, natural killer T-cell responses, and histopathological features. *Stem Cells Int* 2015;2015:853506.

<http://dx.doi.org/10.1155/2015/853506>

[39] Zhang L, Su XS, Ye JS, Wang YY, Guan Z, Yin YF. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress metastatic tumor development in mouse by modulating immune system. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:45.

[40] Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicol Pathol* 2010;38:5S–81S.

[41] Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumor-associated macrophages in tumor progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002;196:254–65.

[42] Pollard JW. Tumor-educated macrophages promote tumor progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004;4:71–8.

[43] Ma C, Horlad H, Ohnishi K, Nakagawa T, Yamada S, Kitada S et al. CD163-positive cancer cells are potentially associated with high malignant potential in clear

cell renal cell carcinoma. *Med Mol Morphol* 2018;51:13–20.

[44] Miyasato Y, Shiota T, Ohnishi K, Pan C, Yano H, Horlad H, et al. High density of CD204-positive macrophages predicts worse clinical prognosis in patients with breast cancer. *Cancer Sci* 2017;108:1693–700.

[45] Shirabe K, Mano Y, Muto J, Matono R, Motomura T, Toshima T, et al. Role of tumor-associated macrophages in the progression of hepatocellular carcinoma. *Surg Today* 2012;42:1–7.

[46] Yeung OW, Lo CM, Ling CC, Qi X, Geng W, Li CX, et al. Alternatively activated (M2) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2015;62:607–16.

[47] Minami K, Hiwatashi K, Ueno S, Sakoda M, Iino S, Okumura H, et al. Prognostic significance of CD68, CD163 and folate receptor- $\beta$  positive macrophages in hepatocellular carcinoma. *Exp Ther Med* 2018;15:4465–76.

[48] Yao RR, Li JH, Zhang R, Chen RX, Wang YH. M2-polarized tumor-associated macrophages facilitated migration and epithelial-mesenchymal transition of HCC cells via the TLR4/STAT3 signaling pathway. *World J Surg Oncol* 2018;16:9.

[49] Abumaree MH, Al Jumah MA, Kalionis B, Jawdat D, Al Khaldi A, Abomaray FM, et al. Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune



suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory to anti-inflammatory M2 macrophages. *Stem Cell Rev* 2013;9:620–41.

[50] Anderson P, Souza-Moreira L, Morell M, Caro M, O'Valle F, Gonzalez-Rey E, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. *Gut* 2013;62:1131–41.

[51] Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol* 2009;37:1445–453.

[52] Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. Third Edition. In: David E. Malarkey, Mark Hoenerhoff, Robert R. Maronpot. Chapter 5 - Carcinogenesis: Mechanisms and Manifestations, Amsterdam: Academic Press; 2013, p. 107–46.

[53] Zong C, Zhang H, Yang X, Gao L, Hou J, Ye F, et al. The distinct roles of mesenchymal stem cells in the initial and progressive stage of hepatocarcinoma. *Cell Death Dis* 2018;9:345.

[54] Uehara T, Ainslie GR, Kutanzi K, Pogribny IP, Muskhelishvili L, Izawa T, et al. Molecular mechanisms of fibrosis-associated promotion of liver carcinogenesis. *Toxicol Sci* 2013;132:53–63.

Table 1. BMSC 投与は foci や腫瘍に影響しない

		Control	BMSCs	P-value
Foci	Occurrence rate (%)	100.0	96.0	$p = 0.39$
	Number (/cm <sup>2</sup> )	2.5 (1.1–4.4)	2.6 (1.7–4.5)	$p = 0.82$
	Size (mm <sup>2</sup> )	0.11 (0.07–0.14)	0.09 (0.06–0.10)	$p = 0.087$
	Area (mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )	0.35 (0.09–0.43)	0.25 (0.11–0.42)	$p = 0.74$
Tumor	Occurrence rate (%)	88.9	88	$p = 0.93$
	Number (/cm <sup>2</sup> )	2.0 (1.1–3.8)	2.7 (1.5–3.9)	$p = 0.67$
	Size (mm <sup>2</sup> )	3.03 (2.12–4.00)	2.91 (1.57–4.19)	$p = 0.91$
	Area (mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )	7.26 (4.49–11.63)	8.62 (4.73–12.29)	$p = 0.70$

NOTE: コントロール群 ( $n = 18$ ), BMSC 投与群 ( $n = 25$ ).

