
先天性肝代謝病に対する胎児期における肝細胞移植

(研究課題番号 : 06671175)

平成7年度科学研究費補助金 [一般研究 (C)] 研究成果報告書

平成8年3月



研究代表者 加藤一哉

(旭川医科大学医学部講師)

I. はしがき

1) 研究の目的と意義

現在全世界的に肝疾患に対し積極的に肝移植術または、特に本邦においては、部分肝移植が行われている。従って、肝移植によってしか治癒の望めない先天性肝酵素欠損症も、そのドナー不足により治療を受けられない事態が予想される。われわれはこれらの疾患のうちいくつかは全肝を必ずしも要さず、肝細胞移植で間に合うものであることを実験的に明らかにしてきた。さらに本疾患は新生児期から発症し重篤化するものも多いため、可及的早期の治療法を検討することも課題として残されていた。

また、一方胎児～新生児期には免疫の発達が不十分のため、非自己を受け入れ易い可能性が高いうえ、いったん移植片を受け入れた場合、免疫学的寛容状態が得られ成長後の同種肝細胞移植に対し拒絶反応を示さない可能性が高いと考えられる。これは免疫抑制剤を要さないことを意味し、本疾患が生後から一生にわたることを考えれば胎児期細胞移植は大変有利な治療といえる。

また本法の臨床応用を考えた場合、既に胎児期遺伝子診断もエコー下臍帯静脈採血も、手技的には確立されており、従って、実験的に胎児～新生児に対し肝細胞移植を試みて効果を調べることは必然

的ともいえる状況にある。しかしながら国内外では唯一正常小羊を対象にして、臍帯静脈からの細胞移植を行った直後の肝内生着をみた報告があるのみである。

小動物には多くの疾患モデルがあるが、最近小動物（ラット、ウサギ）の胎児に対するmicrosurgeryが進歩し、その安全性が高まったことから、肝細胞を小動物の胎児の腹腔あるいは臍帯静脈へ注入するだけの簡単な手技は十分成功が見込めると思われる。また、代謝異常の動物モデルとしては現在各種のtransgenic動物が次々開発されてきていることから、これらを対象にして肝細胞移植の効果をみることは、ヒト先天性代謝異常疾患の中で本法に最適のものをみつけ出す絶好の機会となるであろう。この研究はまた、逆に代謝異常疾患の病態を明らかにするうえでも極めて有用なものであると考えられる。

2) 研究組織

研究代表者： 加藤 一哉（旭川医科大学医学部講師）
（平成7年度より）

研究代表者： 小野寺一彦（旭川医科大学医学部助手）
（平成6年度）

研究分担者： 葛西 眞一（旭川医科大学医学部助教授）
山本 哲（旭川医科大学医学部講師）
稲垣 光裕（旭川医科大学医学部助手）
今井 政人（旭川医科大学医学部助手）

3) 研究経費

平成6年度	100千円
平成7年度	90千円
計	190千円

4) 研究発表

ア) 学会誌等

- 1.Kazuya Kato, et al: Developmental expression of cytochrome P450s within intrasplenically transplanted fetal hepatocytes from spontaneously hypertensive rats. Cell Transplantation 3(1) :15-21,1994.
- 2.Kazuhiko Onodera, et al: Effects of intrasplenic hepatocyte transplantation in rats congenitally deficient in ascorbic acid biosynthetic enzyme. Cell Transplantation Suppl 3:31-34,1994.
- 3.小野寺一彦、他: 先天性肝アスコルビン酸生合成酵素欠損ラットに対する肝細胞移植. 日本外科学会雑誌 96:301-308,1995.
- 4.Kazuhiko Onodera, et al: Effects of hepatocellular transplantation via the umbilical vein in fetal rats with congenital metabolic disease. Transplant Proc 2:1630-1631,1995.
- 5.Kazuya Kato, W.John B.Hodgson, Nader G.Abraham, et al: Long-term developmental expression and inductivity of cytochrome P450s within intrasplenically transplanted fetal hepatocytes from spontaneously hypertensive rats.

Cell Transplant Suppl 4:33-36,1995.

6.Kazuya Kato, Shinichi Kasai, Kazuhiko Onidera, et al: Effect of 70% partial hepatectomy on developmental expression of cytochrome P450 IVA1 within intrasplenically transplanted fetal hepatocytes from spontaneously hypertensive rats. International Hepatology Communications 3:254-259,1995.

7.Kazuya Kato, W.John B.Hodgson, Nader G.Abraham, et al: Expression and inducibility of cytochrome P450 IIIA family within intrasplenically transplanted fetal hepatocytes. Cell Transplantation 5 (in press) 1996.

8.Kazuya Kato, Shinichi Kasai, Kazuhiko Onodera, et al: Developmental expression of cytochrome P450's within intrasplenically transplanted fetal hepatocytes. Cell Transplant Proc (in press) 1996.

イ) 口頭発表

1.K.Onodera, S.Kasai, K.Kato, et al: Effects of hepatocellular transplantation via the umbilical vein in fetal rats with congenital metabolic dispose. Second congress of the international society for experimental microsurgery 1994. September (Kanazawa, Japan)

2.小野寺一彦、葛西眞一、稲垣光裕、他：先天性肝酵素欠損症に対する周産期肝細胞移植の実験的検討. 第30回日本移植学会 1994年11月（広島）

3.加藤一哉、葛西眞一、小野寺一彦、他：ラット脾内移植肝細胞のcytochrome P450の発現について. 第3回細胞療法研究会 1995年1月（東京）

4.加藤一哉、葛西眞一、松田 年、他：ラット脾内移植胎児肝細胞におけるcytochrome P450の発現. 第31回日本肝臓学会 1995年8月（久留米）

II. 研究成果

1. 子宮内胎児手術手技の向上により死産、Cannibalismが回避することが可能となった。

移植群 (n=6) のうち2匹において有意に ($p < 0.05$) 症状発現時期の遅延と生存日数の延長が確認できた (Table 1)。また、病理組織学的検討においても、明らかに肝内生着も確認された。

さらに一方では、新生児ラットへの肝内移植群では安全性は高かったが、その移植効果はコントロール群 (非移植群) に比し有意な差は認められず、新生児時期における移植は有効ではなかった。

2. 今回はcytochrome P450 familyの中のcytochrome P450 IIIA familyにてその発現およびさらにinducerを用いて検討を加えた。

1) 移植前胎児肝細胞、移植後6週目および10週目の脾内胎児肝細胞のCytochrome P450 HLpおよびP450pの発現。

移植後6週目における脾内胎児肝細胞は集塊を形成し赤色髄内存在し増殖していた (図 1)。またBrdU免疫染色では、核が濃染された肝細胞が散見され、増殖分裂を繰り返していることが確認された (図 2)。

Cytochrome P450 pの発現は移植前の胎児肝細胞および移植後6

週目において認められた。しかし移植後10週目では、その発現が認められるも低かったcytochrome P450 HLpの発現は移植前胎児肝細胞および移植後6週目に認められたが、移植後10週目においては認められなかった。(図 3,4)

2) 脾内移植後10週目における脾内胎児肝細胞のdexamethason投与によるcytochrome P450 IIIA familyのinducibility (DEX群)
(図 3,4)。

Cytochrome P450 pの発現は10週目ではわずかに確認されたのみであるが、DEX群ではより強い発現が確認された。Cytochrome P450 HLpの発現は移植後10週目の発現は認められなかったが、DEX群では認められた。

III. 考察と今後の展望

すでに大動物においては、臍帯静脈内肝細胞移植は、その生着が組織学的に確認されている。今回、我々はラット胎児を用いて同様に臍帯静脈より肝細胞移植を行い、その生着確認とともに移植肝細胞の機能を先天性酵素欠損ラットを用いることにより確認し得た。

この結果は、肝内に移植が成功しかつ移植肝細胞が増殖、分化をし、その機能発現に至ったと考えられた。

また一方、cytochrome P450は分化した組織を持つ多細胞生物の高度の調節機能と関連しており、動物の発生段階に応じて種々のcytochrome P450が発現し、またその存在量も変化する。一般に胎児肝では、P450 IIIA familyの発現は非常に低くinductionを用いてもわずかに認められるのみである。今回我々はcytochrome P450 IIIA familyであるcytochrome P450 pおよびP450 HLpの発現についてSHRを用いて、胎児肝および脾内移植後6週において検討を加えたところ、妊娠20日目の胎児肝においてその発現がinductionを用いずに認められ、また移植後6週目においてもその発現が確認された。さらに長期脾内胎児肝細胞移植モデルとして移植10週目にその発現について検討したところP450 pの発現がわずかに認められたがcytochrome P450 HLpの発現は認められなかった。この差はcytochrome P450 HLpはanti-human liver microsome

