

|         |                                  |
|---------|----------------------------------|
| 氏名(本籍)  | 加藤 崇 (長崎県)                       |
| 学位の種類   | 博士(獣医学)                          |
| 学位記番号   | 甲第 134 号                         |
| 学位授与年月日 | 平成 25 年 9 月 30 日                 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 3 条第 2 項該当                 |
| 学位論文題名  | イヌの慢性肝疾患に対する自家骨髄細胞投与療法に関する基礎的研究  |
| 論文審査委員  | (主査) 土屋 亮<br>(副査) 代田 欣二<br>久末 正晴 |

## 論文内容の要旨

近年、イヌでは肝炎、門脈シャント、肝硬変といった難治性の肝疾患が認められ、根治的な治療が不可能な時も多い。これら疾患は近年増加傾向にあり、早急に新規治療法が開発されることが望まれている。「自家骨髄細胞投与 (Autologous bone marrow infusion; ABMi) 療法」は、ヒトの肝硬変患者に対して有効性が高く、かつ容易に実施できる移植療法として注目を集めている。イヌにおいても肝硬変および肝線維化の症例は増えつつあり、ABMi 療法をイヌに適応することが可能と思われる。したがって、本研究ではイヌの肝疾患に対する自家骨髄細胞療法の実用化に向けた基礎研究を行った。

### 第 I 章 障害肝へのイヌ骨髄細胞の集積性

**実験 1. 背景:** 自己の骨髄細胞 (BMC) の静脈内投与による肝機能改善効果のメカニズムは不明な点が多い。メカニズムの一つに投与細胞の Homing 作用が考えられるが、体内動態に関する情報は極めて少ない。また、イヌ骨髄細胞 (cBMC) を利用した例はこれまでにない。そこで実験 1 では、重度免疫不全マウスである NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  (NOG) マウスを利用して、cBMCs の肝障害時の体内動態および肝組織への生着について検討した。**方法:** 雌の NOG マウス (n=10) に対して CCl<sub>4</sub> 1ml/kg を単回腹腔内注射し、急性肝障害モデルを作製した。雄の健常犬 1 頭から採取した骨髄液 20ml を比重遠心法により単核細胞を分離し、リンカー法 (PKH26) にて蛍光標識し、cBMCs を作製した。cBMCs 1 × 10<sup>6</sup> 個を滅菌生理食塩水 (Saline) 200 μl に調製し、NOG マウスの尾静脈より投与した (n=5)。一方で、その他の CCl<sub>4</sub> 処理を施した NOG マウスに対しては、Saline のみを投与した (n=5)。さらに正常対照群としてオリーブオイルのみを腹腔内注射したマウスにも cBMCs 移植処置を行い比較した (n=5)。投与から 1 週間後に肝臓、脾臓、肺を採材し、cBMCs の各臓器への集積と生着について蛍光顕微鏡にて評価した。PKH 陽性領域は Image-J により算出した。さらにマウスの肝臓より PCR 法により、イヌ Y 染色体の検出を試みた。**結果:** 肝臓では CCl<sub>4</sub> 処理群で有意に PKH 陽性細胞の分布

が認められた。肺では CCl<sub>4</sub> 処理および未処理群の双方で一定の cBMCs の分布が認められたが、有意差は認められなかった。脾臓に PKH 陽性細胞の分布は認められなかった。また、PCR 法では、cBMCs 投与 NOG マウスの肝臓においてイヌ Y 染色体の検出が可能であった。**考察**：cBMCs は障害肝に対し特異的に集積することが明らかとなった。しかし、投与細胞は一部で肺に分布していたため、投与経路による有効性の違いが想定された。

**実験 2.** **背景**：実験 1 では、cBMCs が障害肝に集積する性質を示したが、これら cBMCs の役割は不明である。そこで、NOG マウスを利用し肝障害と再生に対する cBMCs 投与の影響について検討した。**方法**：NOG マウス (n=32) に実験 1 と同様に CCl<sub>4</sub> 処理を施し、2 つのグループに群分けした。一方は 1×10<sup>6</sup> 個の cBMCs を、もう一方は Saline のみを尾静脈投与した。なお、cBMCs は実験 1 と同様の要領で作製し PKH 標識を行った。投与から 24、48 時間後および 1 週間後に安楽殺し、肝臓および血清サンプルを採材した。血清生化学的および組織化学的手法により肝障害を評価し、Ki-67 の免疫染色により肝再生を評価した。**結果**：肝臓では移植から 24 時間後から PKH 陽性細胞が分布し、1 週間後で最大値を示した。各肝酵素および HE 染色上の壊死領域は cBMCs 群と Saline 群の間に有意差はなく、cBMCs 投与による肝障害軽減効果は認められなかった。Ki-67 の免疫染色においても両群間に差はみられなかった。**考察**：cBMCs の肝臓への分布は肝障害や再生の期間とは一致せず、役割は不明だった。本研究では、cBMCs 投与による明確な肝障害の治療効果と肝再生改善効果は認められなかった。実際の効果はより臨床例に近い慢性線維化モデルで検討すべきと考えられた。

## 第 II 章. 肝線維化モデルへのイヌ骨髄細胞投与の影響

**実験 1.** **背景**：ABMi による肝疾患の治療効果は、臨床例に近い慢性肝障害モデルで実施することが望ましい。肝臓の線維化進展過程では、免疫細胞が重要な役割を担っているが、リンパ球欠損マウスで肝線維化が誘発できるかは不明である。そこで実験 1 では、CCl<sub>4</sub> 誘発性の肝線維化の程度を Wild-type (WT) モデルと比較し免疫不全の影響を評価した。**方法**：NOG マウスと C57/BL (Wild type: WT) マウスに対して、CCl<sub>4</sub>1ml/kg を週 2 回間隔で連続処理し、慢性肝障害を誘発させた。対照群として oil のみの処理を行い比較した (各 n=24)。それぞれ、CCl<sub>4</sub> 連続処理から 2 週間目と 4 週間目に安楽殺し、血清生化学および病理組織学的手法により、肝臓の線維化を評価した。線維化を評価するにあたり、シリウスレッド染色を行い、線維化の原因細胞である活性化星細胞のマーカーとして  $\alpha$ -SMA の免疫染色を実施した。また Western blot 法により TGF- $\beta$  蛋白の発現を比較した。**結果**：NOG マウスの肝臓では対照群と比較して有意にシリウスレッド陽性領域が増加しており、線維化が誘発されたが、WT マウスと比較して、有意に軽度であった。また、NOG マウスでは WT マウスと比較して  $\alpha$ -SMA および TGF- $\beta$  の発現低下が認められた。**考察**：NOG マウスでは、線維化は誘発されたものの WT と比較して軽度であり、リンパ球欠損の影響が示唆された。より強い線維化を誘発させるためには、さらに長期の CCl<sub>4</sub> 処理が必要と考えられた。

**実験 2 背景：**実験 1 の結果から NOG マウスでも CCl<sub>4</sub>連続処理により、肝線維化が誘発できることが示された。そこで、NOG マウスに対して 8 週間 CCl<sub>4</sub>連続処理を行い、肝線維化モデルとして cBMCs 投与の線維化への影響を評価した。方法：NOG マウスに対して実験 1 の要領で 8 週間の CCl<sub>4</sub>連続処理を施した。CCl<sub>4</sub>連続処理から 8 週間目に 1×10<sup>6</sup> 個の cBMCs を尾静脈から投与した (CCl<sub>4</sub>/cBMC 群)。一方では、Saline のみの尾静脈投与を行った (Saline/cBMC 群)。また、対照群として oil を連続処理した NOG マウスに対して cBMCs の投与を行った (oil/cBMC 群) (各群 n=5)。投与から 2 週間後、マウスを安楽殺し、肝臓の線維化への影響を比較した。線維化を評価のためシリウスレッド染色および α-SMA、Collagen-I の免疫染色を実施した。NOG マウス組織内でイヌ由来細胞を検出するために CD3、CD20 の免疫染色およびイヌ遺伝子特異的 probe を用いた Fluorescein in situ hybridization (FISH)を実施した。**結果：**CCl<sub>4</sub>/cBMC 群では肝門脈周囲への炎症細胞の浸潤とともに重度の線維化が認められ、Collagen I の過剰蓄積と α-SMA 陽性細胞の出現が認められた。浸潤細胞は CD3、CD20 陽性細胞が混在し、FISH に陽性を示した。CCl<sub>4</sub>/cBMC 群と oil/cBMC 群の脾臓は腫大し、組織学的に単核細胞の浸潤像が認められ、これらは CD3 および CD20 陽性、かつ FISH に陽性を示した。**考察：**肝線維化 NOG マウスの体内に生着した cBMCs は、肝臓に浸潤し炎症を惹起させ線維化を促進させたと考えられる。浸潤細胞はイヌ由来リンパ球主体であることから Graft versus host disease (GVHD) の病態と一致する。cBMCs 中には線維化を促進させる免疫細胞集団が含まれ、これらを排除する処理や肝再生に有効な細胞集団を特定・単離することが治療成功率向上の手段の一つになる可能性が示唆された。

