

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19901

研究課題名（和文）羊膜を用いた低抗原性の肝細胞移植デバイスの作製

研究課題名（英文）The low-antigenicity device for hepatocyte transplantation from human amniotic membrane

研究代表者

夏田 孔史（NATSUDA, Koji）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員研究員

研究者番号：80644054

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：妊娠の際に胎児を包んでいる羊膜は、細胞が増えるために必要な成長因子(Growth factor)や、細胞を培養する時の足場となる細胞外マトリックスを豊富に含んでおり、細胞培養を行う材料として有用であると思われる。

帝王切開の際に摘出された羊膜を凍結保存し、ラットから抽出した肝細胞を羊膜の上で培養したところ、肝細胞は通常の培養では1週間ほどで死滅するのに対し、羊膜上では長期間細胞の形を保つことができた。また肝細胞が産生するアルブミンを測定したところ羊膜上では2カ月の間濃度が維持されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓が働かなくなる肝不全に対しては肝移植が唯一の救命治療であるが、その代わりとなる治療として肝細胞移植の研究が行われている。これは肝臓から取り出した肝細胞を培養して増やし移植するという治療であるが、肝細胞は培養環境下では1週間程度で死滅してしまい実用化に至っていない。

今回の研究では羊膜を利用することで肝細胞の機能が少なくとも2カ月間維持することが可能であった。これを応用すれば肝細胞移植を実用化する上で大きな助けとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Amniotic membrane can be a new resource of regenerative medicine because it includes extracellular matrix, and can also product many kinds of Growth Factors.

Primary rat hepatocyte cultured on human amniotic membrane which was derived from cesarean sections could maintain their cell morphology and albumin-productivity more than two months after preparation.

研究分野：肝移植外科学

キーワード：羊膜 初代培養肝細胞 肝細胞移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非代償性肝不全の治療として肝移植が行われているが、本邦では脳死ドナーが少なく、ドナー不足が深刻な問題となっている。このため本邦では脳死に比べて生体肝移植が普及しており、長崎大学移植・消化器外科でも今までに 300 例以上の生体肝移植を施行しているが、健康者から肝臓の一部を提供していただく必要がある。このため肝臓移植の代替治療として肝細胞移植などの研究が行われているが、未だ臨床応用には至っていない。

元来肝細胞は増殖能の高い細胞であるが、培養環境下ではほとんど増殖せず、現在肝細胞の培養基質として最も普及しているコラーゲンコート・ディッシュを用いても 1 週間程度しか培養できないため、長期培養や継代が不可能であることが臨床応用研究が進まない一因である。

一方、分娩の際に排出される羊膜はその大半が利用されことなく廃棄されている。しかし近年の研究で羊膜は多分化能を有する幹細胞を有しており、羊膜細胞が膵島細胞、神経細胞、肝細胞、軟骨細胞、心筋細胞など、様々な細胞に分化することが報告されている(Miki et al. Stem Cells 2005)。また細胞を培養する上で足場となる細胞外マトリックス(型コラーゲンやラミニンなど)を多く含み、上皮細胞成長因子(EGF: Epidermal Growth Factor)や肝細胞成長因子(HGF: Hepatocyte Growth Factor)など種々の成長因子を産生すること(Koizumi et al. Curr Eye Res. 2000)から、細胞培養を助ける基質として大いに期待が持てる。また、羊膜は免疫寛容(母児は別の個体であるのにも関わらず、妊娠中に胎児は母親によって拒絶反応を受けない)にも関与しており(Carosella et al. Adv Immunol 2003)、異種移植でも拒絶を起こしにくいことが言われている。

2. 研究の目的

本研究では以下の三段階の研究を行うことにより、羊膜を用いた移植デバイスの末期肝不全への治療応用の可能性を明らかにする。

(1)羊膜を用いた移植デバイス作製技術の確立

ヒト羊膜の上にラット肝細胞を播種し培養することで、羊膜と肝細胞の複合した移植デバイスの作製技術を確認する。肝細胞の生着効率や適当な播種細胞数、肝機能維持が可能な期間、培地中の成長因子の分泌等を評価する。

(2)野生型ラットへの移植可能性の解明

野生型ラットを用い、作製したデバイスが移植可能であることを検討する。細胞の生着が可能かどうかや拒絶の有無、細胞増殖の有無等を免疫組織化学的検討等で評価する。

(3)移植デバイスの急性肝不全モデル動物への移植可能性と救命効果の解明

移植デバイスを急性肝不全モデルに移植し、作製したデバイスによって急性肝不全の治療が可能であることをデバイスの生着率、肝機能改善の有無、モデル動物の生存率などにより評価する。

3. 研究の方法

(1)羊膜を用いた移植デバイスの作製

羊膜の採取・凍結保存

当院では既に眼科が羊膜の凍結保存及び臨床使用を行っており、羊膜の回収・保存については同科にノウハウを教授していただく。羊膜を清潔操作で胎盤から鈍的に剥離し、白色透明な薄い膜状にし、細切して保存液に浸して-80℃で凍結保存する。1 回の出産で 35mm ディッシュ 30~60 枚分の羊膜が回収可能である。

羊膜上での肝細胞培養、培地の回収

予備実験で栽培培養皿に羊膜を直接静置していたが、羊膜が固定されずに顕微鏡下での観察などが不十分であったため、培養皿の内径に合わせて作製した金属リングで羊膜を固定し、その上に肝細胞を播種することとする。

肝細胞の培養は 1 ヶ月程を目途に行い、その間に適宜培地を回収、凍結保存する。羊膜上での培養で肝細胞の形態が少なくとも 2 週間は維持できることを予備実験で確認済みである。1 ヶ月の培養でも細胞の形態が維持できれば、培養期間を適宜延長する。

ELISA 法を用いた培地の解析

ラット肝細胞のアルブミン産生能を評価するため、培地中のラットアルブミン及びヒトアルブミン、羊膜の成長因子の産生能を評価するため HGF・EGF 濃度を、ELISA 法を用いて測定する。

(2)作製した移植デバイスの野生型ラットへの移植可能性の評価

野生型ラットへの移植

作製した複合体を用いてまずは野生型ラットへの移植を行う。上述の方法でラット肝細胞をヒト羊膜上で培養し、培養後 2 週間でデバイスを回収、野生型ラットの皮下へ移植する。移植部位については移植や標本作製操作の簡便性から皮下を予定しているが、生着が悪い場合は肝表面や大網などのより血流が豊富な部位も検討する。

移植した複合体の生着・増殖評価

移植後 1 週間、2 週間でそれぞれラットを犠牲死させ、移植部位のパラフィン切片を作製し、細胞の生着、増殖の程度、拒絶の有無などを免疫組織化学的に検討する。

(3)移植デバイスの急性肝不全モデル動物への救命効果の評価

急性肝不全モデルへの移植

作製した複合体による急性肝不全モデル動物の救命効果を明らかにするため、既に確立されているモデルである四塩化炭素による急性肝不全モデルラット(Raafat et al. Int J Biochem Cell Biol. 2015)への移植を行う。生存率、肝機能の改善を評価する。

4. 研究成果

(1)羊膜の回収・保存：当院でインフォームド・コンセントを得られた予定帝王切開症例から出産の際に羊膜を回収し凍結保存を行った。羊膜上皮細胞の viability を Green/Red 染色で確認したところ 90%以上と良好であり、実験遂行に支障なかった。

(2)肝細胞の培養：羊膜を細切し培養皿に金属リングで固定し、7 週齢の Wistar 雄性ラットから分離した初代培養肝細胞を播種。鏡顕上では対照群の肝細胞は 10 日程でほぼ死滅したのに対し、羊膜群は同時期まで播種当初の形態を保っていた。

(3)ラットアルブミン(rAlb)の測定：上記(2)の培養上清を回収し rAlb を ELISA 法で測定したところ、対照群の rAlb は 10 日程で測定不可となるのに対し羊膜群は最大で播種後 2 ヶ月まで当初の rAlb 濃度が保たれた。

羊膜群でアルブミン産生能が維持された機序として、(A)羊膜緻密層に多く含まれる細胞外マトリックス(ECM)の関与、また(B) 羊膜上皮が産生する Growth Factor(GF)の関与を考え、それぞれ追加実験を行った。(A)ECM で coating した dish を用いて(2)と同様の実験を行ったが対照群と同様の結果であった。(B)GF の一種である Hepatocyte Growth Factor (HGF) の測定を同様に ELISA で行ったが経時的に低下していた。また(2)の培養液中に羊膜を浮遊させ共培養を行ったが rAlb 濃度は維持されなかった。

以上より、ヒト羊膜を培養基質として用いることにより、ラット肝細胞のアルブミン産生能が少なくとも 2 カ月間維持されることが明らかとなった。本研究を応用することで初代培養肝細胞を長期間維持することができれば将来的に肝細胞移植などの再生医療に応用できる可能性がある。またその際には羊膜の持つ低抗原性が有用となる可能性がある。

このような結果となった機序について、羊膜緻密層に多く含まれる細胞外マトリックスや、羊膜上皮が産生する Growth factor の関与を考え追加実験を行ったが、現在のところ機序はまだ不明であり、今後さらなる実験が必要と考えられる。

また当初予定していた移植デバイスとしての有効性の解明(ラットへの移植、生着の評価)についてはまだ検討できておらず、これらについてもさらなる実験が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 夏田 孔史
2. 発表標題 ヒト羊膜上培養によるラット初代肝細胞の長期間機能維持
3. 学会等名 第117回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 夏田 孔史
2. 発表標題 ラット初代肝細胞は、ヒト羊膜上の培養で長期的に機能維持する
3. 学会等名 第19回日本異種移植研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 夏田 孔史
2. 発表標題 ヒト羊膜を用いたラット初代肝細胞の長期培養
3. 学会等名 第16回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----