

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15489

研究課題名(和文) 有茎腸管グラフト内肝組織片、膵島細胞共充填による体内型補助肝・膵臓の作成

研究課題名(英文) Development of auxiliary liver and pancreas using a small intestinal segment packed together with liver micro fragments and pancreatic islets.

研究代表者

小暮 公孝 (Kogure, Kimitaka)

群馬大学・生体調節研究所・研究員

研究者番号：20125850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は有茎腸管グラフト内の充填肝組織片の急速な増殖環境下に膵組織片や膵島を共充填することで肝組織片からの増殖因子の影響によりこれらが増殖、増大して体内型機能膵臓として機能することを期待して行われた。肝組織片と膵組織片、膵島の共充填例では5週間後、3週間後でも充填組織全体が全く壊死せずグラフト内に生着するケースが認められた。これは肝組織片単独の充填では決してみられなかったものである。膵島移植例では膵島構成細胞の増殖も認められた。しかし、他家移植であるため膵島成分へのリンパ球の浸潤から拒絶反応がおきていることが推察された。今後、拒絶反应对策をたてることで人工肝・膵作成の展望が開けるものと考えらる。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to develop the auxiliary liver and pancreas by using a small intestinal segment packed with liver micro fragments and pancreatic tissue fragments or pancreatic islets putted under the rapid growth environment of the filling liver tissue expecting the their transformation to the functioning pancreas. In the cofilling example of liver micro fragments, pancreatic tissue fragments and pancreatic islets, the case in which the whole packed tissue did not become necrosis at all even after 5 weeks and 3 weeks was observed. This was never seen in the packing of liver tissue fragments alone. In pancreatic islet transplantation, proliferation of pancreatic islet cells was also observed. However, it was inferred from the infiltration of lymphocytes into pancreatic islet components that the rejection occurred due to syngeneic transplantation. From now on, we believe that the prospect of artificial liver-pancreas can be opened by making measures against rejection.

研究分野：再生医学

キーワード：有茎分節腸管 肝組織片移植 膵組織片移植 膵島細胞移植 体内型補助肝・膵臓 糖尿病 肝移植

1. 研究開始当初の背景

I 型糖尿病に対して経門脈的肝内膵島細胞移植が試みられてきたが (N Engl J Med 343: 230-238, 2000, Lancet 365: 1642-1644, 2005)、5 年後には 90%以上で移植膵島細胞の機能が脱落してしまうことが問題となっている (Diabetes 54: 2060-2069, 2005. J HHS 16:118-123,2009)。最近、Gupta らの開発した有茎腸管内 (Liver Transplantation 9:421-424,2003, Nature Medicine 10:749-754,2004) に膵島細胞を充填し長期間、糖尿病ラットの血糖をコントロールできたという報告がなされている (Transplant Int.24:175-183, Epub. 2010)。面白いことに膵島細胞は再生中の肝内に移植された時には通常より大きく増殖増大がすることが知られている (Surgery 123: 398-406, 1998)。我々も Gupta らの方法を追試したが他部位では早やかに壊死に陥る肝組織片が有茎腸管 Graft 内では再び融合して一塊となり増殖増大し長期に生着することを認めている (Kitakanto Medical Journal 63: 133-140, 2013, Kitakanto Medical Journal 63: 223-232, 2013)。膵島細胞単独移植よりも、このような肝組織の増殖環境下に膵島細胞を共充填するなら膵島細胞にも増殖刺激が加わり、この腸管グラフトが膵機能を伴った補助肝・膵臓になることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では Gupta らの開発した有茎腸管に肝組織とミンチした膵組織、肝組織と単離した膵島を共充填して人工肝・膵臓、即ち「有茎腸管グラフト内肝組織片、膵島細胞共充填による体内型補助肝・膵臓の作成」を目指した。

3. 研究の方法

1) 肝組織片・膵組織片あるいは肝組織片・膵島共充填腸管グラフトの作成 (図 1 - A,B,C,D)

雄性ウイスター系ラットを用い、長さ 3-4cm の遊離空腸分節腸管を作成し、同一ラットの肝左葉を摘出しメスでミンチ、また、膵臓の一部を結紮切除しミンチして肝組織片と混和し、これをグラフトに共充填した。膵島共充填例ではミンチした肝組織片と別のラットから採取しておいた膵島を混和して共充填した。対照として肝組織片と膵島を混和したものを鼠径部皮下に移植し、術後、肝組織片・膵組織片共充填例は 14 日、21 日、28 日、35 日、42 日後に、また、肝組織片・膵島共充填例では 14 日、21、28 日に犠牲死させて組織学的に検討した。また、犠牲死させた時に末梢血、門脈血、肝断端の血液の血糖値を測定した。

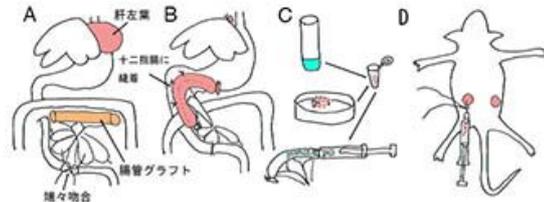


図 1 : 肝組織片・膵組織片あるいは肝組織片・膵島共充填腸管グラフトの作成

2) 膵島の単離法(図 2、図 3)

雄性 Wistar 系ラットの総胆管にカニキュレを挿入し、10ml コラゲナーゼ液で膵を消化後、全摘し、37 で 5 分間インキュベート後、膵を破砕、懸濁し、氷冷した Ca-Free 5.6mM Glucose-HKRB 液を 30ml に混和した後、10ml シャーレに移し、実体顕微鏡下に膵島を採取した。採取した膵島は M-EME+FBS 液 10ml で培養し、使用時には 500rpm x 1min で遠心し 1ml に濃縮して肝組織片との共充填に用いた。

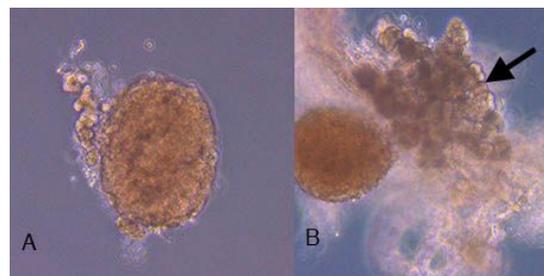


図 2-A : コラゲナーゼ処理により単離した膵

島。膵島構成細胞の集塊が透見できる。200x
 B：膵島の被膜が消化された結果、膵島構成細胞が漏出している（矢印）。200X

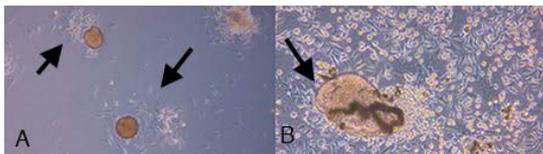


図3-A：単離された膵島の周囲に多数の繊維芽細胞が集簇している（矢印）。100x。 B：培養3ヶ月後のもの。繊維芽細胞は死滅することなく増殖し、その上に膵島（矢印）が盛んに膵島構成細胞（黄褐色）を放出しながら生着している。100x.

4. 研究成果

Gupta 等による有茎分節腸管内にミンチした肝組織片とミンチした膵組織、あるいは単離した膵島を共充填したところ、肝組織片単独充填では一度も経験したことのない充填組織の壊死が全く認められないケースを経験することができた。但し、膵島移植例では別のラットから採取した膵島を用いる他家移植のため拒絶反応がおき膵島の機能を確認することができなかった。以下、典型例を示す。

4-1-1：有茎分節腸管内肝組織片・膵組織片共充填後35日例 160118-2a（図4）

図4-Aは肝組織片と膵組織片を共充填したグラフトを肝中葉に逢着したところ（矢印）35日後のグラフト（図4-B）は硬く大きく緊満、腫大し、肝組織片のみを充填する原法では充填肝組織片の相当部分が壊死してしまう35日後でも充填肝組織片と膵組織片が全く壊死せずグラフト内での生着が認められ、体積で8倍に腫大していた。

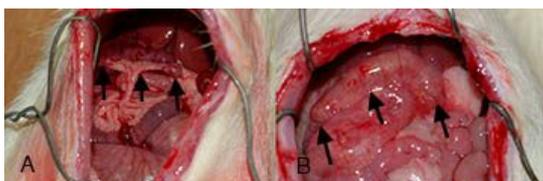


図4-A：グラフト作成時。 B：35日後のグラフト。

4-1-2：有茎分節腸管内肝組織片・膵組織片共充填後35日例の組織図（図5、図6、図7）

図5に示すように共充填した肝組織片と膵組織片には35日後でも全く壊死部分を認めずグラフト内に緊満して生着していた。HEで好酸性、PASで中等度陽性部分は膵組織由来の細胞が密集し硬い組織を形成していた（赤矢印）。中央のHEで弱好酸性、PASで弱陽性部分は充填した肝組織であった（白矢印）。最も、特徴的なのはHEで好塩基性、PASで強陽性に染まる充填組織を取り巻くリング状の部分で（図5-A-B黒矢印）、この部分には網状、平行状の繊維組織が発達し、その間に繊維芽細胞が増生していた。

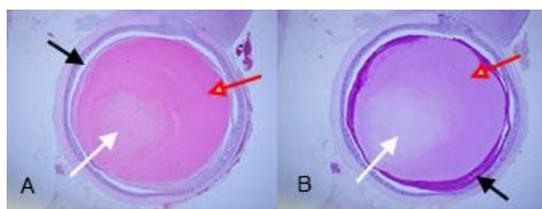


図5-A：HE 12x。 B：PAS 12x.

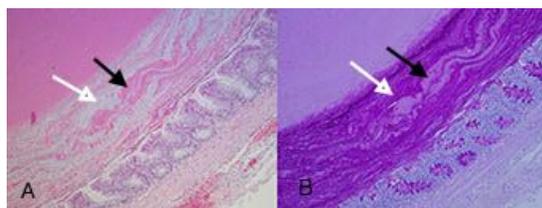


図6-A & B：HE & PAS 100x.

図6は図5A & Bの斜め右下のGraft壁に接触している部分（黒矢印）の拡大像。HEで好酸性に染まる細胞はPASでは淡い陽性を示す（黒矢印）が、HEで染まらず抜けて見える部分はPASでは強陽性に染まり（白矢印）、平行状、あるいは網状の繊維組織が増生し、その間にPASで淡く染まる多数の小型の繊維芽細胞が密集していた。グラフト壁の繊維組織がPASで染まらないのに対しGraft内の繊維組織がPAS強陽性を示すのはGraft(空

腸)の杯細胞から分泌された粘液がこの繊維組織の間にしみ込んだ結果とも考えられた。この繊維組織を産生する細胞は膵島細胞の培養(図3)の際に認められた2種類の支持細胞(繊維芽細胞)が膵組織片から遊離して増殖したものではないかと推測された。

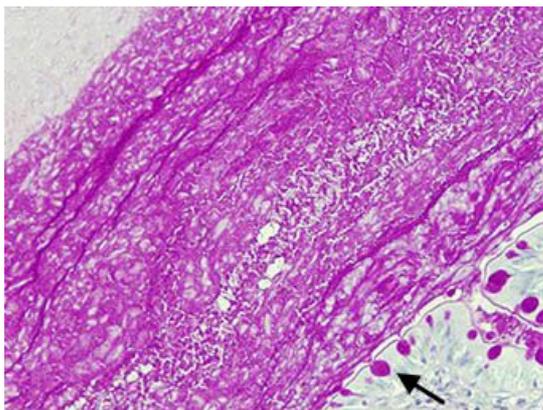


図7 : PAS 200x.

図7はPAS強陽性の厚いはちまき状の繊維組織とその間隙に増殖するPAS弱陽性の繊維芽細胞を、また、この繊維組織内に Graft 壁の杯細胞(矢印)から粘液が注入されていることを示す。最左側は杯細胞がしぼんで粘液の注入が終わったところ、左から2番目は注入終了間際、3番目は注入開始、4番目は注入途中とみられる。

以上は充填肝・膵組織が厚い繊維組織の袋で包まれていることを示す。

4-2-1 : 有茎分節腸管内肝組織片・膵島共充填後21日例(図8、170313-c-170403)

図8-AはGraft作成時で肝組織片と膵島を共充填した径5mm、長さ40mmのGraftを十二指腸に縫着したところ(矢印)、Bは21日目のGraft摘出時でGraftは径10mm、長さ50mmで体積で約5倍に腫大していた(矢印)。

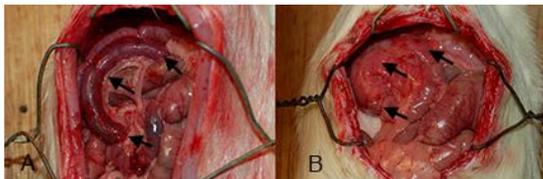


図8-A : グraft作成時。B : 21日後のGraft摘出時。

4-2-2 : 有茎分節腸管内肝組織片・膵島共充填後21日例の組織図(図9、10、11)

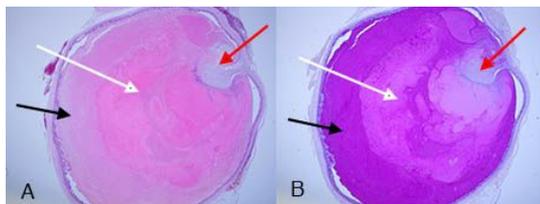


図9-A : HE 12x. B : PAS 12x.

図9に示すように共充填した肝組織片と膵島には21日後でも全く壊死部分を認めずGraft内に緊満して生着していた。HEで好酸性に、PASで中等度陽性に染まる内部の部分は充填肝組織であった(白矢印)。最も、特徴的なのはHEで弱好塩基性、PASで強陽性に染まる充填組織を取り巻く厚いリング状の外層部分である(黒矢印)。この部分には網状、平行状の繊維組織が発達し、その間隙に繊維芽細胞が増殖していた。これは膵島培養の際に認められた強い増殖力を示す繊維芽細胞(図3)がGraft内でも大量に増殖したものと推測された。この部分が強いPAS陽性を示すのは膵組織片と共充填したときと同じようにGraft壁の杯細胞から分泌された粘液が繊維組織内に浸潤したと考えられた。また、斜め右上のHEで好塩基性、PASで弱陽性の小さい円形部分(赤矢印)には膵島由来の膵島構成細胞が密集して増殖し、それらはGraftの粘膜下層にまで浸潤していた。

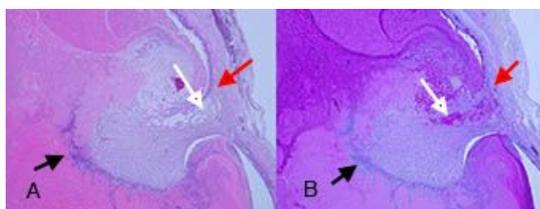


図10-A & B : HE & PAS 40x. 図9の斜め右上の球形部分(赤矢印)。

図10は図9の斜め右上の赤矢印で示す球形部分である。膵島由来の細胞が充填しており、HEで好塩基性を示しPASでは弱陽性であるこの球形部分の内側の辺縁にはリンパ

球の浸潤を認め、他家移植に起因する膵島構成細胞部分に対する拒絶反応が起きているものと推測された（黒矢印）。この球形部分の右側の柄状の部分では HE で染まらず、PAS で強陽性の部分が認められ（白矢印）、Graft の粘膜面の割れ目から Graft の粘膜下層に向かってこれらの PAS 陽性の膵島由来の細胞が浸潤しているように見える（赤矢印）。

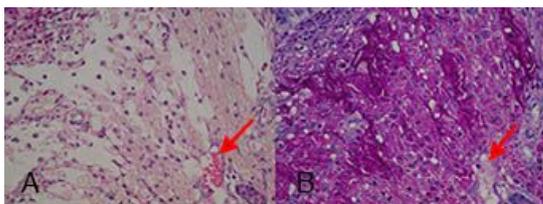


図 1 1-A & B : HE & PAS 400x. 図 1 0 の柄の部分で PAS 陽性部分（白矢印）の拡大図。

図 1 1 に示すように図 1 0 の柄の部分での PAS 陽性部分では偏在した核と細胞質内に HE では染まらず PAS で強陽性の多数の細顆粒を持った比較的大きな細胞が密集して増殖していた。そして、それらが、更に、Graft の粘膜下層に浸潤していた。細胞集団の中には HE で赤く染まり、PAS で陰性の赤血球の充満した血管の侵入も認められた（赤矢印）。

4-3-1 : 著しいリンパ球浸潤を認めた肝組織片・膵島の混合組織の皮下移植例(図 1 2、図 1 3、図 1 4)。(170302-170403)

図 1 2 に示すように 3 0 日後では左側皮下には viable な皮下結節（黒矢印）が、右側皮下には易出血性で一部壊死性の皮下結節（赤矢印）が形成されていた。これまで単離した肝細胞や肝幹様細胞を皮下移植したときには、肉眼的な腫瘤を形成することは無かった。



図 1 2 : 肝・膵島皮下移植例 3 0 日後。

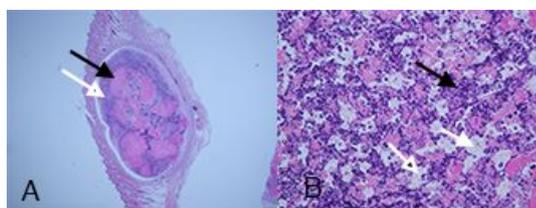


図 1 3-A : 左鼠径部結節 HE12x.B: HE 400x.

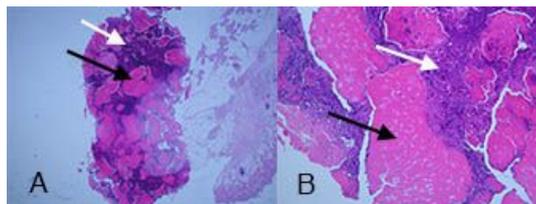


図 1 4-A : 右鼠径部結節 HE 12x.B:HE 100X.

図 1 3 -A, 1 4 -A に示すように好酸性の充填肝組織片（黒矢印）は viable であるが、それらを取り巻く好塩基性の膵島由来成分（白矢印）の周囲には著しいリンパ球の浸潤が認められた。図 1 3-B ではリンパ球浸潤部分（黒矢印）には、膵島構成細胞（白矢印）が遺残し散在しているのが認められた。しかし、図 1 4 -B では著し拒絶反応により膵島構成細胞は全く壊死に陥っていて、その痕跡も認められなかった。

4-4-1 : 肝・膵組織共充填例に於ける末梢血、門脈血、肝内血の血糖値

血糖値は末梢血に比べて門脈血では高値を示し、肝内の血液（肝離断端における血糖値）においては更に、高値を示した（表 1）。

表 1 : 肝・膵組織共充填例に於ける血糖値 (mg/dl) の変化 n=7.

末梢血	156 ± 7.6
門脈血	212.8 ± 26.1
肝内血	298.7 ± 19.6

結 語

有茎腸管グラフト内への肝・膵組織片あるいは肝・膵島共充填においては、従来の、肝組織片のみ、肝組織片と大網の共充填、肝組織片と肝幹様細胞の共充填では見られなかった充填した肝・膵組織片・膵島組織が長期

にわたって壊死に陥らずに生着するケースが認められた。これは共に充填された、臍組織内に、特に臍島周囲や臍島内に存在している支持細胞である繊維芽細胞の旺盛な増殖力、長期生存能に依存することによるところが大きいものと推察された。また、臍島共充填例では臍島内に発達している多くの毛細血管も共に移植されることから充填組織内への血管の発達も充填組織の生着を支持している可能性が示された。本研究でのグラフト内肝・臍組織 臍島共充填法は体内型補助肝・臍臓作成に展望を与えてくれるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 4件)

1. 小暮公孝、小島 至、根本雅明、石崎政利、新木健一郎、桑野博行、幕内雅敏
人肝93例の門脈肝後区域枝の分岐形態の検討

第116回日本外科学会定期学術集会
2016.4.14-16 大阪市(大阪国際会議場)

2. 小暮公孝
尾状葉肝静脈系と尾状葉 notch の関係について

第19回臨床解剖研究会
2015.11.14 東京(東京大学山上会館)

招待

3. 小暮公孝
肝区域の再考察
第3回肝臓外科解剖検討会
2015.8.22 東京(東京女子医大学臨床講堂2)

招待

4. 小暮公孝、小島 至、石崎政利、根本雅明、桑野博之、松崎利行、依藤 宏、高田邦昭、磯村寛樹、幕内雅敏
左三角間膜(left triangular ligament: LTL)と肝繊維付属(appendix fibrosa hepatis:

AFH)の解剖学的関係の再確認-腹部外科における要点-

第115回日本外科学会定期学術集会
2015.4.16-18 名古屋市(名古屋国際会議場)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小暮公孝(Kogure, Kimitaka)
群馬大学・生体調節研究所・研究員
研究者番号:20125850

(2)研究分担者

柴田 宏(Shibata, Hiroshi)
群馬大学・生体調節研究所・准教授
研究者番号:20235584

小島 至(Kojima, Itaru)

群馬大学・生体調節研究所・名誉教授
研究者番号:60143492

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()