

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 23 年 4 月 23 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間： 2010年～2011年

課題番号： 22791215

研究課題名（和文） 部分的脾動脈塞栓術（PSE）を用いた肝臓再生～自家骨髄幹細胞移植と関連して～

研究課題名（英文） Liver regeneration by means of partial splenic embolization (PSE) - associated with autologous bone marrow cell transplantation -

研究代表者

山本 晃 (YAMAMOTO AKIRA)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60419695

研究成果の概要（和文）：兎を用いた実験で、慢性肝障害のモデルを作成できた。血清学的、肉眼的、組織学的に肝臓の線維化を認めた。骨髄幹細胞は大腿骨および脛骨から採取することができ、幹細胞を含む単核球を得た。それぞれ生食動脈内注入、骨髄細胞の注入、脾動脈塞栓術の施行、骨髄幹細胞の注入および脾動脈塞栓術を行った。骨髄細胞の注入および脾動脈塞栓術群では、総ビリルビンの低下が認められたが死亡例が多数で十分な検討ができなかった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we were able to make a rabbit model with chronic liver damage. We confirmed significant fibrosis of the liver. We obtained adequate bone marrow stem cells of rabbit and purified bone marrow contains mesenchymal stem cells. We inserted catheter and infused normal saline to the rabbit in the control group, embolized splenic artery, infused stem cells, and embolized splenic artery and infused bone marrow cells. We confirmed the improvement of the serum bilirubin in the bone marrow plus PSE group; however many rabbits died. This was considered to be over stress to the rabbit with chronic liver damage model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線医学

キーワード：再生医学・放射線

1. 研究開始当初の背景

非代償性肝硬変をはじめとした重症慢性肝機能障害の根治療法は肝移植（生体肝移植・脳死肝移植）であるが、ドナー不足や手術侵襲・免疫拒絶といった問題がつきまとうため、現状では対症療法のみでの対応を余儀なくされるケースが多い。また術後に免疫抑制剤を服用しなければならない必要性から手術費用だけでなく術後も含めた医療費も高額である。これを補う新たな有効、安全、安価な肝臓再生療法の開発が急務とされている。そこで我々が注目した治療法は、

1、部分的脾動脈塞栓術（PSE） PSEは主に血小板減少症に対する治療として1980年頃より行われてきた。近年はその効果の他に、治療後アルブミン値上昇等の肝機能上昇が報告され、また肝移植後の肝機能不良症例にも有効と報告されている。その作用機序は、①脾静脈血の減少による相対的な門脈血流の増加、②脾動脈盗血症候群の是正が考えられているが、実際に病理学的に肝線維化の改善を示した報告はなく、現状では肝機能回復を目的とした治療は行われていない。

2、自己骨髄幹細胞移植 2000年に血液疾患患者に対する骨髄移植および末梢血幹細胞移植施行例（女性患者（XX）に男性（XY）より移植した症例の剖検において、解析の結果、慢性炎症環境下にあった肝臓および消化管組織内にY染色体の存在が確認され、骨髄細胞中に多分化能を有する幹細胞の存在が示唆された。その後、坂井田らはマウスを用いた実験により、自己骨髄幹細胞移植の有用性を示した。また同グループは同治療法を臨床応用している。9人の患者に対し、腸骨から採取された自己骨髄幹細胞移植が静脈内投与され、Child-pugh Scoreの改善、アルブミン値上昇等の肝機能改善が示されている。

現状の問題点と仮説

自己骨髄幹細胞移植は、見込みのある治療法であるが、その肝機能改善効果についてはまだ改良の余地がある。より効率的な肝機能改善を導くために、HGF（hepatocyte growth factor; 肝細胞増殖因子）を培養液に入れ、マウス骨髄幹細胞を2週間培養することによってより効率的な肝細胞への誘導と、アルブミン値の改善をもたらした実験報告がなされた。またHGFだけでなくその他多数の炎症性サイトカインが幹細胞を肝細胞へと誘導することはその他多数報告され、肝細胞増殖に必須の増殖促進因子とされている。問題点は、HGFを用いた培養を臨床応用する際にはGMP（薬事法に基づいて厚生労働大臣が定めた、医薬品等の品質管理基準）を満たす施設を設置（数億円の費用）する必要があり、また自己血を培養するため非常に高価な治療となることが想定される。

我々は門脈圧亢進症の治療に対して、日本有数の症例数を行ってきた。経頸静脈的肝内門脈肝静脈シャント形成術（TIPS: Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt）を行った患者から、脾静脈→門脈内にHGFが産生されていることを発見した。現在症例を重ねている途中ではあるが末梢血にもPSE後1週程度でもHGFが認められている。本研究では、自己骨髄幹細胞移植による幹細胞を肝細胞に誘導するため、静脈内注射ではなく動脈内投与した幹細胞に対してPSEを追加することにより、

- ① 静脈血の減少による相対的な門脈血流の増加、
- ② 脾動脈盗血症候群の是正、
- ③ （仮説）PSE後の脾臓からのHGFや炎症性サイトカインの絶え間ない供給が起り、良好な肝機能改善と肝線維化の改善が起るものと考えた。

2. 研究の目的

本研究において、肝機能改善、肝線維化の改善、生存率の向上の3点をエンドポイントとし、PSEの有用性、自己骨髄幹細胞移植の有用性、そしてその併用療法（自己骨髄幹細胞移植+PSE）の有用性を示したいと考えた。

3. 研究の方法

[対象]

日本白色兔

[使用機器装置]

動物用DSA (digital subtraction angiography) 装置

(1)慢性肝障害モデルの作成

Bernacchi ASら Br J Exp Pathol. 1983 Jun;64(3):261-7.の方法を参考にし、四塩化炭素(CCl₄)を週2回、腹腔内に投与する。採血を行い、総ビリルビン、AST、ALT、ALBの各項目を投与前に測定、6週以降1週ごとに採血を行い総ビリルビン値の悪化を確認し、慢性肝障害モデル確立と判断する。

(2)肝組織の線維化確認

肝機能が悪化したモデル兔に対して、屠殺を行い、病理組織を確認、肉眼的、組織学的に肝臓の組織に肝障害=線維化が認められるかを確認する。組織にはマッソン・トリクローム染色を行い、線維化の可視化を援助する。

(3)骨髄幹細胞の採取

前研究として、十分な量の幹細胞を採取する技術確立する。麻酔した兔に対して、脛骨から骨髄幹細胞を含む血液を採取する。方法は18G針を脛骨骨髄内に穿刺、採取を行う。

(4)脾動脈塞栓術の施行

兔に対する脾動脈塞栓術を行う。前研究として正常兔に対し施行する。用意する物品はシースレスでのアングル型マイクロカテーテルの挿入で行う。全身麻酔下に右単径部を外科的に切除し、大腿動脈を露出する。21ゲージの針を用い、大腿動脈を穿刺、.0018インチのガイドワイヤーを挿入、それに沿わせる形でマイクロカテーテルを挿入する。続いて、腹腔動脈を選択し、さらに脾動脈を選択。適宜造影を行い所定の位置までカテーテルを挿入し、塞栓物質（ジェルパート）にて脾動脈を塞栓する。また、同様に、肝動脈を造影し、骨髄幹細胞を動脈注射する。

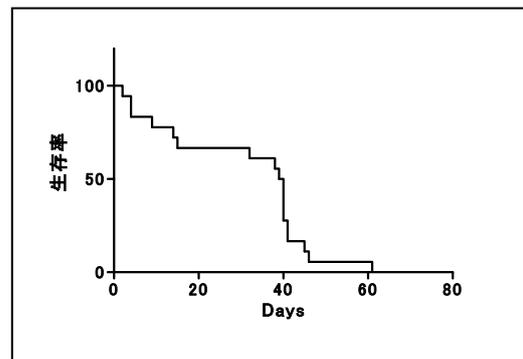
(5)慢性肝障害モデル兔へのPSEと骨髄幹細胞動脈注射の施行

慢性肝障害モデルの兔に対して、生食動脈内注入（コントロール群）、骨髄細胞の注入（骨髄幹細胞群）、脾動脈塞栓術（partial splenic embolization (PSE)）の施行（PSE群）、骨髄幹細胞の注入および脾動脈塞栓術（骨髄幹細胞+PSE群）を行った。肝機能の変化を血液的に、組織学的に評価する。

4. 研究成果

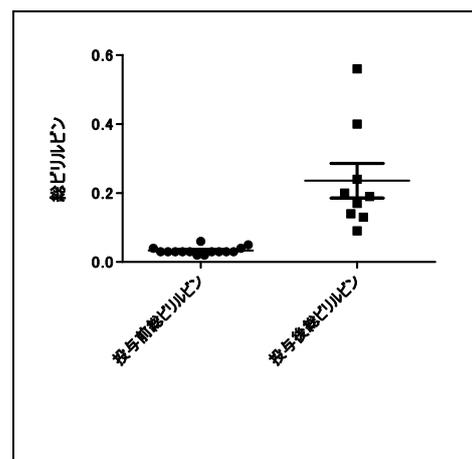
(1)慢性肝障害モデルの作成

計25匹の兔に対して、0.1ml/KgのCCl₄を、週に2回腹腔内投与した。全体として非常に生存率は不良で（下図）、肝不全（急性肝障害）によると思われる早期死亡例を多数に認めたが、体重が2.5Kgを切った場合に腹腔内投与を休止する方法に変更したのち、長期生



存する兔=慢性肝障害兔を得ることができるようになった。

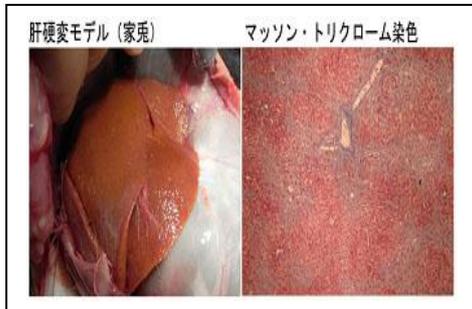
これらの兔に対して、総ビリルビン値は可能である限り6週以降1週ごとに採血を行い、



測定した。術後に有意に悪化を認めた（下図）これらの結果は四塩化炭素の腹腔内持続週2回投与による慢性肝障害モデルの確立と考えられた。

(2) 肝組織の線維化確認

上記のごとく、肝機能悪化例 3 匹の病理標本を得ることができた。肉眼的にすべてにおいて肝臓は黄色に変化し、表面に微細な凹凸が認められた。病理組織上も、マッソン・トリ



クローム染色において、線維化が確認でき、CC 1 4 を用いた腹腔内投与で慢性肝障害モデルが確立できたことが肝臓の肉眼的にも病理的にも確認できた。

(3) 骨髄幹細胞の採取

正常兎 7 匹を用いて、骨髄幹細胞の採取の手技の確立を行った。当初の 4 匹に対しては、骨髄穿刺が十分におこなえず、手技として課題を残したが、脛骨近位および大腿骨遠位からの穿刺を行う方法を確立、さらに、18G の外套針内を 20G の針で穿刺する 2 重管法により安定して骨髄幹細胞を含む血液の採取を行うことができた。12m 1 採取した兎が死亡したことから、1 匹における採取量は 5ml とした。5m 1 の骨髄細胞内に対してフィコール兎用を用いて遠心分離し、単核細胞の形で採取することにも成功している。

(4) 脾動脈塞栓術の施行

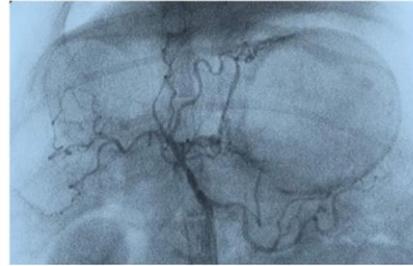
正常兎 4 匹を用いて、前実験を行った。当初はマイクロカテーテルを用いた直接選択方法で予定していたが、困難で 4Fr のカテーテルを直接挿入することとした。

3 匹で手技は成功したが、9 割程度の塞栓を施行した 1 匹目は直後に死亡したため、塞栓率を 3~5 割程度に低減し、成功 (手技後の生存) することが確認できた。

(5) 慢性肝障害モデル兎への PSE と幹細胞動脈注射の施行

四塩化炭素の週 2 回投与に置き、総ビリルビンが低下した兎に対してランダムにわりつけ、各群、1~2 匹、作成することができた。それぞれ、生食動脈内注入 (コントロール群)、骨髄細胞の注入 (骨髄幹細胞群)、脾動脈塞栓術 (partial splenic embolization (PSE)) の施行 (PSE 群)、骨髄幹細胞の注入および脾動脈塞栓術 (骨髄幹細胞 + PSE 群) を行っ

腹腔動脈造影



腹腔動脈造影 (PSE 後)



た。骨髄幹細胞 + PSE 群では、ビリルビン値が 1 週後で 0.24→0.21 と低下を認めたが、もう 1 匹は術後翌日に死亡。PSE 群の 1 匹、骨髄幹細胞群の 2 匹、コントロール群の 2 匹で麻酔時および術中および術直後 1 週以内での死亡が確認された。コントロール群での 1 匹は生存できた。慢性肝障害モデル兎は個体が弱く、麻酔や手術の侵襲には耐えることができないものと考えられた。

(実験の総括)

今回の日本白色兎を用いた実験では、四塩化炭素を用いた慢性肝障害モデルの制作を確立できた。また、手技として骨髄幹細胞の採取が確立できた。脾動脈塞栓術も、手技として確立でき、慢性肝障害モデルの兎に対して、骨髄幹細胞の肝動脈注入と、脾動脈塞栓術の併用が可能であることが確認できた。ただ問題点として、四塩化炭素を用いた慢性肝障害モデルの兎は肝不全で死亡するものが多数であるほど個体として弱体化しており、全身麻酔を必要とする一連の手技に、耐えることができないケース (術中死、術後早期死亡) が多数認められたため、評価を連続して行うほど安定したモデルとは考えられなく、断念した。方向転換をし、非アルコール性脂肪性肝炎モデル兎 (NASH モデル兎) は同様に食餌で肝障害を作るモデルのため、これを用いた同様の実験を予定している。発表等は、途中の必要な手技 (モデルの確立、骨髄幹細胞採取法の確立、脾動脈塞栓術) の確立に成功した段階であるため、行うことができなかった。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 晃 (YAMAMOTO AKIRA)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60419695

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし