

論文の内容の要旨

氏名：佐藤 慶太

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：犬の肝硬変に対する脱分化脂肪細胞の臨床応用に向けた研究

犬の肝硬変は慢性肝炎の終末像であり、病態の進行に伴い肝機能障害と門脈圧亢進症を呈する。その結果、低アルブミン血症、腹水、後天性門脈体循環側副路が出現し、病状はさらに重篤化する。したがって、犬の慢性肝炎の治療には炎症や線維化を抑制するグルココルチコイドや免疫抑制剤を用いた積極的な内科療法が適応となる。しかし、肝硬変に至った犬では治療効果に乏しく、予後が非常に悪い。医学領域において肝硬変の最終的な治療法は生体肝移植となるが、ドナー確保など多くの問題を有することから、生体肝移植に代わる新規治療法が望まれる。

脂肪組織由来間葉系幹細胞（ASC）は、脂肪組織中の間質血管系分画に存在する少数の細胞であり、犬の様々な疾患に治療応用されている。しかし、その作製には多量の脂肪組織が必要となり、低栄養状態である肝硬変の犬では細胞療法に必要なASCの作製に限界がある。一方、脂肪組織中に多く存在する成熟脂肪細胞から、天井培養により線維芽細胞様細胞へ脱分化した脱分化脂肪細胞（DFAT）を作製できる。DFATはASCと類似し、免疫調整作用を有することがマウスの研究で明らかとなっており、犬の肝硬変に対する新たな細胞療法として利用できる可能性がある。

そこで本研究では、犬のDFATを肝硬変の新規治療法として臨床応用することを目標に、第1章では脂肪組織の採材部位および犬DFATの作製について検討し、第2章で他家犬DFATの投与に向けた主要組織適合性複合体（MHC）について検討し、第3章で犬DFATの調整と投与安全性について検討した。

第1章：臨床応用に向けた脂肪組織の採材部位および犬DFATの作製の検討

第1節：進行した慢性肝炎の犬における脂肪組織分布の解析

進行した慢性肝炎の犬は、低栄養状態であり体脂肪組織量の減少が危惧される。そのため、自家犬DFAT作製に必要な脂肪組織の効率的採取のため、組織分布を確認する必要がある。そこで、慢性肝炎罹患犬の皮下脂肪および腹腔内脂肪の組織分布についてCT画像を用いて解析した。

日本大学動物病院でCT検査と病理検査から慢性肝炎と確定診断した犬25頭を対象に、後天性門脈体循環側副路の出現している犬を進行群（11頭）、出現していない犬を非進行群（14頭）に分類した。CT画像は第3腰椎横断面像から閾値を-250から-25HUに設定することにより脂肪組織を抽出し、皮下脂肪面積/全体面積比、腹腔内脂肪面積/全体面積比、腹腔内脂肪面積/皮下脂肪面積比を算出した。その結果、進行群の腹腔内脂肪面積/全体面積比は皮下脂肪面積/全体面積比に比べ高値を示した（ $P=0.02$ ）。また、進行群の腹腔内脂肪面積/皮下脂肪面積比は1.4であり、非進行群（0.8）と比較して高値を示した（ $P=0.002$ ）。以上、進行した慢性肝炎の犬では腹腔内脂肪が多く分布することが明らかとなった。

第2節：腹腔鏡を用いた腹腔内脂肪組織の採取と犬DFATの作製

腹腔鏡下肝生検は、病理診断に有用な肝臓組織を低侵襲に採材できるため、犬の慢性肝炎の肝生検法に推奨されている。進行した慢性肝炎の犬では腹腔内脂肪組織が多く分布しており、DFATの作製に腹腔内脂肪組織を肝生検と同時に採材することは犬の負担が少ない。そこで、腹腔鏡を用いて犬の腹腔内脂肪組織を採材し、分離した成熟脂肪細胞からDFATの作製を試みた。

健常ビーグル犬5頭を用い、腹腔鏡により腹腔内脂肪組織を観察後、生検鉗子にて脂肪組織を採取した。脂肪組織はコラゲナーゼで処理し、成熟脂肪細胞を分離、採集した。次に成熟脂肪細胞を20% FBS添加DMEMに満たした培養フラスコに播種し天井培養した。その結果、腹腔鏡下では鎌状間膜の脂肪組織が採取可能であり、その脂肪組織重量は0.4g（0.2-0.5g）、作製した初代培養DFATは 1.6×10^7

個 ($0.7\text{--}1.7\times 10^7$ 個) であった。以上、腹腔鏡下で採材した少量の腹腔内脂肪組織から犬 DFAT を多量に作製できることが明らかとなった。

第2章：他家犬 DFAT の投与に向けた MHC の検討

第1節：犬 DFAT の MHC 遺伝子発現の解析

DFAT を肝硬変の犬に利用する場合、繰り返し投与する必要性が想定されるため自家投与のみでは限界があり、他家 DFAT の投与も必要となる。しかし、他家犬 DFAT の投与は拒絶反応が生じ細胞療法の十分な効果が得られない可能性がある。したがって、犬 DFAT の MHC mRNA 発現について解析し免疫原性の有無について評価した。

健常ビーグル5頭の腹腔内脂肪組織から犬 DFAT を作製し、天井培養の過程で採取された成熟脂肪細胞と共にサンプルとして使用した。各サンプルを MHC 遺伝子である *DLA-12*、*DLA-88*、*DLA-DRB1*、*DLA-DQA1*、*DLA-DQB1* のプライマーを用い、MHC 遺伝子発現を RT-PCR により半定量した。その結果、犬 DFAT は MHC クラス I の *DLA-12* と *DLA-88*、MHC クラス II の *DLA-DQA1* の発現が確認された。以上、犬 DFAT には複数の MHC 遺伝子が発現していることが明らかとなった。

第2節：MHC 遺伝子マッチングの有用性

犬 DFAT に MHC 遺伝子が発現していることから、免疫原性を有し犬 DFAT の他家移植には拒絶反応が危惧される。したがって、ドナーおよびレシピエントの MHC 遺伝子マッチングが DFAT の細胞療法に重要となる。そこで、他家移植が最も困難である皮膚移植により、犬の他家移植に対する MHC 遺伝子マッチングの有用性について検討した。

既知の MHC 型を持つ健常ビーグル犬8頭を4頭ずつ2セットに分け、それぞれドナー1頭とレシピエント3頭とした。レシピエントは、ドナーと MHC 型が完全一致、半一致、不一致の個体を選び、ドナーとレシピエント間で皮膚移植を実施した。また、ドナーとレシピエント間で混合リンパ球反応 (MLR) を実施した。その結果、皮膚移植では不一致および半一致ペアにおいて14日以内に移植片が壊死した。一方、完全一致ペアでは皮膚移植片が最長21日間生着し、MLRの反応が最も弱かった。以上、犬の他家移植において MHC 型を一致させることで、移植片の生着効率が向上することが明らかとなり、MHC 遺伝子マッチングは犬 DFAT を他家移植する際に有用であることが示唆された。

第3章：臨床応用に向けた犬 DFAT の調整と投与安全性の検討

第1節：細胞療法のための犬 DFAT の調整

DFAT を肝硬変の犬に投与する場合、DFAT を適切な細胞数まで培養増殖させる必要がある。また、DFAT の輸送や投与までの期間、細胞の安定した保存が求められる。したがって、犬 DFAT の増殖能と保存条件について検討した。

健常ビーグル犬5頭から DFAT を作製し、細胞を7日ごとに継代することにより倍加時間と細胞直径を算出した。また、犬 DFAT の調整に生理食塩水とラクトリンゲル液を使用し、室温と4℃の保存条件で犬 DFAT の生存率を調べた。その結果、犬 DFAT の Passage 3 および 4 における倍加時間 (12.8 ± 7.0 日および 21.6 ± 12.3 日) は Passage 1 (2.3 ± 0.9 日) と比較して延長した ($P<0.05$)。また、継代ごとに細胞直径は増加した ($P<0.001$)。なお、ラクトリンゲル液・室温保存の条件が6時間後まで生存率は減少せず、24時間後の生存率は $88.5\pm 4.1\%$ と最も高かった。以上、犬 DFAT は高い増殖能を有しており、継代は Passage 2 までとし、ラクトリンゲル液・室温条件で調整した DFAT の使用が適していることが明らかとなった。

第2節：犬 DFAT の末梢静脈および門脈投与の安全性

犬の細胞療法の重篤な副作用は、末梢静脈投与による肺血栓塞栓や門脈投与による門脈圧上昇である。したがって、健常犬の末梢静脈および門脈から自家 DFAT を投与し、その安全性について検証した。

健常ビーグル犬5頭から腹腔鏡下にて採材した脂肪組織から DFAT を作製した。自家 DFAT をラクト

リンゲル液にて 1.0×10^6 個/kg に調製、室温保存し、1 ヶ月以上期間をあけて末梢静脈と門脈経由により DFAT を投与した。安全性評価として一般身体検査、血液検査、造影 CT 検査を実施し、門脈投与では投与後の門脈圧を測定した。その結果、末梢静脈投与の 1 頭で翌日に一過性の発熱 (39.2°C) が確認されたが、他に身体検査で異常は認められなかった。また血栓マーカーや造影 CT 検査において血栓形成を疑う所見は認められなかった。なお、門脈投与後の門脈圧の変動は 1mmHg 以内であった。以上、自家の犬 DFAT の末梢静脈および門脈投与は、重篤な副作用のない安全な手法であることが明らかとなった。

総括

本研究では、犬の肝硬変に対し DFAT の臨床応用に向けた検討を実施した。その結果、腹腔内脂肪が進行した慢性肝炎の犬の組織採材部位として適しており、腹腔鏡下で得られた少量の脂肪組織から多量の犬 DFAT が作製できることを明らかにした。そして、犬 DFAT は複数の MHC 遺伝子発現を有していることから、MHC 遺伝子マッチングにより他家犬 DFAT を効果的に投与できる可能性を明らかとした。さらに、犬 DFAT 投与に向けた至適な調整方法を明らかとし、犬 DFAT の末梢静脈および門脈投与は安全性が高いことを明らかにした。以上の所見は、犬 DFAT を臨床例に対し低侵襲かつ安全に応用できることを示す知見であり、既存の治療に抵抗性のある犬の肝硬変に対する新規の治療に寄与するものであると考えられる。