

平成 24～26 年度厚生労働科学研究費補助金
(肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業))
研究分担報告書

「皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞の肝硬変に対する効果の研究」

研究分担者氏名：大河内 仁志

所属機関：国立国際医療研究センター研究所 細胞組織再生医学研究部 職名：部長

研究要旨：

【目的】

皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞の投与による肝硬変モデルマウスに対する効果の検討

【方法】

マウスに高脂肪食を投与し、NASH 肝硬変モデルを作成した。このモデルに GFP マウス皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞(ASC)に MMP2 を強制的に発現させたものを作製し、 2×10^5 個の細胞を門脈経由で投与した。1週間後に肝臓組織を採取して、組織学的検討を行った。

【成績】

ASCにMMP2を強制的に発現させると、in vitroではコラーゲンを分解できることを確認した。NASH肝硬変モデルに移植して組織学的に検討したところ、一部の細胞の生着は認められたが、明らかな線維化の改善は認められなかった。

【考案】

これまでの検討で、投与細胞数を多くすると塞栓像が認められたために、今回は投与細胞数を減らしたので、塞栓自体は抑制できたが、一方で生着細胞数も少なくなり、線維化の改善につながらなかった可能性が示唆された。

A. 研究目的

生体肝移植に代わる次世代の肝再生療法の開発は、肝硬変症患者の救命のために喫緊の課題である。肝硬変患者に対する自己骨髄細胞を用いた細胞移植療法の効果が報告されており、特に骨髄細胞の抗線維化作用が注目されている。骨髄には造血幹細胞以外に多能性をもつ間葉系幹細胞の存在が知られている。一方脂肪組織にも骨髄と同様に多分化能をもつ間葉系幹細胞が存在するので、肝硬変の治療に使えるのではないかと考えた。これまでに我々は脂肪由来の間葉系幹細胞はマウスの急性肝炎モデルに投与をすると効果があることを確認している。そこで今回はマウスの肝硬変モデルを作成して、脂肪由来の間葉系幹細胞を移植した場合の効果を検討することを目的とした。

B. 研究方法

脂肪組織由来の間葉系幹細胞(ASC)の分離

GFP マウス (C57BL/6 由来, 10 週齢) の鼠径部の脂肪塊を摘出して phosphate buffered saline (PBS) で洗浄して、control medium [Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, low-glucose; GIBCO) + 10% fetal calf serum (FCS; GIBCO) + 1% penicillin-streptomycin (SIGMA)] の入った dish に移した後、メスで 2-3 mm まで細かく刻み、CO₂ incubator 内で 1 時間培養した。脂肪塊を遠心 (1,300 rpm, 6 min, room temperature) し、液体を吸引し、0.12 % type1 collagenase (Wako) を加え、37 °C で振盪 (30 min) し、細胞を解離した。解離した細胞に control medium を加え、遠心 (1300 rpm, 6 min, room temperature) し、上清及び沈まなかった細胞を吸引したものを SVF(stromal vascular fraction) とした。

細胞培養

SVF を control medium または FGF2(塩基性線維芽細胞増殖因子:10ng/ml)を添加したもので resuspend し、40 μ m filter を通した後、 1×10^6 / 10 cm dish に播種した。培地交換は 2 日に 1 回行い、1 週間後にトリプシン処理して再播種した。細胞を Passage 5 まで培養を続けた後、control medium + 10 % dimethyl sulphoxide (DMSO) (SIGMA) 内に移し液体窒素中で凍結保存するか、または実験に使用した。

ASC に MMP2 遺伝子を強制発現

レトロウイルス(pMY)に MMP2 遺伝子と Puro 耐性遺伝子を導入したものを作製し、P3 の ASC に transfection し、Puromycin で ASC を選択培養した。

細胞抽出液と培養上清を採取し、その MMP2 の活性はゼラチンゼイモグラフィーアッセイキットを使用して in vitro で評価した。

肝硬変モデルマウスの作製と移植実験

C57/BL6 マウスに離乳直後よりココアバターを多く含む高脂肪食(オリエンタル酵母に特注)を3ヶ月間にわたって投与し、NASH 肝硬変モデルを作製した。このマウスに同系 GFP マウスの MMP2 を強制発現させた ASC 2×10^5 個を回盲部の腸間膜静脈から門脈に注入した(n=4)。1 週間後に肝臓組織を採取して、組織学的検討を行い、細胞移植をしなかった群と比較した。線維化の程度はシリウスレッド染色を行い、KEYENCE 社の BZ-II 解析アプリケーションを用いて、肝臓の各葉(内側右葉、外側左葉、外側右葉、尾状葉)の総面積に対して赤く陽性に染まる面積の割合を求めた。

