

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659589

研究課題名(和文) 肝硬変治療への挑戦：再生医療の導入による非移植治療の提案

研究課題名(英文) Introduction of regenerative medicine to the treatment of liver cirrhosis

研究代表者

藤本 康弘 (Fujimoto, Yasuhiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80335281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：まず最初に、Lewラットを用いて、有茎空腸内に肝細胞を移植すると長期にわたって生着することを示した。さらに、遊離空腸を門脈、下大静脈に間置する形で移植したところ、長期に生着することをIVISで確認した。これらより、成熟自己肝細胞は小腸壁内に生着可能であることが示された。それを受けて行った大動物実験では有茎空腸内への移植については、ラットと同様に粘膜除去の上細胞移植を行ったが、これは再現できなかった。一方、粘膜除去を行わずに粘膜下に移植した場合は、肝細胞の生着が確認でき、これに肝切除を並施した場合に、より著明となった。

研究成果の概要(英文)：We showed that hepatocyte survived for a long period if its is injected in the small intestine of Lewis rat. Moreover, free intestinal graft placed between portal vein and IVC is a potential transplant site for the hepatocyte, which was shown with IVIS. However, we failed to show identical results with large animal study.

研究分野：消化器外科、移植外科

キーワード：肝硬変 再生医療

1. 研究開始当初の背景

肝移植の問題点・本研究の動機：日本においては、生体肝移植ドナーから部分肝の提供を受け (Asakuma, Fujimoto et al. *Am J Transplant* 2007)、行われることがまだ多い。生体ドナーの問題点としては、「健康な人にメスをいれる」という倫理的問題がつきまとう (Fujita, Fujimoto et al. *Liver Transpl* 2006)。また、レシピエントの年齢や種々の社会的、医学的問題から適応から外れることも多い。「肝移植の適応とならない、肝硬変を背景とした肝細胞癌患者」をなんとか救うことはできないか？というのが本研究の動機である。

本研究の着想：本研究の着想の一つは、ラット細切肝臓（成熟肝由来）を用いた腸管肝臓化の試み (Berishvili, 2003, *Transplantation*) から得ており、肝硬変患者（胎児肝臓ではなく）から肝細胞を分離し、増殖に適した環境（*in vivo*, 腸管壁）に移植することで、肝臓の役割を担わせることが可能ではないか、と考えた。また、腸管を遊離グラフトとし、門脈-下大静脈間に間置することで、門脈圧亢進症の改善および門脈血流を受けることにより肝細胞増殖に適した環境が得られるのではないかと考えた。予備実験で肝細胞の生着を示唆する所見が得られている（右上図及び Hata, Fujimoto et al. *Microsurgery* 2010）。また MSCs が、肝細胞および（臓器としての）肝再生促進に有効とのデータも得ている。

2. 研究の目的

肝移植には、脳死ドナー不足の問題ないしは生体ドナーの倫理的および安全性の問題がある。本研究では、将来的に肝移植に依らない肝硬変治療、肝不全治療を可能とすることを目標にしている。我々の予備実験では、自己肝細胞は小腸壁内に生着可能であり、また遊離小腸グラフトを門脈（低圧系）-大静脈間に間置することが可能で、門脈減圧が可能であった。本研究により、グラフトが手に入らず移植できない患者、及び移植適応外患者の治療に貢献することを目指す。

（本研究の具体的な目的）

- 1) 小動物モデル：間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; MSCs) の導入により、移植肝細胞の増殖が促進されることを示す。
- 2) 大動物モデル：大量肝切除モデルで同様の実験を行ない、前臨床レ

ベルでの検証を行う

3) 臨床検体：臨床肝切除例にて硬変肝からの肝細胞分離技術を確立する。

3. 研究の方法

- 1) ラット肝切除モデルにて、成熟肝細胞の生着に適した移植（注入）部位、細胞量、MSCs の併用法につき評価する。
- 2) ブタ肝切除モデルにて、移植した細胞の生着、細胞機能の評価する。本計画にて、「成熟肝組織から肝細胞を分離し、腸管壁に移植することで、肝臓の役割を担わせることの可能性」及び「腸管を遊離グラフトとし、門脈-下大静脈間に間置することで、門脈圧亢進症の改善および門脈血流を受けることにより肝細胞増殖に適した環境が得られるのではないか」、以上2点につき、明らかにする。順調に進んだ場合、以下へ進む。
- 3) ヒト硬変肝および正常肝からの肝細胞分離技術の確立

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 27 件)

1: Kitajima T, Fujimoto Y, Hatano E, Nishida H, Ogawa K, Mori A, Okajima H, Kaido T, Nakamura A, Nagamatsu H, Uemoto S. Salvage living-donor liver transplantation for liver failure following definitive radiation therapy for recurrent hepatocellular carcinoma: a case report. *Transplant Proc.* 2015 Apr;47(3):804-8.
doi: 10.1016/j.transproceed.2015.02.01

1. PubMed PMID: 25891735.

2: Okumura S, Kaido T, Hamaguchi Y, Fujimoto Y, Masui T, Mizumoto M, Hammad A, Mori A, Takaori K, Uemoto S. Impact of preoperative quality as well as quantity of skeletal muscle on survival after resection of pancreatic cancer. *Surgery*. 2015 Jun;157(6):1088-98. doi: 10.1016/j.surg.2015.02.002. Epub 2015 Mar 19. PubMed PMID: 25799468.

3: Hamaguchi Y, Kaido T, Okumura S, Ito T, Fujimoto Y, Ogawa K, Mori A, Hammad A, Hatano E, Uemoto S. Preoperative intramuscular adipose tissue content is a novel prognostic predictor after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2015 Jun;22(6):475-85. doi: 10.1002/jhbp.236. Epub 2015 Mar 5. PubMed PMID: 25755128.

4: Mori A, Iida T, Iwasaki J, Ogawa K, Fujimoto Y, Uemura T, Hatano E, Okajima H, Kaido T, Uemoto S. Portal vein reconstruction in adult living donor liver transplantation for patients with portal vein thrombosis in single center experience. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2015 Jun;22(6):467-74. doi: 10.1002/jhbp.235. Epub 2015 Mar 8. PubMed PMID: 25755116.

5: Hammad A, Kaido T, Ogawa K, Fujimoto Y, Uemura T, Mori A, Hatano E, Okajima H, Uemoto S. Liver transplantation for advanced hepatocellular carcinoma in patients with Child-Pugh A and B. *Surg Today*. 2015 Feb 27. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25721174.

6: Kamo N, Kaido T, Hammad A, Ogawa K, Fujimoto Y, Uemura T, Mori A, Hatano E, Okajima H, Uemoto S. Impact of elderly donors for liver transplantation: A single-center experience. *Liver Transpl*. 2015 May;21(5):591-8. doi: 10.1002/lt.24086. Epub 2015 Apr 15. PubMed PMID: 25641778.

7: Kitajima T, Fujimoto Y, Hatano E, Mitsunori Y, Tomiyama K, Taura K, Mizumoto M, Uemoto S. Intraoperative fluorescent cholangiography using indocyanine green for laparoscopic fenestration of nonparasitic huge liver cysts. *Asian J Endosc Surg*. 2015 Feb;8(1):71-4. doi: 10.1111/ases.12137. PubMed PMID: 25598059.

8: 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.

9: Tsuchimoto A, Shinke H, Uesugi M, Kikuchi M, Hashimoto E, Sato T, Ogura Y, Hata K, Fujimoto Y, Kaido T, Kishimoto J, Yanagita M, Matsubara K, Uemoto S, Masuda S. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a useful biomarker for tacrolimus-induced acute kidney injury in liver transplant patients. *PLoS*

One. 2014 Oct 20;9(10):e110527.
doi: 10.1371/journal.pone.0110527.
eCollection
2014. PubMed PMID: 25329716; PubMed
Central PMCID: PMC4203804.

10: Hammad A, Kaido T, Ogawa K,
Fujimoto Y, Tomiyama K, Mori A,
Uemura T, Uemoto S. Perioperative changes in
nutritional parameters and impact
of graft size in
patients undergoing adult living
donor liver transplantation. *Liver
Transpl.* 2014
Dec;20(12):1486-96. doi:
10.1002/lt.23992. PubMed PMID:
25205246.

11: Kaido T, Ogawa K, Fujimoto Y,
Mori A, Hatano E, Okajima H, Uemoto
S. Perioperative changes of
procalcitonin levels in patients
undergoing liver
transplantation. *Transpl Infect
Dis.* 2014 Oct;16(5):790-6. doi:
10.1111/tid.12282. Epub 2014 Aug 25.
PubMed PMID: 25154523.

12: Hamaguchi Y, Kaido T, Okumura S,
Fujimoto Y, Ogawa K, Mori A, Hammad
A, Tamai
Y, Inagaki N, Uemoto S. Impact of
quality as well as quantity of
skeletal muscle
on outcomes after liver
transplantation. *Liver Transpl.*
2014 Nov;20(11):1413-9.
doi: 10.1002/lt.23970. PubMed
PMID: 25088484.

13: Iwasaki J, Iida T, Mizumoto M,
Uemura T, Yagi S, Hori T, Ogawa K,
Fujimoto Y,
Mori A, Kaido T, Uemoto S. Donor
morbidity in right and left
hemiliver living
donor liver transplantation: the
impact of graft selection and
surgical
innovation on donor safety. *Transpl
Int.* 2014 Nov;27(11):1205-13. doi:
10.1111/tri.12414. Epub 2014 Sep 29.
PubMed PMID: 25082133.

14: 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.

15: Kaido T, Tomiyama K, Ogawa K,
Fujimoto Y, Ito T, Mori A, Uemoto S.
Section

12. Living donor liver
transplantation for patients with
high model for end-stage
liver disease scores and acute
liver failure. *Transplantation.*
2014 Apr 27;97
Suppl 8:S46-7. doi:
10.1097/01.tp.0000446276.59051.ae.
PubMed PMID: 24849834.

