

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893052

研究課題名(和文) 新規肝切除後肝再生促進・癒着防止療法の開発：大型動物モデルを用いて

研究課題名(英文) Development of a novel therapy for promoting liver regeneration and preventing postoperative therapy

研究代表者

稲垣 冬樹 (Inagaki, Fuyuki)

東京大学・医学部附属病院・登録研究医

研究者番号：70529015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：原発性及び転移性肝がんに対する治療において、『繰り返し肝切除』は生存期間の延長や根治を期待しうる方法である。しかし『繰り返し肝切除』の問題点として、前回手術後の癒着と残存肝の再生能低下という2つの問題点が挙げられる。我々はマウス肝切除後癒着モデルにおいて、中皮前駆細胞を移植することで肝切除後の癒着を防止しうることを、加えて肝切除後の肝再生を促進しうることをすでに明らかにしている。本研究では、大型動物モデルにおいても中皮細胞移植により良好な癒着防止効果を得ることが出来た。またマウスのアロ移植においても同種同系移植と同様の効果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Repeated hepatectomy is widely accepted as one of the potentially curative treatments for primary and secondary liver neoplasms. But repeated hepatectomy has two major problems; postoperative adhesion and decreased regenerating ability of the remnant liver. We have already reported that the transplantation of mesothelial progenitor cells prevented postoperative adhesion and promoted liver regeneration in the mice practical partial hepatectomy model. In this study, we revealed the anti-adhesive effect of mesothelial cells transplantation in the miniature pig hepatectomy model. In addition, we showed that an allogeneic transplantation was as effective as a syngeneic transplantation in mice.

研究分野：肝胆膵外科学

キーワード：再生医療 肝切除 術後癒着

1. 研究開始当初の背景

原発性及び転移性肝がん再発に対する治療において、『再肝切除・再々肝切除』は生存期間の延長や根治を期待しうる方法として広く有効性が認められている。しかし『再肝切除・再々肝切除』をおこなう際の問題点として、残存肝の再生能低下と前回手術後の癒着という2つの問題点が挙げられる。これらの問題を解決することは実際の肝切除率を上げ、患者予後の更なる改善につながると考えられる。

術後癒着は程度の軽いものまで含めると外科手術後ほぼ全例に起こる。術後癒着は一般的には腸閉塞や慢性骨盤痛、腹痛、不妊などの原因となるほか、再肝切除時には癒着剥離操作が加わることで手術操作が煩雑となり、手術時間の延長や出血量の増大、合併症の増加といったリスクをもたらす。術後癒着を防止するためにセプラフィルム®やインターシード®といった高分子吸収性癒着防止材が世界的に使用されているが、肝切除手術の際には胆汁漏のリスクが増す可能性が危惧されるなどその有用性に関しては十分な検討がおこなわれていない。さらに、もう一つの問題点である残存肝の再生能低下は術後肝不全のリスクを高める。原発性肝がんにおいては元々の背景肝が慢性肝炎・肝硬変などの障害肝であることが多く、残存肝の再生能低下は深刻な問題であるが、現状ではこれに対する有効な対処法は存在しない。

2. 研究の目的

中皮細胞は体腔やその内部の各臓器表面を覆っている細胞である。細胞表面にムコ多糖タンパクを多く発現しており、臓器間や臓器・体腔間の摩擦を減らして癒着を防いでいることが知られている。また様々なサイトカインも分泌しており、特に胎生期において様々な臓器の発生・成熟に必要な不可欠なことが明らかとなっている。申請者らは中皮細胞

に着目して、細胞療法の新たなリソースとして用いることが出来るか研究してきた。その結果、マウス胎仔から肝中皮前駆細胞を分離培養して、細胞シートを肝離断面に移植することで、肝切除後の癒着を防止しうること、加えて肝切除後の肝再生を促進しうることを明らかにした。本研究ではヒトへの臨床応用を見据えて、大型動物を用いて中皮細胞の有用性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

モデル動物としてはヒトに近い体格や臓器の大きさをしているミニブタを用いることとした。ミニブタにおける肝切除後癒着モデルは現状では存在しないため、まず肝切除後癒着モデルの確立をおこなった。肝切除術式はPartial Resectionとした。またミニブタ中皮細胞の培養系を確立して移植用細胞シートを作成した。作成した中皮細胞シートをミニブタ肝切除後癒着モデルへと自家移植して癒着防止効果について検討した。またマウスやラットとは異なり、ミニブタは近交退化の傾向が強いため、99.99%以上遺伝子が同一である真の意味での近交系が実際には確立していない。そのため、ミニブタ間の移植の場合同系統でもアロ移植となってしまう。そこで自家移植だけでなくアロ移植でも同等の効果がみられるかを小動物間の移植で検討した。

4. 研究成果

成体の雄ゲッチングミニブタから大網と肝臓を採取して、腹膜中皮細胞と肝中皮細胞をそれぞれ回収した。37℃に温めたコラゲナーゼ液中で震盪したのち回収は遠心法でおこなった。培養条件を検討したところ、腹膜中皮細胞は細胞シートとして移植可能な程度にまでExpandすることが出来た。肝中皮細胞に関しては十分にExpandせず培養条件の更なる検討が必要と思われた。細胞シー

ト化した腹膜中皮細胞を、同一個体に再肝切除を施してその肝切離面に移植したところ、良好な癒着防止効果を得ることが出来た。中皮細胞の大量培養がまだ難しいため、肝切除術式は Partial Resection とした。

またアロ移植に関しても検討した。まず C57BL/6J background の GFP マウスの胎仔から肝中皮細胞シートを作成した。作成した細胞シートを BALB/c マウス・FVB/NJc1 マウス・C3H/HeJJc1 マウスの 3 系統のマウス肝切除後癒着モデルに移植して、癒着防止効果や肝再生促進効果を検討したところ同種同系移植と同様の効果が得られた。なお移植した中皮細胞は同種同系移植とは異なり肝離断面に生着していなかったことから、術後短期間の生着で癒着防止効果・肝再生促進効果を発揮するに十分なことが明らかとなった。アロ移植の有効性が確認できたことで、今後の臨床応用に向けて可能性が広がった。

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 Inagaki NF*, Inagaki FF*, Kokudo N, Miyajima A. (*These authors contributed equally to this work.) **Use of mouse liver mesothelial cells to prevent postoperative adhesion and promote liver regeneration after hepatectomy.** J Hepatol. 2015 May; 62(5): 1141-7.

② Inagaki NF, Inagaki FF, Kokudo N, Miyajima A. **Cell-based therapy for preventing postoperative adhesion and promoting regeneration after hepatectomy.** J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2015 Apr 15. doi: 10.1002/jhbp.247. [Epub ahead of print]

③ Ohta S, Nishiyama T, Sakoda M, Machioka K, Fuke M, Ichimura S, Inagaki F, Shimizu A, Hasegawa K, Kokudo N, Kaneko M, Yatomi Y, Ito T. **Development of carboxymethyl cellulose nonwoven sheet as a novel hemostatic agent.** J Biosci Bioeng. 2015 Jun; 119(6): 718-23.

④ 岡田真誠, 安野正道, 川上雅代, 石原亜里紗, 稲垣冬樹, 小田剛史, 原義明, 横須賀哲哉, 塩入貞明, 小林利子, 山田滋: 重粒子線により局所根治を得られた直腸癌局所再発の 1 例. 癌と化学療法 2014; 41(12): 1710-1712

[学会発表] (計 14 件)

① 稲垣奈都子, 稲垣冬樹, 國土典宏, 宮島篤 「肝中皮細胞シートを用いた次世代型再生医療」第 21 回 JDDW(日本消化器関連学会週間) 平成 25 年 10 月 9 日-12 日 (品川)

② 稲垣奈都子, 稲垣冬樹, 國土典宏, 宮島篤 「他家移植における肝中皮細胞シートの有用性の検討」第 13 回日本再生医療学会 平成 26 年 3 月 4 日-6 日 (京都)

③ 稲垣奈都子, 稲垣冬樹, 國土典宏, 宮島篤 「臨床応用に向けた肝中皮細胞シートの有用性の検討」第 50 回肝臓学会 平成 26 年 5 月 29 日-30 日 (東京)