GFP 陽性細胞は抗 GFP 抗体を用いて、ALP 活性をもつ二次抗体で赤く発色させた。

C. 研究結果

ASC に MMP2 遺伝子を強制発現

レトロウイルスで MMP2 遺伝子を ASC に導入後、puromycin で生き残った細胞から細胞抽出液と培養上清を採取し、ゼラチンゼイモグラフィーアッセイを行った。

図1のごとく、細胞抽出液と培養上清ともに MMP2 の酵素活性があることを確認した。

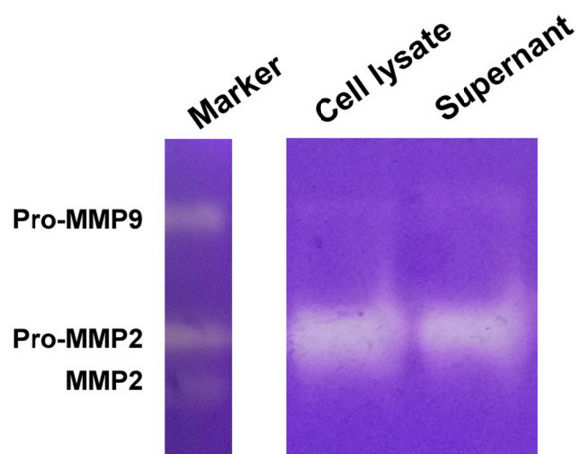


図1 ゼラチンゼイモグラフィーアッセイ

ASC の細胞抽出液と培養上清を電気泳動してコラーゲンの分解を検討した。Pro-MMP2 の位置で最もコラーゲンが分解された。

NASH モデルへの移植実験

培養した ASC 20 万個を門脈から移植した。図2に移植後1週間の組織像を示す。GFP 陽性細胞が赤く染まっており、移植細胞の生着が認められた。

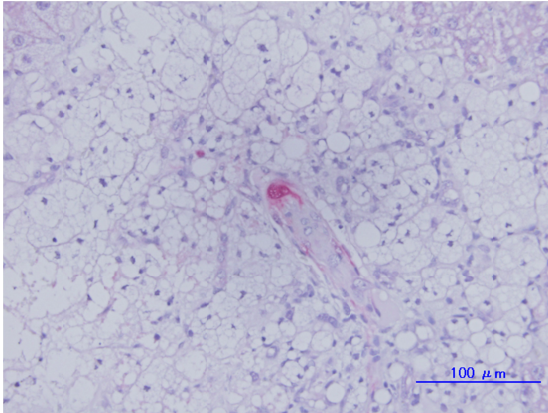


図2 細胞移植後1週間の NASH モデル肝臓組織

抗 GFP 抗体を用いた免疫染色を行い、GFP 陽性細胞が赤く染色されている。

シリウスレッド染色を行い、細胞移植群と非移植群において線維化の程度を比較したが、両者に有意な差は認められなかった。

D. 考察

これまでの検討から細胞を静注すると多くの細胞が肺に集積し、肝臓へ到達する細胞が十分でないことが判明したので、直視下に盲腸近辺の腸間膜静脈をから門脈への細胞注入を行った。投与細胞数が多くなると梗塞をおこして肝臓に大きなダメージを与えることが判明したので、培養時に FGF2 を添加することで、細胞の小型化をはかり、投与時にヘパリンを添加した。

ASC に MMP2 を強制発現させることで、in vitro においてコラーゲンを分解する酵素活性をもった ASC を作製することができた。しかし NASH モデルマウスに投与しても、明らかな線維化の改善は認められなかった。その原因としては生着した細胞数が十分でなかった可能性が考えられる。これまでの経験で、投与細胞数を多くすると塞栓をおこしてしまうため、今回は

細胞数を少なめにした。今後至適細胞数のさらなる検討が必要であると思われた。

E. 結論

脂肪由来の間葉系幹細胞に MMP2 を強制発現させて移植し、NASH モデルにおいて線維化の改善を検討したが、in vivo での明らかな効果は証明できなかった。

研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。