

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23609

研究課題名(和文) バイオ3Dプリンターによるバイオ人工胆管技術に基づく胆道再生医療

研究課題名(英文) Bile duct reconstruction using scaffold-free tubular constructs created by Bio-3D printer

研究代表者

浜田 隆志 (Hamada, Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・研究協力員

研究者番号：80849498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：家畜ブタの皮膚から線維芽細胞を培養し、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。次にブタの総胆管(肝臓から消化管へ流れる胆汁の通り道)を切離し同部位にバイオ人工胆管を移植し、術後2週目に肝臓を含めて摘出し評価を行った。結果、移植前後での血液検査では肝機能に異常は認められず、さらに移植された総胆管の胆道造影検査では造影剤の漏れや狭窄所見を認めなかった。病理組織学的検査ではバイオ人工胆管を確認でき、連続性を確認した。また、バイオ人工胆管周囲組織に血管新生を認めた。従って、バイオ人工胆管の作製、移植に成功したと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道手術や肝移植における胆管胆管吻合の合併症として胆道狭窄が生じることがある。胆道狭窄を解決するため、生体ポリマーやscaffold(細胞の接着、増殖、分化を制御するための細胞培養基材であり足場、骨格のようなもの)を利用した様々な人工胆管の研究があるが、現在までに臨床応用されているものはない。そこで今回、胆管狭窄部を置換可能なscaffold-freeである細胞のみで構成されたバイオ人工胆管を作製し、ブタへの移植(総胆管の置換)に成功した。今後この研究が進めば、実際の臨床現場での人工胆管移植が実現し、これまで困難であった胆管吻合の合併症の治療の一助になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Fibroblasts were cultured from domestic pig skin, and a Bio-3D printer was used to create a ductal structure (Bio-artificial bile duct) made entirely of porcine-derived fibroblasts. Then, the common bile duct (the duct of bile flowing from the liver to the digestive tract) of the pig was removed and the Bio-artificial bile duct was implanted. The bile duct was removed and evaluated two weeks after implantation. As a result, blood tests before and after the transplantation showed no abnormal in liver function. Additionally, cholangiography of the implanted common bile duct showed no evidence of leakage or stenosis. Histopathological examination confirmed the continuity between Bio-artificial bile duct and recipient bile duct. Furthermore, angiogenesis was observed in the tissue surrounding the Bio-artificial bile duct. The Bio-artificial bile duct was successfully created and implanted.

研究分野：消化器外科学

キーワード：バイオ人工胆管 scaffold-free 総胆管の置換 バイオ3Dプリンター ブタ線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胆道狭窄は肝胆膵手術後の最も厄介な合併症の一つである。例えば、医原性胆管損傷 (IBDI) は腹腔鏡下胆嚢摘出術に伴う重大な合併症であり、胆管狭窄を生じる。近年の外科医の腹腔鏡手術技術の向上にもかかわらず、IBDI の発生率は腹腔鏡下胆嚢摘出術において 3% であり、開腹胆嚢摘出術の 0.1 ~ 0.5% と比較して高い。また、肝移植術後においても胆道狭窄は重大な合併症である。胆道合併症は、脳死肝移植よりも生体肝移植の方が高頻度であり、その発生率は 10 ~ 50% と報告されている。

肝移植に伴う胆道狭窄や IBDI に対する標準的な治療法は、内視鏡でのステント留置が主流である。しかし、ステントは長期間留置されるため、詰まってしまうことがあり、定期的な交換が必要がある。さらに、内視鏡でのステント挿入が困難な場合は、Roux-en-Y による胆管空腸吻合術が必要となる。しかし、胆管空腸吻合においては逆行性感染、瘢痕組織形成による狭窄のリスクがある。胆道狭窄に対する再手術はより複雑である。また、経皮経肝的胆道ドレナージはチューブ管理が難しく、患者の QOL を著しく低下させる。

これらの胆道合併症を克服するため、胆管の代わりとして多くの人工胆管が研究されてきたが、免疫反応や人工胆管の素材の安全性、感染、急性アレルギー反応など様々な問題があり、臨床応用されたものはない。

中山らは、細胞のみを用いて scaffold free の管状構築物を作製できる Bio-3D プリンターを開発した。現在までに、Bio-3D プリンターは、血管、末梢神経、横隔膜、気管、食道の作製に使用されてきた。しかし、Bio-3D プリンターを用いた胆管の作製はまだ報告されていない。

2. 研究の目的

我々は、狭窄した胆管を置き換えるための移植片として、チューブ状の構築物を移植することで、胆道合併症を治療できると仮定した。今回、胆管狭窄部を置換することが可能な scaffold-free である細胞のみで構成されたバイオ人工胆管を作製し、その治療への応用の可能性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は豚のモデルを用いて検証された。同種移植であったために、各実験で 2 匹のブタを使用した。1 匹のブタから皮膚を採取し、もう 1 匹のブタを人工胆管の移植に用いた。人工胆管の移植は 5 組に行ったので、合計 10 頭のブタを使用した。すべての実験は、長崎大学の施設動物実験委員会の承認 (第 1711131424 号) を受け、施設および国のガイドラインに準拠して行った。

(1) 線維芽細胞培養

ブタの皮膚は、全身麻酔下で摘出した。ケタミン (5 mg/kg) およびミダゾラム (5 mg/kg) を筋肉内に投与して前投薬した後、セボフルラン (2-3%) を持続吸入して全身麻酔下に大腿部周辺の皮膚を切除した。線維芽細胞を分離するために、Explant 法を用いて培養した。簡潔に記載すると、摘出した皮膚を、抗生物質を含んだ生理食塩水で十分に洗浄した後に、皮膚から真皮を分離、細断 (1-2 mm²) し、培地にまいた。1 週間培養後に線維芽細胞が放射状に増殖していることを確認できた状態で、真皮断片を除去した。その後 5 回の継代を行い、人工胆管作製に十分な細胞数の線維芽細胞を取り出した。

(2) Bio-3D プリンターを用いて管状構造体を作製

培養した線維芽細胞を凝集させて、スフェロイド (細胞塊) を形成した。続いて Bio-3D プリンターを用いてスフェロイドを 1 つずつ自動的に 7mm のニードルアレイに刺し、管状構造体を作製し、培養した。約 1 週間後、スフェロイドは融合し、ニードルアレイを取り外した。その後、強度を高めるために、3 ヶ月間培養を行った。3 ヶ月後、十分な強度を持つ線維芽細胞チューブ (バイオ人工胆管) が完成した。

(3) 牽引強度試験

一軸牽引装置 (EZ-L; 島津製作所、日本、京都) を用いて行った。作製した人工胆管にフックをかけて徐々に引き離していき、強度 (N) を測定した。

(4) ブタへの人工胆管移植

移植実験には体重約 12kg のブタを使用した。全身麻酔をかけた後、上腹部正中切開で手術を開始した。肝臓を頭側に持ち上げ、腸を尾側に移動して肝十二指腸靭帯内の総胆管を確認し、露出させた。次に総胆管を胆嚢管との合流部で切断し、バイオ人工胆管を移植した。総胆管とバイオ人工胆管は PDS-II 6-0 (Ethicon, Inc., Somerville, NJ, USA) を用いて吻合した。胆管周囲には大網を寄せず、そのままの状態に閉腹した。

術後 1 日目からブタに水と餌を与え、術後 1 日目から 13 日目まで毎日、抗生剤および免疫抑制剤（タクロリムス）を摂取させた。術後 14 日目に、ブタを犠牲死させ、バイオ人工胆管移植部位を肝臓と十二指腸とともに一括摘出した。

(5) 血液生化学検査

移植当日、術後 7 日目、術後 14 日目にブタの頸静脈から血液を採取し、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、総ビリルビン（T-Bil）、アルカリホスファターゼ（ALP）、g-グルタミルトランスペプチダーゼ（g-GTP）およびクレアチニン（Cr）を測定した。肝機能検査（T-Bil、AST、ALT、ALP、g-GTP）の結果は、移植を行わずに胆道再建のみを行ったブタと比較した。

(6) 放射線検査

21G シリコンカテーテルを Vater 膨大部に挿入し、60% diatrizoate を用いて胆道造影を行った。胆管造影後、3 次元マイクロ CT を施行し 3D 画像再構成ソフトウェアを用いて解析した。

(7) 病理組織学的検査

組織をヘマトキシリン・エオジン（H&E）および AZAN で染色した。すべての染色手順は、標準的な染色プロトコルを用いて行った。免疫組織化学的検査も行い、マウスモノクローナル抗ブタサイトケラチン（CK）7 抗体、ウサギポリクローナル抗ブタ（CK）19 抗体およびウサギポリクローナル抗ブタ分化群（CD）31 抗体にて評価した。

4. 研究成果

実験を行ったブタはすべて健康で 14 日間の実験期間中に少し体重が増えた。バイオ人工胆管移植を行ったブタは、移植を行わなかったブタと同様に体重の増加が見られた。術後合併症や閉塞性黄疸の兆候、例えば白色便などは認められなかった。

