

令和元年6月17日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01295

研究課題名(和文)ハイブリッド人工胆管構築技術を基盤とした術後胆管狭窄予防

研究課題名(英文)Prevention of postoperative biliary stricture by application of hybrid bioartificial bile duct

研究代表者

曾山 明彦(SOYAMA, Akihiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：10549447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、移植可能な人工胆管の作製を目指し、胆管上皮細胞、血管内細胞、線維芽細胞などの細胞の分離培養技術を確立し、同細胞を3D培養することにより作製された管腔構造体を用いて、ハイブリッド人工胆管を作製することを目的とした。また、人工胆管の有用性を明らかにするため、大動物を用いたブタ胆管移植モデルを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓や胆管の手術の後に、胆管狭窄という合併症が生じる。胆管が狭窄すると、胆汁の流れが悪くなることによる胆管炎や黄疸が生じる。狭窄部の解消のためにチューブを挿入したり、あるいは手術により、胆管と小腸を吻合することで、胆汁の流出を改善させるという治療が行われているが、定期的なチューブ交換が必要となったり、腸内最近逆流による胆管炎を生じたりすることでQOLが損なわれる。そこで、本研究では、細胞を用いて管状の構造体を作成した。そしてブタを用いた実験により、同構造体が胆管の一部を置換しうることを明らかにした。今回作成した構造体により、胆道合併症に対する新たな方法につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Biliary complication following liver transplantation or liver surgery is severe complication that deteriorates patients' quality of life. For biliary stenosis, internal stent or surgical revision has been standard practice. These interventions are also affect patients' quality of life. We conducted this study to fabricate a scaffold-free tubular constructs as an interposition graft for treating biliary complications. Allogeneic fibroblast derived from a pig femoral dermis were proliferated by the explant culture. The scaffold-free tube made of allogeneic pig fibroblast was fabricated by a Bio-3D Printer. The fibroblast tube was implanted as an interposition graft for duct-to-duct biliary reconstruction in a pig model. Two weeks later, at the time of relaparotomy, no biliary leakage or stenosis was recognized. Present study demonstrated the successful reconstruction of the extrahepatic bile duct using the allogeneic fibroblast tube.

研究分野：外科学

キーワード：肝移植 胆道合併症 肝臓外科 再生医療 3Dプリンター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝臓疾患や胆道疾患に対して、胆管の切除を行った場合に、胆道の再建が必要となるが、胆管と胆管を吻合する胆管胆管吻合では、吻合部狭窄が問題となる。例えば生体肝移植後には10-25%の頻度で発生すると報告されている。狭窄をきたすと、肝内胆汁うっ滞による肝細胞障害や繰り返す胆管炎による肝線維化などによる肝不全の原因となり、予後を悪化させる原因の一つとなっている。申請者らはこれまでに、生体肝移植後の胆管吻合部狭窄を予防すべく、手術手技の工夫を報告してきた(Takatsuki, Soyama, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2011)。胆管周囲の血流を最大限に温存し、胆管吻合部にはシリコン製のチューブを3ヶ月留置し、内腔の開存を保つ方法を用いているが、チューブ抜去後には、やはり15%前後の吻合部狭窄が発生する。その原因として、治癒過程での炎症を伴う癒痕治癒や吻合部での血流障害が考えられている。

近年、tissue engineering 技術により、スカフォールドを用いた臓器作製、あるいは細胞シートを用いた組織修復、再生の報告が認められる。胆管再生へのこれらの応用の試みとして、生体吸収性ポリマーチューブや生体吸収性ステントの生体内留置による組織再生が報告されているが、安全性や長期成績などが不明であり、臨床応用はされておらず、また ex vivo での細胞を用いた胆管構築技術も確立されていない。

申請者らは、これまでに、生体吸収スカフォールドや細胞シートによる組織構築、修復の研究を行ってきた。特に、スカフォールドを用いた組織構築は、ハンドリングの容易さという点で優位であり、今回、その立体構造力を活かした人工胆管の作製とその臨床応用の可能性に注目した。

2. 研究の目的

本研究は、生体吸収材料により作製したチューブ構造上で、ヒトの胆管上皮細胞や血管内皮細胞等を培養し、それらのチューブを組み合わせることで、それ自体が組織修復や抗炎症機能を有する機能性ハイブリッド人工胆管を作製し、肝臓疾患や胆道疾患に対する胆管手術後に発生する胆管吻合部狭窄の予防を図るものである。胆管吻合部の狭窄が生じると、繰り返す胆管炎の原因となり、患者の QOL が著しく損なわれる。また肝内胆汁うっ滞による肝機能障害や胆管炎による線維化が進行すると肝不全の原因となりうる。ハイブリッド人工胆管を吻合部に間置グラフトとして用いることにより、炎症を軽減し、血流を良好に保つことで、吻合部狭窄の予防に繋がることが期待される。

3. 研究の方法

ブタから Explant 法で線維芽細胞を培養・増殖し、バイオ3Dプリンターによってブタ由来線維芽細胞のみの管腔構造体(バイオ人工胆管)を作製した。全身麻酔下にブタのそう胆管を離断し、離断した部位にバイオ人工胆管を吻合し、移植した。2週間目に犠牲死させ標本を摘出した。術前と術後1、2週間目に肝機能評価を行い、摘出後は透視や Micro-CT を用いて画像評価し、免疫染色を含む病理組織学的にも評価を行った。

4. 研究成果

本研究は、胆管上皮細胞、血管内細胞、線維芽細胞などの細胞の分離培養技術を確立し、同細胞を3D培養することにより作製された管腔構造体を用いて、それ自体が組織修復や抗炎症機能を有する機能性ハイブリッド人工胆管を作製することを目的とした。マウス胆管上皮細胞の培養、ブタ線維芽細胞の培養技術を確立し、これらの細胞を用いて、管腔構造体の作製を行った。結果、佐賀大学との共同研究によりバイオ3Dプリンターを用いてブタ線維芽細胞による管腔構造体(バイオ人工胆管)作製に成功した。

また、バイオ人工胆管の有用性を明らかにするため、大動物を用いたブタ胆管移植モデルを確立した。これは、ブタの胆管を切断した後に同部位に人工胆管を移植し、その生着や機能を評価するモデルである。このモデルにおいて、バイオ人工胆管が、短期において、吻合部からの胆汁漏や狭窄等なく、生着することを確認した。

5. 主な発表論文等

{雑誌論文}(計4件)

1. Efficacy of a biliary splint at the anastomosis in living donor liver transplantation - With a special reference to postoperative endoscopic treatment for biliary stricture

Satomi Okada, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Amane Kitasato, Shinichiro Ono, Koji Natsuda, Takanobu Hara, Tota Kugiyama, Hajime Imamura, Zhassulan Baimakhanov, Fumihiko Fujita, Tamotsu Kuroki, Susumu Eguchi. International Surgery, In press.

2. Pravisani R, Soyama A, Isola M, Sadykov N, Takatsuki M, Hidaka M, Adachi T, Ono S, Hara T, Hamada T, Baccarani U, Risaliti A, Eguchi S. Chronological changes in skeletal muscle mass following living-donor liver transplantation: An analysis of the predictive factors for long-term post-transplant low muscularity. Clin Transplant. 2019 Apr;33(4):e13495. doi: 10.1111/ctr.13495. Epub 2019 Mar 3. PubMed PMID: 30773726.
3. Baimakhanov Z, Sakai Y, Yamanouchi K, Hidaka M, Soyama A, Takatsuki M, Eguchi S. Spontaneous hepatocyte migration towards an endothelial cell tube network. J Tissue Eng Regen Med. 2018 Mar;12(3):e1767-e1771. doi: 10.1002/term.2577. Epub 2017 Dec 28.
4. Fujii M, Yamanouchi K, Sakai Y, Baimakhanov Z, Yamaguchi I, Soyama A, Hidaka M, Takatsuki M, Kuroki T, Eguchi S. In vivo construction of liver tissue by implantation of a hepatic non-parenchymal/adipose-derived stem cell sheet. J Tissue Eng Regen Med. 2018 Jan;12(1):e287-e295. doi: 10.1002/term.2424. Epub 2017 Jun 15.

〔学会発表〕(計3件)

1. 皮下性ヒト肝細胞/線維芽細胞シートによる肝再生医療. 日高匡章, 堺 裕輔, 曾山明彦, 小池真章子, 山之内孝彰, 夏田孔史, 大野慎一郎, 藤田文彦, 黒木 保, 江口 晋. 日本第20回肝臓学会大会. 2016.11.3-6.
2. 胆道再建術後吻合部狭窄の危険因子に関する検討. 岡田怜美, 北里 周, 大野慎一郎, 原貴信, 夏田孔史, 曾山明彦, 日高匡章, 山之内孝彰, 藤田文彦, 小林和真, 金高賢悟, 黒木 保, 江口 晋. 第116回日本外科学会定期学術集会、2016.4.14-16.
3. 生体肝移植ドナー手術における術中胆道造影の重要性. 村上俊介, 曾山明彦, 日高匡章, 北里 周, 大野慎一郎, 夏田孔史, 岡田怜美, 原 貴信, 釘山統太, 今村一步, Baimakhanov Zhassulan, 山之内孝彰, 小林和真, 金高賢悟, 藤田文彦, 黒木 保, 江口 晋. 第116回日本外科学会定期学術集会、2016.4.14-16.

〔図書〕(計1件)

『消化器外科』2018年4月臨時増刊号

特集『これぞ達人の技! 最新の消化器内視鏡外科手術』

腹腔鏡補助下肝グラフト採取術 (ハイブリッド肝グラフト採取術)

曾山明彦 江口 晋 へるす出版 2018年 p.799-808

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

特に無し

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 江口 晋

ローマ字氏名: EGUCHI, Susumu

所属研究機関名: 長崎大学

部局名: 医歯薬総合研究科 (医学系)

職名：教授

研究者番号（8桁）：80404218

研究分担者氏名：堺 裕輔

ローマ字氏名：SAKAI, Yusuke

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬総合研究科（医学系）

職名：助教

研究者番号（8桁）：10608904

(2)研究協力者

無し

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。