

2019年5月作成

学位論文の関連論文の研究背景及び要旨

所属 山口大学大学院医学系研究科

氏名 西村 達朗

〔題名〕

Liver regeneration therapy through the hepatic artery-infusion of cultured bone marrow cells in a canine liver fibrosis model

(イヌ肝線維化評価モデルにおける培養自己骨髄細胞肝動脈投与による肝再生療法)

〔研究の背景・目的〕

肝硬変は進行した肝線維化、再生結節として特徴づけられ、肝線維化のある慢性肝疾患に対する骨髄細胞の治療効果を証明した報告は、これまでに数多く存在している。

これまでにわれわれは非代償性肝硬変症に対する非培養全骨髄細胞や培養自己骨髄間葉系幹細胞(MSC)を用いた末梢静脈投与に基づく低侵襲肝臓再生療法を報告している。

その一方で、さらに効果の高い治療の検討として、細胞投与を肝動脈より行えば、選択的に肝臓へ細胞を投与することが可能となり、より効果的な肝臓再生療法につながるのではないかと考えられた。そこで本研究では、我々の確立されたイヌ肝線維化評価モデルを使用し、培養自己骨髄 MSC 肝動脈投与の有効性・安全性をこれまでの末梢静脈投与と比較評価したので報告する。

〔対象〕

22頭のビーグル犬（1-2歳；10頭雄、12頭雌）が用いられ、ビーグル犬は山口大学動物舎で飼育された。実験は National Institute of Health criteria に従って Animal Experiment Committee of Yamaguchi University School of Medicine の承認を得た（承認番号 21-033）。

〔方法〕

全身麻酔下にイヌ上腕骨より少量骨髓液を採取し、自己骨髓 MSC を 10%胎児ウシ血清含有 DMEM 培地で通常培養した。また、同時にヒト静脈留置用カテーテルをイヌ胃内に留置し、四塩化炭素(CCl_4)を 10 週間反復投与することで肝線維化評価モデルを作成した。その後、 CCl_4 投与 10 週が経過した時点で、同個体に末梢静脈投与群は自己骨髓 MSC ($4 \times 10^5/\text{kg}$)を点滴投与で、肝動脈投与群は血管造影検査手技を用いて経カテーテル的に自己骨髓 MSC ($4 \times 10^5/\text{kg}$)を動注した。 CCl_4 投与は継続したうえで、自己骨髓 MSC 投与前後においてエコーガイド下肝生検・血液生化学検査（インドシアニングリーン (ICG)試験など）を行い、肝線維化及び血液生化学検査（ICG 値半減時間など）の変化を比較評価した。さらに骨髓 MSC 肝動脈投与の安全性を、3 倍量の細胞数を投与し、造影 CT 検査と経時的血液生化学検査で評価した。

〔結果〕

線維化の評価

0W において線維性の架橋形成や、偽小葉が認められた。細胞非投与群では fibrosis level は $11.3 \pm 3.9\%$ (0W)から $12.9 \pm 2.8\%$ (12W)へ増加していたが、末梢静脈投与群では $9.2 \pm 2.9\%$ (0W)から $6.9 \pm 2.7\%$ (12W)と減少していた。肝動脈投与群では $11.0 \pm 2.5\%$ (0W)から $7.2 \pm 1.2\%$ (4W) ($p < 0.05$)、 $6.8 \pm 1.3\%$ (8W) ($p < 0.05$)、 $6.9 \pm 1.0\%$ (12W) ($p < 0.05$)へ有意な減少を認めた。 Δ fibrosis level では骨髄 MSC 投与後 4 週において、末梢静脈投与群($-2.5 \pm 1.1\%$)、肝動脈投与群($-3.8 \pm 3.0\%$)ともに細胞非投与群(Δ fibrosis area: $+0.9 \pm 1.0\%$)と比較し有意な線維化改善を認めた。さらに肝動脈投与群ではより高い効果を認め、投与後 8 週($-4.3 \pm 3.2\%$)、12 週($-4.2 \pm 2.8\%$)を経過してもその効果は維持されていた。

ICG 試験

ICG 値半減期 Δ 値に関しては、骨髄 MSC 投与後 4 週において、末梢静脈投与群は細胞非投与群と比べて ICG 値半減時間の短縮(Δ ICG 値半減時間[分]: -1.2 ± 0.7 vs. 1.7 ± 1.4 , $p < 0.01$)を認めたが、投与後 8 週、12 週においては明らかな有意差を認めなかった。また肝動脈投与群の ICG 値半減期 Δ 値は、末梢静脈投与群と比しても投与 8 週後(Δ ICG 値半減時間[分]: -3.8 ± 1.7 vs. $+0.4 \pm 2.4$, $p < 0.01$)および投与 12 週後(Δ ICG 値半減時間[分]: -4.2 ± 1.7 vs. $+0.4 \pm 2.7$, $p < 0.01$)と有意に短縮されていた。

血液生化学検査

細胞非投与群においては albumin や AT3 は徐々に増悪傾向にあった。末梢静脈投与群では4週には改善しているが、その後は徐々に増悪傾向を認めた。しかし、肝動脈投与群では4週、8週でも改善しており、12週でも維持していた。

肝線維化関連遺伝子の発現

0週、4週、8週、12週での肝線維化に関する遺伝子である COL1A2、COL3、TIMP-1 の mRNA 発現を解析した。全ての遺伝子に関して、末梢静脈投与群では細胞非投与群と比べ、有意差はないものの、低い傾向を示していた。肝動脈投与群では4週、8週、12週において、細胞非投与群よりも有意に低値だった。

安全性評価

細胞投与後の造影 CT では肝梗塞なく、血清 LDH 上昇や血液凝固亢進も認めなかった。

〔結語〕

独自イヌ肝線維化評価モデルにおいて、培養自己骨髄 MSC 肝動脈投与の有効性（肝線維化および肝機能改善）と安全性を確認したことから、非臨床 POC を取得した。