

令和 3 年 6 月 27 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10677

研究課題名(和文)大量肝切除後の幹細胞補充療法

研究課題名(英文)Stem cell replacement therapy after massive hepatectomy

研究代表者

高原 武志(Takahara, Takeshi)

藤田医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80453306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝移植の代替療法として幹細胞移植が注目されている。SP細胞はDNA結合色素Hoechst 33342排泄能を持つ細胞で、様々な臓器に存在する。先行研究では、全臓器の中で脾臓がSP細胞の最大の貯蔵庫であることを見出した。本研究では、脾臓SP細胞に注目し、凍結による長期保存が可能かどうか調査することで移植細胞としての有用性を検証した。まず、ラット脾細胞を凍結し期間ごとのSP細胞の存在率を測定した。SP細胞はMP細胞と比較し一貫して凍結保存後の生存率が高かった。SP細胞は細胞移植候補として考えた際、凍結ストレスに強いという有利な特性を持つことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回我々はSP細胞の入手源として脾臓に着目した。過去の文献では、ラット大量肝切除モデルに脾臓摘出を加えることで至適門脈圧へのコントロールが可能であり、肝再生が促進されたという報告がある。今後、摘出した脾臓より分離したSP細胞を大量肝切除モデルに移植し、その生着率や肝再生への寄与などを検討していきたい。肝切除後に脾摘を行い、その脾臓よりSP細胞を分離して自家移植し、さらに肝再生を惹起する至適門脈圧に調整することが可能となれば、中長期的には再生医療における選択的細胞増殖法の開発への足がかりや切除不能肝腫瘍の究極的治療の開発につながると期待している。

研究成果の概要(英文)：Stem cell transplantation is attracting attention as an alternative therapy for liver transplantation. SP cells are cells capable of excreting the DNA-binding dye Hoechst 33342 and are present in various organs. Previous studies have found that the spleen is the largest reservoir of SP cells among all organs. In this study, we focused on spleen SP cells and verified their usefulness as transplanted cells by investigating whether long-term storage by freezing is possible. were frozen and the abundance of SP cells was measured for each period. SP cells consistently had a higher survival rate after cryopreservation than MP cells. When SP cells were considered as cell transplant candidates, they were shown to have the advantageous property of being resistant to freezing stress.

研究分野：肝胆膵外科、肝移植

キーワード：SP細胞 肝再生 脾摘

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年になり、幹細胞に関する研究は、飛躍的な進歩を遂げている。しかし、現在確立されている未分化な組織幹細胞は、表面抗原マーカーを複数組み合わせで純化されるものであり、簡便性に欠け、動物種によってそのマーカーが異なることから普遍性に欠ける。1996年、DNA結合色素である Hoechst33342 の排泄能が高い細胞集団(Side Population 細胞、以後 SP 細胞)を、2波長解析 FACS を用いて分離し、それが高い分化・増殖能があることが示された (Goodell MA, et al. J Exp Med. 1996; 183: 1797-806.)。次いで骨髄から分離した SP 細胞を放射線照射したマウスに移植したところ、移植細胞由来の骨格筋が確認され、SP 細胞の可塑性が示唆された (Gussoni E, et al. Nature. 1999; 401: 390-4.)。最近、骨格筋、心筋、脳、肝臓、腎臓、肺、小腸などでも同様の細胞分画があることが報告され、臓器によらない普遍的な組織幹細胞分離法として、現在注目を集めている。

2. 研究の目的

効果的な治療のためには細胞移植のタイミングが重要であり、一時的な保存が必要となることもある。また、より良好な治療効果を得るために複数回にわたり移植を施行する可能性も考えられる。移植細胞が長期保存に耐えうる能力を有していることは重要な条件であり、SP 細胞にもその能力が求められる。本研究では、脾臓由来の SP 細胞が、一般的な細胞保存法である凍結による長期保存が可能かどうか調査することで、移植細胞としての有用性を検証した。

3. 研究の方法

1. 脾細胞の凍結保存と SP 細胞解析

脾細胞をある一定の期間 (1 か月, 2 か月, 3 か月) 凍結保存後に解凍し、長期凍結保存後でも SP 細胞は存在しうるか検証を行った。また、同時に生細胞中に占める SP 細胞の存在率を測定し、比較した。

1) 脾細胞の採取

ラットより脾臓を摘出後、被膜を小剪刀で切開し、リン酸緩衝生理食塩水 (以下 PBS) 内で鑷子を用いて脾臓をしごくように圧搾し、70 μm のセルストレーナー (Falcon Cell Strainers, Corning 社, ニューヨーク, アメリカ) で粗大な結合組織を除去することで、赤血球成分を含む脾細胞浮遊液を作成した。その後、塩化アンモニウム溶液 (RBC Lysis Buffer, pluriSelect 社, ライプツィヒ, ドイツ) で赤血球を溶血させ除去し、脾

細胞を採取した。

上記手技で採取された細胞集団の評価は、採取した細胞中の T 細胞率を測定し、一般的なラット脾細胞の population と比較することにより行った。汎 T 細胞マーカーである CD3 抗原を発現した細胞を、あらかじめ FITC 標識されたラット抗 CD3 抗体 (FITC anti-rat CD3 Antibody, BioLegend 社, サンディエゴ, アメリカ) と反応させ免疫染色し、FACS (FACS Aria, Becton Dickinson 社, フランクリンレイクス, アメリカ) を用いて測定を行った。

2) 脾細胞の凍結保存

採取した脾細胞は $2\sim 3.0 \times 10^6$ 細胞/ml となるようにジメチルスルホキシド (DMSO) 含有の凍結培地 (CELLBANKER 1, 日本全薬工業株式会社, 福島) で懸濁後, -80 で凍結保存した。

3) Hoechst 染色

脾細胞を $10^6 \sim 10^7$ 細胞/ml になるように培地に再懸濁し, Hoechst 33342 (bisBenzimide H 33342, Sigma-Aldrich 社, セントルイス, アメリカ) を終濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ となるように添加した。染色培地はダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich 社) に非働化处理済のウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum, Thermo Fisher Scientific 社, ウォルサム, アメリカ) (以下 FBS) を終濃度 2%, HEPES buffer (HEPES-Buffer 1 M, pH 7.5, American Research Products 社, ウォルサム, アメリカ) を終濃度 10 mM となるように添加したものを使用した。コントロール群には, ペラパミルを終濃度 $20 \mu\text{g/ml}$ となるように追加で添加し

た。攪拌しながら 37 で 90 分間インキュベートした。インキュベート後細胞を洗浄し, propidium iodide (Propidium iodide, Sigma-Aldrich 社) (以下 PI) を終濃度 $2 \mu\text{g/ml}$ となるように添加した冷 PBS で再懸濁した。染色後の細胞は氷上で保管した。

4) SP 細胞解析

Hoechst 染色した脾細胞を FACS を用いて PI 陰性の生細胞を選別後, 縦軸に Hoechst blue (424/44) と横軸に Hoechst red (585/42) の 2 波長に展開した。双方で蛍光強度が低い, すなわち Hoechst 染色性の低い細胞集団が SP 細胞であり, Hoechst 排泄能が高いことを意味する。

2. SP 細胞と MP 細胞の分離と凍結保存

SP 細胞と SP 細胞以外の細胞 (main population 細胞, 以下 MP 細胞) を分離後にそれぞれ単独で凍結保存し, 凍結後 1・5・10・20・30 日で解凍した。凍結保存期間によってそれぞれの細胞の生存率の推移の比較を行った。

採取後の脾細胞を上記と同様に Hoechst 33342, PI で染色し, FACS を用いて SP 細胞と MP 細胞をそれぞれ約 2 万個ずつ分離した。分離した細胞は凍結培地内に直接採取し, 採取後は直ちに -80 で凍結した。

1) 生細胞率測定

SP 細胞と MP 細胞をそれぞれ Annexin V と Ethidium homodimer III (以後 EthD-III) で 2 重染色し解析を行った。

染色には Apoptotic/Necrotic Cell Detection Kit (PromoCell 社, ハイデルベルク, ドイ

ツ) を使用した。Annexin V は細胞膜構造の変化が生じたアポトーシス細胞・ネクローシス細胞に特異的に結合するタンパク質で, 本キットではあらかじめ FITC 標識されている。EthD-III はネクローシス細胞のみを染色する蛍光色素である。レーザーで励起される波長がそれぞれ異なるため FACS で生細胞, アポトーシス細胞, ネクローシス細胞の解析が可能である (図 1)。SP 細胞と MP 細胞をそれぞれプロトコールに準じて染色後, FACS を用いて生細胞数, アポトーシス細胞数を計測し, 生存率を測定した。ピペッティングや遠心操作などの機械的障害に起因すると考えられるネクローシス細胞は, 計測から除外した。

4 . 研究成果

SP 細胞は全保存期間で存在し，凍結後 1 か月で存在率が上昇していた．また，SP 細胞は MP 細胞と比較し一貫して凍結保存後の生存率が高かった．SP 細胞は細胞移植候補として考えた際，凍結ストレスに強いという有利な特性を持つことが示された．

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
研究分担者	佐々木 章 (Sasaki Akira) (40275540)	岩手医科大学・医学部・教授 (31201)	

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