

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09118

研究課題名(和文) 脂肪幹細胞を用いた術後肝障害に対する新規予防治療法の開発

研究課題名(英文) Novel treatment using adipose stem cell for postoperative liver damage

研究代表者

尾上 俊介 (ONOE, Shunsuke)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：20807515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス30%肝切除モデルおよび部分肝切除モデルでの脂肪幹細胞シート貼付後、貼付周囲に癒着を認め、腹水貯留や感染を疑わせる所見はなかった。またヒト脂肪幹細胞シート内に時間経過に伴う血管新生の増生を認めた。蛍光標識したヒト脂肪幹細胞シートの貼付により、マウス肝臓側へのヒト脂肪幹細胞の集積を認め、同時にヒト脂肪幹細胞シート内に多数のマウス由来細胞の混在を認めた。これらの結果より、ヒト脂肪幹細胞シート貼付による肝再生においては、ヒト脂肪幹細胞とマウス細胞の双方向的な細胞遊走の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝切除モデルにおいて脂肪幹細胞シート貼付により腹水貯留や感染などがおきないこと、血管新生が増生することを明らかにした。またヒト脂肪幹細胞シート貼付による肝再生においては、ヒト脂肪幹細胞とマウス細胞の双方向的な細胞遊走の関与を明らかにした。これらはヒト脂肪幹細胞シートを臨床応用するための重要な知見であり学術的意義が大きい。本研究により新規治療法開発の可能性が示唆され、ヒト脂肪幹細胞シートによる治療法が可能になれば、治療成績の向上が期待され社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Adipose stem cell sheets have no side effect, such as ascites retention or infection in the mouse model of 30% hepatectomy and partial hepatectomy. Angiogenesis was increased in the sheet in time dependent manner. A fluorescent-labeled human adipose stem cells were identified on the liver side of the mouse. Interestingly, a large number of mouse cells were observed in the human adipose stem cell sheet. These results suggest that bidirectional migration between human adipose stem cells and mouse cells is involved in liver regeneration using a human adipose stem cell sheet.

研究分野：消化器外科

キーワード：術後肝障害 脂肪幹細胞 周術期対策

1. 研究開始当初の背景

周術期管理は進歩しているが、高度な侵襲を伴う消化器外科手術において術後合併症は大きな問題である。特に肝切除術後に発生する肝障害は、肝臓が生体内での代謝や生合成などの重要な機能に關与しているため、早急に解決しなければいけない課題である。

術後肝障害の原因には量的原因と質的原因がある。量的原因として根治性を得るための大量肝切除による肝容量減少があげられる。

質的原因として術前化学療法術や術中に行われる肝虚血・再灌流による肝機能低下があげられる。安全な手術のためには、肝障害への対策は極めて重要である。

マウス肝障害モデルに対して、脂肪幹細胞投与が有効であったとの報告されており、研究代表者らも脂肪幹細胞がラット肝虚血再灌流モデルでの70%肝切除術後の肝再生に有効であることラット臍液瘻モデルにおいて脂肪幹細胞シートが臍液瘻に有効であることも明らかにしている。このように脂肪幹細胞は周術期において有効と考えられるが、周術期管理において臨床応用されたものはない。

また脂肪幹細胞には多能性はないと考えられていたが、多能性をもつ脂肪幹細胞の存在や骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋細胞など間葉系細胞への分化誘導に加え、神経細胞や肝細胞への分化誘導が報告されている。研究代表者らもヒト脂肪幹細胞シートの研究においてヒト脂肪幹細胞より分化した血管新生の促進を確認しているが、その作用機序は明らかになっていない。

脂肪幹細胞による周術期における有効性および副作用、そのメカニズムを解明することにより、新規周術期対策が可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的は周術期における脂肪幹細胞の投与による術後肝障害に対する有効性およびそのメカニズムを解明し、新規周術期対策を開発することである。

3. 研究の方法

【脂肪幹細胞株】

ヒト由来脂肪幹細胞株 (HADSC) を ADSC-bullet kit を用いて 37 度の 5%CO₂ インキュベータで培養を行った。ヒト脂肪幹細胞をセルリンカーにて蛍光染色後、ヒト脂肪幹細胞シートの貼付を行った。切除後のヒト脂肪幹細胞を蛍光標識にて確認した。