Table 2. BMSC 投与は抗線維化作用と ALT を低下させる作用を有する

	Control	BMSCs	P-value
Alb (g/dL)	2.3 (2.2-2.5)	2.3 (2.2-2.4)	$p = 0.46$
ALT (IU/L)	47 (38-58)	32 (27-39)**	$p = 0.004$
AFP (ng/mL)	64.5 (33.5-119.5)	58.0 (29.0-110.0)	$p = 0.54$
Sirius Red-stained area (%)	3.92 (3.36-4.99)	3.06 (2.65-3.65)*	$p = 0.01$

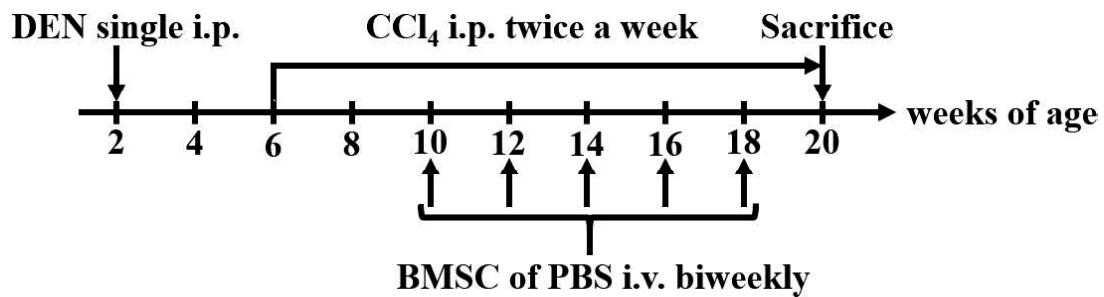
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

NOTE: コントロール群 ( $n = 18$ ), BMSC 投与群 ( $n = 25$ ).

Table 3. BMSC 投与は腫瘍関連マクロファージ(TAM)に影響しない

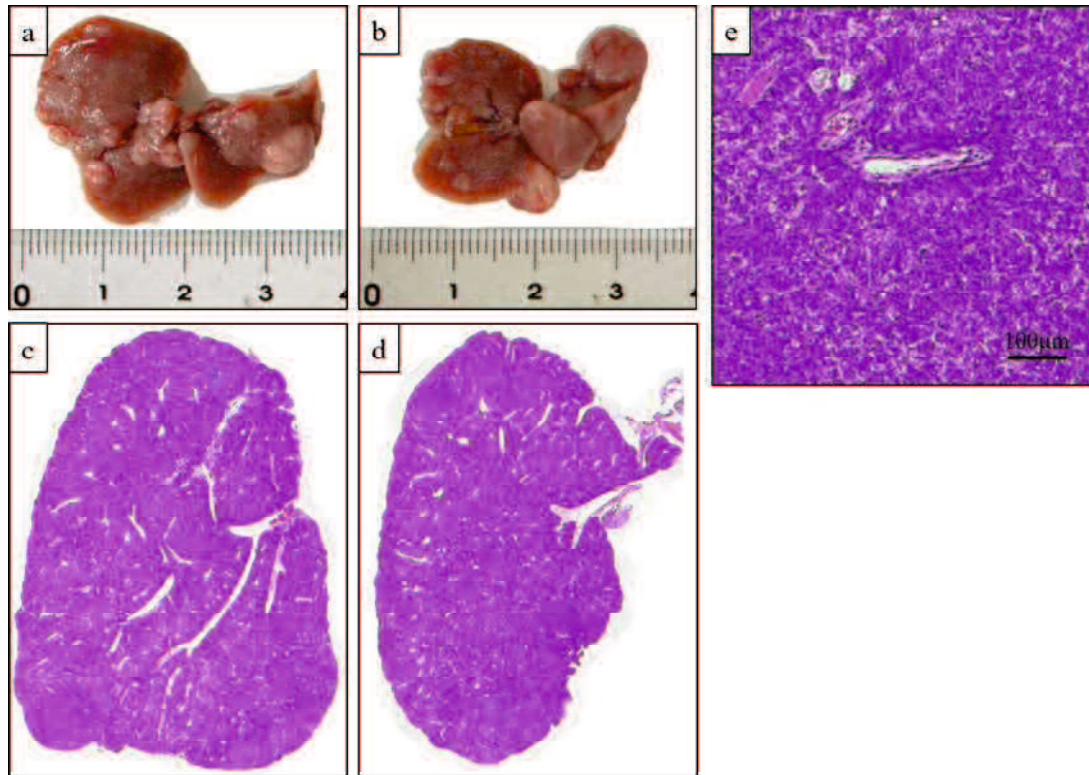
	Control	BMSCs	P-value
F4/80-positive area (mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )	2.56 (1.84-2.95)	1.76 (1.23-3.34)	$p = 0.63$
CD163-positive area (mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )	0.17 (0.11-0.30)	0.10 (0.08-0.18)	$p = 0.25$
CD163 : F4/80 (%)	10.03 (5.79-11.11)	5.94 (3.17-11.14)	$p = 0.53$

NOTE: コントロール群 ( $n = 10$ ), BMSC 投与群 ( $n = 10$ ).



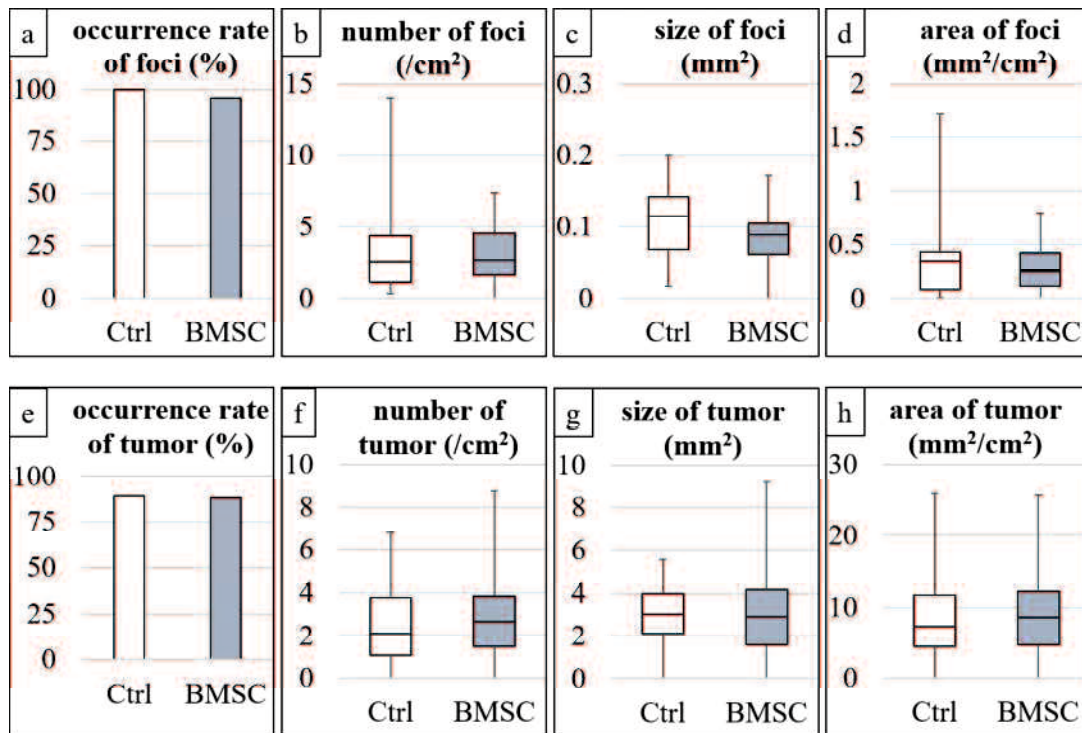
**Figure 1. 実験手順**

マウスは生後 2 週齢で DEN (10 $\mu$ g/g body weight)を腹腔内に投与し, 6 週齢から週 2 回 CCl<sub>4</sub> (1 $\mu$ L/g body weight)を繰り返し腹腔内投与することで肝線維化および肝発癌を誘導した. コントロール群は 10 週齢より 2 週に一度 PBS (100 $\mu$ L)を尾静脈から投与した. 治療群は 10 週齢より 2 週に一度 PBS で 1.0 $\times$ 10<sup>6</sup> 個/100 $\mu$ L に希釈した GFP 陽性 BMSC (100 $\mu$ L)を尾静脈から投与した. 20 週齢, CCl<sub>4</sub>最終投与より 5 日目にジエチルエーテル麻醉下で頸椎脱臼により安楽死し, 組織学的, 血液学的評価を行った.



