

研究 成 果 報 告 書

肝線維化への造血幹細胞の関与：

単一細胞移植法を用いた肝星細胞起源の解明

18591055

平成 18 年度～平成 19 年度科学研究費補助金

(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成 20 年 5 月

研究代表者 榊屋正浩

三重大学大学院医学系研究科 准教授

はしがき

本冊子は、平成18年度から19年度の2年間にわたる科学研究費補助金を用いて行われた「肝線維化への造血幹細胞の関与：単一細胞移植法を用いた肝星細胞起源の解明」の報告書である。

研究組織及び研究経費は以下の通りである。

研究組織

研究代表者

榎屋正浩 三重大学大学院医学系研究科 准教授

交付決定額 (金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	2,000	0	2,000
平成19年度	1,500	450	1,950
総計	3,500	450	3,950

研究の概要

近年、骨髄細胞が神経、肝臓、腎臓、心臓、血管などの非造血細胞へ分化する可塑性を有していることがマウスのみならずヒトの骨髄移植例でも示されるようになった。研究代表者はEGFPマウスの骨髄から分離した1個の造血幹細胞を移植(単一細胞移植法)して作成したsingle EGFP⁺Sca-1⁺c-kit⁺CD34⁻ cell transplanted mice (SCTP mice)の解析から、腎臓のglomerular mesangial cellや脳梗塞巣に出現する血管pericyteが造血幹細胞由来であることを報告した(Blood, 101:2215, 2003、Exp Neurol, 186:134, 2004)。また、これまでは創傷治癒や線維化に関連するfibroblastやmyofibroblastは間葉系幹細胞由来であるとされてきた。しかし、我々はこれらの細胞も骨髄中に存在する造血幹細胞由来であることを報告した(Exp Hematol, 34:208-218, 219-229, 2008)。骨髄中に可塑性を有する細胞が存在すると判明したことは、再生医療という治療の展開において非常に意義深いことである。

ところで、肝炎ウイルスやアルコール、自己免疫による慢性肝炎の患者

は年々増加している。ウイルス性肝炎は抗ウイルス薬とインターフェロン療法との併用により病状の軽快が期待できるが、それ以外の疾患では肝線維化の進行により次第に肝機能が障害され、肝不全に至る。インターフェロンや肝細胞増殖因子が肝線維化軽減に有効であるとのヒトやマウスでの報告があるものの、未だ画期的な治療法は確立されていない。肝線維化には、コラーゲンなどの細胞外マトリックスとこれを分解するマトリックスメタロプロテアーゼやそのインヒビターが関与している。その中で最も大切なのが細胞外マトリックスであるが、これを産生する細胞が Hepatic stellate cell (肝星細胞) である。従って、肝線維化の病態解析においては、この細胞の動態を知ることが極めて重要であり、その制御機構の解明はウイルス性肝炎をはじめとする多くの慢性肝炎・肝硬変患者における肝線維症治療法開発に寄与することとなり、肝疾患患者にとって福音となりうる。

本研究において、我々は単一造血幹細胞移植法と肝傷害モデルを駆使して、肝線維化において中心的役割を演じる肝星細胞の起源が造血幹細胞由来であることを明らかにした。

研究の方法と成果

1. EGFP マウスと単一細胞移植

大阪大学岡部教授より供与された EGFP マウスから骨髓細胞を採取後、Lympholite M を用いて単核球を得る。CD4, CD8, B220, Mac-1, Gr-1, TER119 抗体反応後、Dynabeads により Lineage negative (Lin⁻) cells を回収する。次に、PE-conjugated anti-Sca-1 antibody (Ab), PI, APC-conjugated anti-c-kit Ab, Biotin-conjugated anti-CD34 Ab following APC/Cy7-conjugated Streptavidin にて染色する。FACSaria を用いて Lin⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺ CD34⁻ cell を 1 個ずつ 96-well plate に single cell sort する。

各 well の細胞を SCF と IL-11 を含む液体培養系で 7 日間培養し、培養 7 日目に 20 個以下の細胞を有する well から全細胞を回収する。そして、Ly-5.1 マウスの骨髓単核球から Sca-1 ビーズを用いて得た Sca-1 陰性単核球と一緒に、950cGy 照射後の Ly-5.1 マウスの尾静脈から移植する。対照として、EGFP マウスの全骨髓細胞を移植した Ly-5.1 マウスと (TNC-TP mice) も作成する。2 ヶ月後に末梢血を採取し、ドナー由来の multi-lineage engraftment が高率に (50% 以上) 認められたマウスのみ飼育を継続する。

2. 肝傷害モデル

まず、TNC-TP mice に対して、四塩化炭素及び対照としてオリーブオイルを週2回3ヶ月にわたり腹腔内投与した。オリーブオイル投与マウスの肝臓はほぼ正常で、組織内には EGFP 陽性細胞はほとんど認められなかったが、四塩化炭素投与マウスの肝臓は表面に凹凸があり、組織学的にも線維化が認められ、多数の EGFP 陽性細胞を検出した。これを受けて、骨髄移植2ヶ月後に multi-lineage engraftment が認められた SCTP マウスにも四塩化炭素による傷害を3ヶ月間与えた。血液還流後に取りだした肝臓を4%パラホルムアルデヒドで固定後、凍結標本を作成し、免疫蛍光染色を行い、EGFP 陽性細胞の特性を詳細に検討した。

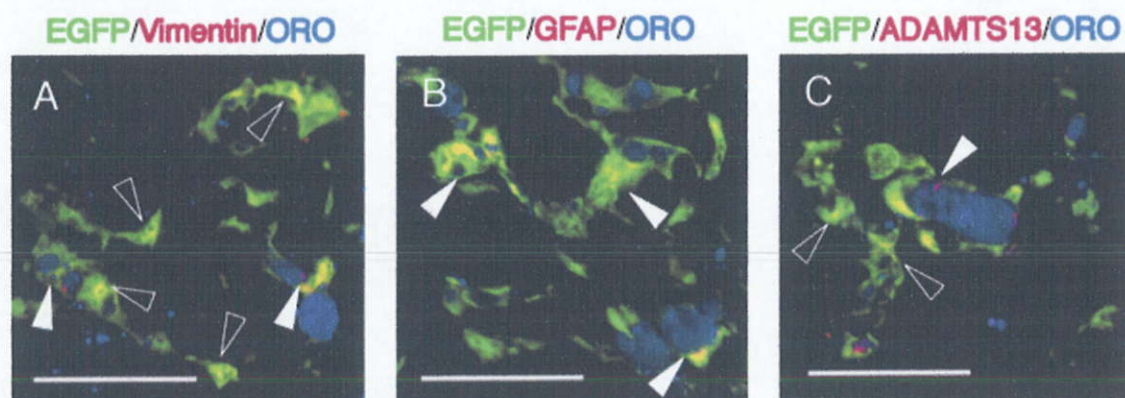
3. 成果

- ① TNC-TP mice に肝傷害を与えた実験では、肝臓内に EGFP 陽性細胞を多数認めた。肝臓内には hepatocyte の他に Kupffer cell, liver-associated NK cell, sinusoidal endothelial cell, hepatic stellate cell などの non-parenchymal cell と呼ばれる細胞が存在する。この内、Kupffer cell は単球/マクロファージ系細胞とされ、CD45 や CD16 などを発現している。また、liver-associated NK cell も血液細胞であり CD45 陽性である。四塩化炭素による傷害により肝臓内に浸潤する好中球、単球やリンパ球といった炎症性細胞も当然 CD45 陽性である。EGFP 陽性細胞が血液細胞なのかどうかを抗 CD45 抗体を用いて検討したところ、50%の細胞は陽性であったが、残り 50%は陰性であり非血液細胞になっていることが判明した。骨髄には造血幹細胞以外に間葉系幹細胞も存在するので、その細胞に由来する可能性が疑われた。そこで、次に、SCTP-mice を用いて同様の検討を行ったが、TNC-mice での結果とほぼ同じ結果が得られた。従って、四塩化炭素による傷害下では、造血幹細胞に由来する非血液細胞が傷害肝に出現することが証明できた。しかし、これらの細胞が oval cell でないことはこれまでの研究（平成 16-17 年度科研費）でわかっていた。肝線維化と関連する細胞として注目されるのが肝星細胞であるが、Vitamin A 貯留細胞、脂肪貯留細胞等とも呼ばれ、oil-red-O (ORO) 染色で赤く陽性に染まる特徴を有する。そこで、まず、ORO 染色を行い EGFP 陽性細胞が脂肪滴を貯留しているかどうか検討したところ、ORO 陽性の細胞が認められた。ORO 染色と各種抗体を用いた免

疫組織染色との同時解析により、EGFP 陽性 ORO 陽性細胞は間葉系細胞に発現する Vimentin や神経外胚葉系細胞に発現する Glial fibrillary acidic protein (GFAP) が陽性であることが判明した。この表現型は肝星細胞のそれに一致するものである。また、肝星細胞が産生することが知られている ADAMTS-13 も陽性であった (Figure 1)。一部の EGFP 陽性細胞は α -smooth muscle actin が陽性であり、活性化した肝星細胞と考えられた。また肝傷害を施した SCTP マウスの肝臓を摘出し、比重遠沈法にて肝星細胞を含む分画を分離後培養し、培養細胞を collagen-I、ADAMTS-13 に対する抗体を用いた染色を行い、造血幹細胞由来の EGFP 陽性細胞が線維化の原因となる collagen-I を産生していることが示された (Figure 2)。

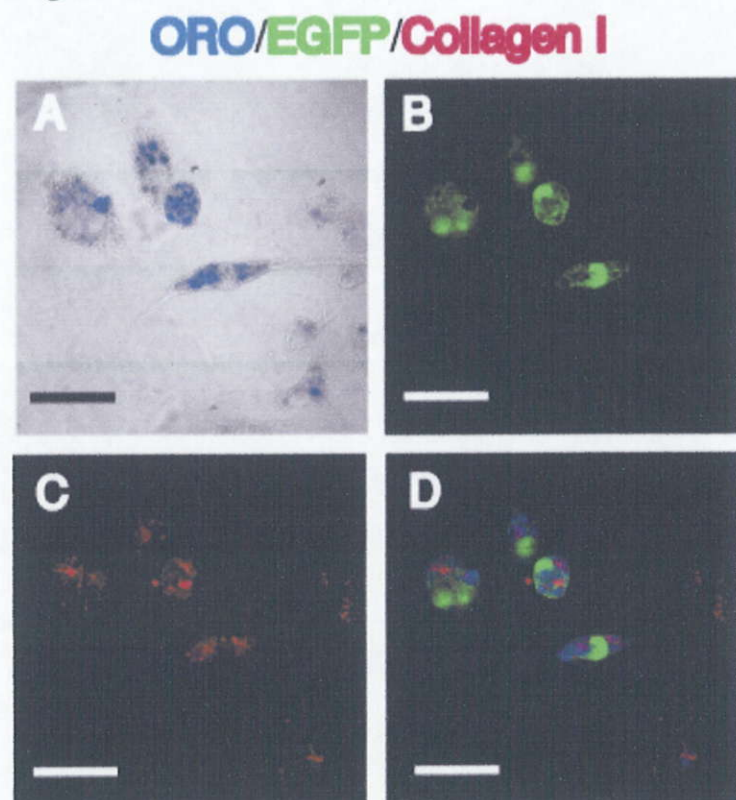
- ② 肝傷害マウスの肝臓に認められた肝星細胞が真にドナーの造血幹細胞からの分化によるものなのか、それともドナーの造血幹細胞に由来する血液細胞とレシピエント細胞の細胞融合なのかを明らかにするために Y 染色体 FISH を行った。我々はオス EGFP マウス由来の造血幹細胞 1 個をオス Ly-5.1 マウスに移植するモデルを作成したので、Y 染色体が 1 個であれば分化によるもの、2 個であれば細胞融合によるものであると結論付けられる。肝臓組織と培養細胞の 2 種類の検討を行ったが、観察した細胞全てで 1 個の Y 染色体を確認したことから、傷害肝に存在する EGFP 陽性の肝星細胞は造血幹細胞からの分化によるものと証明された (Figure 3)。
- ③ 以上の結果は 2006 年 12 月 9-12 日に米国 Orlando にて開催されたアメリカ血液学会で発表 (示説) し、さらに Blood 誌 (111:2427-2435, 2008) に受理された。
- ④ 骨髄中の造血幹細胞に由来する細胞が肝星細胞に分化しうることは証明したものの、真の意味での肝星細胞の前駆細胞を同定した訳ではない。造血幹細胞に始まる血液細胞系譜のどの段階の細胞がどのような機序で傷害肝に生着し、肝星細胞に分化するのかは不明のままである。そこで、分化段階の異なる造血前駆細胞 (common myeloid progenitors, common lymphoid progenitors, granulocyte/macrophage progenitors) をソーティングして移植したキメラマウスを作成するとともに、骨髄から分離した Lin⁻ 細胞を液体培養して得た単球・マクロファージや末梢血から分離した fibrocyte (線維細胞) の移植を行うことを計画し、現在遂行中である。

Figure 1



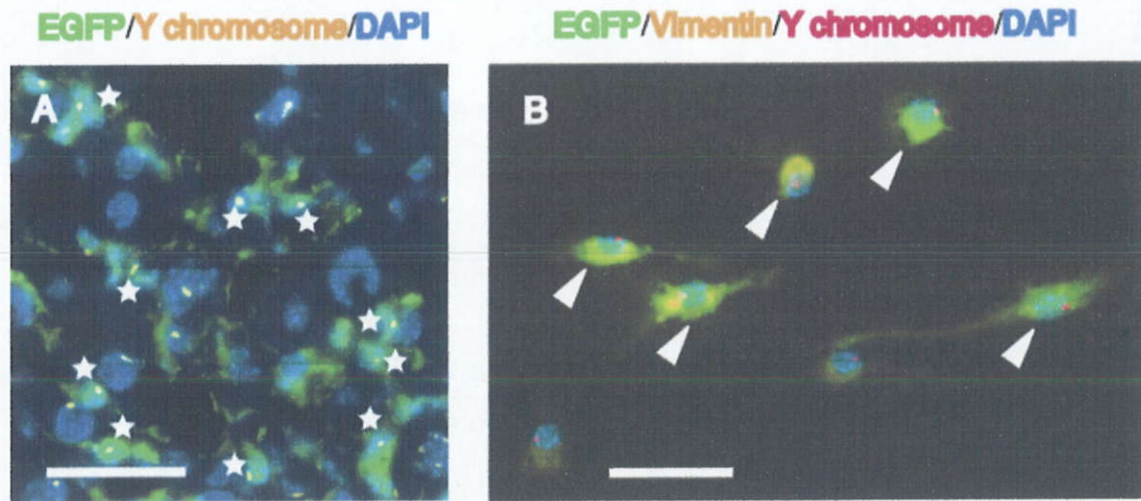
△は EGFP 陽性 ORO 陽性で、かつ、Vimentin、GFAP または ADAMTS-13 陽性の細胞であり、▲は EGFP 陽性だが ORO 陰性の細胞であり、活性化された細胞と考えられる。Vimentin と ADAMTS-13 は活性化細胞にも発現している。

Figure 2



傷害肝より分離後に培養した細胞を用いて、ORO (blue) と Collagen-I (red) の発現を検討した。多くの EGFP (green) 陽性細胞が ORO 陽性であり、Collagen-I を産生していることがわかる。

Figure 3



肝臓組織

培養細胞

肝臓組織の解析 (A) では、全てのEGFP陽性細胞が1個のY染色体を有している (☆) ことがわかる。傷害肝より分離後に培養した細胞の解析 (B) では、EGFP陽性Vimentin陽性細胞に1個のY染色体が存在する (△) ことがわかる。

研究発表

平成18年度～19年度の間に発表されたものは以下の通りである。

(1) 学会誌等

1. Yamamura K, Ohishi K, Katayama N, Yu Z, Kato K, Masuya M, Fujieda A, Sugimoto Y, Miyata E, Shibasaki T, Heike Y, Takaue Y, Shiku H. Pleiotropic role of histone deacetylases in the regulation of human adult erythropoiesis. *Br J Haematol* 135:242-253, 2006
2. Tanaka Y, Masuya M, Katayama N, Miyata E, Sugimoto Y, Shibasaki T, Yamamura K, Ohishi K, Minami N, Shiku H, Nobori T. Development of mixed-type autoimmune hemolytic anemia and Evans' syndrome following chicken pox infection in a case of low-titer cold agglutinin disease. *Int J Hematol* 84:220-223, 2006
3. Sugimoto Y, Katayama N, Masuya M, Miyata E, Ueno M, Ohishi K, Nishii K, Takakura N, Shiku H. Differential cell division history between neutrophils and macrophages in their development from granulocyte-macrophage progenitors. *Br J Haematol* 135:725-731, 2006
4. Kitano S, Kageyama S, Nagata Y, Miyahara Y, Hiasa A, Naota H, Okumura S, Imai H, Shiraishi T, Masuya M, Nishikawa M, Sunamoto J, Akiyoshi K, Kanematsu T, Scott AM, Murphy R, Hoffman EW, Old LJ, Shiku H. HER2-specific T-cell immune responses in patients vaccinated with truncated HER2 protein complexed with nanogels of cholesteryl pullulan. *Clin Cancer Res* 12:7397-7405, 2006
5. Shibasaki T, Katayama N, Ohishi K, Fujieda A, Monma F, Nishii K, Masuya M, Shiku H. IL-3 can not replace GM-CSF in inducing human monocytes to differentiate into Langerhans cells. *Int J Oncol* 30:549-555, 2007
6. Higuchi T, Bartel FO, Masuya M, Deguchi T, Henderson KW, Li R, Muise-Helmericks RC, Kern MJ, Watson DK, Spyropoulos DD. Thymomegaly, microsplenias, and defective homeostatic proliferation of peripheral lymphocytes in p51-Ets1 isoform-specific null mice. *Mol Cell Biol* 27:3353-3366, 2007
7. Suzuki K, Ohishi K, Sekine T, Masuya M, Katayama N. Selective blast cell reduction in elderly patients with acute myeloid leukemia secondary to myelodysplastic syndrome treated with methylprednisolone. *Int J Hematol*

85:344-349, 2007

8. Yamamura K, Ohishi K, Katayama N, Kato K, Shibasaki T, Sugimoto Y, Miyata E, Shiku H, Masuya M, Nishioka J, Nobori T, Nishikawa M, Inagaki Y, Hiramatsu H, Nakahata T. Notch ligand Delta-1 differentially modulates the effects of gp130 activation on interleukin-6 receptor α -positive and α -negative human hematopoietic progenitors. *Cancer Sci* 98:1597-1603, 2007
9. Fuke H, Shiraki K, Sugimoto K, Tanaka J, Beppu T, Yoneda K, Yamamoto N, Ito K, Masuya M, Takei Y. Jak inhibitor induces S phase cell-cycle arrest and augments TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 363:738-744, 2007
10. Yamamura K, Ohishi K, Masuya M, Miyata E, Sugimoto Y, Nakamura S, Fujieda A, Araki H, Katayama N. Ex vivo culture of human cord blood hematopoietic stem/progenitor cells adversely influences their distribution to other bone marrow compartments after intra-bone marrow transplantation. *Stem Cells* 26:543-549, 2008
11. Miyata E, Masuya M, Yoshida S, Nakamura S, Kato K, Sugimoto Y, Shibasaki T, Yamamura K, Ohishi K, Nishii K, Ishikawa F, Shiku H, katayama N. Hematopoietic origin of hepatic stellate cells in the adult liver. *Blood* 111:2427-2435, 2008

(2) 口頭発表

1. 発表者名 : 宮田恵里、榎屋正浩、片山直之
テーマ名 : 肝星細胞は造血幹細胞起源である
学会名 : 第4回幹細胞シンポジウム
年月日 : 平成18年5月19日
開催地 : 東京
2. 発表者名 : Miyata E, Masuya M, Ishikawa F, Yoshida S, Kato K, Ohishi K, Katayama N
テーマ名 : Hematopoietic origin of hepatic stellate cell
学会名 : 48th Annual meeting of American Society of Hematology
年月日 : December 9-12, 2006
開催地 : Orlando, USA

3. 発表者名 : Masuya M
テーマ名 : Hematopoietic origin of hepatic stellate cells
学会名 : Japanese-German Conference Regenerative Medicine 2007
年月日 : March 30-31, 2007
開催地 : Rostock, Germany
4. 発表者名 : 山村賢太郎、大石晃嗣、榊屋正浩、片山直之
テーマ名 : ヒト臍帯血造血前駆細胞を培養後に骨髄内移植すると、生着していない他の部位の骨髄への遊走が低下する
学会名 : 第69回日本血液学会、第49回日本臨床血液学会合同総会
年月日 : 2007年10月11日
開催地 : 横浜

(3) 出版物
なし