

論文内容の要旨

Specific extrahepatic cells, bone marrow-Muse cells, contribute to liver regeneration

(特定の肝外細胞, 骨髄 Muse 細胞は肝臓再生に貢献する)

(片桐弘勝, 西塚哲, 串田良祐, 野島誠, 黒田康勝, 若尾昌平, 石田馨, 遠藤史隆, 久米浩平, 高原武志, 新田浩幸, 津田均, 出澤真理, 若林剛)

(The Journal of Clinical Investigation (投稿審査中))

I. 研究目的

損傷後肝再生には様々な細胞の関与が示唆されている。肝前駆（以下オーバル）細胞は一つの候補として報告されているが、その起源は未だ不明で、肝疾患における細胞療法への応用は困難である。肝外細胞の中では骨髄間葉系幹細胞（BM-MSCs）が損傷後肝再生に関与すると考えられているが、BM-MSCs も単一の細胞集団ではなく、肝外細胞が関わる肝再生の本態は明らかではない。

近年報告されたヒト成人 BM-MSCs（h-BM-MSCs）に属する Muse（multilineage-differentiating stress-enduring）細胞は、培養 h-BM-MSCs より未分化ヒト胚性幹細胞表面マーカー-SSEA-3 陽性細胞として単離できる。また、3 胚葉性の細胞への分化能と自己複製能を持つ一方で、腫瘍性増殖能は持たないという特徴を持つ。

今回我々は、始めに肝外細胞が肝再生に寄与することをヒト生体肝移植（LDLT）において検証した。次に肝再生に関与する肝外性細胞の有力な候補である骨髄 Muse 細胞の損傷肝再生への関与を検証した。

II. 研究対象ならび方法

始めに LDLT における肝外細胞の関与を検証した。岩手医科大学外科で施行された LDLT 20 組（2007-2011 年）のドナー、レシピエント検体と移植片生検組織を対象に、short tandem repeat（STR）解析を用いた個人認証を行い細胞の由来を解析した。移植片組織はレーザーマイクロダイセクションを行い、肝組織を構成する肝細胞、胆管細胞、類洞構成細胞、門脈周囲細胞の 4 つの分画へ分離し解析した。移植後 5 ヶ月以内の移植片組織 5 例に対し肝前駆細胞マーカー（CK19, AFP）の免疫染色を行い蛋白の発現を解析した。また、女性ドナーかつ男性レシピエントの 5 例に対しては fluorescence in situ hybridization（FISH）を行い細胞の由来を解析した。

次に、骨髄 Muse 細胞の損傷肝再生への関与を検証した。8 週齢の雌免疫不全（SCID）マウスに対し肝部分切除術（PPHx）を施行した。GFP で標識した h-BM-MSCs を SSEA-3 により Muse 細胞と Muse 細胞を除く h-BM-MSCs（non-Muse 細胞）に分離し、各々を PPHx 24 時間後に経静脈的に投与した。術後 1, 2, 4 週後の肝組織修復における 2 つの細胞分画の違いについて、抗 GFP 抗体による免疫染色で肝組織への生着を観察し、更に肝組織を構成する各細胞のマーカーとして胆管上皮、類洞内皮、Kupffer と肝細胞に対応したマーカーの免疫染色を行った。抗ヒトミトコンドリア抗体による免疫染色で GFP 陽性細胞がヒト細

胞由来であることも確認した。更に、術後3日においてオーバル細胞マーカーの免疫染色で、損傷後急性期における2つの細胞分画の損傷肝再生への関与を評価した。

### III. 研究結果

1. STR および FISH 解析で、レシピエントの遺伝子型が肝組織を構成する様々な細胞分画で見られた。
2. 胆管上皮分画の中に CK19 と AFP 二重陽性の細胞が含まれていた。
3. 術後 Muse 細胞群で損傷組織近傍に GFP 陽性細胞が観察された。GFP 陽性細胞は肝組織を構成する各種細胞マーカー陽性かつヒトミトコンドリアマーカー陽性であった。
4. 術後急性期の Muse 細胞群で損傷組織近傍に観察された GFP 陽性細胞は、オーバル細胞マーカー陽性かつヒトミトコンドリアマーカー陽性であった。
5. 非 Muse 細胞群では、いずれの観察点においても GFP 陽性細胞が観察されなかった。

### IV. 結 語

ヒト LDLT では、肝組織修復プロセスの少なくとも一部に肝外由来かつ高い分化能を持つ細胞が関与していることが推定された。

BM-MSCs のうち、Muse 細胞は肝組織修復に専従的に関与し、肝臓を構成する多様な細胞の再生に貢献することが示された。また、Muse 細胞以外の BM-MSCs は修復に関わらないという役割分担があることが明らかになった。更に、オーバル細胞の起源の一部に肝外細胞が含まれていること、Muse 細胞は起源が不明であったオーバル細胞の起源の一つの候補であることが示唆された。骨髄 Muse 細胞は肝疾患における細胞療法の有用な供給源となる可能性がある。

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授 前沢 千早 (医歯薬総合研究所：腫瘍生物学研究部門)

副査 准教授 伊藤 薫樹 (血液・腫瘍内科分野)

副査 講師 中屋敷 徳 (法医学講座)

肝再生医療の実践に於いて、いかなる肝構成細胞にも分化可能な肝幹細胞の同定・分取、効率的かつ安全な体外増幅法の開発は極めて肝要なことである。本研究では、肝再生時の肝前駆細胞候補として認知されているオーバル細胞の由来に着目して、骨髄間葉系幹細胞の一種である Muse 細胞がその起源となり得るか、ヒト生体肝移植材料およびマウス肝再生モデルで検証した論文である。

生体肝移植材料を用いた検討では、肝組織修復プロセスの少なくとも一部に肝外由来かつ高い多分化能を持つ細胞が関与していることが推定された。肝部分切除後免疫不全マウスを用いた細胞移植から、骨髄 Muse 細胞は損傷肝組織修復に専従的に関与し肝臓を構成する多様な細胞の再生に貢献することが示された。さらに、ヒト骨髄間葉系幹細胞分画の中で、Muse 細胞以外の骨髄間葉系幹細胞は肝再生修復に関わらないという役割分担があることが明らかになった。更に、オーバル細胞の起源の一部に肝外細胞が含まれていること、骨髄 Muse 細胞がその候補であることが示唆された。

本研究は、骨髄 Muse 細胞が肝疾患における細胞療法の有用な供給源となる可能性を示したものであり、極めて価値の高い研究である。学位に値する。

## 試験・試問の結果の要旨

肝再生に係る細胞の由来、Muse 細胞、骨髄の間葉系幹細胞の分取方法、免疫染色などの解析手法について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。

## 参考論文

- 1) Totally laparoscopic stapled distal pancreatectomy (ステープラーを用いた完全腹腔鏡下膵尾部切除術) (片桐 弘勝, 他 4 名と共著).  
Surgery Today, 42 巻, 10 号 (2010)
- 2) 肝外門脈瘤 (片桐 弘勝, 他 4 名と共著).  
日本臨床別冊, 肝・胆道系症候群 -その他の肝・胆道系疾患を含めて-, 日本臨床社 (2010)
- 3) 栄養過多の具体的疾患とその対策 (片桐 弘勝, 他 10 名と共著).  
Surgery Frontier, 17 巻, 1 号 (2012)