

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18138

研究課題名(和文) 生体に内在する多能性幹細胞Muse細胞の肝切除周術期における血中動態測定 of 解析

研究課題名(英文) Analysis of blood dynamics measurement during perioperative hepatectomy of Muse cells

研究代表者

伊関 雅裕 (Iseki, Masahiro)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：80793877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 300,000円

研究成果の概要(和文)：健常者の末梢血を採取し、SSEA3抗体を用いてFACSを行うために、FACSの条件検討を繰り返し行ったが、適切な条件が定まっておらずヒトMuse細胞の単離が困難であった。抗体の濃度、抗体の変更などの条件検討やバッファの条件検討を行ったが、0.5%以下のごく僅かなSSEA3陽性細胞の単離にとどまり、単離した細胞の機能解析は実施することができなかった。従って実際の肝切除後患者での解析も行うことができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内に内在するMuse細胞が、心筋梗塞などで炎症・壊死が起こった部分に遊走し組織修復に関わっていることが報告されている。同様の遊走の機序が肝切除周術期に起こっているという仮説は妥当であると考えられるが、今回の研究では条件検討に難渋し解析に繋げることができなかった。我々はFACSでの評価を試みたが、他の実験方法を用いた解析を試みる必要があると考えられる。適切な解析方法が確立でき、肝切除周術期のMuse細胞の血中動態が把握できた場合は、Muse細胞移植の適応の判断に活用でき、その意義は大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Peripheral blood of healthy subjects was collected and FACS conditions were repeatedly examined in order to perform FACS using SSEA3 antibody, but appropriate conditions were not determined and it was difficult to isolate human Muse cells. . . Although conditions such as antibody concentration and antibody change and buffer conditions were examined, only a very small amount of SSEA3-positive cells of 0.5% or less could be isolated, and functional analysis of the isolated cells could be performed. There wasn't. Therefore, it was not possible to perform analysis in patients after hepatectomy.

研究分野：再生医療

キーワード：肝再生 Muse細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Muse 細胞は、骨髄・脂肪・皮膚などの生体組織から容易に採取できる間葉系幹細胞に含まれる生体に内在する新たな多能性幹細胞であり、本学出澤研より報告された。(Kuroda Y, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2010) Muse 細胞は、間葉系幹細胞から多能性幹細胞マーカーである SSEA-3 と間葉系幹細胞マーカーである CD105 の二重陽性細胞として簡便に単離することができる。Muse 細胞は、多能性幹細胞マーカーの発現、3 胚葉分化、自己複製能という多能性幹細胞としての性質を有する。これまでに、各種動物疾患モデルに対する Muse 細胞移植の再生治療効果の検証が行われており、ウサギ急性心筋梗塞モデル、ラット脳梗塞モデル、マウス腎障害モデルなどで、投与した Muse 細胞の障害部位への遊走、生着・分化による組織の機能回復が一貫して報告されている。

ES 細胞や iPS 細胞といった多能性幹細胞は倫理的な問題や遺伝子導入に伴う腫瘍形成が臨床応用への大きな障害となっているが、生体内に存在する Muse 細胞はこれらの弊害がなく安全性にも優れている。ウサギ急性心筋梗塞モデルへの Muse 細胞静脈内投与による心機能の回復が示されたことを受け (Yamada Y, et al. Circ Res. 2018) 岐阜大学医学部附属病院が中心となって 2018 年 1 月から急性心筋梗塞を対象とした Muse 細胞製品の探索的臨床研究が開始された。第二の Muse 細胞の臨床研究として、申請者が勤務する東北大学病院でも脳梗塞患者を対象とした Muse 細胞製品の臨床試験が開始されたところであり、他疾患を対象とした臨床試験への動きが加速するものと思われる。

申請者は Muse 細胞の肝再生への関与について研究を進めてきた。大学院生時代に出澤研において研究を行い、マウス肝障害モデルに Muse 細胞経静脈投与を行ったところ、Muse 細胞が障害肝へ遊走・生着し、肝細胞へ分化することを明らかにした。さらにマウス肝線維化モデルに対する Muse 細胞移植実験では、Muse 細胞の肝細胞への直接的分化や肝線維化抑制効果により、肝機能が改善することを解明し筆頭著者として報告した。(Iseki M, et al. Cell transplantation. 2016) 「腫瘍性を持たない多能性幹細胞 Muse 細胞を用いた新たな肝再生治療」(AMED、16fk0210203h0002)においてさらにブタ 70%肝切除モデルに対する同種他家細胞移植実験を行い、Muse 細胞移植による蛋白合成能改善、肝壊死減少による肝機能改善効果を明らかにした。(https://researcher.jp/projects/view/924937) 肝切除後肝不全は未だ有効な治療法がなく難治性であるが、Muse 細胞は肝切除後肝不全に対する予防・治療へ貢献する可能性があり、今後、Muse 細胞の臨床研究の対象疾患となり得ると考えている。

最近の研究において Muse 細胞は臓器の結合組織や末梢血中にも存在することが明らかとなってきており、日々の組織修復を担っていることが示唆されている。急性心筋梗塞患者を対象とした実験では、末梢血中 Muse 細胞が増加する症例は心機能回復が良好であったとの報告がある。(Tanaka T, et al. Circ J. 2018) 一方、外科手術周術期における Muse 細胞の血中動態に対する影響についての解析は今までのところ行われていない。

申請者は、肝切除周術期における Muse 細胞の血中動態に着目した。肝切除の対象となる肝細胞癌、胆管癌、転移性肝癌などの疾患は、肝炎・肝硬変の合併、胆管炎・化学療法の既往などがある場合が多く、背景肝の機能に大きな違いがある。さらに肝切除の術式も、部分切除から葉切除・拡大葉切除といった大量肝切除まで多岐にわたる。肝切除周術期における末梢血中 Muse 細胞が疾患・背景肝・術式別にどのように変動するかという「問い」を解明するための研究であり、この問いが解明することは、Muse 細胞移植の肝切除後肝不全の予防や治療での活用につながると考えている。

2. 研究の目的

本研究では、注目している Muse 細胞は生体に内在する多能性幹細胞で、心筋梗塞・脳梗塞で既に臨床研究が行われている安全性の高い多能性幹細胞である。申請者は齧歯類やブタの動物肝障害モデルへの Muse 細胞移植実験において肝再生・肝機能改善効果を明らかにしている。本研究は、肝切除周術期における末梢血中 Muse 細胞の病態・術式別の変動パターンの把握が目的であった。

3. 研究の方法

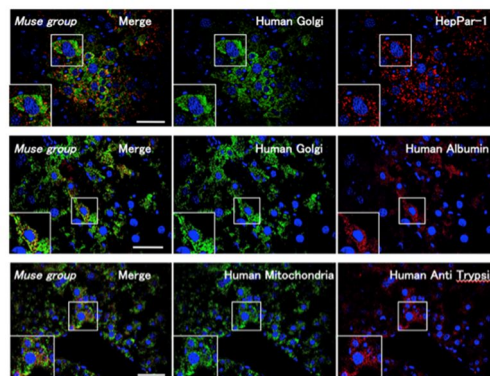


図1. マウス肝線維化モデルにおいて移植した Muse 細胞が生着後、肝細胞マーカーを発現することが明らかになった。

方法として下記の3つを想定していた。

健常者の末梢血を採取し SSEA3 抗体を用いて FACS を行い、Muse 細胞数を計測する手法を習得する。また単離した Muse 細胞の機能評価も行う。単細胞浮遊培養によるクラスター形成率の測定、3 胚葉性分化能を PCR・免疫染色で評価する。これらの実験により、Muse 細胞の多能性幹細胞としての性質が保持されているかを確認する。

次に実際に肝切除患者を対象として実験を行う。術前および術中肝切離開始直後、肝切離終了直後、術直後、術後 1 病日、3 病日、7 病日、14 病日、28 病日に末梢血を 2ml 採取する。血液採取は定期採血および周術期の動脈ラインから回収し、採取量は解析に必要な最低量と考えられる 2ml に留め、患者への侵襲を抑える。回収した血液は迅速に FACS による解析を行い、Muse 細胞数を計測する。さらにクラスター形成率の測定、PCR・免疫染色による三胚葉性分化能の評価を行う。

肝切除患者は、術前必須検査として CT、MRI、肝臓シンチグラフィによる画像評価、ICG 負荷試験を含めた血液検査による肝機能評価を行なっている。術後も同様に血液検査・CT により評価を行なっている。肝切除後の Muse 細胞血中動態の変化と、これらの術前後での肝機能評価による各種評価項目（血清アルブミン値、血清ビリルビン値、プロトロンビン時間、アンモニア値、血小板数、ICG 排泄率、CT による切除肝容量、残肥大率、肝臓シンチグラフィによる残肝機能評価など）の相関を評価する。正常肝と硬変肝、大量肝切除と非大量肝切除、対象疾患（肝細胞癌、胆管癌、転移性肝癌など）で群別化し、疾患・病態・術式別の Muse 細胞の血中動態の傾向を明らかにする。

4. 研究成果

Muse 細胞は生体に内在する多能性幹細胞であり安全性に優れているため、既に心筋梗塞・脳梗塞を対象に臨床研究が開始されている。申請者は、齧歯類やブタの肝障害モデルを使った実験で Muse 細胞の肝再生・肝機能改善効果を解明しており、Muse 細胞の肝疾患への臨床応用も期待される。肝切除後肝不全は未だ有効な治療法がなく難治性であり、本研究は、Muse 細胞の肝切除後肝不全に対する予防・治療への臨床応用を目指し、肝切除患者の周術期における末梢血中 Muse 細胞がどのように変動するかを明らかにし、Muse 細胞の補充が必要である肝疾患・背景肝・術式を解明すること、が目的であった。当初計画していた研究項目は 1 肝切除患者の周術期の末梢血液中 Muse 細胞数の評価、単離した Muse 細胞の質的評価、2 患者を疾患・背景肝・術式で群別化し、それぞれの群ごとの肝切除周術期の Muse 細胞の血中動態の把握、であった。健常者の末梢血を採取し、SSEA3 抗体を用いて FACS を行うために、FACS の条件検討を繰り返し行ったが、適切な条件が定まっておらずヒト Muse 細胞の単離が困難であった。抗体の濃度、抗体の変更などの条件検討やバッファの条件検討を行ったが、0.5%以下のごく僅かな SSEA3 陽性細胞の単離にとどまり、単離した細胞の機能解析は実施することができなかった。従って実際の肝切除後患者での解析も行うことができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|