

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861212

研究課題名(和文)肝外細胞の肝再生に果たす役割

研究課題名(英文)Role of extrahepatic cells in liver regeneration

研究代表者

高原 武志(Takahara, Takeshi)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：80453306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝外細胞の肝再生での働きを肝移植後肝生検組織を使用し調べた。これによるとグラフト肝にはレシピエントとドナー両方の遺伝子が発現していることが確認でき、肝外細胞が肝再生に寄与していることが確認できた。

また肝移植や過大肝切除時に門脈圧の上昇が肝再生に対し抑制的な働きをしていると言われているが詳細な検討はされていない。今回脾臓を摘出し門脈圧を減少させ門脈圧と肝再生を同時に計測した。門脈圧は脾摘された際に直後では低下を認めなかったが、術後1週間で門脈圧を再度検査したところ脾臓摘出群で門脈圧の低下を認め、肝再生は増大を認めた。これより脾臓摘出を行い門脈圧が低下する事は肝再生をより増進する事が分かった。

研究成果の概要(英文)：Extrahepatic cells have been considered a potential cellular resource for liver regeneration in response to liver damages. The genotyping of human living donor liver transplant recipients has reported that cells derived from those recipients of living donor liver transplantation differentiated into multiple types of liver component cells, suggesting that extrahepatic, as well as multipotent, cells contributed to liver regeneration. Excessive portal vein pressure have been considered a disadvantage factor for liver regeneration. We measured portal vein pressure and liver volume simultaneously. That result show that just after splenectomy portal vein pressure didn't go down but one week after operation portal vein pressure went down and liver regeneration was increasing than not splenectomy group. Splenectomy can avoid excessive portal vein pressure and promote liver regeneration at excessive liver resection or liver transplantation.

研究分野：肝再生

キーワード：肝再生 肝外細胞 門脈圧 脾摘

1. 研究開始当初の背景

肝臓の再生機構には、肝臓内の肝芽細胞・オーバル細胞・組織幹細胞(造血幹細胞など)が関与している可能性が高いとされ、これらは肝切除後に血清値が上昇する IL-6 などによって誘導され、HGF などの成長・増殖因子によって制御されている。(Duncan et al. Gastroenterology, 2009) 一方で、肝再生において肝外由来細胞の関与については 2002 年にマウス肝切除モデルや肝障害・肝不全モデルを用いた研究で、肝外由来の細胞が肝再生に関与していることが多数報告されている。以後、多くの臓器(胃・膵臓・小腸・大腸・皮膚・心筋・中枢神経・血管・骨など)で同様の報告がされている。2005 年には、造血幹細胞の分離マーカーである CD133 を用いた研究で、肝外由来細胞、特に骨髄由来細胞が肝再生に関与していることが報告されている。

我々が着目した Side population (SP) 細胞は、DNA 結合色素排泄能の高い細胞集団で、組織幹細胞が濃縮されていると考えられている。臓器によらぬ普遍的な組織幹細胞分離法としても注目されている。多分化能を持つ組織幹細胞は骨髄のみならず肝臓、脾臓などの組織にも存在している。我々は動物実験において、各臓器に占める SP 細胞の割合を検討すると、脾臓が SP 細胞の最大の貯蔵庫であることを証明し、マウスの脾臓由来の SP 細胞を *in vitro* における肝細胞との共培養によって、アルブミン、サイトケラチン 18 などという肝細胞に特異的な蛋白を発現することを確認している。このことは、幹細胞様細胞集団の組織補填による肝再生に対する仮想のひとつの根拠と思われる。

また、もう一つの着目した点は肝再生と門脈圧の関係性である。Small for size syndrome の制御に門脈血流、門脈圧が関与していることが分かっており脾動脈結紮によって門脈圧を低下させることにより、移植後

の生存率を改善させることが報告されている。また 2013 年には肝左葉グラフト移植において脾摘群が非脾摘群と比較し 14 日目の総ビリルビン値、腹水排泄量ともに有意に改善を認め、グラフトの 5 年生存率も脾摘群が有意に良好であったとの報告がある。ラットにおける動物実験においても 90%肝切除を施行し、同時に脾摘した群と非脾摘群では肝切除後の肝再生率が増加し、生存率を比較したところ有意に差を認めた報告がある。このように脾摘により肝再生の促進や生存率の改善は様々報告があるが、門脈圧と肝再生または生存率に言及した論文はなく明らかになっていない状況である。これらをふまえて切除後肝再生と門脈圧の関与を明らかにすることが、さらなる肝移植の安全性を高めるものと考えられている。

2. 研究の目的

本研究では生体肝移植症例においてレシピエントの術後肝生検材料を使用し、肝再生がグラフト肝からの増殖因子によるものか(ドナー由来の組織幹細胞)、レシピエント由来の幹細胞様細胞の組織補填によるものかを同定する。また、過小グラフトによる肝不全を small for size syndrome と表現されており、肝移植において大きな合併症の一つである。グラフト肝に過剰な門脈血流が流入することで残肝の血管床への圧障害が増加し肝再生が不良になるものと推察されている。脾摘をする事で門脈圧が減少し門脈血流の減少により肝再生をより増進させることが報告されている。劇的な肝再生において門脈圧がどのように関わっているのかを明らかにしてゆく。

3. 研究の方法

動物実験において、各臓器に占める SP 細胞の割合を検討すると、脾臓が SP 細胞の最大の貯蔵庫であることを証明し、マウスの脾臓由来の SP 細胞を *in vitro* における肝細胞との共培養によって、アルブミン、サイトケラチン 18 などという肝細胞に特異的な蛋白を発現することを確認している。またさらに、GFP 陽性の肝障害ラットを作成し、別のラットから脾臓 SP 細胞を抽出し、GFP 陽性の肝障害ラットの肝臓に注入することで、脾臓 SP 細胞がアルブミン産生能を獲得できたことをこれまでに証明してきた。このことは、幹細胞様細胞集団の組織補填による肝再生に対する仮想のひとつの根拠と思われる。ヒト allograft のほぼ唯一情報が得られる生体肝移植レシピエントの針生検を用いる。DNA 多型マーカー（プロメガ）のキットには Amelogenin マーカーが含まれ、性別の差および個体間の差を検出できる。本課題で用いる針生検材料は速やかに凍結保存し、Tissue-Tek に包埋する。凍結切片を作製し、核染色を行った後 LM にて肝細胞、類洞上皮細胞、胆肝上皮などに細胞を分割して採取し、DNA 多型マーカーをそれぞれに対して使用し、フラグメント解析によりドナー、レシピエント由来の DNA がそれぞれ何%であるかを検証する。

多型マーカーを用いた融合 DNA の有無の検証はまず、ドナー肝摘出時に肝組織を $8 \times 8 \times 8 \text{mm}^3$ 程度採取し液体窒素中で凍結させる。レシピエントでのグラフトの再生を確認したら、US 下でグラフトの生検を行う。同様に $8 \times 8 \times 8 \text{mm}^3$ 程度採取し液体窒素中で凍結させる。サンプルを凍結切片作成用包埋剤 (Tissue-Tek) に包埋し、 $20 \mu\text{m}$ の凍結切片を作成する。それぞれの凍結切片を LM (レーザーキャプチャーマイクロダイセクション) 法にて肝細胞のみを採取し DNA を抽出する。ドナー、レシピエントそれぞれの末梢白血球

分画から DNA を抽出する。それぞれの DNA を AmpFISTR Identifiler PCR キットによる 16 種類のマイクロサテライト loci を用いて個人識別を行う。

肝再生と門脈圧に関しては、肝切除後全例が生存する 70%モデルと、5日までに生存率が約半分までに低下する 90%モデルを作成し、より肝切除量を増やしたモデルにて検討する。ラットから 90%肝切除する群とさらに脾摘をするモデルを作成する。70%肝切除ラットでは7日で残肝が再生し残肝重量はほぼプラトーになることが報告されている。

術直後、1日目、3日目、5日目、7日目に CT を施行する。術前、術直後、7日目に門脈圧の計測を行い7日目に採血し、犠牲死させて肝臓の病理標本を作成する。

ラット肝臓は7葉に分葉しており、決まった切除法にて 90%、70%肝切除モデルを作成することができる。モデル作成自体は約 30 分で作成可能。手術は岩手医科大学矢巾キャンパスにある動物研究センターにて行なう。

CT 撮像は、同センターにある GE 社製の eXploreRS80 を使用しセボフルレンにて麻酔下に施行する。また肝臓、脾臓に造影効果のある実験動物用造影剤を Miltenybiotec 社の Exitron nano6000 を使用し肝臓にコントラストをつけて撮像する。この画像を富士フィルムメディカル社 Synapse Vincent (岩手医科大学 外科学講座 所有) を使用し volumetry を行なう。

また、門脈圧は麻酔下に回盲静脈よりトランデューサーを挿入し門脈圧を測定する。この際に同時に後大静脈より採血を施行。白血球数、血小板数、TP、Alb、AST、ALT、T-bil、AFP、HGF の測定を行う。7日目に犠牲死させ肝を摘出し HE 染色を施行。また途中で肝不全により死亡したラットに関しても同様の標本作製する。70%肝切除群においては肝再生率のプラトーに達する時期が早まる事で、脾摘群が肝再生を促進していると考えら

れ、また 90%肝切除群ではラットの生存率が上昇する事は報告されているが、脾摘群と非脾摘群において生存因子が肝再生速度によるものなのか、門脈圧によるものなのかを検討する事ができる。

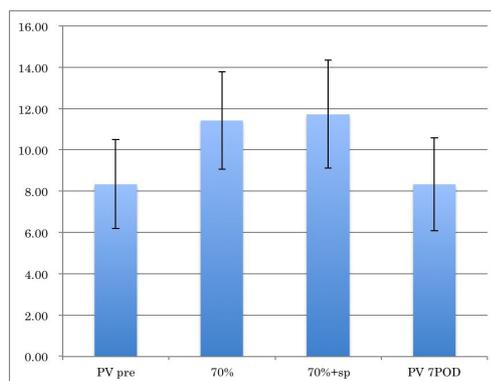
4. 研究成果

ヒト生体肝移植の肝生検組織標本をキャプチャーマイクロダイセクションにてそれぞれジェノタイピングを観察しレシピエント由来の細胞が、複数の肝構成細胞での認められた。これより肝外由来かつ多能性を持った細胞が肝再生に寄与しており、生体肝移植レシピエントの細胞が肝移植の再生に貢献していることが示唆された。

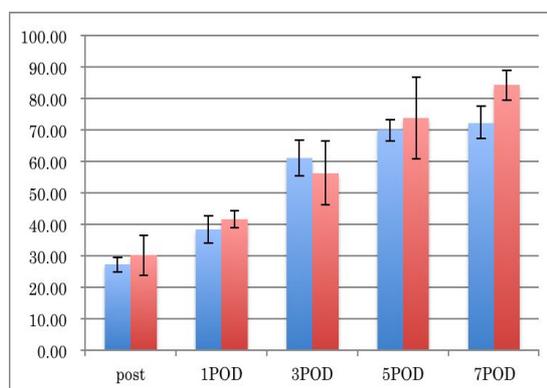
また門脈圧に関しては 70%肝切除を加える事で切除前は平均で 8.94mmHg であったのが、切除後では 11.80mmHg と上昇を認め (p=0.0002)、明らかに門脈圧が上昇することが確認された。しかし 70%肝切除後から脾臓摘出術を施行した群とは有意な差は認めなかった。90%肝切除、90%肝切除+脾摘群に関しては現在論文投稿のために結果を開示しないが、やはり門脈圧は肝切除前、70%肝切除時、90%肝切除時と肝切除量が増えるにつれ門脈圧も上昇する傾向は認めている。

Volumetry にて 70%肝切除群と 70%肝切除+脾摘出群では肝再生率は、1POD で統計学的な有意差は認めなかったが脾摘出群にてより高い値であった。7POD では 72.3%vs84.2%と大きく脾摘出群で高かった(p=0.005)(図2)。これより初期の肝再生でより脾摘出群は急峻な再生をみせ 7POD には非脾摘出群をうわまる肝再生を示した。70%の肝切除では脾摘出により門脈圧の変化はほとんど認められなかったため、これらの肝再生率の上昇因子は肝切除後初期門脈圧の変化によるものとは別のサイトカインや血小板数の変化によるものと考えられる。しかし 7POD での門脈圧は脾摘出群にて低く術直後のみでは判断で

きない門脈圧の変化が肝再生の変化に影響している可能性はあると考えられた。今後より肝切除量が多く門脈圧上昇が強い 90%肝切除群及び 90%肝切除+脾摘出群での結果の解析、採血結果解析、病理学的解析を進め、より肝再生の因子を詳細に突き詰め、現在論文作成中である。



(図1) 縦軸:門脈圧(mmHg) 横軸:経時変化
70%肝切除群、70%肝切除+脾摘出群の門脈圧変化



(図2) 縦軸:肝再生率(%) 横軸:経時変化
70%肝切除群、70%肝切除+脾摘出群の肝再生率

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
高原 武志
(岩手医科大学 外科学講座 助教)

研究者番号：80453306

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：