

論文内容の要旨

幹細胞移植における脾臓 Side Population 細胞の移植細胞としての有用性
(木村拓, 高原武志, 鈴木悠地, 岩谷岳, 新田浩幸, 佐々木章)
(岩手医学雑誌 73 巻, 2 号, 令和 3 年 6 月掲載予定)

I. 研究目的

肝疾患は、世界で最も多い死因の一つである。末期肝不全に対する肝移植は非常に効果的な治療戦略であるが、ドナーの不足、待機中の死亡率、高コストであることなどは依然として大きな問題である。また、悪性疾患に対する大量肝切除後肝不全は肝移植の適応とはなりづらい。このような状況への代替療法として、幹細胞移植が有力な候補の一つと考えられており、研究が進められている。その有力な候補細胞の一つに side population 細胞（以下 SP 細胞）がある。SP 細胞は DNA 結合色素 Hoechst 33342 排泄能を持つ細胞で、様々な臓器に存在する。

我々の先行実験では、脾臓の SP 細胞の存在率が骨髄よりも高く、脾臓が全臓器の中で SP 細胞の最大の貯蔵庫であることを見出した。脾臓は肝硬変患者で腫大し、脾機能亢進のために摘出することがある臓器でもあり、摘出した脾臓から移植細胞を得ることができれば有用性が高く、SP 細胞の入手源として期待される。

効果的な治療のためには細胞移植のタイミングが重要であり、一時的な保存が必要となることもある。また、より良好な治療効果を得るために複数回にわたり移植を施行する可能性も考えられる。移植細胞が長期保存に耐えうる能力を有していることは重要な条件であり、SP 細胞にもその能力が求められる。本研究では、脾臓由来の SP 細胞が、一般的な細胞保存法である凍結による長期保存が可能かどうか調査することで、移植細胞としての有用性を検証した。

II. 研究対象ならび方法

岩手医科大学動物実験委員会の審査で承認を得て、実験動物の適正な取り扱いのもと動物実験を行った。動物は Wistar 系ラット雄性（18～20 週齢）を用いた。

1. 脾細胞の凍結保存と SP 細胞解析

脾細胞をある一定の期間（1 カ月, 2 カ月, 3 カ月）凍結保存後に解凍し、長期凍結保存後でも SP 細胞は存在しうるか検証を行った。また、同時に生細胞中に占める SP 細胞の存在率を測定し、比較した。

2. SP 細胞と MP 細胞の分離と凍結保存

SP 細胞と SP 細胞以外の細胞（main population 細胞, 以下 MP 細胞）とを分離後にそれぞれ単独で凍結保存した。凍結後 1・5・10・20・30 日で解凍し、それぞれの細胞の生存率の推移の比較を行った。

Ⅲ. 研究結果

1. 脾細胞の凍結保存と SP 細胞解析

脾細胞採取直後の SP 細胞の存在率は 1.78%であった. 全凍結保存期間において SP 細胞の存在が確認され, その存在率は凍結後 1・2・3 カ月でそれぞれ 1.83%, 1.21%, 1.18%であり, 凍結後 1 か月で存在率が上昇していた.

2. SP 細胞と MP 細胞の分離と凍結保存

凍結期間が長期になるほど SP 細胞と MP 細胞の生存率は低下した. 分離直後, 凍結後 1 日の SP 細胞と MP 細胞の生存率は, 有意差が認められなかった. 凍結後 5・10・20・30 日の生存率は, SP 細胞が $63.86 \pm 0.55\%$, $59.57 \pm 4.43\%$, $57.86 \pm 2.15\%$, $57.70 \pm 1.26\%$, MP 細胞が $55.93 \pm 3.45\%$, $52.25 \pm 1.81\%$, $48.74 \pm 1.38\%$, $44.45 \pm 1.49\%$ であり, 一貫して SP 細胞において生存率が有意に高かった.

Ⅳ. 結 語

SP 細胞は細胞移植候補として考えた際, 凍結ストレスに強いという有利な特性を持つことが示された. 肝切除後に脾摘を行い, その脾臓より SP 細胞を分離して自家移植し, さらに肝再生を惹起する至適門脈圧に調整することが可能となれば, 中長期的には再生医療における選択的細胞増殖法の開発への足がかりや切除不能肝腫瘍の究極的治療の開発につながると期待している.

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 肥田 圭介 (医療安全学講座)

副査 教授 滝川 康裕 (内科学講座：消化器内科肝臓分野)

副査 教授 木村 祐輔 (緩和医療学科)

種々の要因による肝不全に対する肝移植は効果的な治療戦略であるが、一方で様々な問題も併存している。そのような状況における代替療法として幹細胞移植が注目されており、その有力な候補細胞の一つに脾臓 side population (SP) 細胞がある。SP 細胞を効果的に用いるためには移植細胞が長期保存に耐えうる能力を有していることが重要な条件であり、本研究では脾臓 SP 細胞が凍結による長期保存が可能であるかを検証した論文である。脾細胞採取直後の SP 細胞の生存率は 1.78% であり、凍結後 1 ヶ月で 1.83% と上昇していた。SP 細胞と MP 細胞を分離した後の凍結保存の比較では SP 細胞において生存率が優位に高値を示した。このことにより SP 細胞を幹細胞移植候補として考慮するにあたり、凍結ストレスに強いという有利な点を初めて示した論文である。

本論文は、今後の脾臓から SP 細胞を分離・自家移植という、再生医療における選択的細胞増殖法の開発につながる有益な知見を示した研究であり、学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

肝不全に対する幹細胞移植としての脾臓 SP 細胞の実用化へ向けた基礎実験の方法と結果や問題点、今後の実用化へ向けた展望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える。また、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作等の研究不正は無いことを確認した。

参考論文

- 1) 成人片側性鼠径ヘルニアに対する transabdominal preperitoneal repair (TAPP) 法における鼠径浸潤麻酔による鎮痛効果の前向き比較研究 (須藤 隆之, 他 4 名と共著).
日本外科系連合学会誌, 44 巻, 5 号 (2019) : p871-877.
- 2) Portal bifurcation reconstruction using own hepatic vein grafts due to portal vein anomaly of the living donor for the patient with portal vein thrombosis (門脈血栓症患者における生体ドナーの門脈走行破格に対する自己静脈グラフトを用いた門脈分岐再建術)
Annals of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, 24 巻, 4 号 (2020) : p533-538.