④ 清水篤志, 大道清彦, 稲垣冬樹, 宮田明典, 長谷川潔, 國土典宏 「ラット肝切除癒着モデルを用いた新規癒着防止材料の開発研究」第 26 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 平成 26 年 6 月 11 日-13 日 (和歌山)

⑤ 原義明, 稲垣冬樹, 小田剛史, 川上雅代, 塩入貞明, 安野正道 「膵体尾部切除後の膵液瘻に対する内視鏡的膵管ドレナージによる治療経験」第 26 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 平成 26 年 6 月 11 日-13 日 (和歌山)

⑥ 稲垣奈都子, 稲垣冬樹, 國土典宏, 宮島篤 「肝中皮細胞を用いた細胞療法の開発」第 21 回肝細胞研究会 平成 26 年 6 月 27 日-28 日 (東京)

⑦ 谷貝知樹, 松井理司, 原田憲一, 中沼安二,

稲垣冬樹, 西條栄子, 宮島篤, 田中稔「胆管傷害および胆管癌における sterile alpha motif domain containing 5 の発現解析」第 21 回肝細胞研究会 平成 26 年 6 月 27 日-28 日(東京)

⑧ 原義明, 中野智継, 稲垣冬樹, 小田剛史, 川上雅代, 塩入貞明, 安野 正道「大腸穿孔症例の検討」第 69 回日本消化器外科学会総会 平成 26 年 7 月 16 日-18 日(郡山)

⑨ 岡田真誠, 安野正道, 川上雅代, 塩入貞明, 原義明, 小田剛史, 稲垣冬樹, 林薫里, 石原亜里紗, 山田滋「重粒子線治療により局所根治を得られた直腸癌局所再発の 3 例」第 69 回日本消化器外科学会総会 平成 26 年 7 月 16 日-18 日(郡山)

⑩ 稲垣奈都子, 稲垣冬樹, 國土典宏, 宮島篤「Study of the utility of the fetal liver mesothelial cells in the liver regeneration」第 87 回日本生化学会大会 平成 26 年 10 月 15 日-18 日(東京)

⑪ 稲垣冬樹, 原義明, 春日聡, 岡田真誠, 石原亜理紗, 花岡まりえ, 川上雅代, 塩入貞明, 常見あきさ, 田中道雄, 竹田利明, 安野正道「経過観察中の胆嚢腺筋腫症が発生母地と考えられた進行胆嚢癌の一例」第 76 回日本臨床外科学会 平成 26 年 11 月 20 日-22 日(郡山)

⑫ 石原亜里紗, 川上雅代, 稲垣冬樹, 原義明, 塩入貞明, 安野正道「虫垂憩室出血に対し腹腔鏡下虫垂切除術施行した 1 例」第 76 回日本臨床外科学会 平成 26 年 11 月 20 日-22 日(郡山)

⑬ 花岡まりえ, 稲垣冬樹, 小田剛士, 川上雅代, 横須賀哲哉, 原義明, 塩入貞明, 小林利子, 安野正道「サルコペニアに関連する高齢者術後肺炎の予測 腹部 CT による腸腰筋断面積は有用な指標か?」第 76 回日本臨床外科学会 平成 26 年 11 月 20 日-22 日(郡山)

⑭ 稲垣冬樹, 原義明, 春日聡, 常深あきさ, 田中道雄, 安野正道「アミロイドーシスが原因と考えられた多発大腸壊死の一例」第 51 回日本腹部救急医学会総会 平成 27 年 3 月 5 日-6 日(京都)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

名称: 癒着防止材

発明者: 稲垣冬樹、稲垣奈都子、宮島篤、

國土典宏

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2014/51280

出願年月日: 2014 年 1 月 22 日

国内外の別: 国内

名称: iPS 細胞からの中皮細胞の分化誘導系の確立

発明者: 稲垣冬樹、稲垣奈都子、宮島篤、國土典宏

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2015/64867

出願年月日: 2015 年 5 月 25 日

国内外の別: 国内

○取得状況(計 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

稲垣 冬樹 (FUYUKI INAGAKI)

東京大学・医学部附属病院・登録研究医

研究者番号: 70529015

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: