

研究者：横山 知美（所属：日本歯科大学大学院生命歯学研究科 衛生学講座）

研究題目：肝硬変ラットモデルへの再生肝細胞移植の治療効果について

目的：

肝臓疾患の原因はウイルス性から代謝性のものまで多様であり、これらの疾患は慢性的な刺激により肝硬変に移行するが、この病態については様々な治療が試みられている。臓器移植はその治療のひとつであるが、ドナー不足のため難しいという現状がある。さらに移植した臓器が患者に適合するか、拒絶反応が見られないかといったことも熟慮されるべき重要な課題である。したがって移植治療は有用ではあるが、困難さを伴う治療法であるといえる。

そこで我々はこの代替治療として肝臓再生について研究している。これまでに行った研究内容は、ヒト乳歯歯髄幹細胞を肝細胞に分化させ、急性肝障害や胆汁性肝硬変のラットモデルに移植する実験である。この前臨床研究では、肝細胞に分化させる際に、硫化水素を用いてその成熟度を上げるという事実を確かめている。今回はそれらの実験を応用し、四塩化炭素によって作成した重度の肝硬変ラットに移植することで、その治療効果について検討した。

対象および方法：

対象：乳歯歯髄細胞及びヌードラット、オス、9週齢

方法：

1. 細胞培養と分化

採取した歯髄細胞を 4mg mL^{-1} dispase II 及び 3mg mL^{-1} collagenase I にて酵素処理を行い、 25cm^2 のフラスコに播種した。その際に用いる培養液は 20% fetal bovine serum (FBS)、 100U mL^{-1} penicillin、 $100\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin、 $0.25\mu\text{g mL}^{-1}$ amphotericin B (GIBCO) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) であり、培養は 37°C 、5% CO_2 インキュベーター内で行った。

その後 FBS を 10% に減らして 3 回継代培養を行った後、CD117 Micro Bead Kit human を用いて CD117 陽性細胞を抽出した。CD117 陽性細胞が十分な数に到達した段階で、肝細胞分化を開始した。分化培地には 2 種類の培養液を用いた。

ITS-X、ETF 添加 SFM (DMEM) に 20ng mL^{-2} の recombinant human hepatocyte growth factor (HGF) を加え、5 日間培養を行った。その後、1% ITS-X、 $100\mu\text{g mL}^{-1}$ ETF、 20ng mL^{-2} HGF、 10ng mL^{-1} recombinant human oncostatin、 10nmol^{-1} dexamethasone 添加 Iscove's Modified Dulbecco's Medium に分化培地を変更し、11 日間培養した。そのうち最後の 6 日間は 0.1ng mL^{-1} 硫化水素に曝露させた。肝細胞分化に関しては、免疫染色を用いて確認した。

2. 肝硬変モデルの作成

ラットを Test 群、Positive control 群、Negative control 群に分け、Test 群と Positive Control 群に 40% 四塩化炭素を体重に応じて (1.5ml/kg)、月曜日、木曜日それぞれ腹腔内投与した。こ

れを12週間続け、最終投与日から5日後、歯髄幹細胞から分化させた上記肝細胞を10-30個凝集させてHank's Balanced Salt Solution (HBSS)に懸濁し、Test群各1匹あたり 2×10^6 個/100 μ lを、注射器にて脾頭に注入した。またPositive controlに対し、上記に準じ脾臓にHBSS 100 μ lを脾臓に注入した。移植してから28日後、全動物を安楽死させ肝臓、肺、脾臓及び血液を採取した。

3. 動物実験により採取した資料の分析

安楽死時採取した肝臓、脾臓、肺に対してHE染色、Masson's Trichrome染色を行った。同時に、Human Mitochondria、 α FP、albumin、HNF 4 α 、CPS-1、IGFにて免疫染色を行った。また線維化の指標分析のためにWestern blottingによる解析評価も行った。

安楽死前に心臓から採血を行い、アルブミン、尿素窒素、総ビリルビン、ALT、ヒアルロン酸、AFPの血清学的分析を行った。

結果および考察：

1. 細胞培養と分化

光学顕微鏡所見から、分化前の細胞は線維芽細胞であるのに対し、右側の分化後の細胞形態は肝細胞のごとく多角形の形状に変化していた。また免疫染色に関しては、核は青色に、抗体に反応した部分は赤色に染まっている。それぞれの抗原が肝臓マーカーに染色されていることが観察できた。

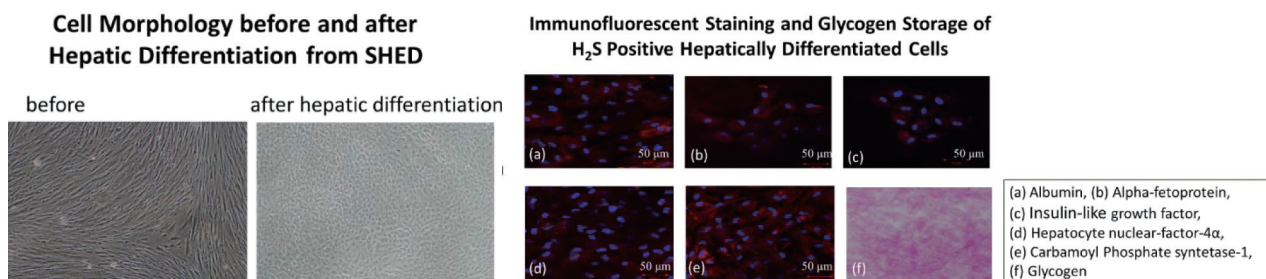


図1 培養細胞の光学顕微鏡像

図2 分化細胞の免疫染色の結果

3. 動物実験により採取した資料の分析

HE染色とMasson's Trichrome染色の結果について示す。移植時と安楽死時の染色像を比較すると、4週間で線維化が減少したことが確認できた。また安楽死時のPositive control群は、Negative control群、Test群と比較して線維化が多く確認された。ヒト乳歯歯髄肝細胞を肝細胞に分化させたものをさらに、脾臓を介して肝臓に移植することによって、線維化の回復が認められたと考えられる。

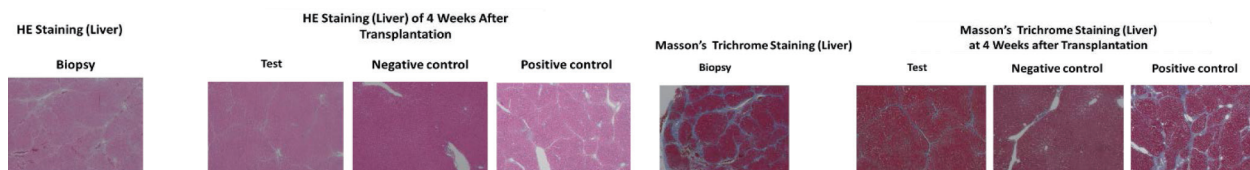


図3 肝臓のHE染色、マッソン・トリクローム染色

免疫染色の結果を以下に示す。肝臓マーカーに関しては、Human Mitochondria、 α FP、HNF 4 α 、IGF、アルブミンが陽性であった。以上の結果より、移植した肝細胞は肝臓及び脾臓内で生着したと言える。また、脾臓内の細胞も肝臓マーカーに陽性のことから、第2の肝臓が脾臓に形成されることも確認できた。

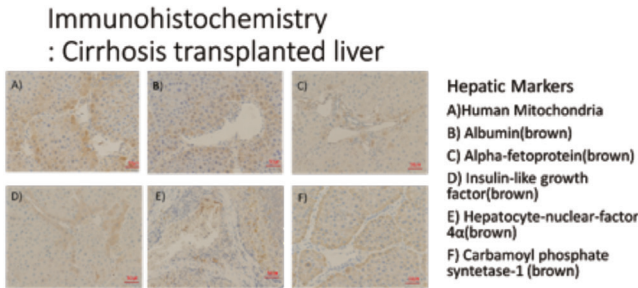


図4 肝臓の免疫染色像

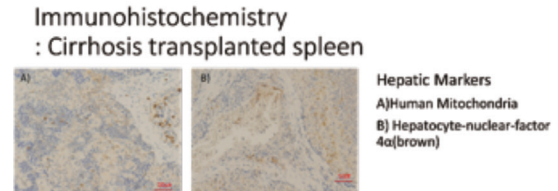


図5 脾臓の免疫染色

血清学的分析について、ALTはTest群をPositive control群と比較すると、3分の1に減少した。ビリルビンも同様に、Test群の値が減少していた。尿素窒素でも、Positive control群はTest群と比較して減少していた。HAはPositive control群内にて高値であり、十分に分解されていないということが確認できた。以上からTest群では肝機能の回復が確認できたと考えられる。

アルブミンに関しては、ヒト及びラットアルブミンについて検査を行った。Test群については、ラットアルブミンの量は少ないがヒトアルブミンが68%を占めており、両者を合計するとNegative control群に近い値まで回復していた。以上のことから、肝機能の明らかな差異を見つけ、Test群はPositive Controlと比較して回復が認められた。

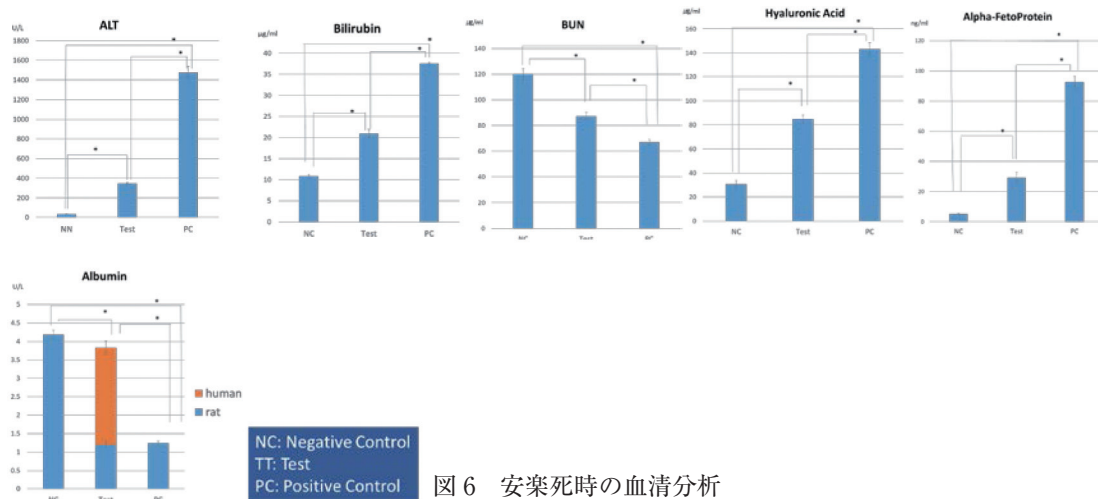


図6 安楽死時の血清分析

Western blotting を用いて線維化について確認した。有意差が認められない結果もあったが、全ての結果において、Positive control 群の肝臓の線維化を示すタンパクが強く検出された。

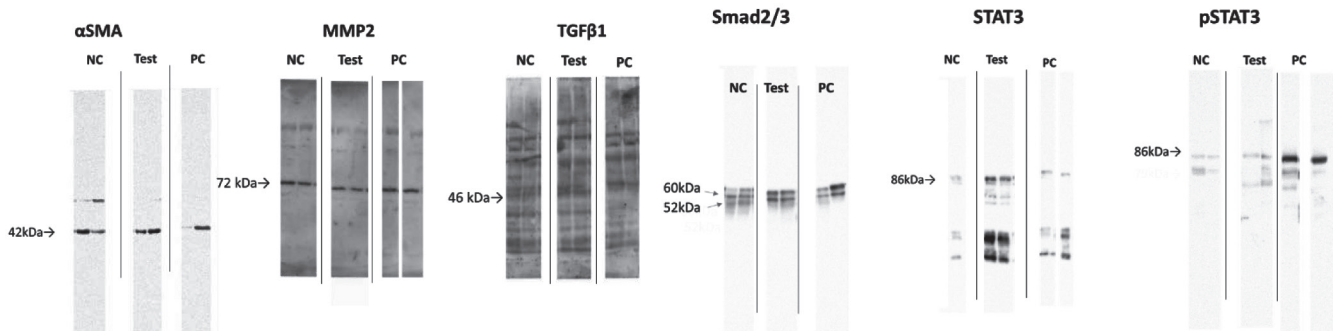


図7 安楽死時の肝臓のタンパク量の測定

本研究の結果から、ヒト歯髄幹細胞から分化させた肝細胞を、脾臓を介して移植することによって、肝硬変により線維化された肝臓の機能が回復することを確認できた。従って今後、肝疾患の肝臓移植以外の代替治療として、歯髄幹細胞を用いた治療の展開への一助となるのではないかと考えている。

今後の研究としては培地内のアルブミン濃度を測定することで、培養肝様細胞の評価をしたいと考えている。

成果発表：（予定を含めて口頭発表、学術雑誌など）

T.Yokoyama, H.Yagi, K.Yaegaki and H.Ishikawa, Therapeutic Effect of Hepatocyte-like Cells Transplantation into Cirrhosis Rat Model, 95th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, 2017.03.26, San Francisco, Calif., USA.