

機関番号：10107

研究種目：基礎研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591509

研究課題名(和文) 選択的骨髄細胞移植の効果に関する基礎的検討

研究課題名(英文) Effects of selective bone marrow cells transplantation

研究代表者

稲垣 光裕 (INAGAKI MITSUHIRO)

旭川医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80261410

研究成果の概要(和文)：骨髄細胞および分離肝細胞移植の治療効果を、レトルリシン / 70% 部分肝切除による肝障害に対して検討した。無アルブミンラット(F344alb)に肝細胞の増殖抑制効果のあるレトルリシンを2回(2週あけて)腹腔内投与し、その4週目に70%部分肝切除後すぐに門脈内に、F344ラットから分離した骨髄由来細胞または分離肝細胞を注入し移植した。骨髄細胞および分離肝細胞の肝内移植は、パラクライン機構により急性肝障害を抑制する。

研究成果の概要(英文)：The therapeutic effects of bone marrow and hepatocyte transplantation were investigated regarding the treatment of retrorsine-partial hepatectomy-induced liver injury. Analbuminemic F344alb rats were given 2 doses of retrorsine 2 wk apart, followed 4 wk later by transplantation with F344 rat bone marrow cells or hepatocytes immediately after a two-thirds hepatectomy. Both bone marrow and isolated hepatocytes transplantation into the liver could prevent acute hepatic injury, conceivably due to a paracrine mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
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：外科学一般

キーワード：移植外科学

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで“第2の肝臓”を生体内に再構築するため、先天的にアルブミン合成能を欠くF344ラット由来の無アルブミンラット(F344-alb)を用いた分離肝細胞(HEP)および骨髄由来細胞(BMC)の脾臓・門脈内移植法について報告してきた。この移植モデルは、1) 同種同系移植では免疫抑制剤投与を必要としない。2) 抗アルブミン抗体を用いた免

疫染色やエライザ法による血清中アルブミン値の測定により簡単かつ再現性よく移植細胞の評価が長期間可能である。3) 正常型アルブミン遺伝子解析により移植細胞の存在を容易に同定できる。などの優位な点がある。この移植系を用いて、1) 同系正常アルブミン産生ラット(F344)からコラゲナーゼを用いて分離したHEPをF344-alb脾臓内および門脈内に移植、これら臓器内で移植肝細胞

が生着・増殖(脾臓内)し肝固有機能を長期間維持すること(K. Ogawa, M. Inagaki, et al. Transplantation 1993;56:9-15、H. Ikebukuro, M. Inagaki, et al. Eur Surg Res 1999;31:39-47)。2) F344 由来BMCをF344-alb 門脈内へ移植、宿主肝臓内でBMCから hepatocyte-like cellsへ分化・クラスター形成すること(J. Arikura, M. Inagaki, et al. J Hepatol 2004;41:215-221)。3) G-CSF投与により末梢血中に誘導した末梢血幹細胞もBMC同様に宿主肝臓にて hepatocyte-like cells へと分化・クラスター形成すること(X. Huiling, M. Inagaki, et al. J Surg Res 2004;122,75-82)。4) BMC凍結保存後も hepatocyte-like cellsへの分化・クラスター形成能を維持すること(M. Inagaki et al. Surg Today 2005;35:955-960)。5) 肝非実質細胞中にも多分化能を有する幹細胞が存在し、宿主肝臓内で hepatocyte-like cells へ分化・クラスター形成すること(Y. Xia, B. Zhang, M. Inagaki, et al. Eur Surg Res 2006;38:533-539)。を報告してきた。

近年、骨髄に存在する多分化能を有する幹細胞(mesenchymal stem cell)を hepatocyte-like cells へ分化・誘導できることが報告(B. E. Petersen, et al. Science 1999;284:1168-1170、N. D. Theise, et al. Hepatology 2000;31:235-240)され、肝機能補助を目的とする再生療法において採取しやすい細胞供給源としての自己骨髄由来細胞が注目されているが、急性肝障害に対する骨髄由来細胞移植の評価についての報告は限られている。

2. 研究の目的

今回の研究は、アルブミン合成能力のない無アルブミンラット(F344-alb)を用いて、アルブミン合成能力のある正常型ラット(F344)の骨髄由来細胞(BMC)移植および分離肝細胞(HEP)移植による肝障害抑制効果を明確に評価し、今後の臨床試験を推進するための基礎的データを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

1. Retrorsine(RS)投与後 2/3 部分肝切除(PH) F344-albに関する検討

現在まで肝障害抑制(肝線維化改善)・肝再生促進への骨髄由来細胞(BMC)移植効果に関する報告は、1) GFP/CCl₄マウスモデルでの肝線維化抑制効果(S. Terai, et al. J Biochem (Tokyo) 2003;134:551-558、I. Sakaida, et al. Hepatology 2004;40:1304-1311)。2) 本邦初の臨床報告例(9例、肝硬変症例)(S. Terai, et al. Stem Cell 2006;24:2292-2298)。3) 独国からの

臨床報告例(6例、術前門脈塞栓術施行症例)(G. Furst, et al. Radiology 2007;243:171-179)等発表されているが、BMC移植療法による有効な肝障害抑制効果および肝再生促進効果を示す研究・臨床報告はきわめて限られ、急性肝障害に対する自己細胞療法について評価する必要がある。

また、1) 肝機能補助に有効な骨髄細胞分画、移植細胞数、移植のタイミング。2) 宿主肝臓内での移植後長期にわたるBMCのFate等の未確定な基本的問題がある。

今回我々は、ラット肝障害モデルを作製するために、細胞周期特異的に肝細胞増殖抑制作用を有する Retrorsine (RS)(pyrrolizidine alkaloids)に着目し、RS(30 mg/kgを2回 ip)投与後4週目に2/3部分肝切除(RS/PH)を施行した F344-alb 門脈内に HEP を移植、宿主肝臓を移植肝細胞群でほぼ置換する F344-alb 肝置換モデルを作製した(R. Oren, et al. Am J Pathol 1999;29:75-81)。R. Oren, et al. (Am J Pathol 1999;29:75-81)らはSDラット(SD)由来の無アルブミンラット(NAR)を用いてRS/PH後SD由来HEPを門脈内移植、宿主肝臓が移植肝細胞で置換されることが示したが、急性肝障害モデルとしてRS/PH後のNAR生存率に関する報告はない。さらに、加齢ラットを用いた肝障害報告は限られているため、RS/PHによる加齢F344-albの肝障害・処置後の生存率等を検討した。

2. BMC移植およびHEP移植による肝障害抑制機序および肝臓内生着機序に関する検討

BMCおよびHEP門脈内移植による“直接的なRS/PH後のF344-alb肝障害抑制機序”に、1) 宿主肝臓内に生着した骨髄由来細胞からのサイトカイン放出(パラクライン機構)または、接触伝達(ジャクスタクライン機構)等による肝細胞保護効果、2) BMCおよびHEPから肝細胞以外の細胞形質転換による肝機能補助・再生促進効果等があるのかを検証した。

3. 宿主肝臓内で生着した移植BMC発現形質および長期経過に関する検討

宿主肝臓内で生着したBMC由来細胞移植の長期経過を検討、特に癌化の有無を観察した。

4. 骨髄置換モデルにおける免疫寛容誘導の検討

同種細胞移植を可能にするための基礎的検討として、全身放射線照射後のF344-albに同種BMC移植を行い同種細胞移植への免疫

誘導が可能か検討した。

4. 研究成果

1. Rerorsine(RS)投与後 2/3 部分肝切除 (PH) F344-a1bに関する検討 (論文1)

RS/PH を施行した生後 6 ヶ月 (以降) の雄 F344-a1b は肝障害が進行し、処置後 2 週目での生存率は約 30%に低下する。この RS/PH 後の雄 F344-a1b に、雄 F344 (7 週齢) 由来 a) 分離肝細胞 (HEP) b) 骨髄由来細胞 (BMC) をそれぞれ門脈内に移植、これまで以下の興味深い基礎的結果を得た。RS 投与または PH のみでは、F344-a1b は全例生存した。HEP 移植群での生存率改善 (50%) は軽度だった、BMC 移植群では著明に改善 (75%) した。死亡したコントロール群では、RS/PH 後著明に血中ビリルビン・AST/ALT 値が上昇したが、BMC 移植群ではごく軽度であり肝機能障害が有意に抑制された。BMC 移植の投与経路に関しては、門脈内投与と静脈内投与との差はなかった。

2. BMC移植およびHEP移植による肝障害抑制機序および肝臓内生着機序に関する検討 (論文1)

HEP 移植群では、門脈内移植後長期間にわたり正常型アルブミン遺伝子が宿主肝臓内で検出可能であった。一方、BMC 移植群では、門脈内移植後 48 時間目まで正常型アルブミン遺伝子が宿主肝臓内で検出可能であった。BMC 移植群の血中アルブミン値は上昇しなかったが、HEP 移植群では移植後 4 週目では正常 F344 とほぼ同程度の血中アルブミン値まで上昇した。宿主肝臓アルブミン染色では、生存した HEP 移植群では A1b+クラスターが広範囲に生着していたが、BMC 移植群では少数のアルブミン陽性細胞 (A1b+) がクラスター形成していた。

以上の検討より RS/PH 雄 F344-a1b を用いた基礎的検討では、1) RS/PH 処置により雄 F344-a1b は肝機能障害の進行により約 3 分の 2 が死亡する。2) BMC 門脈内移植が RS/PH 後 F344-a1b の生存率改善に寄与し、そのメカニズムには宿主肝臓内で BMC から正常肝細胞へと分化 (誘導)・増殖する肝再生促進効果ではなく、宿主肝臓内に生着した BMC による“直接的な肝障害抑制効果”によることが推測された。

3. 宿主肝臓内で生着した移植BMC発現形質および長期経過に関する検討

宿主肝臓内で生着した BMC 由来細胞移植の長期経過を検討した結果、癌化はみとめられなかった。

4. 骨髄置換モデルにおける免疫寛容誘導の検討 (論文2)

全身放射線照射後の F344-a1b に同種 BMC 移植を行い同種 HEP への免疫誘導が可能であることを確認した。

(今後の課題)

今回の研究では、急性肝障害に対する BMC 門脈内移植の有効性とそのメカニズムを推定することができたが、BMC 中どのような細胞群が寄与しているのかを判定するために各細胞分画を分離・培養後の移植を試みたが、分画した細胞群の維持培養が困難で再現性のある移植結果を得ることができなかった。今後は、精度の高い分離方法・維持培養法を確立することにより、急性肝障害に対する自己細胞療法への応用が期待される。

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 2 件)

1) B. Zhang, M. Inagaki, B. Jiang, M. Miyakoshi, J. Arikura, K. Ogawa, S. Kasai. Effects of bone marrow and hepatocytes transplantation on liver injury. **Journal of Surgical Research** 157, 2009, 71-80

2) M. Inagaki, H. Furukawa, Y. Satake, Y. Okada, S. Ciba, N. Nishikawa, K. Ogawa. The replacement of the liver parenchyma in analbuminemic rats with allogenic hepatocytes is facilitated by intrabone marrow-bone marrow transplantation. **Cell Transplantation (in press)**

[学会発表] (計 3 件)

1) M. Inagaki, B. Zhang, J. Arikura, K. Ogawa. The effect of bone marrow and hepatocyte transplantation against retrorsine-partial hepatectomy induced liver injury in analbuminemic rats. The 10th international cell transplant congress and 36th annual meeting of JSOPMB (Symposium) 2009. 4. 20 Okayama (Japan)

2) 稲垣光裕、佐竹由康、岡田陽子、葛西眞一、山本雅大、小川勝洋 骨髄細胞移植した無アルブミンラットへの adult allogenic hepatocyte 移植に関する検討 第 16 回肝細胞研究会 2009. 6. 26 山形

3) 稲垣光裕、古川博之、西川祐司 ラット同種肝細胞移植による宿主肝細胞置換について—同種骨髄細胞移植による免疫寛容の誘導— JDDW2010 横浜 2010. 10. 13 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣光裕 (INAGAKI MITSUHIRO)
旭川医科大学・大学病院・非常勤医師
研究者番号：80261410

(2) 研究分担者

小川勝洋 (OGAWA KATSUHIRO)
旭川医科大学・医学部・名誉教授
研究者番号：50045514