(1) 血液生化学検査

バイオ人工胆管を移植されたブタでは、血清中の T-Bil、AST、ALT、ALP、g-GTP の濃度は実験期間中に大きく変化せず、すべてのブタがすべての時点で正常な Cr 値を示した。〔AST(IU/L):34(POD0) vs 46(POD14), ALT(IU/L):50 vs 68, T-Bil(mg/dL):0.041 vs 0.091, ALP(IU/L):691 vs 550, g-GTP(IU/L):36 vs 50, Cr(mg/dL):0.67 vs 0.67〕。バイオ人工胆管移植を行ったブタと、移植を行わずに胆管再建のみを行ったブタの血液検査を比較すると T-Bil、AST、g-GTP には有意差はみられなかったが、ALT、ALP には有意差がみられた。ALP については、POD0 に有意差があったため、上昇率で比較した（POD7/POD0、POD14/POD7、POD14/POD0）ところ、有意差は認められなかった。

(2) 引張強度試験

最大荷重は、バイオ人工胆管で 4.575 N、生来の胆管で 13.375 N であった。バイオ人工胆管の牽引強度は生来の胆管よりも低かったが、その強度は縫合が可能な程度に十分に高いものであった。これらの結果から、バイオ人工胆管の牽引強度は比較的高く、吻合に十分な強度を有していると判断した。

(3) 画像所見

術後 14 日目の胆管造影では、肝内胆管は拡張していなかった。胆汁の流れは一定で、胆汁漏はないことを確認できた。3 次元マイクロ CT により移植部位を詳細に観察した。造影剤の圧力により固有胆管が拡張し、固有胆管とバイオ人工胆管との接合部が狭くなったように見えたが、開存していた。

(4) 病理組織学的診断

移植部位の周囲には緩やかな線維性癒着があり、移植されたバイオ人工胆管に容易に到達することができた。移植部位はわずかに肥厚しており、移植片の外層は本来の管と区別がつかないほどであった。さらに、バイオ人工胆管の形状に目立った変化はなく、すべての切除標本で管状構造が維持されていた。どのブタも胆汁漏や腹膜炎の兆候を示さなかった。

H&E および AZAN 染色では、移植部位に線維芽細胞が管状に残存していた。AZAN 染色切片では、バイオ人工胆管の周囲に連続した線維性組織が認められた。バイオ人工胆管の内腔側には凝固壊死組織が存在したが、バイオ人工胆管と生来の胆管との連続性を確認できた。CK7 と CK19 で免疫組織化学的に評価したところ、胆道上皮はバイオ人工胆管には及んでいなかった。一方で CD31 を用いて評価すると、移植したバイオ人工胆管の外層に血管新生を認めた。また、吻合部においても密な血管新生が認められた。

以上から本研究にて線維芽細胞を用いた scaffold-free の管腔構造体が、バイオ人工胆管として移植可能であることが明らかとなった。線維芽細胞を用いた理由は線維芽細胞を容易に培養でき、機械的強度が期待できたためである。また、本研究で作製したバイオ人工胆管の強度は

縫合可能であるほど十分に高く、さらに胆汁による化学的刺激にも耐えられることも明らかとなった。

吻合部狭窄の大きな原因の一つが虚血による局所炎症である。本研究では吻合部狭窄は認めなかった。その理由として、免疫組織化学的所見においてバイオ人工胆管の管内と吻合部側面に新生血管が存在していることから、吻合部に十分な血液を供給していたことにより狭窄が生じなかったと考えられる。胆道上皮においても新生血管は不可欠であり、管腔内で血管新生が認められたことにより長期観察によって周囲より伸展する可能性があり、さらなる研究が必要である。

組織工学によって生成された生体適合性の高い scaffold は臨床的応用が期待される一方、レシピエントの免疫反応、分解産物の長期的な安全性や感染リスクなどの問題も含んでいる。本研究で作製した scaffold free の管状構造体は細胞のみで構成され、生体適合製剤は使用されていないため、アレルギーや感染症のリスクが軽減され、また scaffold の分解産物がないため、毒性の懸念がない。

