

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590968

研究課題名(和文) 遺伝子導入による間葉系幹細胞の肝修復再生能プログラミングと肝再生療法への応用

研究課題名(英文) Gene transfer programming of mesenchymal stem cells for repairing and regeneration of the liver, and its application for liver regeneration therapy

研究代表者

酒井 佳夫 (Sakai, Yoshio)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：80401925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織由来間質細胞への遺伝子導入による肝細胞への分化誘導を試みる研究を行った。GFPタグ付HNF4a、HNF1b発現プラスミド(pCMV6-HNF4a-GFP, pCMV6-HNF1b-GFP)をエレクトロポレーション法にて導入した。導入後15日目の細胞を回収し、リアルタイムPCRにて遺伝子発現解析を行った。pCMV6-HNF4a-GFP導入細胞ではHNF4aの発現を認めたが、Albumin発現は見られなかった。pCMV6-HNF1b-GFP導入細胞は、HNF1bの発現、Albuminの発現双方認められなかった。脂肪組織由来間質細胞への遺伝子導入による肝細胞分化には、改良が必要であった。

研究成果の概要(英文)：The experimental trial of differentiation of adipose-tissue derived stromal cells to hepatocyte by means of gene transduction was conducted. The pCMV6-HNF4a-GFP expressing GFP-tagged HNF4a and the pCMV6-HNF1b-GFP expressing GFP-tagged HNF1b was transduced to adipose tissue-derived stromal cells by electroporation method. Cells at day 15 after transduction was assessed for gene expression by real-time detective PCR. Cells transduced with pCMV6-HNF4a-GFP expressed HNF4a, however, did not express albumin. Cells transduced with pCMV6-HNF1b-GFP neither expressed HNF1b nor albumin. Improvement is required for differentiation of adipose tissue derived stromal cells by electroporation method.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学 肝再生

1. 研究開始当初の背景

肝臓は、生体のさまざまな代謝の中心的な役割を担い、生命活動の維持に極めて重要な臓器である。肝臓に障害をきたす慢性肝疾患には、B型・C型の慢性ウイルス性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、その他、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変等がある。ウイルス肝炎感染者は、全世界で約5億人、また我が国においては、C型肝炎ウイルス感染者は約190～230万人、B型肝炎ウイルス感染者は約110～140万人と非常に多い。また、現在の国民的健康課題である生活習慣病に多くみられる非アルコール性脂肪性肝炎患者は、我が国では約100万人と推測され、最近では、経済成長の著しい新興国においても増加してきている。これらの慢性肝疾患は、慢性炎症により、肝細胞の壊死、肝線維化の進展を経て、肝硬変に至り、末期的には、代謝機能が破綻し、肝不全に至る。また、慢性肝疾患の終末像である肝硬変状態は、肝癌発生の高危険状態であり、C型肝炎硬変の場合の肝癌発症率は、年率7%である。肝硬変の唯一の根治的治療は肝移植であるが、我が国をはじめとしたアジアでは、文化的・社会的背景のため、脳死肝移植は極めて少なく、生体肝移植が主に行われている。しかし、生体肝移植は、健常者ドナーへの侵襲の問題がある。また、移植レシピエントには免疫抑制剤の継続投与が必要であり、QOLが低下する。よって肝移植に代わる治療法の確立が切望されている。

2. 研究の目的

脂肪組織由来間質細胞における間葉系幹細胞は、肝細胞へ分化する能力を有する。脂肪組織由来間葉系幹細胞への肝細胞分化を誘導する遺伝子導入による肝細胞分化誘導法を検討し、慢性肝疾患に対する肝修復再生効果を最大に発揮する条件、方法を確立し、次世代の脂肪組織由来間質細胞を用いる肝再生療法の基盤技術開発を目指す。

3. 研究の方法

マウス脂肪組織由来間葉系幹細胞への遺伝子導入方法を検討する。脂肪組織はC57BL/6Jマウス鼠径部皮下脂肪組織より酵素処理にて間質細胞を分離し、継代培養し獲得する。Nucleofector™ 2b(Lonza)を用いた電気穿孔法、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入効率を検討し、導入効率を検討する。肝細胞への分化に重要なHNF4a、HNF1b遺伝子導入による脂肪組織由来間葉系幹細胞の肝細胞への分化プログラミングを検討する。

4. 研究成果

電気穿孔法について、継代培養した脂肪組織由来間葉系幹細胞 4×10^5 個へ、(i)CMVプロモーター下にenhanced yellow fluorescent proteinを発現するプラスミドpDC316.EYFP 2 microgramを、細胞懸濁液としてPBS(-) (ii) pDC316.EYFP 2 microgram と human MSC, nucleofector solution (LONZA) バッファー、(iii) pDC316.EYFP 5 microgram と PBS(-)(iv) pDC316.EYFP 5 microgram と human MSC, nucleofector solution (LONZA) バッファー、の各条件にて、装置内のMSC HUMAN HIGH EFFICIENCY U-023の設定にて遺伝子導入を行った。導入後24時間後および144時間後のEYFP発現細胞数は、(i)28.3%(24時間後)、37.3%(144時間後) (ii) 31.4%、19.1% (iii) 24.3%、16.9% (iv) 39.6%、37.3%であった。

また、レンチウイルスベクターによる導入法について検討を行った。GFPを発現するLentivirus(Lentivirus-GFP)をHEK293T細胞にて、Lenti-XTM HTX packaging systemを用いて調整した。多重感染比(MOI: copies/cell)と感染後48時間後のGFP陽性細胞率は、MOI 4.5×10^2 、 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 にて、それぞれ6.6%、16.9%、24.4%、41.9%であった。

次に、CMVプロモーター下にGFPタグ付HNF4aあるいはHNF1bを発現するプラスミド(pCMV6-HNF4a-GFP、pCMV6-HNF1b-GFP、OriGene)を作製し、継代したマウス脂肪組織由

来間葉系幹細胞に対して、Nucleofector TM 2b (Lonza)を用いてエレクトロポレーション法にて遺伝子導入を行った。

遺伝子導入後3日目においてFACSにて評価したところ、16.5%、17.4%の細胞がGFP陽性であった。導入後15日目において細胞を回収、RNAを精製し、リアルタイムPCRにて遺伝子発現解析を行った。コントロール細胞として、マウス肝細胞株H2.35、マウス肝細胞癌株Hepa1-6を用いた。H2.35およびHepa1-6のHNF4a発現は、relative ratio to GAPDHでそれぞれ0.00065、0.00745であった。HNF1bの発現pCMV6-HNF4a-GFPを導入した細胞では、H2.35よりも高いrelative ratio to GAPDH = 0.00148のHNF4aの発現を認めた。しかしながらAlbumin発現は見られなかった。pCMV6-HNF1b-GFPを導入した細胞については、HNF1bの発現、Albuminの発現双方認められなかった。

以上より、脂肪組織由来間葉系幹細胞への遺伝子導入による肝細胞分化には、さらなる改良が必要であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計12件)

1. Higashimoto M, Sakai Y, Takamura M, Usui S, Nasti A, Yoshida K, Seki A, Komura T, Honda M, Wada T, Furuichi K, Ochiya T, Kaneko S. Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4+ T-cell suppression. Eur J Immunol. vol.43, p.2956-2968, 2013. 査読有

2. Seki A, Sakai Y, Komura T, Nasti A, Yoshida K, Higashimoto M, Honda M, Usui S,

Takamura M, Takamura T, Ochiya T, Furuichi K, Wada T, Kaneko S. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. Hepatology. vol. 58, p.1133-1142, 2013.

3. Wada T, Shimizu M, Yokoyama H, Iwata Y, Sakai Y, Kaneko S, Furuichi K. Nodular lesions and mesangiolysis in diabetic nephropathy. Clin Exp Nephrol. vol.17, p.3-9, 2013. 査読有

4. Nakade Y, Fujimura M, Ohkura N, Okuizumi Y, Nakatas M, Nanbu Y, Oe H, Horita H, Sakai Y, Wada T. Prediction formula for interrupter respiratory resistance in healthy Japanese adults. Rinsho Byori vol.60, p.725-733, 2012. 査読有

5. Sakai Y, Tatsumi I, Higashimoto M, Seki A, Nasti A, Yoshida K, Kawaguchi K, Wada T, Honda M, Komura T, Kaneko S. Association of changes in the gene expression profile of blood cells with the local tumor inflammatory response in a murine tumor model. Biochem Biophys Res Commun. vol.428, p.36-43, 2012. 査読有

6. Okada H, Honda M, Campbell JS, Sakai Y, Yamashita T, Takebuchi Y, Hada K, Shirasaki T, Takabatake R, Nakamura M, Sunagozaka H, Tanaka T, Fausto N, Kaneko S. Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. Cancer Res. vol.72, p.4459-4471, 2012. 査読有

7. Takeshita Y, Takamura T, Kita Y, Ando H, Ueda T, Kato K, Misu H, Sunagozaka H, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. Beneficial effect of branched-chain amino acid supplementation on glycemic control in chronic hepatitis C patients with insulin resistance: implications for type 2 diabetes. *Metabolism*. vol.61, p.1388-1394, 2012. 査読有

8. Furuichi K, Shintani H, Sakai Y, Ochiya T, Matsushima K, Kaneko S, Wada T. Effects of adipose-derived mesenchymal cells on ischemia-reperfusion injury in kidney. *Clin Exp Nephrol*. vol.16, p.670-680, 2012. 査読有

9. Marukawa Y, Nakamoto Y, Kakinoki K, Tsuchiyama T, Iida N, Kagaya T, Sakai Y, Naito M, Mukaida N, Kaneko S. Membrane-bound form of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy in a model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther*. vol.10, p.312-319, 2012. 査読有

10. Takata Y, Nakamoto Y, Nakada A, Terashima T, Arihara F, Kitahara M, Kakinoki K, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. Frequency of CD45RO+ subset in CD4+CD25(high) regulatory T cells associated with progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. vol.307, p.165-173, 2011. 査読有

11. Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Sakai A, Sakai Y, Kagaya T,

Yamashita T, Honda M, Kaneko S. Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* vol.53, p.1206-1216, 2011. 査読有

12. Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* vol.141, p.128-140, 2011. 査読有

〔学会発表〕(計8件)

1. 酒井佳夫、関晃裕、金子周一. 肝硬変マウスモデルにおける脂肪組織由来間質細胞投与による肝修復再生効果の検討. 第40回日本肝臓学会西部会. 平成25年12月6日. 岐阜都ホテル、岐阜.

2. Akihiro Seki, Yoshio Sakai, Mami Higashimoto, Takuya Komura, Alessandro Nasti, Keiko Yoshida, Takahiro Ochiya, Takashi Wada, Masao Honda, Shuichi Kaneko. Features of immunomodulatory and therapeutic effects of mesenchymal stromal/stem cells on non-alcoholic steatohepatitis murine model in early and cirrhotic phases. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2013.11.4. Washington D.C., U.S.A.

3. 関晃裕、酒井佳夫、Alessandro Nasti、

吉田佳子、東元真実、小村卓也、本多政夫、金子周一。肝硬変マウスモデルにおける脂肪組織由来幹細胞による肝修復再生療法の検討。第49回日本肝臓学会総会。平成25年6月6日。京王プラザホテル、東京。

4. 酒井佳夫、本多政夫、金子周一。血液細胞の遺伝子発現解析による生体のがん反応解明と消化器癌診断法開発の可能性。第99回日本消化器病学会総会。2013年03月21日。鹿児島。

5. 酒井佳夫、関晃裕、金子周一。肝硬変に対する脂肪組織由来間質細胞による肝再生療法開発。JDDW 2012 シンポジウム 11。2012年10月11日。神戸ポートピアホテル。

6. 酒井佳夫、金子周一、古市賢吾、和田隆志。マウス皮下肝癌モデルにおける末梢血液細胞の遺伝子発現プロファイルの変化。第59回日本臨床検査医学会学術集会。2012年11月30日。京都。

7. Akihiro Seki, Yoshio Sakai, Takuya Komura, Mami Higashimoto, Haruo Fujinaga, Masao Honda, Takashi Wada, Toshinari Takamura, Takahiro Ochiya, Shuichi Kaneko. Therapeutic effect of adipose derived mesenchymal stem cell to murine NASH liver cirrhosis inactivating Kupffer/Macrophage and helper T cell. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study Liver Diseases. 2012年11月13日。Boston.

8. 酒井佳夫、関晃裕、金子周一。脂肪組織由来間質細胞を用いた肝硬変に対する肝再生療法実用化への基礎的検討。第55回日本消化器病学会大会。平成25年10月10日。グランドプリンスホテル新高輪、東京。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

酒井 佳夫 (Sakai Yoshio)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号: 80401925

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし