

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月12日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21500454

研究課題名（和文） 心停止後のドナー肝からの臨床成熟肝細胞移植を目指した包括的戦略

研究課題名（英文） Clinical application for hepatocyte transplantation from non-heart beating donor

研究代表者 青木武士(AOKI TAKESHI)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：30317515

研究成果の概要（和文）：ラット心停止モデルにおいて、2層法を導入する事により、摘出肝冷保存後の肝細胞機能は良好に維持されていることが確認された。また細胞凍結保存法として、温度感応性ゲルを用いたマイクロカプセル化細胞凍結保存を行うことで、細胞機能を良好に維持し移植時には脱カプセル化細胞移植が可能になることから、移植後の生着率が向上した。心停止後肝の冷保存・凍結保存方法として、2層法および温度感応性ゲルの有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Liver preservation by the two layer method before hepatocyte isolation and cryopreservation of hepatocytes using thermo-reversible gelation polymer is extremely beneficial and will have an impact in the field of hepatocyte transplantation.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：肝細胞移植、細胞凍結保存、臓器保存、温度感応生ゲル

## 1. 研究開始当初の背景

成熟肝細胞を患者の肝臓から採取し移植する方法とその有用性については、臨床の現場で既に数多く報告されている。しかしながら、移植時には大量の細胞数が必要であり、さらに繰り返し移植を施行する場合に

は常時安定的な細胞数の確保が必要である。よって細胞移植においても臓器移植同様ドナー細胞の確保が最大の煩悶とも言われている。ドナー細胞の確保、確保した細胞を効率よく保存する方法を包括的に整備することが、成熟肝細胞治療を行う上で極めて

重要な課題である。本研究では1) 臓器移植不適合な肝臓を新たなドナー肝細胞として有効利用を目指すとともに、供給されている肝細胞の生存率を高め、2) 至適な肝細胞凍結保存方法を標準化し、3) 移植後の細胞生着高率を高めることに取り組むことを目標とし、臨床応用に即した成熟肝細胞治療の展開を目指す。

## 2. 研究の目的

肝冷保存において2層法に着目し、肝の冷保存を行うとともに、細胞分離後細胞の凍結保存法として温度感応性ゲルを用いた細胞凍結保存方法の有用性を検討した。

## 3. 研究の方法

### 移植不適合肝の細胞移植への応用

心停止後肝(NHBD)が細胞ドナーソースとして利用可能か検証するためラット心停止モデルを作成し検討した。心停止直後、NHBD-0(A群)、15分後NHBD-15(B群)、30分後NHBD-30(C群)に肝を摘出し、それぞれの群に対し速やかに肝細胞分離を施行した(Cont)群と、2層法あるいはUW液を用いて摘出肝の冷保存を3時間、12時間施行した群に分類した。

### 温度感応性高分子を用いた細胞凍結保存方法

マイクロカプセル化肝細胞がラット脾臓内でその細胞高次機能を発揮することを過去に報告しているが(Aoki, T, et al Intrasplenic transplantation of encapsulated cells: a novel approach to cell therapy, Cell Transplantation: 553-561, 2002)、移植時にカプセルの破壊やカプセルの存在が臨床応用の弊害になる可能性が危惧され、凍結時はカプセル化し移植時には脱カプセル化にて細胞移植ができるシステムを考案した。

MebiolGel TM (池田理化)は完全化学合成のポリマーで、温度感応性高分子と親水性高分子との共重合体で転移温度以下で流動性

のゾル、転移温度以上でゲル状という特異な物性を示す。よって転移温度以上のゲル状態で、肝細胞を凍結保存し、解凍後は転移温度以下のゾル状態で脱ゲル化肝細胞とする。マイクロカプセル化はゾル状態のMebiol gelで混和し、37℃でゲル状態としair jet systemで、肝細胞をゲル化する。ゲル化肝細胞は、10% FBSおよび10% DMSOを含むDMEMの凍結保存液に浸し、直ちに液体窒素内にて急速凍結保存する。

### ゲル化肝細胞凍結保存後の脱ゲル化誘導

MebiolGelは、4℃にてゾル状態となるため、37℃の温槽にて凍結保存したゲル化肝細胞を急速解凍する。ゲル化肝細胞は急速解凍時、ゾル状態となる。(MebiolGelは、4℃にてゾル状態となるため)ゾル状態の肝細胞を遠心分離後、脱ゲル化肝細胞とする。

## 4. 研究成果

### 移植不適合肝の細胞移植への応用

A群、B群、C群のviabilityは時間経過とともに低下したが、2層法は、UW液に比較し、冷保存3、12時間後も有意にviabilityが良好であった。ATP活性、アルブミン合成能においても2層法はUW群に比較し有意に高いレベルを維持していた。さらに脾臓内移植実験においても2層法群は、移植後28日間にわたり血清アルブミン値はUW群に比較し有意に高値を示した。このことから2層法をNHBDの冷保存に導入することで、肝細胞機能を良好に維持し、細胞移植へ応用することが可能であることが確認された。

### 温度感応性高分子を用いた細胞凍結保存方法

本システムの細胞移植の有用性を検証するため、ラット脾臓内に凍結保存後脱ゲル化肝細胞移植を施行した。脱ゲル化肝細胞はラット脾臓内で良好に生存し、肝細胞機能を発現しており、温度感応性高分子を用いた細胞凍結保存技術が細胞移植に応用可能であることが示唆された。

## 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4件)

1. Odaira M, Aoki T, Miyamoto Y, et al. Cold preservation of the liver with oxygenation by a two-layer method. J Surg Res. 2009. 152: 209-17.

2. Intraoperative fluorescent imaging using indocyanine green for liver mapping and cholangiography. Aoki T, Murakami M, et al. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2009,

3. Sentinel node mapping guided by indocyanine green fluorescence imaging in gastric cancer. Tajima Y, Yamazaki K, Masuda Y, Kato M, Yasuda D, Aoki T, Kato T, Murakami M, Miwa M, Kusano M. Ann Surg. 2009 Jan;249(1):58-62.

4. 肝臓疾患に対する再生医療の現況と展望  
青木武士、他 昭和医学会雑誌 71 巻、2011、459-464

[学会発表] (計5件)

1. Cryopreserved hepatocyte transplantation from non-heart beating donor in rat Yasuda Daisuke, Aoki Takeshi, et al. 36<sup>th</sup> Cell Transplantation Okayama, 2009. 4

2. Possibility of hepatocytes for cell transplantation from non heart beating donor rat liver after warm ischemia and cold preservation, using two layer method Enami yuta, Aoki, Takeshi, et al. 36<sup>th</sup> Cell Transplantation Okayama, 2009. 4

3. 臨床肝細胞移植療法を目指した心停止後肝の有用性-新たな肝冷保存法と肝細胞凍結保存法の確立 (シンポジウム) 青木武士、他 第16回肝細胞研究会 2009. 6 (山形)

4. 肝冷却保存法導入による肝組織スライス

片自家移植の基礎的検討 青木武士 他 第10回日本再生医療学会総会 2011. 3. 1 (口演)

5. Free radical scavenger 投与による冷却保存後肝組織スライス片自家移植の基礎的検討 青木武士 他 日本肝臓学会 2011. 5 (口演)

[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1件)

名称：METHOD FOR CRYOPRESERVING MICROENCAPSULATED LIVING ANIMAL CELLS ENCLOSED IN IMMUNOISOLATION MEMBERS, SUCH MICROENCAPSULATED LIVING ANIMAL CELLS IN IMMUNOISOLATION MEMBRANES, AND BIOHYBRID ARTIFICIAL ORGAN MODULES USING SUCH MICROENCAPSULATED LIVING ANIMAL CELLS IN IMMUNOISOLATION MEMBRANE.

発明者：青木武士  
権利者：昭和大学  
種類：  
番号：US7,553,612B2  
取得年月日：2009. 6. 30  
国内外の別：USA

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
青木武士 (AOKI TAKESHI)  
昭和大学・医学部・講師  
研究者番号：30317515

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :