

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462034

研究課題名(和文) 末期肝不全に対する肝過小グラフト移植を基盤とした多能性幹細胞融合肝再生法の開発

研究課題名(英文) Hybrid transplantation technique using stem cells based on liver transplantation from small for size grafts

研究代表者

宮城 重人 (Miyagi, Shigehito)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号：00420042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞の分離採取については、腹腔内脂肪からMSCを採取培養し順調に施行。次に基盤となるブタ過小グラフト移植実験に移ったが、門脈からの細胞投与はやはり門脈圧亢進を認めるため、類洞環境改善を目指しPV-IVCシャント群を作成した。また並行シラットにて肝内微小循環改善法(移植前酸素化一時還流+再灌流時PGE1投与)を検討した。手技安定に時間を要したが、結果的にシャント作成群では生存例が増加した。しかしこのモデルはあまりに状態が不良となるため、このままでは細胞移植によるハイブリッド移植は不可能であると判断された。一方ラット酸素化一時還流モデルは、肝類洞微小循環を改善し考慮に値する方法と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We collected mesenchymal stem cells from pigs' abdominal fat. We made the pig model of liver transplantation from small for size grafts (25%model = posterior section graft). Then, we performed hybrid transplantation based on the small for size liver grafts. Furthermore, we added the shunt from portal vein (PV) to inferior vena cava (IVC) on this small for size grafts to prevent hyper pressure of portal vein. We divided these transplant pigs in two groups. On the non-shunt group; we transplanted this small for size grafts without PV-IVC shunt. On the shunt group; we transplanted this small for size grafts with PV-IVC shunt. As a result, survival rate and microcirculation were improved on the shunt group. But this experiment revealed that the cell boost hybrid transplantation was difficult in this model because the body condition was too bad. From these results, we made the rat transplant model that was treated with short oxygenated warm perfusion of Krebs-Henseleit buffer and PGE1.

研究分野：肝移植および幹細胞移植

キーワード：肝移植 マージナルドナー 幹細胞移植

1. 研究開始当初の背景

本邦では末期肝不全の治療として生体肝移植に頼る状況が続いている。だが現在の成人間生体移植は、**ドナー負担の非常に大きなものであり(右葉移植は自分の肝臓の 2/3 を提供)これがドナー不足の大きな原因の一つとなっている。**

2. 研究の目的

幹細胞からの臓器再生はまだ不可能である。そこで、**小さい肝臓を骨格として移植し、そこに細胞を追加移植し早期増殖させる技術**を確立すれば現状を打破できると考えた。我々は近年当大学にて確認された**癌化のない多能性幹細胞**に着目した。**本研究の目的は、多能性幹細胞を利用した肝再生促進法の開発にある。**

3. 研究の方法

再生医療を応用した過小グラフト移植の成功に向け、以下の様に分け研究を進める。

(1). **ラット及びブタの骨髄等の間葉系幹細胞から、間葉系幹細胞および Muse 細胞の分離採取**

東北大学出澤研究室及び後藤研究室(細胞移植学:当科と共同研究中)の協力のもと、ラットの骨髄等の間葉系幹細胞から、**SSEA-3 によって同定され多能性が確認された多能性幹細胞**を採取する。出澤研究室で確立したフローサイトメトリーを利用した分離採取法にて採取し培養する。またブタでも既に同様の方法で多能性幹細胞が同定・分離されているので、効率的採取・培養に挑戦する。

(2). **マウス 70%肝切モデルで、多能性幹細胞及び間葉系幹細胞を移植し肝再生を比較検証**

マウス 70%肝切モデルに門脈カテを挿入し、対照群(70%肝切のみ)、上記実験で採取した多能性幹細胞(Muse)移植群、及び間葉系幹細胞移植群にわけ、肝再生を

比較検討する。幹細胞は Luciferase transgenic マウスから採取し、ルシフェリン投与にて生体内で発光させ**蛍光イメージング装置で半定量的にトレーシング**できるようにする。こうして**肝機能、凝固能などの機能検査に加え、グラフト volume の recovery rate、細胞の分化増殖能および生着率を確認する。**

(3).**当科で報告したシャントを造設したブ 25%未摘肝過小グラフト移植モデルに多能性幹細胞移植を組み合わせて臨床応用可能か検証する**

過小グラフト移植モデル作成

ドナーブタに左 3 区域切除施行。残った後区域(25%)に門脈カニューレションし wash out しながら愛護的にドネーション施行。UW溶液による冷保存を 3 時間置く。次に過小肝グラフト移植術をレシピエントブタに施行。ブタは IVC が肝内に取り込まれているため、アンスロンチューブを利用し V-V バイパスおよび P-V バイパスを施行したうえで、IVC ごと部分肝移植を施行する。さらに前上臍十二指腸静脈に門脈注入用カテーテルを挿入しておく(参考文献として Wang, Miyazawa の当科実験モデル参照 Wang HS, Miyagi et al. Transplant Proc 2005)

過小グラフト移植に、ドナー大腿骨髄より分離採取した**多能性幹細胞移植を施行**

過小グラフト移植モデルに、前述の方法 1 で後藤研究室協力のもと表面抗原発現を確認し精製・培養した細胞を、**経門脈的に約 2×10^7 個(重量にして全肝の 0.2%弱) 3 時間かけて持続投与する(細胞移植群)**。さらに **PGE1+セリンプロテアーゼを同時に門脈から持続投与した群も作り(細胞移植+門脈圧コントロール群)**と対照群(**過小グラフトのみの群**)をおき 1 週間後の肝再生を肝機能、凝固能、ICG などの機能検

査に加え、犠牲死後のグラフト volume の recovery rate, 類洞の状態を形態学的に比較検討する (PGE1 及びセリンプロテアーゼ阻害剤の濃度等は Transplant Proc. 2009 Jan-Feb;41(1):36-9 参照) なお移植細胞の種類(間葉系幹細胞、Muse 細胞、or 両方?) や移植細胞数は前述方法 2 の結果を踏まえて再検討する。

同時に門脈カテーテルにて術後 96 時間まで持続で門脈圧のモニタリングを施行、幹細胞投与数と門脈圧変化の関係を明らかにとし、結果によって更に移植細胞数の増減を検討する。なお、移植細胞の生着率は、大動物であり蛍光イメージング装置が使用できないため、Ultra-small Super Paramagnetic Iron Oxide(USPIO)を標的細胞に取り込ませて MRI で評価することを検討している。

以上の 3 段階にわたる実験にて、本実験の目的となる肝過小グラフトを土台とした多能性幹細胞による肝再生療法を確立する。

4. 研究成果

・多能性幹細胞 (MSC および Muse) の分離採取については Muse 細胞の収量が想定細胞数に到底及ばないため、腹腔内脂肪から MSC を採取培養し、とりあえずこちらで進めることとした。こちらは順調に施行され分化誘導を確認。

・次に、肝過小グラフト + 細胞移植ブースト実験を施行した。マウスおよびラットの予備実験から細胞移植をすると門脈圧亢進症となって死亡することはわかっていたため、細胞移植時門脈圧亢進対策として門脈下大静脈シャントを用いることとした。方法としては donor に肝左 3 区域切除を施行し、残った後区域を約 25% の過小グラフトとして摘出、レシピエントの全肝を摘出後に上記過小グラフトを移植した。実際に移植を成功させ検体採取ができるようになる

まで手技安定に時間を要したが、結果的に 28 年度では門脈下大静脈シャント非作成群(5 例)、門脈下大静脈シャント作成群(5 例)を完遂できた。生存率、術後の生化学、肝重量の変化、病理組織を比較検討した。門脈下大静脈シャント非作成群(5 例)は術後肝不全・腹水多量にて当日夜死亡したが、門脈下大静脈シャント作成群(5 例)は 5 例中 2 例が 48 時間以上生存した(3 例は術直後死亡)。ただ、7 日以上生存例はなく、このモデルで細胞ブースト移植をするにはあまりに全身状態が悪く不安定であることがわかった。このため生着効率を下げない細胞移植を目指し肝内微小循環改善法(再灌流時 PGE 1 使用および移植前酸素化一時還流)をラットに戻って検討した。

・ラット移植前酸素化一時還流グラフトによる移植を想定した還流実験を施行。その結果、ラットにおいては移植前酸素化一時還流にて肝類洞内皮細胞が健康に保たれることが、電子顕微鏡・光学顕微鏡結果および免染等で明らかになった。

・これを受け、ブタ、マージナルドナー全肝グラフト(心停止 + 20 分温阻血)での移植前酸素化一時還流モデルを作成した。今後こちらをハイブリッド移植のベースにハイブリッド移植をトライしていく予定である。

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 6 件)

1. Kashiwadate T, Miyagi S, Hara Y, Akamatsu Y, Sekiguchi S, Kawagishi N, Ohuchi N, Satomi S.

Soluble thrombomodulin ameliorates ischemia-reperfusion injury of liver grafts by modulating the

proinflammatory role of high-mobility group box 1.

Tohoku J Exp Med. 2016; 239(4):315-23.

doi: 10.1620/tjem.239.315. 査読あり

2. Shimizu K, **Miyagi S**, Miyazawa K, Maida K, Kashiwadate T, Hara Y, Goto M, Kawagishi N, Ohuchi N.

Resveratrol prevents warm ischemia-reperfusion injury in liver grafts from non-heart-beating donor rats.

Transplant Proc. 2016 May; 48(4):1221-5.

doi: 10.1016/j.transproceed.2015.11.031.

査読あり

3. **Miyagi S**, Kawagishi N, Kashiwadate T, Fujio A, Tokodai K, Hara Y, Nakanishi C, Kamei T, Ohuchi N, Satomi S.

Relationship between bile duct reconstruction and complications in living donor liver transplantation.

Transplant Proc. 2016 May; 48(4):1166-9.

doi: 10.1016/j.transproceed.2015.10.073.

査読あり

4. Tokodai K*, Kawagishi N, **Miyagi S**, Nakanishi C, Hara Y, Fujio A, Kashiwadate T, Maida K, Goto H, Kamei T, and Ohuchi N.

Poor long-term outcomes of adult liver transplantation involving elderly living donors

Transplant Proc. 2016 May;48(4):1130-3.

doi: 10.1016/j.transproceed.2016.01.016. 査読あり

5. Maida K, Akamatsu Y, Hara Y, Tokodai K, **Miyagi S**, Kashiwadate T, Miyazawa K, Kawagishi N, and Ohuchi N.

Short oxygenated warm perfusion with prostaglandin E1 administration before cold preservation as a novel resuscitation

method for liver grafts from donors after cardiac death in a rat in vivo model.

Transplantation 2016 May;100(5):1052-8.

doi: 10.1097/TP.0000000000001127. 査読あり

6. **Miyagi S**, Shimizu K, Miyazawa K, Kakizaki Y, Fujio A, Hara Y, Nakanishi C, Goto H, Kamei T, Kawagishi N, Ohuchi N, and Satomi S.

The reconstruction of hepatic arteries using extra-anatomical free autografts in living donor liver transplantation

J Transplant Technol Res 2016; 7:2, 157.

doi.org/10.4172/2161-0991.1000157. 査読あり

[学会発表](計 5件)

1. K. Shimizu, S. Miyagi et al.

The effects of resveratrol on liver transplantation from non-heart-beating donors in pigs.

International Congress of the Transplantation Society. August 18, 2016 in Hong Kong, China.

2. S. Miyagi, K. Shimizu, et al.

Early term results of biliary reconstruction using microsurgical outer knotted suture technique in living donor liver transplantation.

International Congress of the Transplantation Society. August 18, 2016 in Hong Kong, China.

3. Y. Kakizaki, S. Miyagi et al.

Ex vivo subnormothermic oxygenated liver perfusion just before liver transplantation from non-heart-beating donors might improve graft viability, in pig model.

International Congress of the Transplantation Society. August 18, 2016 in Hong Kong, China.

4. 福岡健吾、松村宗幸、宮城重人、後藤昌史
肝細胞移植におけるグラフト保存法の至適化
日本移植学会 2016.9.29. グランド
プリンスホテル新高輪、東京

5.宮城重人 他 動脈再建困難例に対する
肝移植の工夫 日本移植学会 2016.9.29.
グランドプリンスホテル新高輪、東京

〔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：
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

宮城 重人 (Miyagi, Shigehito)
東北大学・大学病院・准教授
研究者番号：00420042

(2)研究分担者

川岸 直樹 (Kawagishi, Naoki)
東北大学・大学病院・准教授
研究者番号：00333807

後藤 昌史 (Goto, Masafumi)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：50400453

中西 史 (Nakanishi, Chikashi)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号：00547408

中西 涉 (Nakanishi, Wataru)
東北大学・東北メディカルメガバンク機
構・助教
研究者番号：50636024