

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592694

研究課題名(和文) グラフト肝虚血再灌流障害の飛躍的改善：間葉系幹細胞導入による臓器保存液の開発

研究課題名(英文) Improvement of ischemia reperfusion injury after liver transplantation by introduction of MSCs

研究代表者

岡本 晋弥 (Okamoto, Shinya)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00329377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、門脈投与した間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells: MSCs)が、肝臓において虚血再灌流障害の抑制につながることを示してきた。引き続き、臨床応用のために、MSCsの培養上澄からexosomeを分離採取する技術を確立した。これについては、同種異系細胞間での免疫反応の抑制が認められることを示している。ラット肝移植モデルでの検証をするために、部分肝移植モデルを作成しexosomeの働きを検証したところ、レシピエントの生存期間が長くなる傾向が見られた。

研究成果の概要(英文)：We have shown that mesenchymal stem cells administered via portal vein is effective in terms of amelioration of ischemia-reperfusion injury. We also established the technique with which we can extract exosome from supernatant of culture media of MSCs. Exosome from MSCs was shown to have immuno-modulatory effect and suppress immunological reaction between allogeneic cells. In order to evaluate the effect of exosome we established rat liver transplantation model. The tentative results showed that the exosome have a potential to improve rat survival after partial liver transplantation.

研究分野：小児外科、移植外科

キーワード：MSCs exosome 肝移植 部分肝移植

1. 研究開始当初の背景

1996年臓器移植法が成立し、脳死肝移植が可能となった。しかし10年余脳死移植の症例数は増加しなかった事から、2009年、2010年法改正が行われ、脳死患者本人の意思表示がない場合でも親族の同意のもとに臓器提供が可能となった。それまで、年間10例余であった脳死肝移植は、臓器移植法改正後半年のあいだに30例を超え、その中には、胆道閉鎖症、胆道閉鎖症に対する移植後肝不全、oxalosis、原発性硬化性胆管炎などの10歳未満から30歳までの患者も含まれている。今後脳死が広く理解され脳死肝移植の症例数が増加するものとみられる。

実際には、移植後の良好な成績のためには運搬時間を4時間以内にとどめておくことが望ましい事が示されている(市田隆文 肝臓 52巻2号 81-86(2011))。またドナー臓器は『臓器保存液』と呼ばれる液体に浸し、レシピエントへと輸送される。肝臓においては通常、UW液を灌流させ、低温下にて『保存』『運搬』されている。以上の理由より、長時間の運搬後の肝機能低下を緩和し、さらに術後肝機能回復の向上が期待される新しい『臓器保存液の開発』および『治療法』が求められている。そこで本申請研究は、間葉系幹細胞が分泌する様々な因子を既存の臓器保存液に添加する事による『摘出肝臓の保存時におけるviabilityの向上効果』および、肝臓移植時に間葉系幹細胞を同時に移植する事による『移植後の肝臓機能の回復効果』について検討する事を目的としている。

1999年に間葉系幹細胞は脂肪、軟骨、骨へ分化能をもつ多能幹細胞として骨髄より抽出されその表面抗原など細胞特徴が報告され(Pittenger MF, et al. Science 1999)。その後、間葉系幹細胞が肝障害軽減、肝再生に陽性作用があることが報告されてきた。HGFとともに培養した骨髄由来の間葉系幹細胞を移植したところラット肝障害を効果的に軽減した(Oyagi S, J Hepatol 2006)。ヒト臍帯内間葉系幹細胞が肝機能を回復させ肝再生を促進させることを、ラットの四塩化炭素肝障害モデルを用いて示している(Tsai PC, et al. Liver transpl 2009)。

これまでに研究申請者および共同研究者との長年の研究で、間葉系幹細胞には『肝再生促進効果』『肝障害軽減作用』を有している事が明らかとなり(Stem Cells 2008)、既に小動物にて

安全性と有効性を確認している(PLoS ONE 2011)。また我々は独自の方法で、間葉系幹細胞を安全に血管内に投与できる手法を確立し(特願2010-251273)、大動物(ブタ)肝臓虚血再灌流モデルを用いて、世界で最初に間葉系幹細胞によるきわめて有効な虚血再灌流障害治療の前臨床モデルを確立してきた(論文投稿準備中)。