本研究で用いた線維芽細胞は患者自身の皮膚から簡便かつ低侵襲で採取でき効率的に培養可能であり、自家移植への臨床応用を考える際に有用な細胞源と考える。本研究により、細胞による scaffold free の管状構造体を用いたバイオ人工胆管の移植の実施可能性を大動物モデルで証明した。今後、長期例での有効性、安全性や組織学的変化を明らかにすることにより、胆道狭窄に対する革新的な再生治療法につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takashi Hamada, Anna Nakamura, Akihiko Soyama, Yusuke Sakai, Takayuki Miyoshi, Shun Yamaguchi, Masaaki Hidaka, Takanobu Hara, Tota Kugiyama, Mitsuhsa Takatsuki, Akihito Kamiya, Koichi Nakayama, Susumu Eguchi.	4. 巻 16
2. 論文標題 Bile duct reconstruction using scaffold-free tubular constructs created by Bio-3D printer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 81-89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2021.02.001.	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 濱田隆志, 原 貴信, 釘山統太, 川口雄太, 吉元智子, 田中貴之, 大野慎一郎, 足立智彦, 金高賢悟, 江口 晋
2. 発表標題 パイオ3Dプリンターを用いた細胞のみの人工胆管の作製と移植効果
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 濱田隆志, 中村アンナ, 曾山明彦, 堺 裕輔, 三好敬之, 山口 峻, 日高匡章, 夏田孔史, 釘山統太, 田中貴之, 大野慎一郎, 足立智彦, 紙谷聡英, 中山功一, 江口 晋
2. 発表標題 細胞のみで構成される管腔構造体を用いたパイオ人工胆管の作製
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hamada T, Soyama A, Nakamura A, Sakai Y, Miyoshi T, Yamaguchi S, Hidaka M, Hara T, Kugiyama T, Takatsuki M, Kamiya A, Nakayama K, Eguchi S
2. 発表標題 Bile duct reconstruction using scaffold-free tubular constructs created by a Bio-3D Printer for transplantation
3. 学会等名 28th International Congress of The Transplantation Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 濱田隆志, 中村アンナ, 曾山明彦, 宮本大輔, 三好敬之, 山口 峻, 原 貴信, 田中貴之, 足立智彦, 日高匡章, 金高賢悟, 紙谷聡英, 中山功一, 江口 晋
2. 発表標題 細胞のみで構成される管腔構造体を用いたバイオ人工胆管の作製と移植
3. 学会等名 第56回日本移植学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 濱田隆志, 中村アンナ, 曾山明彦, 堺 裕輔, 三好敬之, 山口 峻, 原 貴信, 松島 肇, 田中貴之, 足立智彦, 日高匡章, 伊藤信一郎, 金高賢悟, 紙谷聡英, 中山功一, 江口 晋
2. 発表標題 細胞のみで構成される管腔構造体を用いたバイオ人工胆管の作製
3. 学会等名 第58回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hamada T, Nakamura A, Soyama A, Sakai Y, Miyoshi T, Yamaguchi S, Hidaka M, Hara T, Kugiyama T, Kamiya A, Nakayama K, Eguchi S
2. 発表標題 Bile Duct Reconstruction Using Scaffold-Free Tubular Constructs Created by Bio 3D Printer
3. 学会等名 日本肝胆膵外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takashi Hamada, Anna Nakamura, Akihiko Soyama, Yusuke Sakai, Takayuki Miyoshi, Masaaki Hidaka, Koji Natsuda, Mitsuhiisa Takatsuki, Akihide Kamiya, Koichi Nakayama, Susumu Eguchi
2. 発表標題 Bile Duct Reconstruction Using Scaffold-Free Tubular Constructs of Allogeneic Pig Fibroblast
3. 学会等名 1st ECTORS Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Hamada, Anna Nakamura, Akihiko Soyama, Yusuke Sakai, Takayuki Miyoshi, Masaaki Hidaka, Koji Natsuda, Mitsuhsa Takatsuki, Akihide Kamiya, Koichi Nakayama, Susumu Eguchi
2. 発表標題 Bile Duct Reconstruction Using Scaffold-Free Tubular Constructs of Allogeneic Pig Fibroblast
3. 学会等名 ESOT2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱田隆志、中村アンナ、曾山明彦、堺 裕輔、三好敬之、 山口 峻、日高匡章、夏田孔史、釘山統太、大野慎一郎、 足立智彦、高槻光寿、紙谷聡英、中山功一、江口 晋
2. 発表標題 細胞のみで構成される管腔構造体を用いたパイオ人工胆管の作製
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱田隆志、中村アンナ、曾山明彦、堺 裕輔、三好敬之、 山口 峻、日高匡章、夏田孔史、釘山統太、大野慎一郎、 足立智彦、高槻光寿、紙谷聡英、中山功一、江口 晋
2. 発表標題 パイオ3Dプリンターを用いた細胞のみの人工胆管の作製と移植効果
3. 学会等名 第7回細胞凝集研究会
4. 発表年 2019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
---------	---------