に対する polychronal antibody を用いているためと推測された。そこで cytochrome P450 IIIA family の inducer である DEX を用いて脾内移植胎児肝細胞についてその inducibility について検討を加えたところ Cytochrome P450 p および P450 HLp の発現の増強が認められた。このことは脾内に移植された胎児肝細胞が増殖、分化し成熟肝細胞と同様の response を備えたと思われる。一般に cytochrome P450 IIIA family は主として microsome の 6β -hydroxylase の活性と相関を示し、雄性のラットの成熟肝細胞に特異的とされる。しかしながら未熟ラットにおいては、性差はなくその発現が低いながら同レベルに認められる。したがって cytochrome P450 p および P450 HLp の発現が6週および10週目で認められたことは、脾内に移植された胎児肝細胞が分化増殖を繰り返し成熟肝細胞へと発達してきたことを示唆するものと考えられる。以上、脾内移植胎児肝細胞において移植後10週目においても cytochrome P450 の代謝系が存在することが確認された。

以上のことにより、胎児肝細胞移植は、周産期において少なくとも同種間にてトランス誘導の可能性も生じ、大量の肝細胞を移植することも可能であり、その後脾臓内または肝臓内において十分に増殖分化し成熟肝細胞に至り、その結果先天性酵素欠損症の早期治療に非常に期待がもてるであろうことが判明した。

**Table. 1 Onset of the Disease and Survival
(weeks after cessation of AsA)**

	Onset of the disease	Survival
transplanted rats (n=6)		
male (n=2)	7	10
male } (n=4)	3~4	5~7
female }	2~3	3~4
non-transplanted rats (n=76)		
male (n>36)	3~4	5~7
female (n>32)	2~3	3~4