本申請では研究期間中に、自治医科大学で作製された『蛍の光』を全身で発現している遺伝子組換えラット(Transplantation, 81: 1179-1184 (2006))を用いてまずは小動物レベルでの保存肝臓の移植後の肝機能回復効果を確認し、次に大動物であるブタを用いて前臨床試験のデータを回収する『移植結果』とともに、『分子レベルでの解析』の両面から評価を行い、研究成果の有効性と安全性について明らかにする。

2. 研究の目的

肝臓移植において、ドナーから摘出した肝臓を臓器保存液にて保存し、レシピエントに移植される。新生児、小児移植では当面ドナーが不足することが予測され、保存時間、搬送時間も長くなるものと考えられる。そこでドナー肝臓の『搬送(虚血)時間』や『移植後(再灌流)障害』が問題となっている。そこで本申請研究では様々な機能を有している間葉系幹細胞の『分泌因子』に着目し、ドナー肝臓の搬送可能な時間の『延長』や再灌流障害の『緩和』効果についての検討を行う。まずは小動物(ラット)で評価を行い、次に大動物(ブタ)へとスケールアップする。『安全性』と『有効性』が確認された場合、臨床試験実施に向けた準備を行う。

3. 研究の方法

ラット保存肝臓と脂肪組織由来間葉系幹細胞の培養液濃縮液を用いた移植実験

ドナー肝臓の保存液中における最適温度の決定と、濃縮培養液添加による保存時間の延長化をレシピエントに移植して検討する

保存肝臓の移植に対する間葉系幹細胞移植の併用効果についての検討

自己間葉系幹細胞を細胞懸濁液に混合し、脈管系を介して細胞移植を行い、保存肝臓の移植後における機能回復の促進効果を検討する。

大動物を用いた前臨床試験の実施

ラットで実施した実験内容をブタ(大動物)にスケールアップして実施する。

臨床治験実施に向けた検討
大動物で安全性と有効性が確認された場合、十分なインフォームドコンセントのもと臨床試験を行う

4. 研究成果

我々は、門脈投与した間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells: MSCs)が、肝臓において虚血再灌流障害の抑制につながることを示してきた。引き続き、臨床応用のために、MSCsの培養上澄から exosome を分離採取する技術を確立した。これについては、同種異系細胞間での免疫反応の抑制が認められることを示している。ラット肝移植モデルでの検証をするために、部分肝移植モデルを作成し exosome の働きを検証したところ、レシピエントの生存期間が長くなる傾向が見られた。

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8件)

1: Saida S, Watanabe KI, Kato I, Fujino H, Umeda K, Okamoto S, Uemoto S, Hishiki T, Yoshida H, Tanaka S, Adachi S, Niwa A, Nakahata T, Heike T. Prognostic significance of Aminopeptidase-N (CD13) in hepatoblastoma. *Pediatr Int.* 2015 Feb 12. doi: 10.1111/ped.12597. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25682862.

2: Matsumura Y, Tanaka M, Yamamoto M, Nagao M, Machida K, Ito Y, Takakura S, Ogawa K, Yoshizawa A, Fujimoto Y, Okamoto S, Uemoto S, Ichiyama S. High prevalence of carbapenem resistance among plasmid-mediated AmpC -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* during outbreaks in liver transplantation units. *Int J Antimicrob Agents.* 2015 Jan;45(1):33-40. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.08.015. Epub 2014 Oct 14. PubMed PMID: 25455850.

3: Uesugi M, Kikuchi M, Shinke H, Omura T, Yonezawa A, Matsubara K, Fujimoto Y, Okamoto S, Kaido T, Uemoto S, Masuda S. Impact of cytochrome P450 3A5 polymorphism in graft livers on the frequency of acute cellular rejection in living-donor liver transplantation. *Pharmacogenet Genomics.* 2014 Jul;24(7):356-66. doi: 10.1097/FPC.000000000000060. PubMed PMID: 24911663.

4: Yabuta M, Shibata T, Shibata T, Shinozuka K, Isoda H, Okamoto S, Uemoto S, Togashi K. Long-term outcome of percutaneous transhepatic balloon angioplasty for portal vein stenosis after pediatric living donor liver transplantation: a single institute's experience. *J Vasc Interv Radiol.* 2014 Sep;25(9):1406-12. doi: 10.1016/j.jvir.2014.03.034. Epub 2014 May 20. PubMed PMID: 24854391.

5: Iguchi K, Hatano E, Yamanaka K, Sato M, Yamamoto G, Kasai Y, Okamoto T, Okuno M, Taura K, Fukumoto K, Ueno K, Uemoto S. Hepatoprotective effect by pretreatment with olprinone in a swine partial hepatectomy model. *Liver Transpl.* 2014 Jul;20(7):838-49. doi: 10.1002/lt.23884. Epub 2014 May 26. PubMed PMID: 24700629.

6: Uesugi M, Hosokawa M, Shinke H, Hashimoto E, Takahashi T, Kawai T, Matsubara K, Ogawa K, Fujimoto Y, Okamoto S, Kaido T, Uemoto S, Masuda S. Influence of cytochrome P450 (CYP) 3A4*1G polymorphism on the pharmacokinetics of tacrolimus, probability of acute cellular rejection, and mRNA expression level of CYP3A5 rather than CYP3A4 in living-donor

liver transplant patients. Biol Pharm Bull. 2013;36(11):1814-21. PubMed PMID: 24189425.

7: Yabuta M, Shibata T, Shibata T, Shinozuka K, Isoda H, Okamoto S, Uemoto S, Togashi K. Long-term outcome of percutaneous interventions for hepatic venous outflow obstruction after pediatric living donor liver transplantation: experience from a single institute. J Vasc Interv Radiol. 2013 Nov;24(11):1673-81. doi: 10.1016/j.jvir.2013.07.010. Epub 2013 Sep 2. PubMed PMID: 24008112.

8: Shinke H, Hashi S, Kinoshita R, Taniguchi R, Sugimoto M, Matsubara K, Ogawa E, Sonoda M, Takada N, Yoshizawa A, Ogawa K, Okamoto S, Uemoto S, Masuda S. Effectiveness of sirolimus in combination with cyclosporine against chronic rejection in a pediatric liver transplant patient. Biol Pharm Bull. 2013;36(7):1221-5. Epub 2013 May 15. PubMed PMID: 23676788.

〔学会発表〕(計13件)

2014 日本消化器外科外科学会
小腸移植後急性拒絶反応における腸内抗菌ペプチドの変化
北村 好史、Von Websky Martin、Pech Thomas、Schaefer Nico、藤本 康弘、吉澤 淳、岡本 晋弥、Kalff JoeRg、上本 伸二

2014 日本小児外科学会
当院で経験した先天性横隔膜ヘルニアの成績
岡本 晋弥、小川 絵里、吉澤 淳、岡島 英明、長谷川 豪、河井 昌彦、上本 伸二

2014 日本小児外科学会
小児再々肝移植症例の検討
小川 絵里、吉澤 淳、岡本 晋弥、岡島 英明、上本 伸二

2014 日本外科学会
特発性移植後肝炎における自己免疫の関与の検証
平田 義弘、吉澤 淳、宮川 文、小川 晃平、藤本 康弘、岡本 晋也、海道 利実、羽賀 博典、上本 伸二

2014 日本外科学会
当科で経験した先天性横隔膜ヘルニアの成績
岡本 晋弥、小川 絵里、吉澤 淳、上本 伸二

2014 日本外科学会
右葉グラフトを用いた生体部分肝移植における肝静脈再建
奥村 晋也、藤本 康弘、小川 晃平、政野 裕紀、濱口 雄平、吉村 弥緒、土井 淳司、富山 浩司、吉澤 淳、秦 浩一郎、植村 忠弘、岡本 晋弥、波多野 悦朗、森 章、岡島 英明、海道 利実、上本 伸二

2014 日本外科学会
肝移植後 de novo 悪性腫瘍症例の検討
濱口 雄平、藤本 康弘、小川 晃平、政野 裕紀、奥村 晋也、吉村 弥緒、土井 淳司、富山 浩司、吉澤 淳、秦 浩一郎、植村 忠弘、岡本 晋弥、波多野 悦朗、森 章、岡島 英明、海道 利実、上本 伸二

2014 日本外科学会
肝移植周術期管理における医療安全上の問題点とそれに対する取り組み
藤本 康弘、海道 利実、小川 晃平、岡本 晋弥、森 章、波多野 悦朗、松村 由美、高倉 俊二、岡島 英明、上本 伸二

2014 日本小児外科学会
TI - 小児の移植医療の現状と未来について 小児肝移植の現状
岡本 晋弥、小川 絵里、吉澤 淳、岡島 英明、上本 伸二

〔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：
出願年月日：
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 岡本晋弥

()

研究者番号：00329377

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：