

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10504

研究課題名(和文) マージナルドナー肝移植とMuse細胞移植を融合した新たな末期肝不全治療法の開発

研究課題名(英文) The new method for the liver failure using the hybrid transplantation of the liver and Muse cells

研究代表者

宮城 重人 (Shigehito, Miyagi)

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：・ラットによるマージナルドナーグラフト+細胞ブースト移植実験は、生存困難であった。このため正常肝のラット過小グラフト移植モデルを作成し、こちらにMuse細胞のブースト移植をするモデルに変更した。
・30%過小グラフト肝移植+細胞ブーストモデルについては安定して生存するようになった。ただし、細胞ブーストなしでも生存率や生化学検査結果が変わらないため、20%か小グラフトモデルに変更した。ブースト細胞数だが、Muse採取量に限界があるため、10万、40万、100万個の移植細胞数での効果を見たところ、40万個で優位に再生能力を発揮することがICG検査等で確認された。詳細は論文にて公表する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝不全治療における新たな手法、臓器移植と細胞移植のハイブリッド移植という新たな治療の臨床応用へのきっかけを作ることができた。Muse細胞のすぐれた組織修復能力と抗炎症効果が確認でき、今後の再生医療におけるきっかけとなった。過小肝グラフト移植などにおける類洞内皮障害や門脈圧亢進症状(SFSS)の改善というレベルでの効果は、Museの組織修復能力は有効だと確認できた。今後の研究継続が必要である。

研究成果の概要(英文)：The treatment for the sinusoidal microcirculatory injury (SMI) induced by excessive shear stress to liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) is necessary for the regeneration. Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse) cells selectively home to the injured organ and repair by spontaneously differentiation. We hypothesized that intravenous administration of Muse cells might improve SMI the sinusoid. Then we evaluated the protective effects of Muse cells using an extra-small partial liver transplantation model in rats. The analysis of liver sinusoidal images, indocyanine green test, immunohistochemical stain of LSECs revealed that sinusoidal continuity, volume and surface area were protected significantly by administrated Muse cells. Furthermore, Ki-67 positive ratio of hepatocyte is higher in Muse group. The combination of cell transplantation using Muse cells and organ transplantation of small-for-size grafts is effective as a treatment for end-stage of liver disease.

研究分野：肝再生、肝移植

キーワード：Muse細胞 心停止ドナーグラフト 過小グラフト 酸素化灌流 類洞微小循環

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体肝移植における術後予後不良を引き起こす原因としてマージナルドナー肝移植(心停止ドナー肝移植や脂肪肝移植、過小グラフト肝移植による過小グラフト症候群(small-for-size syndrome(SFSS))などがある。本研究は当初、心停止ドナー肝移植に焦点を当てていたが、ラットによる心停止ドナー肝グラフト(死線期を経た心停止ドナーに温阻血30分をおいたモデル)+細胞ブースト移植実験は、生存率的にこのままのモデルでの実験継続は困難であった(なお、ブタは酸素還流モデルで細胞移植をせずに臓器移植のみの研究は継続中)。

そこで、我々はSFSSの克服に研究の焦点をうつした。SFSSは多因子疾患であるが、主病態の一つとして小さなグラフトに過剰な門脈血流が入ることによる類洞内皮障害が報告されている。類洞内皮障害を軽減することができれば過小グラフトでも安全に生体肝移植が可能となり(現在はドナーの残肝不足や移植肝グラフトボリューム不足のため、生体ドナー不適格とされるケースがかなり存在する)心停止ドナーに頼らないドナーソースの拡大にもつながる。さらには生体ドナーの負担軽減や、肝癌の肝切除にも応用が可能であり、肝再生医療の根本解決につながると考えられる。

一方、ヒト体内にもともと備わるstage specific embryonic antigen 3 (SSEA-3)で同定可能なMultilineage-differentiating Stress Enduring(Muse)細胞が報告されている。肝障害モデルでの改善や動脈瘤モデルにおける血管構成細胞への分化も認められている。近年、このエリート幹細胞であるMuse細胞の分離は、磁力を利用したMACSソーティングに移行し、効率を落とさずより簡便に採取精製することができるようになっており、本研究でも肝細胞への分化誘導が確認できた。そこで我々は極小肝移植ラットモデルを使用して、Museによる類洞保護効果を検討した。

2. 研究の目的

極小肝移植モデル(SFSSモデル)をラットで作成して、Museによる類洞保護効果を明らかにすることである

3. 研究の方法

正常肝のラット過小グラフト移植モデルを作成し、こちらにMuse細胞のブースト移植をするモデルに変更した。

- (1) まず30%過小グラフト肝移植モデル作成した。これについては安定して生存するようになった。その後、30%過小グラフト肝移植+細胞ブーストモデルを作成した。ただし、細胞ブーストなしでも生存率や生化学検査結果が変わらないため、実験モデルを変更することとした
- (2) 20%過小グラフト肝移植+細胞ブーストモデルを作成した。ブースト細胞数だが、Muse採取量に限界があるため、10万、40万、100万個の移植細胞数での効果を見た。

4. 研究成果

(1) 術後早期の類洞状態が肝再生に重要と報告されているため、術後早期に焦点を当てて評価した。

まず肝血流の評価であるICG検査にて、Museによる改善効果を40万個移植群にて認めた。

類洞の状態を臓器透明化手技により評価したところ、類洞の連続性や開存性が改善していた。また肝臓にMuse細胞が遊走していることを確認した。

類洞内皮表面マーカーであるIyve-1を免疫染色すると明らかにMuse群において表現が多かった。これらはMuse細胞によるtrophic効果によるものと思われる。これらデータから類洞微小循環が改善したことが証明された。

Muse細胞が分泌する肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor; HGF)や血管内皮増殖因子A(vascular endothelial growth factor A; VEGFA)に注目した。これらはMuse細胞においてMSCよりも発現量が高いことが確認できた

⑤ 肝細胞の増殖を表すKi-67染色でMuse群は有意に増加していることが示された。以上よりMuse細胞による類洞保護効果およびそれに伴う肝再生促進効果がみられた。

(2) マージナルドナー全肝グラフト(死線期を経た心停止ドナーに温阻血 30 分をおいたモデル) + 細胞ブースト移植モデルを作成し、ブタ移植実験を施行。

モデルについての詳細は *Cytoprotective Effects of Mesenchymal Stem Cells During Liver Transplantation from Donors After Cardiac Death in Rats*. Sasajima H, Miyagi S, Kakizaki Y, Kamei T, Unno M, Satomi S, Goto M. *Transplant Proc.* 2018 Nov;50(9):2815-2820. に掲載したが、これは MSC の細胞ブーストモデルまでについての報告である。

Muse 細胞ブーストも出つについては、前述もした通り、Muse 細胞収量が足りないため現在延期中である。

(3) その前段階として、まずは細胞移植を付加しない、マージナルドナーグラフト酸素化移植モデルを作成し還流実験を施行した。

類洞環境改善効果を見るため冷保存前酸素化一時還流したところ、予想外にマージナルグラフトの Viability が改善した。

これをうけて、より臨床応用可能な冷保存後移植直前の酸素化一時還流したところ、肝移植後生着率・生存率が上昇した (3/5 vs 0/5)。

同モデルでは、光学顕微鏡所見で、類洞の開存傾向が認められた

さらに炎症性サイトカイン (TNF および IL-1) の低下を認めた。

詳細は、*The Effects of Short-term Subnormothermic Perfusion After Cold Preservation on Liver Grafts From Donors After Circulatory Death: An Ex Vivo Rat Model*. Kakizaki Y, Miyagi S, Shimizu K, Miyazawa K, Nakanishi W, Tokodai K, Hara Y, Nakanishi C, Unno M, Kamei T, Goto M, Satomi S. *Transplantation.* 2018 Apr;102(4):e147-e154. doi: 10.1097/TP.0000000000002080. に掲載。

このため

ラットにおいても同実験系を作成し、メカニズム解明を行った。今後このモデルをハイブリッド移植のベースとし MSC 細胞ブースト移植をトライしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakanishi C1, Miyagi S1, Tokodai K1, Nakanishi W1, Nishimura R1, Goto M2, Unno M1, Kamei T1.	4. 巻 24
2. 論文標題 Pediatric Living-Donor Liver Transplant Recipients without Transition After Reaching Adulthood	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Transplant. 2019 Jan 8;24:18-24	6. 最初と最後の頁 18-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12659/AOT.911544.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sasajima H, Miyagi S, Kakizaki Y, Kamei T, Unno M, Satomi S, Goto M.	4. 巻 50(9)
2. 論文標題 Cytoprotective Effects of Mesenchymal Stem Cells During Liver Transplantation from Donors After Cardiac Death in Rats.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transplant Proc. 2018 Nov;50(9):2815-2820.	6. 最初と最後の頁 :2815-2820
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2018.02.180. Epub 2018 Mar 20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu K, Miyagi S, Maida K, Nakanishi W, Hara Y, Tokodai K, Nakanishi C, Umeda Y, Satomi S, Goto M, Unno M, Kamei T.	4. 巻 50(9)
2. 論文標題 Arterial Complication After Simultaneous Pancreas-Kidney Transplantation From an Abdominal Aortic Aneurysm Donor: A Case Report.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transplant Proc. 2018 Nov;50(9):2891-2894.	6. 最初と最後の頁 2891-2894
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2018.02.188. Epub 2018 Mar 20.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 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.	4. 巻 50(9)
2. 論文標題 Correlation Between Splenectomy and Portal Vein Complications in Living Donor Liver Transplantation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transplant Proc. 2018 Nov;50(9):2611-2613.	6. 最初と最後の頁 2611-2613.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2018.03.104. Epub 2018 Mar 19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyazawa K, Miyagi S, Nakanishi C, Hara Y, Tokodai K, Nakanishi W, Uematsu S, Shimizu K, Goto M, Kamei T, Unno M.	4. 巻 50(5)
2. 論文標題 Effect of Middle Hepatic Vein Tributaries Preserving Technique Until Just Before Graft Retrieval on Donors' Surgical Outcomes in Living Donor Liver Transplantation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transplant Proc. 2018 Jun;50(5):1538-1543.	6. 最初と最後の頁 1538-1543.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2018.02.061. Epub 2018 Apr 25.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kakizaki Y, Miyagi S, Shimizu K, Kumata H, Matsumura M, Miyazaki Y, Fukuoka K, Uematsu SS, Tokodai K, Hara Y, Nakanishi C, Unno M, Kamei T, Goto M	4. 巻 49(10)
2. 論文標題 Effects of Subnormothermic Perfusion Before Transplantation for Liver Grafts from Donation After Cardiac Death: A Simplified Dripping Perfusion Method in Pigs. .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transplant Proc. 2018 Jun;50(5):1538-1543.	6. 最初と最後の頁 2315-2317.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.transproceed.2018.02.061. Epub 2018 Apr 25.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kakizaki Y, Miyagi S, Shimizu K, Miyazawa K, Nakanishi W, Tokodai K, Hara Y, Nakanishi C, Unno M, Kamei T, Goto M, Satomi S.	4. 巻 102(4)
