

E染色像から観察され、免疫染色像から基底層の存在が観察された。移植時のフルオレセイン染色により、細胞シートはバリア機能を有していることがわかった。移植後1週間で、角膜上皮部に血管はなく、バリア機能を有した。さらにその組織切片像から、移植した細胞シートが、3層の重層化を有し、基底層を有しながら生着していることが確認できた。

〔考察〕

TEF内でヒト臨床適用可能な再生組織を、GMPに準拠して製造する自動培養技術の開発を目的として試作した自動培養装置で、動物移植可能な品質を有した細胞シートを自動培養装置で作製可能であることを示した。さらに、定温輸送容器を使用することで、移植可能な細胞シートの品質を保持したまま、搬送可能であることを示した。このことから、TEF内の自動培養装置で製造した細胞シートを病院へ輸送し、移植する一連の工程が可能となり、細胞シートの産業化を促進する方向性を示した。

〔結論〕

自動培養した細胞シートが動物移植可能な品質を有し、汚染リスクを最小とする閉鎖系培養容器を特徴とした小型自動培養装置を開発した。さらに、TEF内での自動培養、輸送、移植といった一連のフローを実現するシステムを開発した。

本研究開発の一部はNEDOの成果である。

論文審査の要旨

ヒト臨床に使用することのできる細胞シートは、CPC (cell processing center) 内でGMP (good manufacturing practice) に従った手作業で作製されている。今後、多くの患者を救済していくためには、細胞シートを自動製造するためのティッシュエンジニアリングファクトリー (tissue engineering factory : TEF) という新概念とその実現が重要である。申請者はTEFでコアとなる細胞シート自動製造技術と移植技術の開発を行った。動物角膜輪部細胞を装置へ投入し、2週間の自動培養で、角膜上皮シートの作製を可能とした。その後、細胞シートを装置から手術室まで約6時間で搬送し、細胞シートの構造と機能を損なうことがない定温輸送システムを開発し、角膜上皮移植ができることを確認した。

本研究で開発された装置によって達成された自動培養技術は、今後のTEFの実現と細胞シート製造の効率化を可能にする基盤技術となる。すなわち、細胞培養や細胞シート作製のバイオ技術とロボット技術の融合により自動培養シート作製装置の開発を成功させ、再生医療の新しい局面を作った研究は博士論文に相応しいものと判定した。

氏名	板垣裕子
学位の種類	博士(医学)
学位授与の番号	甲第541号
学位授与の日付	平成24年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(医学研究科専攻, 博士課程修了者)
学位論文題目	Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice (メチオニン・コリン欠乏(MCD)食誘導性非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)モデルマウスにおける肝病態の進展に伴う形態学的・機能的変化に関する研究)
主論文公表誌	Hepatology Research 投稿中
論文審査委員	(主査) 教授 江崎 太一 (副査) 教授 小田 秀明, 立元 敬子

論文内容の要旨

〔目的〕

近年、生活習慣病の増加が問題となっている。その肝部分症である非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) を経て肝硬変、そして肝臓癌にも進展しうる。今回我々はマウスの食餌誘導性 NAFLD モデルを用い、NASH への進展に伴う肝臓の病態変化を主に形態学的手法を用いて解析した。

〔対象および方法〕

雄性 9 週齢の C57BL/6 マウスにメチオニン・コリン欠乏 (MCD) 飼料を最長 30 週まで摂取させた NAFLD モデル (M 群) と、8, 16, 30 週後に MCD 飼料を通常飼料に換えて 2 週摂取させた食餌変換モデル (R 群) を作製した。深麻酔下で採血を行い、経時的に血中 AST, ALT 値の測定と、さらに 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定後、肝臓の凍結切片・樹脂包埋切片を作製して、脂肪染色, Azan 染色をはじめとする病理組織学的検索を行った。また、PCNA や CD68 に対する免疫染色を行った。さらに、real-time PCR を行い、肝マクロファージの機能に関連する CCL-2 (monocyte chemoattractant protein-1: MCP-1), matrix metalloproteinase (MMP) -9, MMP-13 の mRNA 発現レベルを解析した。

〔結果〕

M 群では著明な体重と肝重量の減少とともに、既に 2 週から AST, ALT 値の上昇と CD68 陽性細胞をはじめとする炎症細胞の浸潤を伴う典型的脂肪性肝炎の所見を呈した。この脂肪性肝炎はその後増悪し 16 週まで続くが、その後 CD68 陽性細胞の浸潤を除いては 30 週ではむしろ軽減した。一方、線維化は 10 週より出現し、以後増悪の一途をたどった。これに対して R 群ではほとんどすべての炎症所見や脂肪沈着が正常対照群とほぼ同じレベルまで回復したが、線維化と CD68 陽性細胞の出現やその貪食過剰による巨大化は改善が認められなかった。real-time PCR によるマクロファージの機能解析では、CCL-2 や MMP-13 の発現は 8 週でピークとなり、その後は著明に減少していた。一方で、MMP-9 の発現は 16 週以降上昇していた。

〔考察〕

MCD 飼料長期摂取による NAFLD の病態変化による特徴は摂取後 8 週までの炎症早期と線維化が著明化する 16 週以後の後期に分けられる。これらの病期の一連の変化は肝臓での CD68 陽性細胞の主体である Kupffer 細胞の変化とも強く関連する可能性がある。すなわち、MCD 飼料摂取後 8 週までの早期には、肝への炎症細胞の流入を促す CCL-2 および線維化を抑制する MMP-13 の発現上昇に伴う CD68 陽性細胞の増加が典型的な脂肪性肝炎を形成するとともに、この時期の線維化を抑制していると考えられる。ところが、16 週以降の炎症後期になると CD68 陽性細胞は過度の貪食による巨大化を呈するなどその貪食能も限界となり、逆に 30 週では脂肪沈着を伴う炎症も見かけ上軽減する。さらに、CCL-2 や MMP-13 の著減による線維化が 10 週以降に出現、増悪し、ついには食餌を正常食に換えても不可逆性となるものと考えられる。

〔結論〕

MCD 食長期摂取による NAFLD において、CD68 陽性 Kupffer 細胞の機能変化が病態早期の脂肪性肝炎や後期の不可逆性の線維化に深く関与する可能性が示唆された。

論文審査の要旨

本研究はマウスのメチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食長期摂取による非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) モデルを用いて、肝障害の進行に伴う病態変化を主に形態学的に解析したものである。

9 週齢雄の C57BL/6 マウスに MCD 飼料を最長 30 週間摂取させると、摂取後 8 週までは炎症細胞の肝流入を促すケモカイン (CCL-2) および線維化を抑制する MMP-13 の発現上昇に伴う CD68 陽性細胞の増加による典型的な脂肪性肝炎が発症した。16 週以降は CD68 陽性細胞の機能変化とともに、線維化が 10 週以降から出現増悪し、食餌を正常食に換えても脂肪性肝炎所見は正常化するものの、線維化と CD68 陽性細胞所見については不可逆性となることが明らかとなった。

本研究は生活習慣病に伴う NAFLD において、CD68 陽性細胞の機能変化が病態の進行や不可逆性の線維化に関与する可能性を示唆した点で、学術的価値が高いと思われる。