

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590794

研究課題名 (和文) 末梢血のリサイクルによる新たな肝不全治療法の確立

研究課題名 (英文) Establishing a new therapeutic strategy for liver failure by recycling phlebotomized blood cells

研究代表者

松本 伸行 (MATSUMOTO NOBUYUKI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：60300951

研究成果の概要：C型慢性肝炎に対する瀉血療法で採取された血液にはC型肝炎ウイルスが存在しているため廃棄処分されている。本研究は、この末梢血液を再利用する事により安全で安価な新しい肝不全治療戦略の可能性を追求するものである。本研究では、以下の内容を示すことができた。1) 瀉血血液中には肝細胞へ分化可能な細胞が存在している。2) 瀉血により血中ヘモグロビン値の低下を認めた症例では、末梢血幹細胞のマーカーであるCD34陽性の細胞が瀉血血液中に増加する。3) 瀉血により血中ヘモグロビン値の低下を認めた症例では、肝細胞へ分化しうる細胞集団も増加する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：C型慢性肝炎、瀉血療法、肝再生

1. 研究開始当初の背景

Kimberらは慢性肝疾患における貧血発症の機序についての研究で、肝硬変症例の約半数に骨髓所見を認める事を報告した (Kimber, C. et al. Q. J. Med. 34:33-63, 1965)。また、近年肝再生における肝細胞の source として骨髓細胞の可能性が指摘されている (. Petersen BE, et al., Science. 284:1168-70, 1999, Terai S, et al., Stem Cells.

24:2292-8, 2006)が、骨髓細胞が生体内で直接肝細胞へ分化する事は稀であると考えられている (Thorgeirsson SS, et al. Hepatology. ;43:2-8, 2006)。

また一方で、サイトカインなどによる様々な骨髓への造血刺激により、末梢血幹細胞が増加する事

はずで知られている (Teshima T, et al., Bone Marrow Transplant. 1992 ;10:215-20, 1992)。これらの事から、瀉血による骨髄造血刺激においても末梢血幹細胞が増加する可能性があり、この末梢血幹細胞は肝細胞へ分化が可能であると想定され、肝不全治療に使用できる可能性があるが、現在までに瀉血血液中にそのような細胞が存在しているという報告はない。

C 型慢性肝炎に対する瀉血療法で採取された血液には C 型肝炎ウイルスが存在しているため廃棄処分されている。本研究は、この末梢血液を再利用する事により安全で安価な新しい肝不全治療戦略の可能性を追求するものとして計画された。

2. 研究の目的

瀉血治療を行っている C 型慢性肝炎症例の末梢血中に、肝細胞への分化が可能な細胞が存在する事を証明する事を目的とする。

3. 研究の方法

IFN を用いた抗ウイルス療法にてウイルス排除を達成できず、他の肝庇護療法にて血清 ALT 値の改善を認めなかった C 型慢性肝炎患者で瀉血治療を行っており、本研究への参加に同意を得られた症例を対象とした。

(1) 瀉血血液から密度勾配遠心法により単核球を分離し、ヒト間葉系幹細胞用培地 (Mesenchymal Stem Cell Basal Medium: MSCBM) を用い Gelatin Coated Plate 上で 14 日間培養を行った。

(2) 14 日間培養した細胞をさらに、Ochiya らの報告 (Yamamoto H, et al. Hepatology. 37:983-93. 2003) を参考に、Dexamethasone, HGF, FGF1, FGF4 を用いて 7 日間培養し、分化誘導を行った後、肝細胞特異的な遺伝子の発現について解析した。

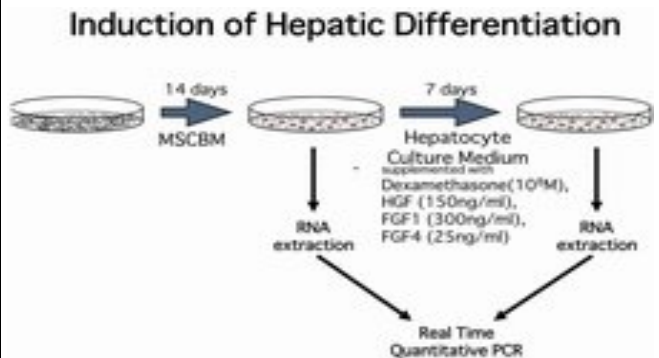
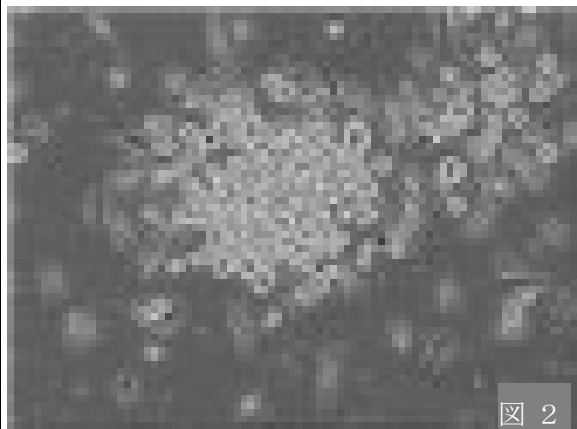


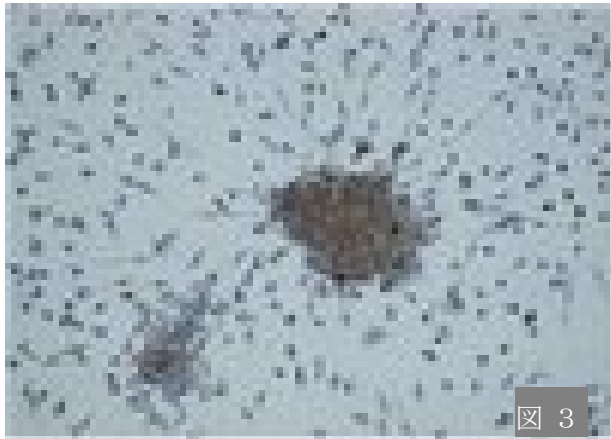
図 1

4. 研究成果

(1) 瀉血により Hb 値の低下を認めた症例で図 2 の様なコロニー形成を認めた。



一方で、Hb 低下を認めない症例ではこの様な形態のコロニー形成は認められなかった。免疫染色にて検討を行ったところ、CD34 陽性であることが示された (図 3)。
この結果より、瀉血による貧血刺激により、末梢血幹細胞分画が増加する事が示唆された。



(2) この末梢血幹細胞を含む末梢血単核球を用い一週間の分化誘導する事により、GATA4, HNF4a, HNF3b 等、内胚葉系細胞で発現する転写因子で 15~50 倍の発現増強を認めた(図 4)。

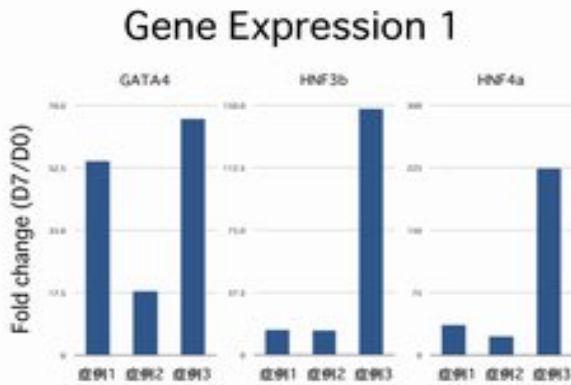


図 4

同時に、AAT, TAT, TTR, AFP, ALB, AAT, TAT, G6P 等の肝細胞特異的遺伝子の u 発現を調べると、15~900 倍の発現増強を認めた(図 5、6)。

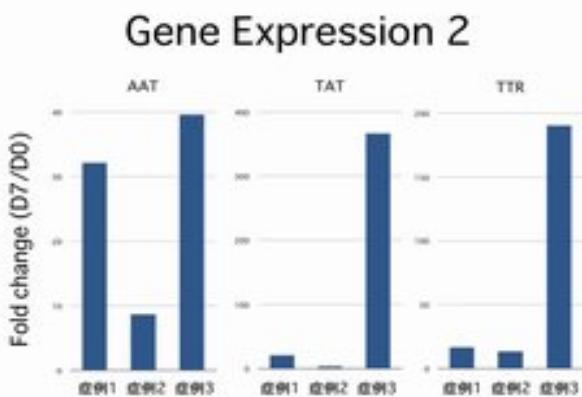


図 5

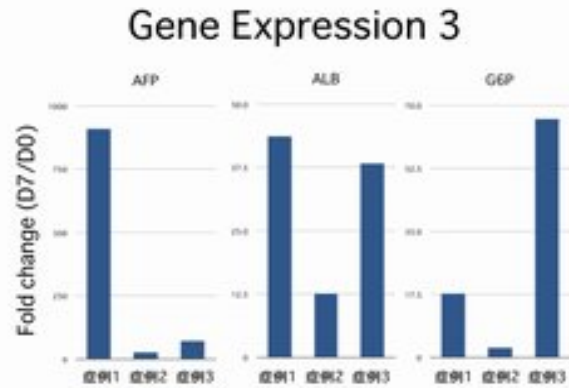


図 6

以上の結果より、瀉血血液内に含まれる単核球には肝細胞への分化能を有する細胞分画が存在している事が示された。

また、本研究で用いられた細胞は約一年間の凍結保存の後、同様の実験結果を再現する事が可能であった。

本研究における今後の課題として下記が挙げられる。

- (1) 本研究で示されたような、瀉血症例の末梢血で増加している未分化な細胞分画の特定と、生体内における役割の解析。
- (2) 培養条件の最適化による再現性と分化効率の向上。
- (3) 長期冷凍保存の細胞への影響の検討。

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)

[学会発表](計 1 件)
松本伸行、鈴木通博、伊東文生
 瀉血血液中に含まれる肝細胞分化可能細胞分画同定の試み
 第 16 回日本消化器関連学会週間

2008年10月1日

東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 伸行(MATSUMOTO NOBUYUKI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号：60300951

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし