

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09087

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞/間質細胞株(ASCL)による肝虚血再灌流障害の抑制と肝移植への応用

研究課題名(英文) Evaluation of Adipose-derived Mesenchymal Stem/stromal Cell Line (ASCL) therapy for hepatic ischemia/reperfusion injury and application to liver transplantation

研究代表者

尾原 秀明(OBARA, Hideaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：20276265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラット肝虚血再灌流モデルにおいて、虚血開始24時間前にコントロール(生理食塩水)、ASC、ASCLをそれぞれ脾臓注入したモデルを作成した。120分虚血後の生存率は、無治療のコントロール群と比べ、ASCL又はASCの前投与群では生存率が有意に上昇した。60分虚血後のAST/ALT値は、再灌流3時間後ではASCL群はコントロール群と比較し有意に低下した。HE及びTUNEL染色ではコントロール群と比較し、ASCL及びASCs群ではアポトーシスと組織障害が明らかに軽減した。ASCLはin vivoにおいても抗炎症性サイトカインを発現することにより、虚血再灌流障害を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で使用するASCLは、国際細胞治療学会が定める間葉系幹細胞の定義を全て満たしており、既に医療応用されている他の間葉系幹細胞と同様、高い安全性を有している。一方、従来の間葉系幹細胞の採取方法では、完全に均一な性質を持つ細胞集団を得ることが困難であったが、ASCLはこの課題を克服している。本研究は、これまでの国内外で実施されてきた研究とは異なる世界初の研究である。本研究結果からASCLは肝虚血再灌流障害を抑制することが示唆され、実臨床の肝移植手術における応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In the rat liver ischemia-reperfusion injury model, control (saline), ASCs, and ASCLs were injected into the spleen 24 h before the start of ischemia, respectively. The survival rate of 120 min ischemia was significantly increased in the ASCL or ASCs pre-treatment group compared to the untreated control group. AST/ALT levels after 60 min ischemia were significantly lower in the ASCL group than in the control group at 3 hours after the reperfusion. ASCL may inhibit ischemia-reperfusion injury by expressing anti-inflammatory cytokines in vivo.

研究分野：臓器移植

キーワード：再生医療 間葉系幹細胞 虚血再灌流 肝移植 細胞シート

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝移植時の重篤な合併症の 1 つに肝虚血再灌流血流障害があり、いまだ解決されていない課題である。虚血再灌流は、高度な炎症反応、血管内皮細胞傷害、微小循環障害を惹起し、臓器障害に進展するとともに、急性細胞性拒絶反応も増悪する可能性(Obara H, et al. Am J Transplant. 2005;5:2094-103.)が考えられている。一方、近年、組織/器官障害に対する新しい治療法として幹細胞の応用が期待されている。当教室では、1995 年 4 月から 2018 年 5 月まで、計 276 例の肝移植を施行し、安定した成績を収めているが、さらなる安定した成績を上げるためには術後合併症の克服が急務である。われわれは以前から肝虚血再灌流障害に着目し、その克服のため現在まで数々の基礎研究を継続してきた。

2. 研究の目的

本研究では、ラット肝虚血再灌流障害モデルおよび肝移植モデルを用いて、高い幹細胞活性と多様な生理活性(抗炎症作用、組織保護作用、過剰な免疫抑制作用)等を有する間葉系幹細胞/間質細胞株(ASCL: Adipose-derived Mesenchymal Stem/stromal Cell Line, Tozawa K, Matsubara Y. Blood. 2019 Feb 14;133(7):633-643.)の有用性を検証する。虚血再灌流障害を抑制し、肝移植の新たな治療法を開発することを目的とする(図 1)。

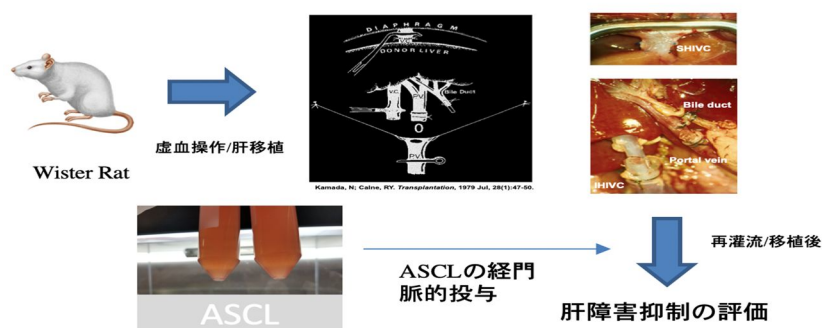
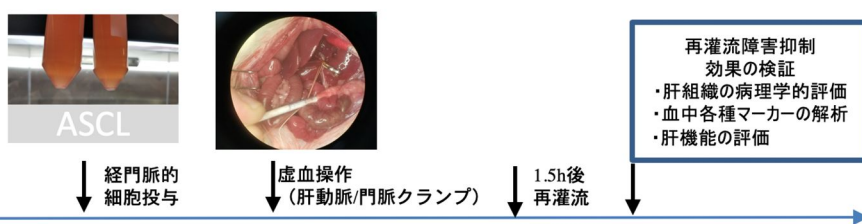