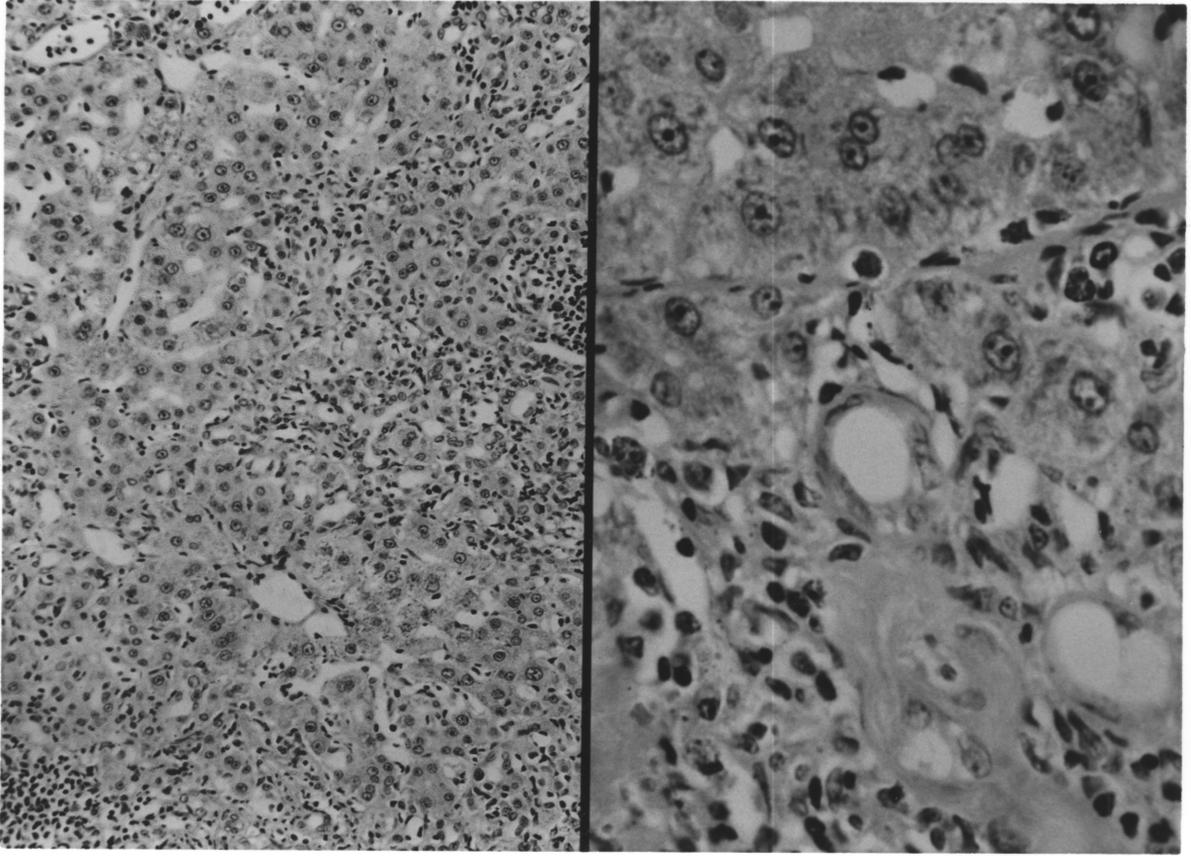


图 1. 光镜下观察脾内移植的肝细胞。脾脏经 10% 甲醛固定，HE 染色。在脾脏红髓中观察到大量肝细胞，呈索状排列，并见增生的胆管。肝细胞呈卵圆形，周围有淋巴细胞和红细胞。移植 10 周后观察到较大规模的肝细胞。

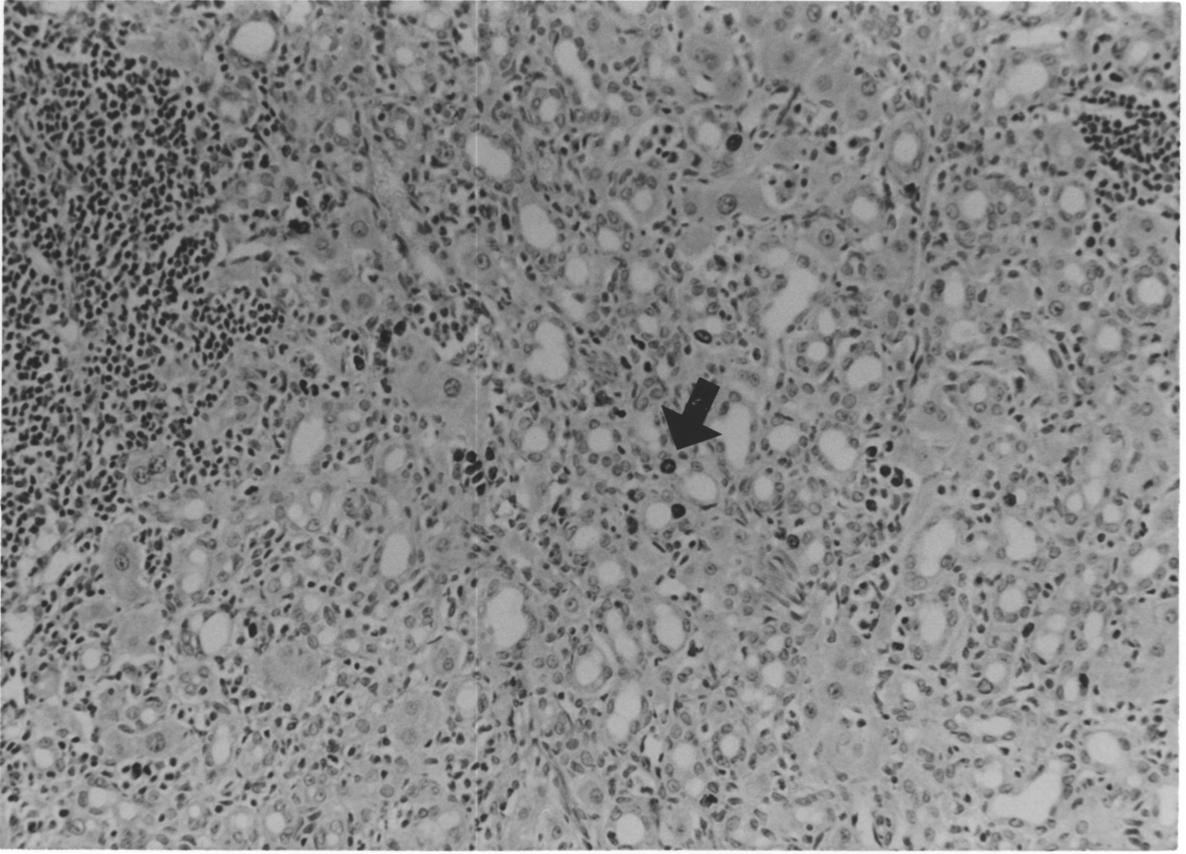
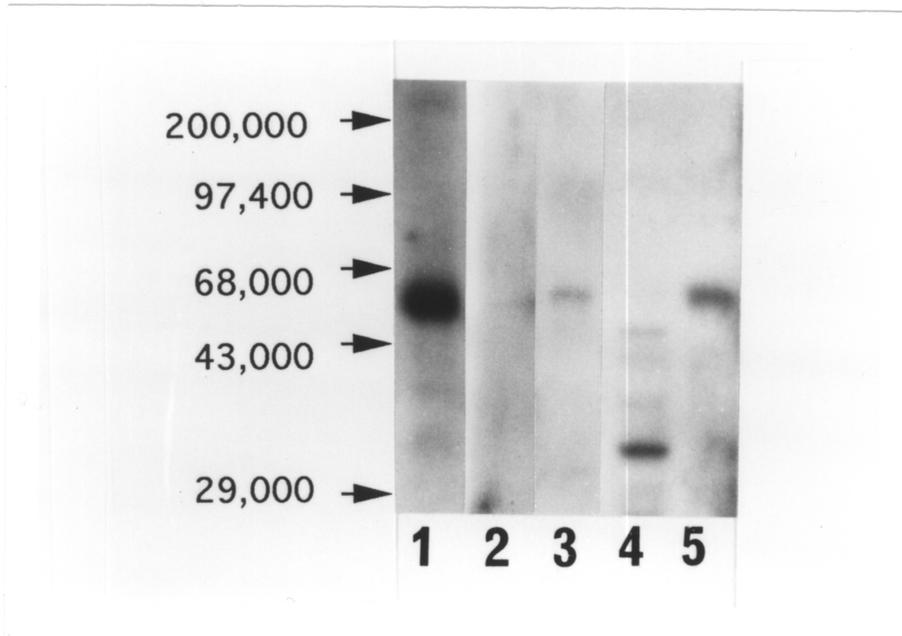


图 2. Spleen sections stained by an immunohistochemical technique with anti-BrdU monoclonal antibody. Proliferating hepatocytes were observed.



☒ 3. Immunoblot analysis of cytochrome P450s of microsomes from fetal liver and splenic microsomes from recipient rats. In all cases, 50 μ g of microsomal protein was loaded and the cytochrome P450 antibodies were diluted 1:100. Cytochrome P450 p: Lane 1, 16 ng of purified P450 p; Lane 2, control, nontrans-planted spleens; Lane 3, untreated fetal liver; Lane 4, spleens 10 wk after transplantation with fetal hepatocytes; Lane 5, spleens 10 wk after transplantation with fetal hepatocytes induced with DEX.

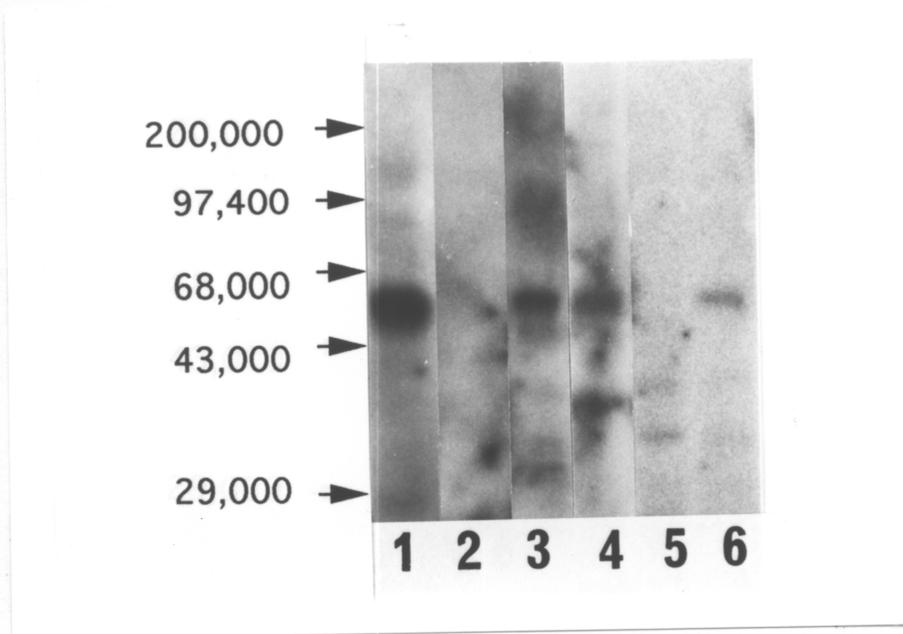


图 4. Cytochrome P450 HLp Lane 1, 16 ng of purified P450 HLp; Lane 2, control, nontransplanted spleens; Lane 3, untreated fetal liver; Lane 4, spleens 10 wk after transplantation with fetal hepatocytes; Lane 5, spleens 10 wk after transplantation with fetal hepatocytes induced with DEX.