**Figure 2.** 20 週齢での肉眼的・組織学的所見

20 週齢の時点でいずれの群も肉眼的，組織学的(HE 染色)に腫瘍を認める． a, c ; コントロール群, b, d ; BMSC 投与群. e は adenoma の特徴とされる portal triad と考えられる構造を認めるが，周囲の異型は比較的強く HCC が疑われる． このため adenoma と HCC の厳密な鑑別は困難であった．



**Figure 3. 20 週齢での foci および腫瘍の発生動態**

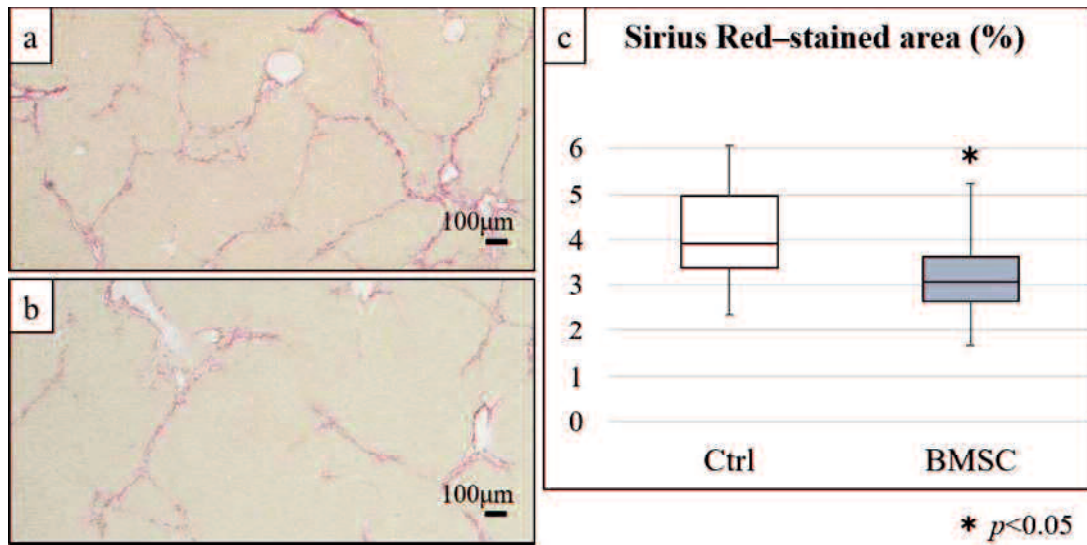
コントロール群 ( $n = 18$ ), BMSC 投与群 ( $n = 25$ ). 箱ひげ図の箱は中央値と四分位範囲を

示す. ひげは最小値と最大値を示す. (a,e)はそれぞれコントロール群と BMSC 投与群の

foci 発生率(a), 腫瘍発生率(e)を示す. (b, f)はそれぞれ肝臓の単位面積当たりの foci 数

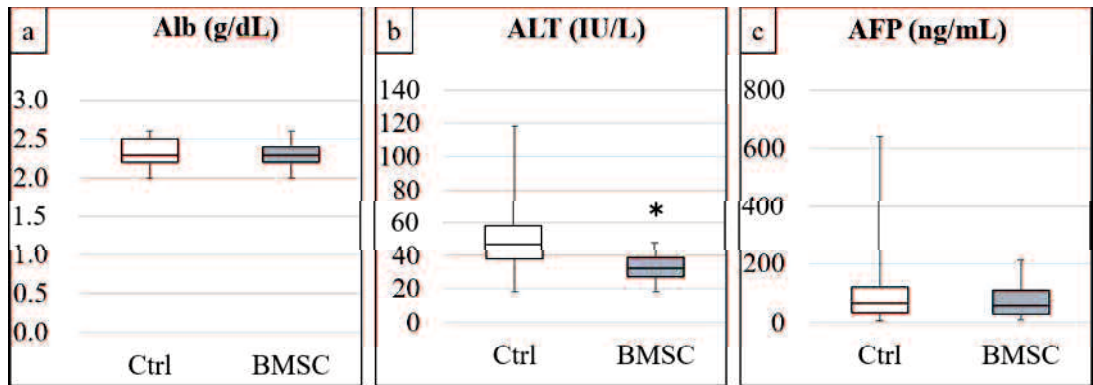
(b), 腫瘍数(f)を示す. (c, g)はそれぞれ平均 foci サイズ(c), 腫瘍サイズ(g)を示す. (d, h)は

それぞれ肝臓の単位面積当たりの foci の占める面積(d), 腫瘍の占める面積(h)を示す.



**Figure 4. 20週齢での Sirius Red 染色による肝線維化の評価**

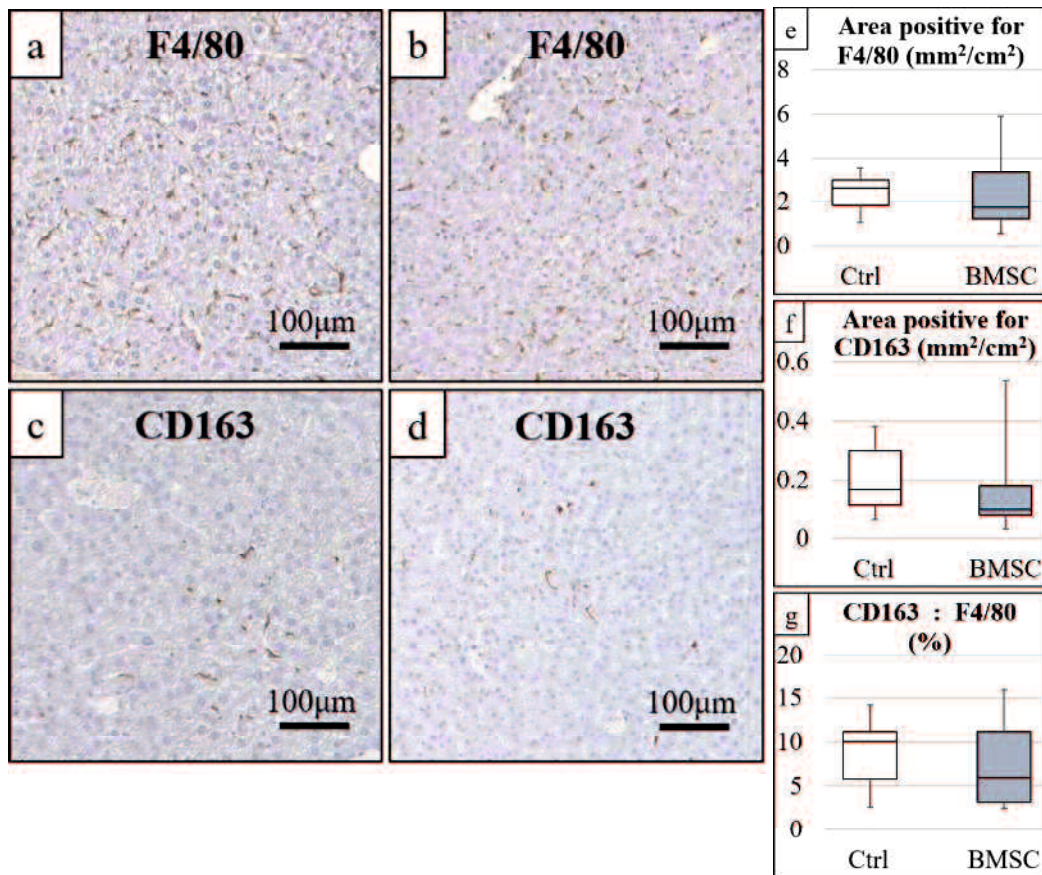
コントロール群 ( $n = 18$ ), BMSC 投与群 ( $n = 25$ ) . 箱ひげ図の箱は中央値と四分位範囲を示す. ひげは最小値と最大値を示す. \*はコントロール群との比較で  $p < 0.05$  であることを示す. (a,b)はそれぞれコントロール群(a)と BMSC 投与群(b)の肝切片の Sirius Red 染色の顕微鏡像を示す. (c)は肝臓の Sirius Red 染色陽性となる面積の割合を示す.



\*  $p < 0.05$

**Figure 5. 20 週齡での血液生化学検査**

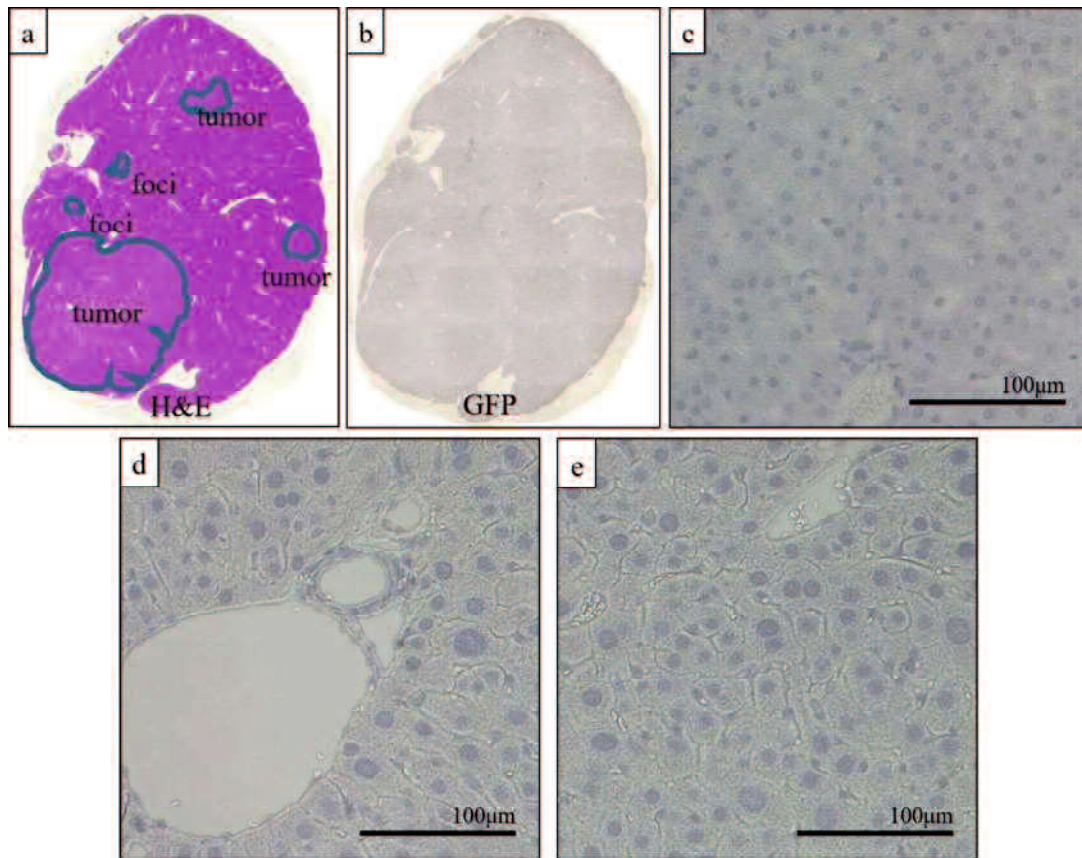
コントロール群 ( $n = 18$ ), BMSC 投与群 ( $n = 25$ ). 箱ひげ図の箱は中央値と四分位範囲を示す. ひげは最小値と最大値を示す. \*はコントロール群との比較で  $p < 0.05$  であることを示す. (a, b, c)はそれぞれ血清のアルブミン(Alb)値(a), アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)値,  $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)値を示す.



**Figure 6. 20 週齢での肝腫瘍内における腫瘍関連マクロファージ(TAM)の評価**

コントロール群 ( $n = 10$ ), BMSC 投与群 ( $n = 10$ ). (a, b)はそれぞれコントロール群(a)と BMSC 投与群(b)の肝腫瘍における汎マクロファージマーカーである F4/80 の免疫染色像を示す. (c, d)はそれぞれコントロール群(c)と BMSC 投与群(d)の肝腫瘍における M2 マクロファージマーカーである CD163 の免疫染色像を示す. 箱ひげ図の箱は中央値と四分位範囲を示す. ひげは最小値と最大値を示す. (e, f)はそれぞれ肝腫瘍における単位面積当たりの F4/80 の陽性面積(e)と CD163 の陽性面積(f)を示す. (g)は肝腫瘍における F4/80 陽性面積に対する CD163 陽性面積を示す.