16: Kaido T, Ogawa K, Fujimoto Y,
Ito T, Tomiyama K, Mori A, Ogura Y,
Uemoto S.
Section 7. A new therapeutic
strategy on portal flow modulation
that increases
donor safety with good recipient
outcomes. *Transplantation.* 2014
Apr 27;97 Suppl
8:S30-2. doi:
10.1097/01.tp.0000446271.28557.e8.
PubMed PMID: 24849829.

17: Hashi S, Masuda S, Kikuchi M,
Uesugi M, Yano I, Omura T, Yonezawa
A, Fujimoto
Y, Ogawa K, Kaido T, Uemoto S,
Matsubara K. Assessment of four
methodologies
(microparticle enzyme immunoassay,
chemiluminescent enzyme
immunoassay, affinity
column-mediated immunoassay, and
flow injection assay-tandem mass
spectrometry)
for measuring tacrolimus blood
concentration in Japanese liver
transplant
recipients. *Transplant Proc.* 2014

Apr;46(3):758-60. doi:
10.1016/j.transproceed.2013.11.06
0. PubMed PMID: 24767342.

18: Endo K, Iida T, Yagi S, Yoshizawa A, Fujimoto Y, Ogawa K, Ogura Y, Mori A, Kaido T, Uemoto S. Impact of preoperative uncontrollable hepatic hydrothorax and massive ascites in adult liver transplantation. *Surg Today*. 2014 Dec;44(12):2293-9. doi: 10.1007/s00595-014-0839-y. Epub 2014 Feb 8. PubMed PMID: 24509883.

19: Doi J, Teratani T, Kasahara N, Kikuchi T, Fujimoto Y, Uemoto S, Kobayashi E. Evaluation of liver preservation solutions by using rats transgenic for luciferase. *Transplant Proc*. 2014 Jan-Feb;46(1):63-5. doi: 10.1016/j.transproceed.2013.07.077. PubMed PMID: 24507027.

20: Salah A, Fujimoto M, Yoshizawa A, Yurugi K, Miyagawa-Hayashino A, Sumiyoshi S, Minamiguchi S, Uemoto S, Maekawa T, Haga H. Application of complement component 4d immunohistochemistry to ABO-compatible and ABO-incompatible liver transplantation. *Liver Transpl*. 2014 Feb;20(2):200-9. doi: 10.1002/lt.23789. PubMed PMID: 24470446.

21: Kikuchi M, Okuda Y, Ueda Y, Nishioka Y, Uesugi M, Hashimoto E, Takahashi T, Kawai T, Hashi S, Shinke H, Omura T, Yonezawa A, Ito T, Fujimoto Y, Kaido T, Chiba T, Uemoto S, Matsubara K, Masuda S. Successful telaprevir treatment in combination of cyclosporine against recurrence of hepatitis C in the Japanese liver transplant patients. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(3):417-23.

Epub 2013 Dec 26.
PubMed PMID: 24369269.

22: 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.

23: Ueda Y, Kaido T, Ito T, Ogawa K, Yoshizawa A, Fujimoto Y, Mori A, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Marusawa H, Chiba T, Uemoto S. Chronic rejection associated with antiviral therapy for recurrent hepatitis C after living-donor liver transplantation. *Transplantation*. 2014 Feb 15;97(3):344-50. doi: 10.1097/01.TP.0000435702.61642.0a. PubMed PMID: 24157473.

24: Kaido T, Ogawa K, Mori A, Fujimoto Y, Ito T, Tomiyama K, Takada Y, Uemoto S. Usefulness of the Kyoto criteria as expanded selection criteria for liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Surgery*. 2013 Nov;154(5):1053-60. doi: 10.1016/j.surg.2013.04.056. Epub 2013 Sep 24. PubMed PMID: 24074704.

25: Iwasaki J, Hata T, Uemoto S, Fujimoto Y, Kanazawa H, Teratani T, Hishikawa S, Kobayashi E. Portocaval shunt for hepatocyte package: challenging application of small intestinal graft in animal models. *Organogenesis*. 2013 Oct

1;9(4):273-9.
doi: 10.4161/org.25968. Epub 2013
Aug 8. PubMed PMID: 23974217;
PubMed Central
PMCID: PMC3903696.

26: Hosohata K, Uesugi M, Hashi S,
Hosokawa M, Inui K, Matsubara K,
Ogawa K,
Fujimoto Y, Kaido T, Uemoto S,
Masuda S. Association between
CYP3A5 genotypes in
graft liver and increase in
tacrolimus biotransformation from
steroid treatment
in living-donor liver transplant
patients. Drug Metab
Pharmacokinet.
2014;29(1):83-9. Epub 2013 Aug 13.
PubMed PMID: 23955548.

27: Kasahara N, Kikuchi T, Doi J,
Teratani T, Fujimoto Y, Uemoto S,
Yasuda Y,
Kobayashi E. Luminescence-based
assay to screen preservation
solutions for
optimal ability to maintain
viability of rat intestinal grafts.
Transplant Proc.
2013 Jul-Aug;45(6):2486-90. doi:
10.1016/j.transproceed.2013.02.11
7. PubMed PMID:
23953567.

〔学会発表〕(計5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
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

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者 藤本 康弘

()

研究者番号: 80335281

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号: