

令和元年6月5日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10417

研究課題名(和文) マージナルドナー肝移植に対する親生体素材シートを用いた肝細胞移植ブースト法の開発

研究課題名(英文) Hybrid transplantation of marginal donor grafts and hepatocytes using biological affinity cell sheet

研究代表者

宮澤 恒持 (Miyazawa, Koji)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：80757237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：無アルブミンラットへの移植実験では、線維芽細胞シート被覆肝細胞を、従来の門脈内移植、文献的報告の多い脾臓実質内移植、腎皮膜下移植、我々の目指す肝臓実質内移植、さらに大網、鼠径部、ADSC(脂肪)、皮下、筋肉、腹腔内にも移植し比較検討した(今までこれをきちんと比較した報告が存在しなかった)。血清アルブミン値の推移と免疫染色にて生着を評価した。その結果最も生着効率が高いのは驚くことに門脈内肝細胞移植であった(線維芽細胞シート被覆による原始免疫反応を回避する効果があったと考えられる)。この結果は2018国際移植学会(Spain Madrid)で報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の大きさで生着率が変わるのではなく個々の細胞の性質で生着率が変わることが分かった点、最も生着効率が高いのは結果的には門脈内肝細胞移植であることが分かった点、肝細胞は線維芽細胞シート被覆により原始免疫反応を回避する効果があり生着率が上がることが分かった点で、学術的意義が高いと考えられる

研究成果の概要(英文)：Rat hepatocytes were isolated using a modified two-step collagenase perfusion technique and then purified by Percoll density gradient centrifugation. Hepatocytes (1.0×10^7) with a viability exceeding 90% were directly injected into the portal vein ($n=8$), spleen pulp ($n=8$), liver parenchyma, and so on, on the analbuminemic rats using a gastight syringe for 60 seconds. Blood samples were taken pre-transplantation and at weeks 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 16 after transplantation. The serum albumin levels were quantified using a rat albumin enzyme-linked immunosorbent assay kit.

As a result, the serum albumin levels of the intrasplenic group (pre-transplantation: $7.55 \pm 0.65 \mu\text{g/ml}$, Week 2: $55.00 \pm 21.02 \mu\text{g/ml}$, Week 4: $79.88 \pm 32.62 \mu\text{g/ml}$, Week 6: $105.96 \pm 54.46 \mu\text{g/ml}$, Week 8: $114.73 \pm 58.34 \mu\text{g/ml}$, Week 10: $116.11 \pm 56.33 \mu\text{g/ml}$, Week 12: $122.76 \pm 60.85 \mu\text{g/ml}$, and Week 16: $133.96 \pm 66.03 \mu\text{g/ml}$, respectively) were significantly lower than those of the intraportal group

研究分野：肝臓移植、細胞移植

キーワード：線維芽細胞シート被覆肝細胞 門脈内移植 肝臓実質内移植 脾臓実質内移植

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

1. 研究開始当初の背景

現在肝移植の提供者(以下ドナー)不足が全世界的に問題となっている。**心臓停止ドナーを含めたいわゆるマージナルドナーからの肝移植**が検討され始めているが、死戦期等による温阻血のため現在の医療では臨床使用は困難である。一方肝細胞移植は、小児代謝性疾患等胆道再建が不要な症例に対し既に臨床応用されている安全かつ低侵襲な治療である。しかし現在主流となっている門脈内細胞移植法では、炎症や原始免疫反応等による血栓凝固付着・微小循環障害により、十分な生着が望めず効果も極めて限定的である。これを打破するために親生体素材シートを用いて肝表面への細胞移植に着手した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ラット及びブタを使用し、本格的に臨床応用可能な肝表面への新規肝細胞移植法を開発することである

3. 研究の方法

我々は門脈内移植直後の炎症反応抑制に関する基礎研究を膵島移植の分野で行ってきており、また門脈圧亢進による微小循環障害・類洞内皮障害と肝再生の研究も行ってきた(Tokodai K, Goto M et al. Transplantation 2010、Miyagi S et al. Transplantation 2004、Wang HS et al. Transplant Proc 2005)。しかし未だ十分制御はできておらず、結果的には門脈内が細胞・組織移植部位として至適部位であるとは言えない状況である。

申請者らのグループでは、**リコンビナントコラゲナーゼの比率を最適化することによる独自の細胞分離法を開発**しており、この方法を用いてラットの肝細胞を分離し、肝表面への新規移植法を従来の門脈内注入法と比較し検証する。グラフト生着を評価するための小動物モデルとしてアルブミンを生成できない無アルブミンラットを用いて**肝細胞移植後のアルブミン生成量を第一のエンドポイント**として行う。

大きく以下の2点について詳細に検討する。1点目は、**肝細胞移植の臨床応用に向けて肝細胞の最適サイズを検討**する。2点目は、**肝表面への移植に用いる最適人工シートについて、移植効率や臨床使用実現性の点から検討**する(ラットのみでなくブタでも使用可能か検証)。

4. 研究成果

当初の研究では、移植細胞サイズの検討として、肝細胞より大きな膵島細胞が肝被膜を通過したのを確認した。しかし、それにもかかわらず、膵島より小さな肝細胞が肝被膜を全く通過しないことが確認された。原因は細胞のサイズではなく、細胞の性質によるものと考えられ、肝細胞においては個々を分離したうえで人工シート以外のものを検討する必要があると判断した。

このため親生体素材シートではなく自己細胞シートに変更してみることにした。自己線維芽細胞シートについては、肝表面に腎被膜下と類似の環境を作ることで、原始免疫反応を回避し、移植成績を向上させることを目的とした。方法としては、F344ラット新生児より採取した線維芽細胞を用いて、線維芽細胞シートを作成。次に無アルブミンラットの肝表面にF344ラットより分離した肝細胞をのせ、線維芽細胞シートで覆い移植用被覆肝細胞を作成した。この線維芽細胞シート被覆肝細胞を使って、ようやく無アルブミンラットへの移植実験が開始となった。

無アルブミンラットへの移植実験では、線維芽細胞シート被覆肝細胞を、従来の門脈内移植、文献的報告の多い脾臓実質内移植、腎皮膜下移植、我々の目指す肝臓実質内移植、さらに大網、鼠径部、ADSC(脂肪)、皮下、筋肉、腹腔内にも移植し比較検討した(今までこれをきちんと比較した報告が存在しなかった)。血清アルブミン値の推移と免疫染色にて生着を評価した。

その結果最も生着効率が高いのは驚くことに門脈内肝細胞移植であった(線維芽細胞シート被覆による原始免疫反応を回避する効果があったと考えられる)。この結果は2018International Congress of The Transplantation Society (Spain Madrid)で報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Miyazawa K, Miyagi S, Nakanishi C, Hara Y, Tokodai K, Nakanishi W, Uematsu S, Shimizu K, Goto M, Kamei T, Unno M. Effect of Middle Hepatic Vein Tributaries Preserving Technique Until Just Before Graft Retrieval on Donors' Surgical Outcomes in Living Donor Liver Transplantation. *Transplant Proc.* 2018 Jun;50(5):1538-1543
2. Miyagi S, Nakanishi C, Hara Y, Nakanishi W, Tokodai K, Shimizu K, Uematsu S, Kumata H, Kakizaki Y, Goto M, Kamei T, Unno M, Satomi S. Correlation Between Splenectomy and Portal Vein Complications in Living Donor Liver Transplantation. *Transplant Proc.* 2018 Jun;50(5):1538-1543
3. Kakizaki Y, Miyagi S, Shimizu K, Miyazawa K, Nakanishi W, Tokodai K, Hara Y, Nakanishi C, Unno M, Kamei T, Goto M, Satomi S. The Effects of Short-term Subnormothermic Perfusion After Cold Preservation on Liver Grafts From Donors After Circulatory Death: An Ex Vivo Rat Model. *Transplantation* 2018; 102(4): e147-e154
4. Uematsu SS, Inagaki A, Nakamura Y, Imura T, Igarashi Y, Fathi I, Miyagi S, Ohuchi N, Satomi S, Goto M. The Optimization of the Prevascularization Procedures for Improving Subcutaneous Islet Engraftment. *Transplantation.* 2018 Mar;102(3):387-395

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Hiroyuki Ogasawara¹, Yuji Teramura^{2,3}, Takehiro Imura⁴, Akiko Inagaki⁴, Yoshikatsu Saito¹, Muneyuki Matsumura¹, Kengo Fukuoka¹, Ibrahim Fathi⁴, Shigehito Miyagi¹, Kristina Nilsson³, Kazuo Ohashi⁵, Michiaki Unno¹, Takashi Kamei¹, Susumu Satomi¹, Bo Nilsson³, Elisabet Gustafson⁶, Masafumi Goto^{1,2}. The optimization of the hepatocyte surface modification procedures in terms of heparin and apyrase for improving hepatocyte Engraftment. 27th International Congress of The Transplantation Society (国際移植学会) 発表年 2018.
2. Hiroyuki Ogasawara¹, Akiko Inagaki², Takehiro Imura², Yoshikatsu Saito¹, Muneyuki Matsumura¹, Kengo Fukuoka¹, Ibrahim Fathi², Shigehito Miyagi¹, Kazuo Ohashi³, Michiaki Unno¹, Takashi Kamei¹, Susumu Satomi¹ and Masafumi Goto^{1,2}. A comparison of the transplant efficiency between intraportal and intrasplenic procedures in hepatocyte transplantation. 27th International Congress of The Transplantation Society (国際移植学会) 発表年2018.
3. Shigehito Miyagi, Chikashi Nakanishi, Yasuyuki Hara, Wataru Nakanishi, Kazuaki Tokodai, Kenji Shimizu, Satomi Uematsu, Hiroyuki Kumata, Yuta Kakizaki, Masafumi Goto, Susumu Satomi, Michiaki Unno and Takashi Kamei. The risk factors for portal vein thrombosis after living donor liver transplantation in adults. 27th International Congress of The Transplantation Society (国際移植学会) 発表年2018.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

(1)研究代表者

宮澤 恒持 (Miyazawa Koji)
東北大学・大学病院 非常勤講師
研究者番号 80757237

(2)研究分担者

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

(3)研究分担者

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

(4)研究協力者

原 康之 (Hara Yasuyuki)
東北大学・大学病院 非常勤講師
研究者番号：50636008

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。