**Figure 7. 20 週齢での肝内における GFP 陽性細胞の評価**

(a)は BMSC 投与群のマウスにおける H&E 染色を示す. (b)は(a)と同じマウスの肝臓における GFP の免疫染色を示す. (c, d, e)はそれぞれ高倍率視野における腫瘍(c), 門脈周辺域(d), 小葉中間帯/小葉中心域(e)の GFP の免疫染色像を示す. GFP 陽性細胞は肝実質や腫瘍の間質には認められなかった. また, GFP 陽性の foci や腫瘍も認められなかった.

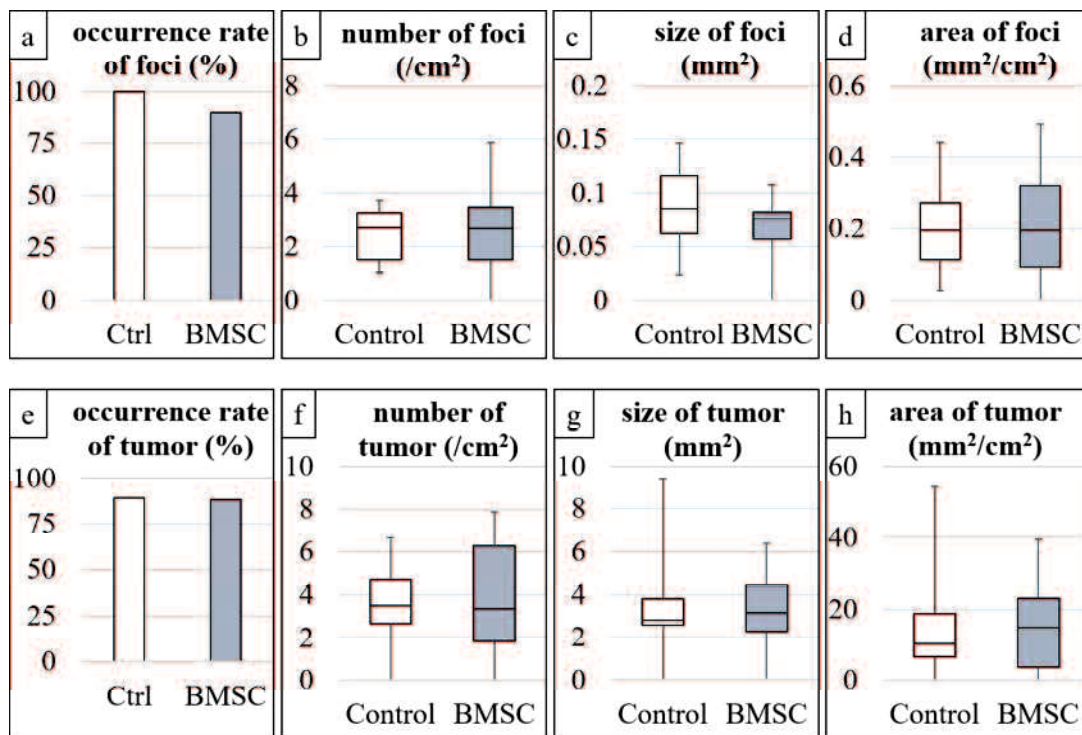


Figure 8. 実験の再現性

コントロール群 ( $n = 10$ ), BMSC 投与群 ( $n = 10$ ). 箱ひげ図の箱は中央値と四分位範囲を示す. ひげは最小値と最大値を示す. (a,e)はそれぞれコントロール群と BMSC 投与群の foci 発生率(a), 腫瘍発生率(e)を示す. (b, f)はそれぞれ肝臓の単位面積当たりの foci 数 (b), 腫瘍数(f)を示す. (c, g)はそれぞれ平均 foci サイズ(c), 腫瘍サイズ(g)を示す. (d, h)はそれぞれ肝臓の単位面積当たりの foci の占める面積(d), 腫瘍の占める面積(h)を示す.