図 1 ラット肝移植モデルに対する ASCL の再灌流障害抑制効果の検証実験

3. 研究の方法

(1) ラット皮下脂肪組織由来 ASCL について、遺伝子及びタンパク発現を検証し機能評価を行う。

(2) ラット虚血再灌流モデルに対する ASCL 投与における虚血再灌流障害の予防効果の検証。
ラット虚血再灌流モデルに対し ASCL を脾臓注入し、再灌流後の肝臓におよぼす組織障害や炎症、アポトーシス、血中各種マーカーおよび生命予後についての評価を行う。



肝虚血直前に、経門脈的に ASCL を 5.0×10^6 cells 投与する。ラット肝十二指腸間膜を 1 時間 70% クランプし、その後に再灌流する。再灌流後、1, 3, 6, 12, 24, 48 時間後に動脈血を採取する。別個体で、再灌流後 12, 24, 48 時間後に肝組織を採取する。ASCL に対するコントロールとして、PBS を経門脈的に投与し、同様に動脈血および肝組織を採取し、ASCL 群と比較検討する。

4. 研究成果

ラット肝虚血再灌流モデル(70%虚血)において、虚血開始 24 時間前にコントロール(生理食塩水)、ASC、ASCL をそれぞれ脾臓注入したモデルを作成した。120 分虚血後の生存率は、無治療のコントロール群と比べ、ASCL 又は ASC の前投与群では生存率が有意に上昇していた。60 分虚血後の AST/ALT 値は、再灌流 3 時間後では ASCL 群はコントロール群と比較し有意に低下し、24 時間後も同様に低値であった。HE 及び TUNEL 染色ではコントロール群と比較し、ASCL 及び ASCs 群で

はアポトーシスと組織障害が明らかに軽減した。肝組織障害を Suzuki score で定量化:コントロール群に比し、ASC 及び ASCL 群では有意にスコアが低下した。肝臓組織の PCR 検査値において ASCL 群では、TGF- β 1, IL-10, IL-1Ra の遺伝子発現量が有意に上昇し、IL-6 の遺伝子発現量は有意に減少を示した。血清の ELISA 測定において ASCL 群では TGF- β 1, IL-10 の濃度が上昇し、IL-18 の血清濃度はコントロール群より有意に減少を示した。肝臓組織のタンパク発現(Western blot 法)において ASCL 群では、NLRP3, cleaved Caspase-1, IL-1 β , IL-18 の蛋白量発現量が低下した。以上より、ASCL は in vivo においても抗炎症性サイトカインを発現することにより、虚血再灌流障害を抑制する可能性が示唆された。

2022 年度からラット肝移植モデルの作成を開始し、現在、syngeneic combination で安定した生存が得られるかを検証中であり、確認でき次第、虚血再灌流モデルに準じてレシピエントラットの肝移植前に ASCL を脾臓注入し、同様の検証を行う予定である。

脾臓注入法により ASCL の虚血再灌流抑制効果を示唆する結果が得られたが、実臨床では脾臓注入は侵襲が大きく、より実臨床に応用できる ASCL の投与法を模索し、2022 年度は ASCL の細胞シートを作成することとした。温度応答性培養皿を使用することでシート化に成功し、ラット正常肝に貼付したところ、ASCL の生着を確認した。本細胞シートで同様の虚血再灌流実験を行い、脾臓注入群と同等の生存率改善効果が得られた。今後はラット肝移植モデルで検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾原秀明
2. 発表標題 間葉系幹細胞/間質細胞株（ASCL）による肝虚血再灌流障害軽減効果の検討
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 脂肪組織由来間葉系幹細胞株（ASCL）による肝臓治療	発明者 尾原秀明	権利者 慶應義塾
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-204143	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	松原 由美子 (MATSUBARA Yumiko) (70365427)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任准教授 (32612)	
研究分担者	福田 和正 (FUKUDA Kazumasa) (50348786)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	

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
---------	---------