### 第三章 イヌに対する自家骨髄細胞移植の検討

**背景：**これまで、7 つのヒト肝硬変症例における ABMi の報告がなされ、その臨床治験では 68%で血中アルブミン濃度は増加し、83%の症例で腹水の消失が認められている。人では、重篤な副作用は示されていないが、犬での実施例はこれまで報告されていない。そこで第三章では、健康犬に対する ABMi の短期的な副作用の有無を調査するとともに、2 例の臨床症例における ABMi 療法の影響を調査した。**方法：**健康ビーグル犬 (n=4) から、骨髄液 6mL/kg を麻酔下で採取した。100 μm セルストレイナーで細胞浮遊液を作製し、細胞洗浄を行った。得た単核細胞 (Mononuclear cell: MNC) は生細胞比率を算出後 30mL に調製し、末梢静脈から投与した。その後、身体検査および血液検査を定期的実施した。また、臨床的に肝硬変と診断された症例に対する ABMi を実施し、安全性と治療効果を評価した。ABMi の適応項目として、①組織学的に慢性肝炎/肝硬変/肝線維症と診断される。②内科治療が無効。③血清 T-Bil 値が 7mg/dL 以下。④血小板数が 50,000/μl 以上。⑤重篤な併発疾患が存在しない。⑥腫瘍性病変が存在しないことを設定し実施した。採取した骨髄液の一部は、細胞表面抗原解析 (CD45, CD34, CD133) に利用した。ABMi 前後 2 ヶ月間の血液検査の推移を評価した。**結果：**健康犬 4 頭から平均 8.9±1.2×10<sup>8</sup> の MNCs が採取され、それぞれ細胞生存率は 80%以上を示した。ABMi 後の身体検査および血液検査に顕著な異常は示されなかった。臨床症例では 2 頭が臨床的に肝硬変および慢

性肝炎と診断され、ABMi の適応条件に該当した。症例はアメリカンコッカースパニエルとミニチュアシュナウザーで、それぞれ MNCs の総量は  $9.2 \times 10^8$  個および  $6.8 \times 10^8$  個であった。CD45 陽性かつ CD34 陽性細胞は約 1.45% を占めていた。ABMi 後、2 症例ともに身体検査上の異常は認められなかったが、治療実施から 45 日後、症例 2 は斃死した。2 症例ともに、ABMi 後の血清 Albumin 濃度は低下し肝機能改善効果は示されなかった。考察：健常イヌでは ABMi の短期的な安全性の可能性が示唆された。また、臨床症例でも十分量の骨髄液が採取された実行性が示されたが、肝硬変症例における ABMi の安全性は不明確であった。

## 結論

NOG マウスを利用した異種移植実験では、cBMCs が障害肝へ特異的に集積することが明らかとなり標的臓器への分布が適切に行われることが示唆された。一方、cBMCs 中には線維化進展に重要な細胞集団が含まれることが示唆され、レシピエントの状態によっては肝線維化が促進させることも懸念された。イヌに対する自家移植では、一定の安全性が確認されたが明確な治療効果は得られず、長期の安全性や肝機能改善効果などは、症例を蓄積しさらなる評価が必要である。ABMi の安全かつ有効な臨床応用には、BMCs 中の有効な細胞分画を特定し、これら細胞の培養技術を確立させることが、今後の最重要課題であると思われた。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、イヌの肝疾患の新しい治療法として、自家骨髄細胞移植 (Autologous Bone Marrow infusion; ABMi) 療法応用の可能性を検討したものである。ABMi 療法は再生医療の一手法で、近年ヒトの難治性肝疾患に対する新しい治療法として注目されている。

論文は 3 章からなり、第 I 章と第 II 章では、肝障害を誘発させた免疫不全モデルマウス (NOG マウス) にイヌの骨髄細胞 (canine bone marrow cells; cBMCs) を投与し、cBMCs のマウス体内での動態や、cBMCs 投与による肝障害進行への影響について検討した。また、第 III 章では、難治性肝疾患の症例犬を対象に、それぞれの個体から採取した骨髄液より cBMCs を作製し、ABMi 療法を試みた。詳細は次のとおりである。

第 I 章では、実験 1 として、10 匹の雌の NOG マウスに対して四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 1ml/kg を腹腔内単回投与 (CCl<sub>4</sub> 処理) して急性肝障害を誘発させ、このうち 5 匹に対して cBMCs を投与し、障害肝へのイヌ骨髄細胞の集積性について検討した。cBMCs はマウスの尾静脈より  $1 \times 10^6$  個投与した。また、他の 5 匹の CCl<sub>4</sub> 処理マウスには cBMCs を投与せずに滅菌生理食塩水 (saline) を投与し、その後は cBMCs 投与マウスと同様に評価した。更に、CCl<sub>4</sub> 非処理マウスとして、5 匹の NOG マウスに CCl<sub>4</sub> に代えてオリーブオイル (oil) を投与し、これらにも cBMCs を投与した。なお、cBMCs は 1 頭の雄ビーグル犬から採取した骨髄液から作製したものをを用いた。また、マウスへの投与前、投与後



のマウス組織内においてイヌ骨髄由来細胞であることを確認するために、cBMCs を PKH26 にて蛍光標識した。各群のマウスは cBMCs 又は saline 投与 1 週間後にすべて安楽殺し、cBMCs の肝臓、脾臓及び肺への集積と生着について、PKH26 を指標として組織学的に検索した。cBMCs の組織への集積は、CCl<sub>4</sub> 投与により急性肝障害を誘発させた NOG マウスの肝臓で強く認められた。一方、CCl<sub>4</sub> 非処理マウスの肝臓には目立った集積を認めなかった。また、肺では CCl<sub>4</sub> 処理及び非処理マウスの両群で cBMCs の分布が認められたが、脾臓では分布は認められなかった。また、肝臓に集積した細胞は、PCR 検査でイヌ特異的 Y 染色体を検出することにより、雄イヌの cBMCs 由来細胞であることが確認された。

実験 2 では、32 匹の NOG マウスに CCl<sub>4</sub> 処理を施し、このうち 16 匹には cBMCs を、他の 16 匹には saline を尾静脈から投与した。両群のマウスは、cBMCs 又は saline 投与 24、48 時間後及び 1 週間後に安楽殺し、血清化学検査及び肝臓の組織学的検査により、CCl<sub>4</sub> 処理マウスにおける cBMCs 投与の肝障害及び肝再生への影響について評価した。実験 2 においても、cBMCs はマウスへの投与前に PKH26 で標識した。

cBMCs は投与 24 時間後には肝臓の中心静脈周囲に分布し、投与 1 週間後には最大となった。集積細胞は肝臓の中心静脈周囲に局在し、形態学的には小型で類円系細胞が主体であった。

CCl<sub>4</sub> 処理マウスにおける肝酵素値の変化及び壊死領域（肝臓全体の 40-50%）は cBMCs 投与群と saline 投与群の間に差はなく、cBMCs 投与による肝障害軽減効果は認められなかった。cBMCs は障害肝に集積したが、肝障害のピークと推測される CCl<sub>4</sub> 処理 24、48 時間後における集積はわずかで、高度の集積はそれ以降であった。

以上の結果から、NOG マウスはモデル動物として、肝障害に対するイヌの骨髄細胞移植関連の実験に使用できるものと考えられた。なお、cBMCs は障害肝に高度に集積したが、肺にも一部分布していたため、投与経路について再検討する必要性が示唆された。

また、本研究では CCl<sub>4</sub> 単回投与による急性肝障害を対象としたが、cBMCs 投与による肝障害治療効果と肝再生改善効果は得られなかった。このことから、以後の研究では、想定するイヌの難治性肝疾患により近い、線維化した慢性肝障害モデルでの検討が必要と考えられた。

第 II 章では、肝線維化モデルマウスへのイヌ骨髄細胞投与の影響について検討した。第 I 章で考察されたとおり、ABMi 療法の治療効果を検討するためには臨床例により近い線維化を伴う慢性肝障害モデルにて実施することが望ましい。しかしながら、リンパ球を欠損した NOG マウスにおいて CCl<sub>4</sub> による肝線維化が誘発されるか否かは不明である。そこで第 II 章では、CCl<sub>4</sub> 誘発性肝線維化の程度を wild-type (WT) モデルマウスと比較して、NOG マウスが肝線維化モデル動物として使用可能か否かを検討した。両系統のマウスは、それぞれ 24 匹ずつ使用した。肝線維化発現は、両モデルマウスに対して CCl<sub>4</sub> を週 2 回・4 週間（延べ 8 回）投与して、CCl<sub>4</sub> 処理前、CCl<sub>4</sub> 処理から 2 週間及び 4 週間後の肝臓を病理組織学的に比較評価した。その結果、NOG マウスは、WT マウスと比較して軽度であったものの、その肝臓に線維化が誘発された。すなわち、NOG マウスは、肝線維化に対する骨髄細胞投

与のモデル動物としても有用であることが示唆された。

そこで、5匹のNOGマウスに対して8週間(述べ16回)CCl<sub>4</sub>処理を施して慢性肝障害を発現させ、 $1 \times 10^6$ 個のcBMCsを尾静脈から移植した(CC14/cBMCs群)。これらのマウスにおける肝線維化を、CCl<sub>4</sub>処理を施さないでcBMCsを投与したNOGマウス(oil/cBMCs群:n=5)及びCCl<sub>4</sub>処理を施してcBMCsを投与しないNOGマウス(CC14/Saline群:n=5)と比較した。各群のマウスとも、cBMCs又はSaline投与2週間後に安楽殺し、肝線維化の評価のためシリウスレッド染色及びCollagen I、 $\alpha$ -SMAの免疫染色を行った。また、肝臓に集積した細胞がリンパ系細胞であることを確認するために、CD3及びCD20免疫染色も行った。更に、マウス組織中におけるイヌ由来細胞確認のためイヌ遺伝子特異的プローブを用いてFluorescein in situ hybridization (FISH)を行った。

その結果、CC14/cBMCs群では、CC14/Saline群よりも強く肝門脈周囲への炎症細胞浸潤と肝線維化が認められ、Collagen I蓄積と $\alpha$ -SMA陽性細胞の出現を確認した。浸潤細胞はCD3及びCD20陽性細胞が混在しリンパ球であることが確認された。また、FISHに陽性を示したことから、cBMCs由来であることも確認された。CC14/cBMCs群とoil/cBMCs群の脾臓は腫大し、HE染色で単核細胞の浸潤像が認められ、これらはCD3及びCD20陽性細胞が多く含まれ、更にFISHにも陽性を示した。

以上の結果から、NOGマウスの体内に生着したイヌ由来免疫細胞はリンパ球主体で、「移植片対宿主病」の病態として、肝臓に浸潤して炎症を惹起し、肝臓の線維化を促進させたと考えられた。すなわち、cBMCs中には炎症や線維化を促進させる免疫細胞集団が含まれ、これらを排除する工夫や肝再生に有効な細胞集団を特定・単離することが、治療効果の改善につながるものと考えられた。

第Ⅲ章では、難治性慢性肝疾患犬に対するABMi療法の実施を試みた。ヒトのABMi療法ではこれまで重篤な副作用例は示されていないが、イヌでの実施例は報告されておらず、事前に副作用発現の危険性について確認する必要があった。そこでまず、4頭の健常ビーグルに対してABMiを実施し、身体検査と血液検査等によって短期的な副作用発現がないことを確認した上で、実際の臨床例に対してABMi療法を適用した。

症例は臨床的に肝硬変と診断された2頭であり、ABMi実施前後2カ月間の血液検査の推移を評価した。

ABMi実施後は、2症例ともABMiによると思われる身体検査上の異常は認められなかった。しかしながら、いずれの症例とも引き続き肝障害は進行し、症例2はABMi実施から45日後に死亡した。すなわち、ABMi療法を実施したこれら2頭では期待したような肝機能改善効果は得られなかった。しかしながら、いまだ実施例が少なく、また健常ビーグルを含む延べ6頭のABMi実施犬のいずれにおいても特に危険な副作用は認めなかったことから、今後も継続して治験を実施しデータを蓄積することが望まれる。また、今後は、第2章で述べたようにcBMCsから有効な細胞集団を特定・単離するなどの工夫を加えることも検討する必要があるだろう。

本研究では、肝疾患に対する骨髄移植療法の治療効果までは確認できなかったものの、NOG マウスがこの分野の研究を行う上で有用なことを明らかにした。また骨髄細胞の中でも肝障害の治療に有効な細胞集団を選別する必要があることなど、今後の研究における重要な課題を示した。更に、犬の肝疾患 2 症例と 4 頭の健康犬に対しても ABMi を実施した。結果として治療効果は得られなかったものの比較的安全に実施可能と推測され、この結果は、臨床研究への足がかりとなることが期待される。

以上のことから本研究は、博士（獣医学）の学位を授与するのにふさわしい業績と判断した。