

望月聡之論文内容の要旨

主 論 文

Liver repopulation by transplanted hepatocytes in a rat model of acute liver failure induced by carbon tetrachloride and a partial hepatectomy

四塩化炭素と肝切除により誘導した肝不全ラットモデルにおける
肝細胞移植を用いた肝再生の検討

望月聡之、川下雄丈、江口 晋、高槻光寿、渡海大隆、山之内孝彰
日高匡章、曾山明彦、永吉茂樹、兼松隆之

Annals of Transplantation 2011年 掲載予定

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：兼松隆之教授)

<緒 言>

病的肝を正常肝と置き換える肝臓移植は難治性肝疾患に対する根治的治療手段として確立してきたが、ドナー臓器の不足、高侵襲性などは未解決の課題である。一方細胞分離・培養そしてその生体内移植という一連の細胞移植の技術が確立し、その一つの形態として肝細胞移植の臨床応用に期待がかかっている。分離された肝実質細胞（肝細胞）は分裂増殖能力を保持していることが判明しており、したがって生体内へ移植した分離肝細胞を効果的に増殖させるストラテジーを確立すれば肝臓移植を代替ないし補助し得る可能性がある。今回、四塩化炭素の投与と肝部分切除により誘導した肝不全ラットモデルにおいて、移植肝細胞の動態を観察し生着・増殖性を検討した。

<対象と方法>

動物：Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) 陽性の Fisher ラットをドナー（提供側）、DPPIV 陰性 の Fisher ラットをレシピエント（受容側）として用いた。

*DPPIV 陽性ラットでは肝細胞の細胞質に DPPIV が発現する。DPPIV 染色にて陽性細胞の細胞質が赤染し、ドナー由来肝細胞の検出が可能となる。

前処置：(1) 四塩化炭素 (CCL₄) 投与；レシピエントラットに CCL₄ 300 μ l/kg の腹腔内投与を週 2 回、4 週行なった後、肝部分切除、肝細胞移植を行った。

その後、CCL₄ 100 μ l/kg ないし 300 μ l/kg の腹腔内投与を継続した。

(2) 肝切除 (PH)；エーテル麻酔下に肝前葉を切除する 68%肝部分切除を

行なった。

(3)肝細胞移植(HT)；ドナーから採取した肝臓を EDTA/コラゲナーゼ法にて分離し、脾臓・門脈経由で肝臓内に移植した。

群別：GroupA(N=5)；CCL₄+PH+HT

GroupB(N=6)；CCL₄+HT

GroupC(N=5)；PH+HT

GroupD(N=18)；CCL₄+PH+HT

GroupE(N=16)；CCL₄+PH

GroupA、B、C では肝細胞移植後の CCL₄ 投与量を 100 μ l/kg、GroupD、E では 300 μ l/kg とした。

評価：(1)肝再生率；肝重量／体重比にて評価した。

(2)肝再構築率；DPPIV 染色を行い、レシピエント肝内の DPPIV 陽性のドナー由来細胞の割合を計測した。

(3)統計解析；t-検定を用いて行い、多群間の比較では Bonferroni 補正を行った。P 値が 0.05 未満を有意差ありとした。

<結果>

(1)肝再成率：A 群で 3.5、B 群で 3.7、C 群で 2.6 と A-C 群、B-C 群の間に有意差が見られた。

(2)肝再構築率：

- ・ DPPIV 陽性細胞はレシピエント肝内に 1 週間目から観察され、4 週目まで経時的な増殖が見られた。
- ・ 4 週目の肝再構築率は A 群 1.16%、B 群 0.09%、C 群 0.07%で、A-B 群、A-C 群の間に有意差が見られた。
- ・ D 群では肝再構築率が 1 週目で 1.1%、4 週目で 13.4%と顕著に増殖していた。

<考察>

正常な肝臓へ分離した肝細胞を移植しても正着せず、移植肝細胞を効果的に受容させるためにはレシピエント肝へ何らかの前処置が必要であることが既報で明らかとなっている。今回作成した肝不全モデルの意義は、CCL₄ 投与により肝障害を惹起しつつ肝切除により再生刺激を誘導することである。これは肝臓が機能失調に陥り、何らかの補助療法なしには生存が危ぶまれる条件下へ調節したモデルである。

DPPIV 染色の検討から、CCL₄+PH 前処置により移植肝細胞正着と増殖率は最大となり、この結果は肝再生率の結果からも支持された。特に肝再構築率は、CCL₄+PH により対照の 10 倍以上の再構築がみられた。これらの結果は肝切除による再生刺激が CCL₄ 前処置により病的な宿主肝細胞よりも、移植された健常な肝細胞へ選択的に作用したものと考えられる。今回確立した実験系を用いてさらに、移植肝細胞の増殖に最適な微小環境 (Niche) の探求と実際に移植肝細胞の増殖を刺激した再生因子の動態等を解明していく必要があるものとする。