

論 文 内 容 要 旨

題目 The protective effect of adipose-derived stem cells against liver injury by trophic molecules.

(脂肪由来幹細胞の栄養因子を介した肝傷害に対する保護効果)

著者 Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Morine Y, Imura S, Mori H, Sugimoto K, Iwahashi S, Asanoma M.

平成 25 年 3 月発行 JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH

第 180 巻第 1 号

162 ページから 168 ページに発表済

内容要旨

大量肝切除や肝移植における虚血再灌流傷害及び残肝容積不足への対策は術後肝不全を回避する上で重要な課題である。そこで我々は、低侵襲かつ大量に採取可能である脂肪由来間葉系幹細胞 (ADSC; adipose tissue derived mesenchymal stem cell) に注目した。近年、ADSC は様々な栄養因子を分泌することで肝細胞死を軽減し、肝再生を促進することが報告されている。さらに、vascular endothelial growth factor (VEGF) を介した細胞保護効果や抗アポトーシス効果が傷害膵島や胃粘膜細胞において報告されているが、肝細胞における詳細な機序は未だ不明である。

本研究では、まず、in vitro において、Balb/c nu-nu マウスから分離した肝細胞 (1.0×10^5 cells / well) とヒト ADSC STEMPRO[®] (1.0×10^5 cells / well) を Transwell[®]を用いて共培養し、培養 1・3・5・7 日目の肝細胞 viability を FDA/PI 染色にて、また、培養液中の VEGF・hepatocyte growth factor (HGF) を ELISA 法にて経時的に追跡し肝細胞単独培養群と比較した。さらに、培養液中に抗 VEGF 抗体である Bevacizumab (Bev) (25 μ g/ml) を投与しその影響を検討した。

続いて、in vivo において、6 週齢雌性 Balb/c nu-nu マウスに 15 分全肝虚血下に 70%肝切除を施行した。再灌流直後に ADSC 投与群には ADSC (1.0×10^5 cells / 200 μ l / mouse) を経静脈的に投与し、ADSC 非投与群には同量の PBS を投与した。術後 6・24 時間の血清肝機能 (AST・ALT・T-Bil) を両群で比較検討した。さらに、20 分全肝虚血下に 70%肝切除を施行し (致死モデル)、術後 24 時間での生存率及び肝再生 (残肝体重比) を比較検討した。

培養 3・5・7 日目において肝細胞の viability は ADSC 共培養群で有意に良好

様式(8)

であった(培養 7 日目; 25 vs. 7 % $p<0.05$)。また、ADSC 共培養群で、培養液中の VEGF 濃度が培養 7 日目まで有意に上昇していた。培養 5 日目の HGF が ADSC 共培養群で有意に上昇していた。さらに、培養液中に Bev を投与したところ VEGF 濃度は低下したが、ADSC の viability 改善効果は抑制されなかった。

ADSC 投与群において術後 6 時間の血清肝機能が有意に改善しており (AST: 3,793 vs. 5,748 U/l $p<0.05$ 、ALT: 2,443 vs. 3,672 U/l $p<0.05$ 、T-Bil: 0.17 vs. 0.48 mg/dl $p<0.01$)、術後 24 時間においても改善傾向を認めた。また、致死モデルにおいて術後 24 時間の生存率は ADSC 投与群で 41.2% (7/17)、非投与群では 23.5% (4/17) と高い傾向を認めた。さらに、ADSC 投与群は非投与群と比較して、残肝体重比が良好な傾向を認めた (2.7 vs. 2.2 $p=0.07$)。

ADSC は 70% 肝切除及び虚血再灌流傷害モデルマウスにおいて、術後肝傷害を軽減し、肝再生を促進した。また、ADSC は肝細胞に対して栄養因子を介した保護効果を持つが、それは Bev 投与により抑制されず、VEGF signal 以外のメカニズムによると考えられた。以上より、ADSC を用いた細胞移植療法は、大量肝切除あるいは肝移植術後の肝不全を予防する 1 つの治療オプションとして期待される。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1163 号	氏名	齋藤 裕
審査委員	主査 丹黒 章 副査 高山 哲治 副査 坂下 直実		

題目 The protective effect of adipose-derived stem cells against liver injury by trophic molecules
(脂肪由来幹細胞の栄養因子を介した肝傷害に対する保護効果)

著者 Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Morine Y, Imura S, Mori H, Sugimoto K, Iwahashi S, Asanoma M.
平成 25 年 3 月発行 Journal of Surgical Research 第 180 巻第 1 号
162 ページから 168 ページに発表済
(主任教授 島田 光生)

要旨 大量肝切除や肝移植における虚血再灌流傷害及び残肝容積不足への対策は術後肝不全を回避する上で重要な課題である。
Adipose-derived stem cell (ADSC)は様々な栄養因子を分泌して肝細胞死を軽減し肝再生を促進すること、傷害脾島や胃粘膜細胞においては vascular endothelial growth factor (VEGF) を介した細胞保護や抗アポトーシス効果が報告されているが、肝細胞の保護機序に関する報告はほとんどない。
そこで申請者らは、肝傷害に対する ADSC の効果とその機序に関して以下の実験を行った。In vitro において、Balb/c nu-nu マウスから分離した肝細胞とヒト ADSC STEMPRO[®]を共培養し、1、3、5、7 日目の肝細胞の viability と培養液中の VEGF と hepatocyte growth factor (HGF) 濃度を測定し、肝細胞単独培養群と比較した。さらに、抗 VEGF 抗体の bevacizumab を投与してその影響を検討した。In vivo において、6 週齢雌性 Balb/c nu-nu マウスに 15 分全

肝虚血下に 70%肝切除を行い、ADSC を経静脈的に投与し、術後 6 および 24 時間の肝機能 (AST・ALT・T-Bil) を測定し、ADSC 非投与群と比較した。さらに致死モデルである 20 分全肝虚血下の 70%肝切除 24 時間後の生存率及び肝再生 (残肝体重比) を比較した。

得られた結果は、以下のごとくである。

- 1) 培養 3、5、7 日目における肝細胞の viability は ADSC 共培養群で有意に高く、VEGF 濃度の上昇(3、5、7 日目)と HGF 濃度の上昇(5 日目)を認めた。
- 2) 培養液中に bevacizumab を投与した結果、VEGF 濃度は低下したが、ADSC 投与群の viability は抑制されなかった。
- 3) ADSC 投与群において手術 6 時間後の血清肝機能は有意に改善しており、24 時間後においても改善傾向を認めた。
- 4) 致死モデルの手術 24 時間後の生存率は ADSC 投与群で高い傾向を認めた。さらに、非投与群と比較して、残肝体重比が良好な傾向を認めた。

以上の結果から ADSC は肝傷害に対して VEGF 以外の栄養因子を介した保護効果を持ち、肝再生を促進することが示唆された。

本研究は、大量肝切除あるいは肝移植術後の肝不全予防に ADSC 細胞移植療法の臨床応用の可能性を示唆しており、その臨床的意義は大きく学位授与に値すると判定した。