

京都大学	博士（医学）	氏名	安田 勝太郎
論文題目	A nonhuman primate model of liver fibrosis towards cell therapy for liver cirrhosis (肝硬変に対する細胞療法の確立のための非ヒト霊長類肝線維症モデルの開発)		
(論文内容の要旨)			
<p>【背景・目的】肝硬変は慢性炎症性肝疾患の共通の終末像であり、肝硬変の唯一の根治療法は肝移植である。しかし、深刻なドナー肝不足のため、肝移植実施数は肝硬変患者数に全く追いついていない。肝細胞移植は肝硬変による肝不全を改善させ、肝移植のタイミングを遅らせることで、ドナー肝不足の問題解決に寄与すると考えられている。齧歯類モデルを用いた基礎研究ではその効果を期待させたが、臨床試験では期待通りの効果は得られていない。その理由として、一つは移植細胞の問題がある。深刻なドナー肝不足により、質の高いドナー肝は肝移植に使用され、肝細胞移植に用いられるドナー肝は数も少なく質も低い傾向にある。それが臨床試験の規模を制限し、結果にも影響を与えていると考えられる。もう一つの理由としては、齧歯類とヒトとの解剖学的・生理学的違いが挙げられる。これらの問題を解決するには、新たな移植細胞源と、治療効果を検証可能なヒトに近い動物モデルの開発が必要である。ヒト iPS 細胞は無限の増殖能と肝細胞 (human iPSC-derived hepatocyte-like cells; hiPSC-HLCs) にも分化しうる多分化能を持つため、新たな移植細胞源として注目されている。そこで、hiPSC-HLCs を用いた細胞移植療法の治療効果の検証が可能な非ヒト霊長類肝線維症モデルと移植方法の開発を試みた。</p> <p>【方法・結果】本研究では6頭のカニクイザルを用いた。既報の齧歯類肝線維症モデルを参考にして、6頭のうち3頭に肝細胞に特異的に障害を与える Thioacetamide (TAA) の長期皮下投与を行い、慢性肝炎を惹起させた。残りの3頭は非投与の正常対照群とした。肝線維化については適宜肝生検を行い、膠原線維染色後に Ishak staging で評価した。TAA 投与により惹起される肝炎・肝線維化の程度には個体差が大きく、血液検査・肝生検結果を目安に、各個体の適切な TAA の投与量・投与期間を調節した。最終的に安楽殺を行い肝組織を評価したところ、3頭とも Ishak stage 4 以上の肝線維化が得られた。うち2頭は Ishak stage 5 の肝硬変であった。血液所見では肝硬変に特徴的な血小板数の減少および血清アルブミン値の低下、ICG15 分値の上昇を認めた。肉眼解剖学的には肝臓の萎縮・肝表面の粗造化、門脈圧亢進を示唆する脾臓の腫大や門脈本管・分枝の拡張を認めた。以上より、各個体に合わせて TAA の投与方法を調整することで、カニクイザル3頭に門脈圧亢進症を伴う肝線維症・肝硬変を再現することができた。次に、安楽殺前の肝線維症モデルの3頭の肝臓に、免疫抑制剤投与下に hiPSC-HLCs を移植し、肝線維症・肝硬変の肝臓に生着するか否かの検証を行った。開腹下で下腸間膜静脈分枝より門脈内にカテーテルを留置し、肝前区域に hiPSC-HLCs <math>1.0 \times 10^4</math> 個からなる細胞塊 <math>1.0 \times 10^3</math> 個を選択的に移植した。生着を組織切片で確認するため、移植細胞には <i>ALBUMIN</i>-<i>GFP</i> reporter hiPSCs を用いた。移植 14 日後に安楽殺を行い、免疫組織染色を行ったところ、肝線維症モデル3頭全てに、前区域の線維化で拡大した門脈域への移植細胞の生着を認めた。</p> <p>【考察・結論】本研究は門脈域に生着した hiPSC-HLCs の機能評価や長期観察といった課題が残る。しかし、本研究がカニクイザル肝線維症モデルを用いた肝硬変に対する細胞移植療法の前臨床研究を加速させ、肝硬変に対する iPS 細胞技術を用いた細胞療法の開発に寄与するものと考えられる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

肝移植は肝硬変の唯一の根治療法であるが、深刻なドナー肝不足の問題が存在する。iPS 細胞由来肝細胞を用いた細胞移植療法は、この問題の解決に寄与すると期待されている。本研究は、その実現に向けてヒトと同じ霊長類であるカニクイザルを用いた肝線維症モデルの樹立と移植方法の確立を目的とした。

血液検査・肝生検による肝障害・肝線維化の評価を適宜行いつつ、投与量・投与期間を調節してチオアセトアミドをカニクイザルに反復投与することで、投与された3頭全てに Ishak fibrosis score 4 以上の肝線維症、うち2頭は Ishak fibrosis score 5 の肝硬変の再現に成功した。樹立した肝線維症モデルは典型的な肝硬変の血液所見を呈し、門脈圧亢進を示唆する脾腫や門脈系の拡張を伴っていた。続いて、作製したカニクイザル肝線維症モデルの下腸間膜静脈分枝より門脈前区域枝に血管カテーテルを進め、免疫抑制剤投与下にアルブミンレポーターヒト iPS 細胞株より分化誘導した肝細胞を肝前区域に移植した。移植後 14 日目の肝前区域の組織切片の免疫染色を行い、本移植条件でヒト iPS 由来肝細胞がカニクイザルの肝線維症・肝硬変の肝臓の門脈域に生着することを確認した。

以上の研究はカニクイザル肝線維症モデルを用いた前臨床研究を加速させ、肝硬変に対するヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた細胞療法の実現に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 2 年 7 月 16 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降