

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18069

研究課題名(和文)ALPPSと脱細胞化技術を組み合わせた新規in situ肝再生法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel in situ liver regeneration method combining ALPPS and decellularization technology

研究代表者

黒田 晃平(Kuroda, Kohei)

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号：20825400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、効率的な肝臓再生医療を実現するために、近年開発された新術式である二期的肝切除術(ALPPS)を応用し、体内で肝臓の一部を細胞外骨格の足場構造として利用する新しい手法を開発することである。ブタを用いたALPPSを確立し、左門脈枝を確保し、界面活性剤を灌流し、廃液を左肝静脈から体外へ排出する手法によって細胞洗浄試薬の循環を局所で制御することに成功した。また脱細胞化後に血管系を縫合することにより血液の再循環にも成功しており、生体内でも構造を維持したまま脱細胞化可能であることが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで脱細胞化に関する研究は、生体外で脱細胞化臓器に細胞を生着させ人工臓器を作出するといったコンセプトのものが大半であった。生体外で作製された臓器は移植手術が必要な点や臓器のサイズ等の問題が存在した。一方、自己の臓器を使用する場合には、これらの問題が解決されるだけでなく、免疫拒絶の心配がなく、異種移植のような安全面や倫理的問題も存在しない。今回確立した生体内脱細胞化手法は、まだまだ不十分な点は多くさらなる検討は必要であるが、生体外で作出する人工臓器が抱える問題を一気に解決しうる、新しい肝再生技術基盤の足がけとなることが想定される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a new technique to utilize a part of the liver as a scaffold structure for the cellular exoskeleton in the body by applying a recently developed new technique, the two-stage hepatectomy with liver regeneration (ALPPS), in order to realize efficient liver regenerative medicine. We established ALPPS using pigs and succeeded in controlling the circulation of cell washing reagents locally by a technique in which the left portal vein branch is secured, surfactant is perfused, and the waste fluid is drained out of the body through the left hepatic vein. The technique also succeeded in recirculating blood by suturing the vasculature after decellularization, proving that decellularization can be performed in vivo with the structure maintained.

研究分野：生体組織工学

キーワード：生体内脱細胞化 ALPPS ECM

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脱細胞化は臓器より細胞成分を除去した骨格を利用する技術である。これまで脱細胞化に関する研究は、生体外で脱細胞化臓器に細胞を生着させ人工臓器を作出するといったコンセプトのものが大半であった。しかし、生体外で作製された臓器は移植手術が必要な点や臓器のサイズ等の問題、異種移植における安全面や倫理面の問題などが存在した。そこで我々はそれらの問題を解決するために自身の臓器を用いる手法を検討した。生体にとって最も親和性がよい細胞外環境は自身の臓器である。よって自身の臓器を用いて脱細胞化臓器を作成すれば移植による拒絶もない、より優れた臓器再生が期待できるのではないかとこの着想に至り、生体内で部分的な脱細胞化をおこなう本手法を考案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ALPPS で用いる肝離断法に我々がこれまで開発してきた臓器の脱細胞化法を合わせることで、体内で肝臓の一部を骨格として利用する新しい手法を開発することである。本課題では、ALPPS を応用することで脱細胞化試薬の循環を標的の肝葉に限定することで、大循環への試薬の流出を制限しながら生体内での部分的な肝脱細胞化を完了する手法を検討した。

3. 研究の方法

(1) 摘出肝臓での検討

豚から摘出した肝臓を用いて各肝葉へ分岐する主要な門脈および静脈にカニューレーションを行った。その後、葉間裂を基準として確保した血管は残しつつ肝実質離断を行なった。離断後、脱細胞化試薬を確保した各血管より灌流し、試薬が大循環へ流出せず限局した部分脱細胞化が可能な血管確保位置や肝実質の離断部位を決定した。

(2) 生体での検討

20kg のブタを麻酔下にて開腹し、(1)で決定した門脈および静脈を確保後、肝実質の離断を行なった。肝実質の離断後、脱細胞化試薬の灌流を開始し、肝臓の一部の葉に限局した生体内脱細胞化を実施した。また灌流後の廃液は可及的に吸引廃棄した。脱細胞化中には大循環側の静脈および門脈は遮断しておき、脱細胞完了後に縫合することにより血流の再循環を行なった。

4. 研究成果

(1) 主要な門脈および静脈にカニューレーションを行い検討したところ、解剖学的な脈管の分岐等から左葉へ向かう脈管系の確保が最も用意かつ肝臓の損傷が少ないと思われた。また左門脈枝は内側および外側左葉への分岐部が比較的肝臓表面に位置するため、カニューレーションの位置を工夫することで灌流を外側左葉のみ限定することが可能であった。一方、豚の肝静脈は、肝臓内で後大静脈と合流している。よって、左肝静脈のみを確保するためには後大静から肝実質を一部剥離し分岐部を確保する必要性があった。しかし、右や中央部の肝区域と比較すると分岐部は最も肝表面に近い位置であった。また豚の肝臓は人の肝臓と違い葉間裂が明瞭である。そのため、葉間裂を基準として肝実質離断を行う方が、肝臓表面より血管までの距離が近くより実質の損傷を軽減することが可能であった。また肝実質損