2. 論文標題 The Effects of Short-term Subnormothermic Perfusion After Cold Preservation on Liver Grafts From Donors After Circulatory Death: An Ex Vivo Rat Model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transplantation. 2018 Apr;102(4):e147-e154.	6. 最初と最後の頁 e147-e154.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1097/TP.0000000000002080.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kakizaki Y, Miyagi S, Shimizu K, Miyazawa K, Nakanishi W, Tokodai K, Hara Y, Nakanishi C, Unno M, Kamei T, Goto M, Satomi S.	4. 巻 102(4)
2. 論文標題 The Effects of Short-term Subnormothermic Perfusion After Cold Preservation on Liver Grafts From Donors After Circulatory Death: An Ex Vivo Rat Model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transplantation. 2018 Apr;102(4):e147-e154.	6. 最初と最後の頁 e147-e154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1097/TP.0000000000002080.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uematsu SS, Inagaki A, Nakamura Y, Imura T, Igarashi Y, Fathi I, Miyagi S, Ohuchi N, Satomi S, Goto M.	4. 巻 102(3)
2. 論文標題 The Optimization of the Prevascularization Procedures for Improving Subcutaneous Islet Engraftment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transplantation. 2018 Mar;102(3):387-395	6. 最初と最後の頁 387-395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1097/TP.0000000000001970.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukuoka K, Inagaki A, Nakamura Y, Matsumura M, Yoshida S, Imura T, Igarashi Y, Miyagi S, Ohashi K, Enosawa S, Kamei T, Unno M, Ohuchi N, Satomi S, Goto M.	4. 巻 3(7)
2. 論文標題 The Optimization of Short-Term Hepatocyte Preservation Before Transplantation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Transplant Direct. 2017 Jun 19;3(7):e176	6. 最初と最後の頁 e176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1097/TXD.0000000000000687.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyagi S, Kakizaki Y, Satomi S, et al(total11, First).	4. 巻 48(2)
2. 論文標題 Arterial and biliary complications after living donor liver transplantation: a single-center retrospective study and literature review.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Surg Today. 2018 Feb;48(2):131-139.	6. 最初と最後の頁 131-139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s00595-017-1515-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tokodai K, Miyagi S, Nakanishi C, Goto M, et al(total18, Second).	4. 巻 3(8)
2. 論文標題 Impact of the Trough Level of Calcineurin Inhibitor on the Prevalence of Donor-Specific Human Leukocyte Antigen Antibodies During Long-Term Follow-Up After Pediatric Liver Transplantation: Antibody Strength and Complement-Binding Ability.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Transplant Direct. 2017 Jul 11;3(8):e196.	6. 最初と最後の頁 e196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1097/TXD.0000000000000713	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 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.
2. 発表標題 The risk factors for portal vein thrombosis after living donor liver transplantation in adults
3. 学会等名 27th International Congress of The Transplantation Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Ogasawara ¹ , Yuji Teramura ^{2,3} , Takehiro Imura ⁴ , Akiko Inagaki ⁴ , Yoshikatsu Saito ¹ , Muneyuki Matsumura ¹ , Kengo Fukuoka ¹ , Ibrahim Fathi ⁴ , Shigehito Miyagi ¹ , Kristina Nilsson ³ , Kazuo Ohashi ⁵ , Michiaki Unno ¹ , Takashi Kamei ¹ , Susumu Satomi ¹ , Bo Nilsson ³ , Elisabet Gustafson ⁶ , Masafumi Goto ^{1,2}
2. 発表標題 The optimization of the hepatocyte surface modification procedures in terms of heparin and apyrase for improving hepatocyte engraftment
3. 学会等名 27th International Congress of The Transplantation Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Ogasawara ¹ , Akiko Inagaki ² , Takehiro Imura ² , Yoshikatsu Saito ¹ , Muneyuki Matsumura ¹ , Kengo Fukuoka ¹ , Ibrahim Fathi ² , Shigehito Miyagi ¹ , Kazuo Ohashi ³ , Michiaki Unno ¹ , Takashi Kamei ¹ , Susumu Satomi ¹ and Masafumi Goto ^{1,2}
2. 発表標題 A comparison of the transplant efficiency between intraportal and intrasplenic procedures in hepatocyte transplantation
3. 学会等名 27th International Congress of The Transplantation Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柿崎裕太, 宮城重人, 清水健司, 熊田博之, 松村宗幸, 宮崎勇希, 福岡健吾, 植松智海, 原康之, 戸子台和哲, 中西史, 海野倫明, 亀井尚
2. 発表標題 心停止下摘出肝グラフトに対する移植前室温酸素化灌流の臓器保存効果
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮城重人、中西史、戸子台和哲、原康之、中西渉、西村隆一、清水健司、福岡健吾、松村宗幸、熊田博之、里見進、亀井尚、海野倫明
2. 発表標題 生体肝移植における微小胆管に対する顕微鏡下胆道再建法の短期成績及び胆道狭窄の危険因子の検討
3. 学会等名 日本肝移植研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮城重人、戸子台和哲、中西 渉、西村隆一、藤尾淳、佐々木健吾、福岡健吾、熊田博之、柿崎裕太、藤盛啓成、後藤昌史、亀井尚、海野倫明
2. 発表標題 脳死肝摘出オールジャパン体制は是か否か 肝臓移植を同チームで施行する立場から
3. 学会等名 日本移植学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤純健1), 稲垣明子2), 猪村武弘2), 猪村梢2), Ibrahim Fathi2), 小笠原弘之1), 宮城重人1), 亀井尚1), 海野倫明1), 安波洋一3), 後藤昌史2)
2. 発表標題 豚島との共移植が肝細胞生着へ及ぼす影響に関する検討
3. 学会等名 日本臓器保存生物医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹嶋秀憲, 宮城重人, 柿崎裕太
2. 発表標題 大動物を用いた心停止ドナー肝グラフトに対する間葉系幹細胞による保護効果の検証
3. 学会等名 日本臓器保存生物医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideaki Sasajima ¹ , Shigehito Miyagi ¹ , Yuta Kakizaki ¹ , Takashi Kamei ¹ , Michiaki Unno ¹ , Susumu Satomi ¹ , and Masafumi Goto
2. 発表標題 The Cytoprotective Effects of Mesenchymal Stem Cells on Liver Transplantation from Donors after Cardiac Death
3. 学会等名 15th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Koji Miyazawa, Shigehito Miyagi, Chikashi Nakanishi, Yasuyuki Hara, Kazuaki Tokodai, Wataru Nakanishi, et al (total11, second).
2. 発表標題 Effect of the middle hepatic vein tributaries preserving technique just until graft retrieving on donors' surgical outcomes in living donor liver transplantation
3. 学会等名 15th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松村 宗幸, 猪村 武弘, 小笠原 弘之, 福岡 健吾, 稲垣 明子, 宮城 重人, 海野 倫明, 亀井 尚, 里見 進, 後藤 昌史
2. 発表標題 移植前肝細胞におけるviability評価法としてのADP/ATP assayの有用性に関する検証
3. 学会等名 日本臓器保存生物医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笹嶋 秀憲 宮城 重人
2. 発表標題 心停止ドナー肝グラフトに対する 間葉系幹細胞による保護効果の検証
3. 学会等名 日本臓器保存生物医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柿崎裕太, 宮城重人, 清水健司, 熊田博之, 松村宗幸, 宮崎勇希, 福岡健吾, 植松智海, 原康之, 中西史, 海野倫明, 亀井尚
2. 発表標題 ブタ心停止ドナーモデルにおける肝移植前酸素化室温灌流の臓器保存効果
3. 学会等名 日本移植学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	後藤 昌史 (Goto Masafumi) (50400453)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	戸子台 和哲 (Tokodai Kazuaki) (50581641)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	原 康之 (Hara Yasuyuki) (50636008)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	
研究分担者	中西 渉 (Nakanishi Wataru) (50636024)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	宮澤 恒持 (Miyazawa Koji) (80757237)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	