

村岡いづみ論文内容の要旨

主 論 文

題名: Transplanted fibroblast cell sheets promote migration of hepatic progenitor cells in the incised host liver in allogeneic rat model
(ラットモデルを用いた肝切離面への線維芽細胞シート移植による肝前駆細胞の誘導)

村岡いづみ、高槻光寿、堺 裕輔、朝長哲生、曾山明彦、日高匡章、菱川善隆、
小路武彦、鶴頭理恵、大橋一夫、岡野光夫、兼松隆之、江口 晋
(Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine • Epub ahead of print
2013年)

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: 江口 晋教授)

緒 言

近年、温度変化によって形態が変化する特殊なポリマーによってコーティングされた温度応答性培養皿上で作成した細胞シートを用いたシート工学の技術が、再生医療分野における新たな技術として注目されている。この温度応答性培養皿を用いることによって、細胞は温度変化のみでシート状に回収することが可能となり、従来のようなトリプシン等による酵素処理が不要である為、細胞間の結合や接着因子を壊すことなく細胞に大きな傷害を与えないという利点が挙げられる。この技術は既に眼科領域での自己細胞シートを用いた角膜移植や食道 ESD (Endoscopic submucosal dissection) 後の狭窄予防目的の自己口腔粘膜シート貼付等で臨床応用されており、新たな再生医療として注目されている。今回我々は、細胞シート工学技術の肝臓外科領域での臨床応用を目指し、肝切離面に細胞シートを貼付し、その影響、細胞動態を明らかにすることを目的とし研究を行った。

対象と方法

温度応答性培養皿を用いて、Sprague-Dawley (SD) ラットの皮膚線維芽細胞より線維芽細胞シートを作成。レシピエント (F344 ヌードラット) の肝実質に切開を加え、切離面に線維芽細胞シートの貼付を行った。コントロールとして、肝実質に切開のみを加え、細胞シートの貼付を行わない群を作成した。両群ともに術後 7、14、28 日目に犠牲死させ (各群 n=5)、肝を摘出し、肉眼的、病理組織学的 (H&E 染色、アザン染色) 及

び免疫組織学的検査(CK-8:胆管上皮細胞のマーカー、OV-6:肝前駆細胞のマーカー、AFP:未熟肝細胞のマーカー)、にて切開部の評価を行った。

さらに、レシピエントラットに70%肝切除を行い再生刺激を加えた後、同様の方法で線維芽細胞シート貼付を行い、再生刺激が細胞シート貼付部に与える影響について、術後7日目の細胞シート貼付部におけるOV-6陽性細胞数を比較することにより行った。

また、細胞シート貼付部に出現した新たな細胞の起源を明らかにする目的に、GFP(Green Fluorescent Protein)を導入した線維芽細胞にて細胞シートを作成して同様の実験を行い、術後7日目にラットを犠牲死させ、細胞シート貼付部の観察を行った。

結 果

線維芽細胞シートを貼付した部位では、何れのタイムポイントにおいてもコントロールと比較して肉眼的に黄白色の組織肥厚が認められ、アザン染色では著明な線維組織の増生が認められた。H&E染色においては、肥厚組織内に幼弱な肝細胞様の細胞や、胆管様管腔構造の集塊の出現が認められた。それらの新たな細胞は、術後7日目では肝切離部近傍に多く認められていたが、術後日数が進むにつれて徐々に肥厚組織内へ移動してくような傾向にあった。免疫組織学的検査において、H&E染色にて胆管様構造を示した細胞はCK-8陽性であり、新生胆管周囲に出現した未熟な胆管様構造物はOV-6あるいはAFP陽性を示した。

70%肝切除を加え再生刺激を与えた群においては、再生刺激を与えなかった群と比較して、OV-6陽性を示す細胞数に有意な差は認めなかった。

GFPを導入した線維芽細胞シート群において、細胞シート貼付部に新たに出現した未熟な肝細胞や胆管様構造物を構成する細胞はGFP陽性を示した。

考 察

皮膚線維芽細胞シートを貼付した肝損傷部位において、その治癒過程で胆管様構造物や幼弱な肝細胞様の細胞の出現が認められた。また、新たに出現した細胞はレシピエント肝由来ではなく、移植した線維芽細胞シート由来であることが明らかとなった。皮膚線維芽細胞は、様々なサイトカインやVEGF(Vascular endothelial growth factor)、HGF(Hepatocyte growth factor)等の分泌能を有していることが報告されている。移植した線維芽細胞シートから分泌されたこれらの物質が何らかの刺激となり、レシピエント肝より前駆細胞を誘導、細胞分化の足場となった可能性があると考えている。

今後、肝損傷部位に皮膚線維芽細胞シートを貼付することによって肝前駆細胞の誘導さらには肝再生促進効果が認められた場合、肝切除術や生体肝移植後レシピエントの肝切離面に自己の皮膚線維芽細胞より作成した細胞シートを貼付することにより術後早期の肝再生促進の補助等、臨床応用に繋がる可能性があると考えられる。

また、肝臓は多種の細胞から構成され、生体内では代謝や糖貯蔵等多様な機能を担っており、臓器として再生することは困難とされてきた。しかし、細胞シート工学技術を用いることによって、血流低下に弱いとされている肝細胞を用いて作成した肝細胞シートと血管内皮細胞シートや線維芽細胞シート等を重層化することにより、臓器としての肝再生を実現することも可能になるのではないかと考える。