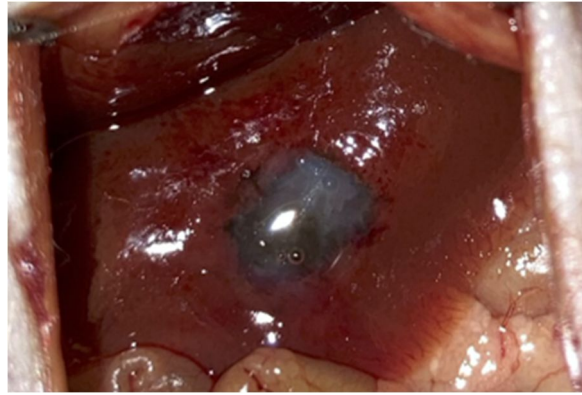
【免疫組織学的検討】

ヒト脂肪幹細胞シートおよび肝臓における血管内皮細胞については CD31 の発現にて検討した。またヒト由来細胞の同定についてはヒトミトコンドリア抗体、ヒト LaminB 抗体を用いて免疫組織学的に検討した。

【マウス肝切除モデルを用いた実験】

マウス肝臓の切除により 30% 肝切除モデルを作成する。肝切除部位へマウス脂肪幹細胞シートを貼付し、脂肪幹細胞シート貼付後の腹腔内所見を貼付後 2 日、3 日、5 日、7 日、14 日目に検討した。切除肝臓の重量より脂肪幹細胞シートによる肝再生を評価した。またヒト脂肪幹細胞シートを切除し、病理学的に経時的な変化を検討した。

マウス肝臓にパンチにより穴を開け、部分肝切除モデルを作成する。肝臓欠損部にマウス脂肪幹細胞シートの充填を行い、脂肪幹細胞シート充填後の腹腔内所見を貼付後2日、3日、5日、7日、14日目に検討した（右図：肝臓中央部の褐色部-脂肪幹細胞シート）。



ラット総胆管の小切開からのカテーテルの挿入後、空腸を吻合するラット胆管空腸吻

合モデルに対して脂肪幹細胞チューブによる置換術を行った。腹腔内所見を検討した。

【脂肪幹細胞の上下に定磁場をかけるシート化機器開発】

脂肪幹細胞のシート化に磁石を用いているが、磁場が不安定なため、脂肪幹細胞シートの細胞分布に不均一が生じている。臨床応用に関しては、規格化が重要であり、上下に定磁場をかけるシート化機器を開発した。

4. 研究成果

【マウス肝切除モデルでの脂肪幹細胞シートによる肝障害抑制効果の検討】

マウス30%肝切除モデルの肝切除部位への脂肪幹細胞シート貼付48時間後、脂肪幹細胞シートの脱落を認めなかった。また腹腔内所見で、貼付周囲に癒着を認めたが、腹水貯留や感染を疑わせる所見はなかった。

マウス部分肝切除モデルの肝臓欠損部へのマウス脂肪幹細胞シートの充填2日後に貼付周囲に癒着を認めた。また貼付充填した脂肪幹細胞シートは肝臓欠損部に生着していた。腹水貯留や胆汁の漏出、感染を疑わせる所見はなかった。

【マウス肝切除モデルにおける脂肪幹細胞シートの作用機序の検討】

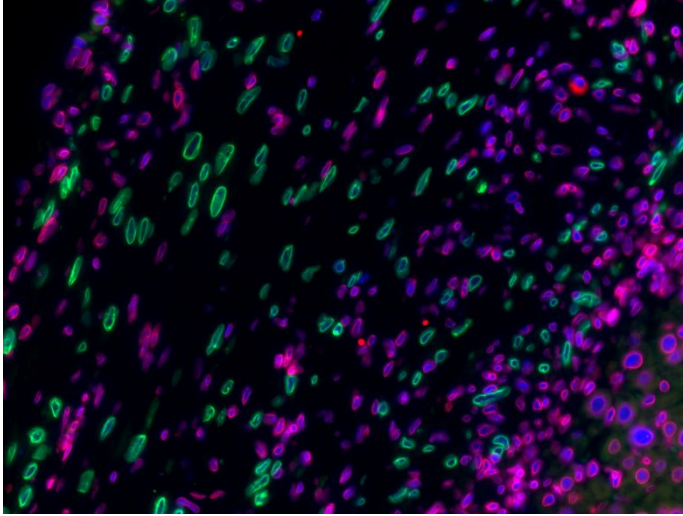
部分肝切除モデルの肝臓欠損部へのヒト脂肪幹細胞シートの充填後2日、3日、5日、7日、14日目の腹腔内所見では貼付による癒着を認めたが、腹水貯留や感染を疑わせる所見はなかった。切除肝臓の重量の経時変化を認めず、ヒト脂肪幹細胞シートによる肝重量には経時的な差を認めなかった。ヒト脂肪幹細胞シートは14日目においても貼付部に残っており脱落や吸収はされていなかった。

同時に貼付後2日、3日、5日、7日目、に切除したヒト脂肪幹細胞シートの病理学的検討では、ヒト脂肪幹細胞シート内には貼付2日目から血管新生が出現し、時間経過に伴う血管新生の増生を認めた。

ヒト脂肪幹細胞シート内のCD31に染色された血管内皮細胞は、ヒトミトコンドリア抗体にも染色され、ヒト由来と考えられた。

ヒト脂肪幹細胞シートによる血管新生についてヒトlaminBにて染色を行ったところ、ヒト脂肪幹細胞シートから離れたマウス肝組織部位に染色されるヒト由来細胞を認め、ヒト脂肪幹細胞の遊走を認めた。

14日目ではヒト脂肪幹細胞シート内のCD31に染色された血管内皮細胞は、ヒトlaminBおよびヒトミトコンドリア抗体で染色されなかった。同時にヒト脂肪幹細胞シート内にヒトlaminBで染色されない多数のマウス由来細胞の混在を認めた（次ページ図：緑-ヒトlaminB1、赤-マウスlaminB1、紫-DAPI）。



これは、マウス由来細胞のヒト脂肪幹細胞シート内への遊走と考えられた。

ヒト脂肪幹細胞をセルリンカーにて蛍光染色後、ヒト脂肪幹細胞シートの貼付を行った。マウス肝組織内に遊走するヒト脂肪幹細胞の蛍光を認めた。セルリンカーにて蛍光標識したヒト脂肪幹細胞の細胞シートの貼付により、貼付後のヒト脂肪幹細胞の局在を検討した。マウス肝臓側へのヒト脂肪幹細胞の集積を認め、ヒト脂肪幹細胞

の遊走を確認した。これらの結果より、ヒト脂肪幹細胞シート貼付による肝再生においては、ヒト脂肪幹細胞とマウス細胞の双方向的な細胞遊走の関与が示唆された。

【ラット胆管空腸吻合モデルでの脂肪幹細胞シートによる胆管空腸吻合の検討】

ラット胆管空腸吻合モデルに対して脂肪幹細胞チューブによる置換術では、吻合部の生着が不十分であり、炎症反応を認め、有効性の確認はできなかった。

【脂肪幹細胞シートの規格化の検討】

脂肪幹細胞の上下に定磁場をかけるシート化機器開発により、均一かつ多層性のヒト脂肪幹細胞シート化が可能になった。しかし、定磁場による温度上昇のため、シート化後のヒト脂肪幹細胞のviabilityが低下していた。温度制御可能なシステムを開発し、viabilityの維持されたヒト脂肪幹細胞シートの作成を可能にした。

規格されたヒト脂肪幹細胞の作製が可能になった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Onoe Shunsuke, Yokoyama Yukihiro, Kokuryo Toshio, Igami Tsuyoshi, Mizuno Takashi, Yamaguchi Junpei, Watanabe Nobuyuki, Kawakatsu Shoji, Ebata Tomoki	4. 巻 169
2. 論文標題 A presurgical prognostic stratification based on nutritional assessment and carbohydrate antigen 19-9 in pancreatic carcinoma: An approach with nonanatomic biomarkers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 1463 ~ 1470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.surg.2020.11.035	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onoe Shunsuke, Ebata Tomoki, Yokoyama Yukihiro, Igami Tsuyoshi, Mizuno Takashi, Yamaguchi Junpei, Watanabe Nobuyuki, Otsuka Shinpei, Nakamura Shigeo, Shimoyama Yoshie, Nagino Masato	4. 巻 23
2. 論文標題 A clinicopathological reappraisal of intraductal papillary neoplasm of the bile duct (IPNB): a continuous spectrum with papillary cholangiocarcinoma in 181 curatively resected cases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 HPB	6. 最初と最後の頁 1525 ~ 1532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hpb.2021.03.004	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onoe Shunsuke, Yokoyama Yukihiro, Ebata Tomoki, Igami Tsuyoshi, Mizuno Takashi, Yamaguchi Junpei, Watanabe Nobuyuki, Suzuki Shogo, Nishiwaki Kimitoshi, Ando Masahiko, Nagino Masato	4. 巻 28
2. 論文標題 Impact of Perioperative Steroid Administration in Patients Undergoing Major Hepatectomy with Extrahepatic Bile Duct Resection: A Randomized Controlled Trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 121 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-08745-7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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	棚野 正人 (NAGINO Masato) (20237564)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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	江畑 智希 (EBATA Tomoki) (60362258)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	横山 幸浩 (YOKOYAMA Yukihiro) (80378091)	名古屋大学・医学系研究科・特任教授 (13901)	
研究分担者	國料 俊男 (KOKURYO Toshio) (60378023)	名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授 (13901)	
研究分担者	山口 淳平 (YAMAGUCHI Junpei) (00566987)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関