傷部が少ないため灌流液の流出をより抑制する結果となった。摘出肝臓にて、検討した部位での血管確保および肝離断を実施し、脱細胞化試薬の灌流を実施したところ、肝臓外側左葉に局限した脱細胞化が可能であった。

(2) 摘出肝臓での検討で決定した部位にて血管確保および肝離断を実施した。その結果、生体においても大きな問題なく血管の確保は可能であった。肝実質の離断においては、小さな血管からの出血が認められたが、イリゲーションバイポーラなどの止血デバイスの使用により大出血には至らずに確保した血管を残して離断が可能であった。肝離断の完了

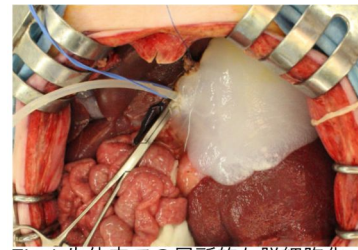


Fig.1 生体内での局所的な脱細胞化

後、門脈へ挿入したカテーテルから PBS、milliQ 水、0.5% triton-X+0.05 % EGTA 溶液、0.5% SDS 溶液を順に灌流することで生体内でも外側左葉に局限した脱細胞化が可能であった(Fig.1)。一部を切除し、術後に病理学的に評価を行ったところ、脱細胞化部位には細胞や核の残像はなく、その他肝葉には試薬による影響は認められなかった(Fig.2)。また免疫染色では collagen I, collagen IV, laminin といった ECM 成分の残存が確認された(Fig.3)。脱細胞化を実施している間、灌流液は大循環へ流入した様子はなく、バイタルにも大きな変化は認められなかった。脱細胞化完了後、血管系を縫合し血液の再循環を行った。漏出なく血管に沿って血液が循環する様子が認められた。

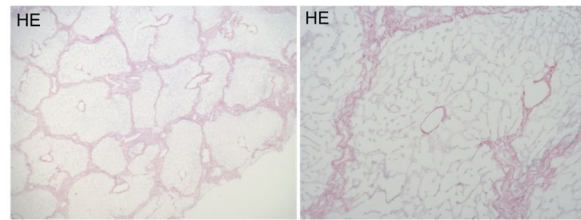


Fig.2 脱細胞化後のHE

た(Fig.2)。また免疫染色では collagen I, collagen IV, laminin といった ECM 成分の残存が確認された(Fig.3)。脱細胞化を実施している間、灌流液は大循環へ流入した様子はなく、バイタルにも大きな変化は認められなかった。脱細胞化完了後、血管系を縫合し血液の再循環を行った。漏出なく血管に沿って血液が循環する様子が認められた。

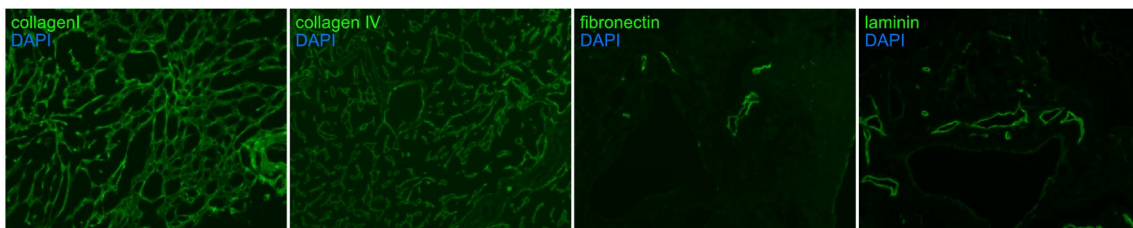


Fig.3 ECM成分の残存

本検討から灌流を局所に制御することで生体内での部分的な脱細胞化が可能であることが示された。また細胞接着に重要な ECM 成分の残存が生体内脱細胞化でも認められたことから、血流からの幹細胞や再細胞化による細胞の生着の可能性が示唆された。今回確立した生体内脱細胞化手法は、まだまだ不十分な点は多く今後より最適な条件や細胞生着に関する検討が必要ではあるが、脱細胞化技術が抱える臓器ソースといった問題を解決する可能性が示唆された。本技術の検討が更に進めば、生体外で作出する人工臓器が抱える問題を一気に解決する、新しい肝再生技術の基盤となることが想定される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒田晃平、八木洋、田島一樹、蛭川和也、櫛笥博子、北川雄光
2. 発表標題 自己臓器再生を誘導するためのIn Situ肝部分脱細胞化の検討
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------