

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10593

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞を利用した膵液瘻発症予防・難治性膵液瘻治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment in the treatment strategies to prevent the incidence of pancreatic fistula and reduce the refractory pancreatic fistula using mesenchymal stem cells

研究代表者

浅利 貞毅 (Asari, Sadaki)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：20580682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：(1) Lewis ratを用い、膵周囲脂肪織よりMSCを単離し、骨、軟骨、脂肪織への多分化能を確認した。膵管を含む膵臓を任意の部位で離断し、膵体部での離断が最も適切な膵液瘻モデルとなることを確認した。UpCellを用いて、P3まで継代したMSCの細胞シートの作成に成功した。(2) 無治療群とMSC細胞シート貼付群で、術後2, 3, 7日目に膵液瘻発症予防の評価を行った。術後7日目で、いずれのラットも腹水アミラーゼ値の上昇を認めなかった。術後2, 3日目で、貼付群で有意に腹水アミラーゼ値の低下を認めた。腹腔内の炎症に伴う癒着も軽度で、MSC細胞シートによる膵液瘻抑制効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵液瘻は膵切除における主要合併症のひとつである。膵切除後約20%以上で膵液瘻の発症を認め、その一部が難治化し、動脈瘤形成および動脈瘤破綻による出血など、生命に關与する重大な合併症となる。膵液瘻発症予防、膵液瘻の難治化予防は膵臓外科医にとって解決すべき主要課題である。

MSCs(間葉系幹細胞)は、多分化能以外にも組織損傷の修復や免疫システムの調節機能を有することが明らかになりつつある。この幹細胞の組織修復能により膵液瘻発症予防あるいは難治性膵液瘻の予防が可能になれば膵切除の治療成績の向上のみならず、在院期間の短縮や治療費削減など患者への恩恵、医療経済への影響は計り知れない。

研究成果の概要(英文)：(1) Mesenchymal stem cells (MSCs) were purified by culturing the adipose tissues around pancreas derived from Lewis rats. The MSCs were demonstrated to possess pluripotent differentiation into osteocytes, chondrocytes and adipocytes. We established a suitable model of pancreatic fistula (PF) incidence in the rats in which the pancreas was cut in the body. We also achieved the development of the MSC-sheets (3rd passage) using UpCell.

(2) We evaluated the prevention of PF incidence in the rats with the MSC-sheets compared to the rats without those sheets on postoperative days (POD) 2, 3 and 7. On POD 7, the value of amylase in the ascites was not elevated in any rats. On POD 2 and 3, the value of amylase in the ascites was significantly in the rats with the MSC-sheets compared to the rats without those sheets. In the rats with the MSC-sheets, moreover, the intra-abdominal adhesion caused by peritonitis was dominantly alleviated. The MSC-sheets resulted in the prevention of PF incidence.

研究分野：膵臓外科

キーワード：膵液瘻 間葉系幹細胞 細胞シート

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵液瘻は膵切除における主要合併症のひとつである。膵切除後約 20%以上で膵液瘻の発症を認め、その一部が難治化し、動脈瘤形成および動脈瘤破綻による出血など、生命に關与する重大な合併症となる。膵液瘻発症予防、膵液瘻の難治化予防は膵臓外科医にとって解決すべき主要課題である。

MSCs (Mesenchymal stem cells: 間葉系幹細胞)は、多分化能以外にも組織損傷の修復や免疫システムの調節機能を有することが明らかになりつつある。この幹細胞の組織修復能により膵液瘻発症予防あるいは難治性膵液瘻の予防が可能になれば膵切除の治療成績の向上のみならず、在院期間の短縮や治療費削減など患者への恩恵、医療経済への影響は計り知れない。

2. 研究の目的

日常臨床で未だ解決できない膵切除後膵液瘻発症予防、難治性膵液瘻の治療を確立することを最終目的とする。本研究では、膵液瘻ラットモデルを作成し膵液瘻作成時あるいは作成後に MSCs を経静脈的投与、経腹的投与、局所投与(局注)、シートによる貼付を行い、MSCs が生体内で膵組織の修復・再生に果たす役割とそのメカニズムについて明らかにする。また、MSCs の組織修復能を分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

MSCs による膵液瘻発症予防法を確立する。さらに難治性膵液瘻に対する治療法を確立するため、本研究計画では以下の研究項目を予定している。

- (1) 複数系統のラット骨髄、その他組織から MSCs を単離し、その細胞学的特徴を明らかにする。
- (2) 複数系統のラットで安定した膵液瘻モデルを樹立する。
- (3) 樹立した膵液瘻ラットモデルで膵液瘻に対する MSCs の効果を評価する。MSCs の投与時期を変更することにより、膵液瘻発症予防に対する MSCs の効果、加えて、難治性膵液瘻に対する MSCs の効果を明らかにする。

4. 研究成果

平成 28 年度、2012 年に Tanaka ら (J Gastroenterol 2012) が報告した膵液瘻ラットモデルの追試に成功した。Lewis rat を用い、膵管を含む膵臓を複数の任意の位置で離断し、膵体部での離断モデルが最も適切な膵液瘻モデルとなることを確認した。また、Lewis rat の膵周囲脂肪織より MSCs を単離し、骨、軟骨、脂肪織への多分化能を確認した。P3 まで継代したのち、冷凍保存しストックした。

平成 29 年度、UpCell®を用いて、P3 まで継代した MSCs の細胞シートの作成に成功した。シートは温度管理の影響が強く、作成までに多大な時間を要した。また、作成した MSCs 細胞シートを用いて、膵液瘻治療効果を検討した。膵液瘻ラットモデルにおいて、無治療群と MSC 細胞シート貼付 (頭尾側膵管切離両端に貼付) 群で振り分け検討したところ、MSCs シート貼付群で有意に腹水アミラーゼ値、採血でのリパーゼ値で膵液瘻改善効果を認めた。

平成 30 年度、無治療群と MSC 細胞シート貼付 (頭尾側膵管切離両端に貼付) 群で、術後 2, 3, 7 日目に膵液瘻の評価を行った。術後 7 日目では、いずれのラットも自然治癒にて膵液瘻は改善され、腹水アミラーゼ値の上昇を認めなかった。術後 2, 3 日目では、貼付した群で、腹水アミラー

ぜ値に有意な改善を認めたほか、腹腔内の炎症に伴う癒着も軽度であり、MSCs 細胞シートによる腓液瘻抑制効果を認めた。

令和元年度、細胞シートの形状やサイズに再現性が乏しい課題を解決するため、シートの代用として MSCs のゲル状化投与を試みたが、物理的に腓切離断端に固定されない、MSC の形質が維持されない(分化誘導される)、などの問題点に直面した。また、MSCs 細胞シートの再現性に、温度管理が重要であることを明らかにしたが、最適化するまでには至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	外山 博近 (Toyama Hirochika) (10444598)	神戸大学・未来医工学研究開発センター・准教授 (14501)	
研究分担者	寺井 祥雄 (Terai Sachio) (30761259)	神戸大学・医学部附属病院・助教 (14501)	
研究分担者	具 英成 (Ku Yonson) (40195615)	神戸大学・医学研究科・名誉教授 (14501)	
研究分担者	後藤 直大 (Goto Tadahiro) (40580684)	神戸大学・医学研究科・医学研究員 (14501)	
研究分担者	福本 巧 (Fukumoto Takumi) (70379402)	神戸大学・医学研究科・教授 (14501)	