

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462097

研究課題名(和文) 脂肪組織由来多能性幹細胞移植による肝代謝性疾患治療の試み

研究課題名(英文) Construction of liver tissue in vivo with preparative partial hepatic irradiation and growth stimulus: investigations of less invasive techniques and progenitor cells.

研究代表者

山之内 孝彰(YAMANOUCHI, Kosho)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：10448508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：目的;脂肪組織由来幹細胞(ADMSC)移植による新たな代謝性肝疾患治療法の確立。方法と結果;ドナー;DPP4陽性ラット、レシピエント;陰性ラット。1. レシピエントラットの前処置として、門脈枝結紮により肝細胞増殖刺激を与えると共に部分肝X線照射を行いレシピエント肝細胞の増殖能を抑制。2. ドナーラットより分離の成熟肝細胞、小型肝細胞、新鮮ADMSCをレシピエントラット脾臓へ移植。2カ月後犠牲死し肝臓摘出、DPP4染色施行。で移植細胞によるレシピエント肝細胞の置換を認めた(>)。は移植細胞は散在するのみ。ADSMCをin vitroで肝細胞へ分化を試みたが十分な分化を得られず。

研究成果の概要(英文)：The selective proliferation of transplanted hepatocytes with a growth stimulus, such as portal vein branch ligation (PVBL), concomitant with hepatic irradiation (HIR), which can suppress proliferation of host hepatocytes, has been reported. We have conducted experiments that focused on less invasive and clinically applicable techniques and progenitor cells. First, DPP4-F344 rats underwent partial HIR and PVBL of one lobe, followed by intrasplenic hepatocyte transplantation at 1×10^7 . Second, after partial HIR and PVBL, two types of progenitor cells were transplanted (small hepatocytes (SHs) or adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSMC)). RESULTS: 16 wk after transplantation, the donor cells constituted > 70% of the hepatocytes of the irradiated lobe, showing Cx32, PCK-1, and glycogen storage. The SHs grew more quickly than the hepatocytes. Although the ADSMCs were engrafted after 8 wk, their proliferation was not observed.

研究分野：再生医療学

キーワード：再生医療 脂肪組織由来多能性幹細胞 肝放射線照射 増殖刺激

1. 研究開始当初の背景

代謝性肝疾患の治療においては、肝移植が唯一の根治治療である。しかしながら、肝移植はドナーを必要とし、ドナー・レシピエントに大きな負担がかかることが欠点である。肝移植に変わり得る手段、あるいは肝移植までの "bridge" として、臨床の場で低侵襲な肝細胞移植が試みられつつあるが、ドナー肝細胞不足が問題である。一方、脂肪組織由来多能性幹細胞(ADMSC)の hepatocyte 様細胞への分化が報告されている(Sgodda M, et al. Exp Cell Res 313: 2875-86. 2007)。ADMSC 使用の利点として、骨髓由来幹細胞や ES 細胞等と比較して、採取が容易、比較的大量に得ることが出来る、倫理的問題が無い、等が挙げられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ADMSC 移植による新たな代謝性肝疾患治療法を確立することである。そのためのブレークスルーとして、動物実験系を用いて、脂肪組織由来多能性幹細胞から分化誘導した hepatocyte 様細胞をレシピエント肝に移植し、さらに増殖刺激を加えることにより増殖を促し、特に代謝性肝疾患に対する細胞療法の有用性を検討する。移植細胞に選択的に増殖刺激を加えるための方法として、レシピエント肝への部分的 X 線照射や門脈枝結紮あるいはこれらを組み合わせた低侵襲な方法を開発して、将来的に臨床応用へと発展させることを目指す。

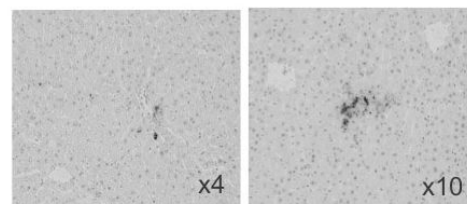
3. 研究の方法

実験動物においてレシピエントとドナーの細胞を区別するために Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV)をマーカーとして用いる。DPPIV 陽性 F344 ラットより採取した ADMSC を *in vitro* で肝細胞様細胞へ分化後、「肝 X 線照射 + 門脈枝結紮」を加えた DPP IV 陰性 F344 ラットの門脈内に移植する。移

植細胞の増殖の評価は主に肝組織 DPPIV 染色で確認するとともに、微細構造や肝としての機能の評価も併せて行う。さらに、同様の移植実験を、レシピエントをビリルビン代謝異常モデルラットとして行い、治療効果(ビリルビン正常化等)を検討する。

4. 研究成果

新鮮 ADMSC を門脈内へ移植したところ、レシピエント肝内で生着するが、成熟肝細胞のような著明な増殖は来さなかった。



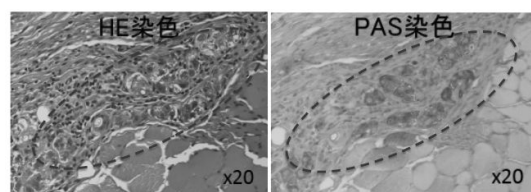
ADMSC 移植後 8 週目のレシピエント肝
(黒; 移植 ADMSC)

in vitro での ADMSC の分化誘導

ADMSC 培養液への HHF 等の添加を行ったが、hepatocyte 様細胞への分化は見られなかった。

ADMSC の支持細胞としての役割

温度応答性培養皿を用いて作成したラット肝細胞シートは、レシピエントラット皮下での生着は困難であり、原因としては皮下の血管網が乏しいことが挙げられる。しかし、ADMSC を支持細胞とした肝細胞との二層細胞シートでは 8 週間の皮下生着を確認した(下図)。



考察/結論;

ADMSC は細胞療法において、肝細胞の代替

としては利用は難しい。しかし、移植細胞の生着を改善するための支持細胞としては有用である可能性が示唆された。今後、サイトカインや血管新生因子産生等、その機序を解明するために検討を行う予定である。

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2件)

Baimakhanov Z, Yamanouchi K, Sakai Y, Koike M, Soyama A, Hidaka M, Takatsuki M, Fujita F, Kanetaka K, Kuroki T, Eguchi S. Efficacy of Multilayered Hepatocyte Sheet Transplantation for Radiation-Induced Liver Damage and Partial Hepatectomy in a Rat Model. Cell Transplant. 査読あり
2016;25(3):549-58. doi:
10.3727/096368915X688669.

Miyazaki K, Yamanouchi K, Sakai Y, Yamaguchi I, Takatsuki M, Kuroki T, Guha C, Eguchi S. Construction of liver tissue in vivo with preparative partial hepatic irradiation and growth stimulus: investigations of less invasive techniques and progenitor cells. J Surg Res. 査読あり
2013 ;185(2):889-95. doi:
10.1016/j.jss.2013.06.016.

[学会発表](計3件)

第15回日本再生医療学会総会、大阪国際会議場(大阪) 2016年3月17日~3月19日、Baimakhanov Z、山之内孝彰、堺裕輔、江口晋、他. 放射線肝障害と肝切除を組み合わせたラットモデルに対する多層肝細胞シートの移植効果

American College of Surgeon, Clinical Congress 2015, Chicago (米国), 2015年10月4日~10月8日. Baimakhanov Z, Yamanouchi K, Sakai Y, Eguchi S, et al. Multilayered Hepatocyte Sheet Transplantation for Radiation-Induced Liver Damage and Partial Hepatectomy in a Rat Model.

第114回日本外科学会定期学術集会、国立京都国際会館(京都) 2014年4月3日~5日、藤井美緒、山之内孝彰、堺裕輔、日高匡章、曾山明彦、高槻光寿、金高賢悟、藤田文彦、南恵樹、黒木保、江口晋. 肝非実質細胞シートを用いた皮下肝組織構築の試み.

[図書](計1件)

山之内孝彰、他(一部執筆) 株式会社メディカルトリビューン、再生医療用語ハンドブック、2015年、p. 137.

[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：
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

山之内 孝彰 (YAMANOUCHI, Kosho)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
講師

研究者番号：10448508

(2)研究分担者

江口 晋 (EGUCHI, Susumu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)
・教授

研究者番号：80404218

堺 裕輔 (SAKAI, Yusuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
助教

研究者番号：10608904

(3)連携研究者 該当無し

()

研究者番号：