

機関番号：20101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591615

研究課題名 (和文) 超過冷却保存されたヒト小型肝細胞によるヒト肝臓化ハイブリットマウスの開発

研究課題名 (英文) Development of hybrid mouse with humanized liver using superfreezing preserved human small hepatocytes .

研究代表者

水口 徹 (MIZUGUCHI TORU)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30347174

## 研究成果の概要 (和文) :

肝細胞移植に必要なドナー細胞の採取は、安全に施行される必要がある。肝切除術は、難易度が高い手術とされ、高い合併症と在院死亡が問題となっていた。生食滴下モノポーラーによる肝切除術は、止血能力が高く、術後の肝機能の早期回復に影響していた (Hepatogastroenterology 2008; 55: 2188-2192.)。小型肝細胞に Pdx-1 遺伝子を強制発現させるとインスリン・グルカゴン・ソマトスタチンの産生細胞に形質転換させられることを証明した (J Hepatobiliary Pancreat Surg 2008;15:310-317.)。同時に小型肝細胞はβ細胞に成熟肝細胞はα細胞に形質転換しやすいことを証明した (J Hepatobiliary Pancreat Surg 2008;15:403-409.)。次に UTI は肝再生にとって重要な因子であり、UTI 欠損動物では肝再生が遅れることを証明した (Liver Int 2009;29:979-987.)。宿主反応性の遺伝子発現で日本人とフィンランド人でのどのような遺伝子発現の共通性や相違性が認められるかを網羅的解析で証明し、人種特異的な遺伝子反応セットを証明した (Genes Chromosomes Cancer 2010; 49: 28-39.)。これらを証明し、国内および国外で発表し、意見交換と学術交流を行った。

## 研究成果の概要 (英文) :

It is very important to perform surgical operation to obtain cell donation for cell transplantation therapy. Conventional hepatectomy has been considered to be difficult to decrease high morbidity with mortality. A saline-linked electric cautery was very effective to achieve vessel sealing and decrease bleeding. In addition, recovery of postoperative Apo-B in this group was much faster than conventional hepatectomy (Hepatogastroenterology 2008; 55: 2188-2192.). Gene transduction of Pdx-1 could transform small hepatocyte into insulin, glucagon, and somatostatine producing cells. Furthermore, small hepatocytes tend to be trans-differentiated into beta cells and mature hepatocytes tend to be trans-differentiated into alpha cells after transduction of Pdx-1 gene (J Hepatobiliary Pancreat Surg 2008;15:403-409.). On the other hand, urinary trypsin inhibitor (UTI) is one of the proteins which the liver could produce by itself exclusively. The liver regeneration has been impaired in UTI deficient animals (Liver Int 2009;29:979-987.). The gene expression could be depending on host conditions and human races. So, we compared gene expressions using micro DNA array analysis among Japanese patients and Finn patients (Genes Chromosomes Cancer 2010; 49: 28-39.). We proved all above research results and presented the data in both national and international congresses. We also discuss each other to promote further collaboration in future.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：(1)自己組織化 (2)生体機能利用 (3)移植・再生医療 (4)応用動物 (5)再生医学

### 1. 研究開始当初の背景

近年の消化器外科手術において肝臓外科手術はとくに Belghiti のハンギングマニピュラー法などの手技上の工夫に加え、低温焼灼切離機器の開発により飛躍的に安全性が向上している。一方で肝臓外科にとって術前の肝機能評価は術後の肝不全予測に重要で、術後肝不全が予測されるミラノ基準に適合する肝細胞癌には積極的な肝移植が望まれる。しかしながら、ドナー不足の問題から肝切除を優先しているのが現状であり、肝切除を安全に乗り切る方法の確立が望まれている。

これまでに、ICG に代表される古典的肝機能指標に加え、ヒアルロン酸値やアシアロシンチグラフィはさらなる術後肝不全の予測指標として重要であることを発表してきた (Mizuguchi T, et al. World J Surg 2004;28:971-6.)。また、周術期の肝機能回復指標としてアポタンパク質の有用性に関して発表してきた (Kawamoto M, Mizuguchi T, et al. Liver Int. 2006;26:203-10)。肝再生現象はラットを用いた肝切除モデルにおいてその機序解明がなされており、大量肝切除後における肝不全発症に SP-1 の DNA 結合能の関与 (Mizuguchi T, et al. J Surg Res. 2001;99:385-96.)や肝切除後における門脈血流の及ぼす肝再生の影響 (Nobuoka T, Mizuguchi T, et al. Eur Surg Res 2006;38:522-32)を発表してきた。肝切除における分子

生物学的機序に関して遺伝子操作を加えたマウスが使用され、TNF $\alpha$ や IL-6 の関与や HGF に代表される増殖因子の関与が示唆されてきた。しかしながら、CT 画像を用いたヒトの研究からヒト肝再生はげっ歯類を用いた肝再生現象とは一致しない事が知られている。したがって、ヒト肝再生現象を再現するモデルの開発は、さらにその機序解明に寄与するばかりでなく、安全な肝切除基準の確立と術後肝不全の治療開発に重要であった。

このようなヒト臨床に応用可能なヒト臓器を再現した動物モデルはヒトキメラ動物もしくはハイブリット動物を開発する必要がある。また、このことは肝移植を代替える肝細胞移植治療の開発に重要と考えられていた。

### 2. 研究の目的

小型肝細胞は In vitro で増殖可能で凍結保存後もその増殖能力が保持されている (Ikeda S, Hirata K, et al. J Hepatol. 2002;37:7-14.)。また、ヒト小型肝細胞もラット小型肝細胞と同様の性質を示すことを In Vitro における三次元組織の形成などから証明した (Sugimoto S, Mizuguchi T, Tissue Eng. 2005;11:626-33)。したがって、これまでの研究で小型肝細胞のヒトからの分離方法と培養法が確立されているため、近い将来においてはヒト小型肝細胞を移植細胞源として臨床治療に応用できると考えている。

ヒト臨床応用に向けて、分離ヒト肝細胞が生体内

で生着し増殖可能であるかの検証が必要である。また、同時に生体内で増殖可能な細胞の性質を同定し、ドナー細胞としての適合条件を決めることも重要な課題である。本年度の研究では、これらの問題点を解決すべく研究を進めることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 小型肝細胞分離方法 (担当：水口・三高)

分離方法は0.05%コラゲナーゼ+0.5%ディスパーゼ灌流法により行う。灌流は実体顕微鏡下に、肝切離面に露出する門脈枝に27G注射針を挿入して行う。細胞は10%FBS含有L-15培養液で洗浄し、50gにて1分間の低速遠心から沈澱細胞を得る。

#### 過冷却保存 (担当：目黒)

標準保存液にはUW液に添加剤の含有された凍結保存液を使用する。分離細胞を200ml用の凍結バックに充填し、超過冷却装置で超低温まで冷却し、プログラムフリーザーで-30度まで冷却後、保存する。

凍結期間 (従来の冷蔵保存24時間を新超過冷却保存により6日間の長期安定保存を目指す。) 超過冷却状態で保存6日間のものと新規ハイブリット凍結法による30日間保存のものとを新鮮細胞と比較する。

#### 細胞障害評価 (担当：川本・平田)

過冷却保存細胞は37℃の温浴槽にて急速加熱を行い、凍結液上清中のAST/ALTおよびLDHを測定する。細胞の一部は蛍光標識によるDead/Alive cell 検出キット (Molecular Probe) により二重標識を行い、顕微鏡下でシグナルを解析し生存率を決定する。また、解凍後に生理食塩水で洗浄し、30分の氷上整置後の細胞にも同様の解析を行う。逸脱酵素の測定と細胞状態の形態学的検討により、凍結保存方法が開発できる。最終的にはこれらから得られた最適の凍結条件下と従来の方法とを比較し、Apoptosis 検出キット (Molecular Probe) および細胞内ATPの測定と走査電顕による形態観察を追加する予定である。

#### ヒト肝細胞培養実験およびヒト肝細胞移植 (担当：中村・三高)

分離ヒト小型肝細胞を分離直後の新鮮細胞、過冷

却装置を使用して保存した過冷却保存小型肝細胞にオリジナル凍結法による超過冷却保存小型肝細胞の培養・比較検討を行う。培養後1日目に生着率および生存率 (細胞障害評価を参照) を検討し、cytochrome P450 cyp 3Aの誘導実験を行い、RT-PCR法およびWestern blot法により酵素誘導能を確認する。また、BrdUラベルによる免疫染色により細胞増殖能もあわせて検討する。また、免疫欠損マウス (NOGマウス) を使用し、肝細胞移植による生着率を免疫染色およびRT-PCRにより検証する。一方で、CDAA欠損食による肝硬変ラットモデルを作成し、肝細胞移植を施行後に肝切除を施行し、移植細胞の機能を実際の生存率で検証する。

#### CDAA肝硬変ラットの生存率改善に寄与する遺伝子発現解析 (担当：中村・水口)

CDAA肝硬変ラットに肝細胞移植を施行すると生存率が改善する事を証明した。アルブミン産生を確認し、Y染色体およびDPPIV活性の確認を行ったが、脾臓内での移植細胞は証明できたものの、肝臓内では生存率の改善を見込める移植細胞の確認は出来なかった。肝細胞移植により何らかの生体防御反応や細胞保護作用が予想されたので、移植群および非移植群の遺伝子発現比較解析を行い、責任伝達経路の同定を行う。

### 4. 研究成果

肝細胞移植に必要なドナー細胞の採取は、安全に施行される必要がある。肝切除術は、難易度が高い手術とされ、高い合併症と在院死亡が問題となっていた。安全性を担保するために、従来のアルゴンレーザーによる止血法による肝切除術と生食滴下モノポーラーによる止血法による肝切除術を比較検討した。出血量や合併症には両群間で有意差を認めないものの術後1週間目のアポ蛋白Bの回復では生食滴下モノポーラーによる止血法による肝切除術のほうが有意に高いことがわかった (Hepatogastroenterology 2008; 55: 2188-2192.)。このことは、生食滴下モノポーラーによる肝切除術は、止血能力が高く、術後の肝機能の早期回復に影響していた事を示唆していた。

肝細胞移植に使用する小型肝細胞は、内胚葉由来とされ膵臓のβ細胞と起源を共有するのみならず、転写因子のレベルでも約半数を共有していることが判明していた。これらの小型肝細胞に Pdx-1 遺伝子を強制発現させるとインスリン・グルカゴン・ソマトスタチンの産生細胞に形質転換させられることを証明した (J Hepatobiliary Pancreat Surg 2008;15:310-317.)。同時に小型肝細胞はβ細胞に成熟肝細胞はα細胞に形質転換しやすいことを証明した (J Hepatobiliary Pancreat Surg 2008;15:403-409.)。

肝細胞移植のドナー細胞を採取する際の肝切除術では合併症を最小限度にすることが重要である。洗練された手術手技や完成された周術期の管理下においては、合併症の発生は宿主の肝機能状態や免疫状態に依存すると考えられる。肝細胞癌治療では術後合併症そのものが、術後の予後も予測できる因子である可能性があり、これを症例集積研究で証明した。また、合併症を認めない群においては多変量解析において HGF が予後を規定する因子として抽出され、HGF の肝細胞癌再発への関連が臨床成績の中で証明された (Gastrointest Surg 2009;13:325-333.)。

肝細胞移植後の肝再生機序は不明な点も多い。UTI (ウリナリートリプシンインヒビター) は肝臓が産生するタンパク質の一種で抗凝固に関係したタンパク質と考えられている。肝再生に及ぼす影響に関しては不明であり、UTI 遺伝子欠損動物を使用し、この生体内における重要性を証明した。UTI は肝再生にとって重要な因子であり、UTI 欠損動物では肝再生が遅れることを証明した (Liver Int 2009;29:979-987.)。

このような細胞移植治療では、宿主の免疫反応に依存した成績が期待される。癌治療においても人種を越えた共通の反応や人種特異的な反応などが予想される。そこで、胃がん患者の遺伝子発現で日本人とフィンランド人でどのような遺伝子発現の共通性や相違性が認められるかを網羅的解析で証明し、人種特異的な遺伝子反応セットを証明した (Genes Chromosomes Cancer 2010; 49: 28-39.)。

肝臓が産生するタンパク質にはそれぞれが機能を持

っているが、ATIII は抗凝固因子の一つと考えられている。肝硬変では凝固因子が低下しているのにもかかわらず、それ以上に抗凝固因子の産生低下が認められるため、血栓症が多発する。つまり、これらの止血・凝固能のバランスを観察することで肝機能の評価も可能であると考えた。ATIII は評価因子の中で最も相互に相関する共通して肝機能指標として信頼性の高い指標であることを証明し、これに伴い術後の予後因子としても重要な指標である事を証明した (Hepatogastroenterology : in press)。

これらを証明し、国内および国外で発表し、意見交換と学術交流を行った。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Nakamura Y, Hirata K. Prognostic impact of preoperative branched-chain amino acids to the tyrosine ratio level in hepatocellular carcinoma patients after initial hepatectomy. J Gastroint Surg, 査読有, (in press).
2. Mizuguchi T, Kawamoto M, Son S, Meguro M, Shibata T, Nakamura Y, Harada K, Furuhata T, and Hirata K. Serum antithrombin III level is well correlated with multiple indicators for assessment of liver function and diagnostic accuracy for predicting postoperative liver failure in hepatocellular carcinoma patients. Hepatogastroenterology, 査読有, (in press)
3. Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Shibata T, Nakamura Y, Sonoda T, and Hirata K. Laparoscopic hepatectomy: a systematic review, meta-analysis and power analysis. Surg Today, 査読有, 2011;41:39-47.
4. Junnila S, Kokkola A, Mizuguchi T, Hirata K, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Monni O. Gene expression analysis identifies over-expression of CXCL1, SPARC, SPP1, and SULF1 in gastric cancer. Genes Chromosomes Cancer, 査読有, 2010;49:28-39.

5. Meguro M, Furuhashi T, Okita K, Nishidate T, Mizuguchi T, Hirata K. Clinical compliance with an oral uracil/tegafur (UFT) plus leucovorin (LV) regimen as adjuvant chemotherapy in Japanese colorectal cancer patients. *Int J Clin Oncol*, 査読有, 2009;14:402-407.
  6. Nobuoka T, Mizuguchi T, Oshima H, Shibata T, Kaji S, Nagayama M, Meguro M, Mitaka T, Hirata K. Impaired liver regeneration with humoral and genetic disturbances in urinary trypsin inhibitor-deficient mice. *Liver Int*, 査読有, 2009;29:979-987.
  7. Mizuguchi T, Nagayama M, Meguro M, Shibata T, Kaji S, Nobuoka T, Kimura Y, Furuhashi T, Hirata K. Prognostic impact of surgical complications and preoperative serum hepatocyte growth factor in hepatocellular carcinoma patients after initial hepatectomy. *J Gastrointest Surg*, 査読有, 2009;13:325-333.
  8. Kikkawa Y, Sudo R, Kon J, Mizuguchi T, Nomizu M, Hirata K, Mitaka T. Laminin alpha 5 mediates ectopic adhesion of hepatocellular carcinoma through integrins and/or Lutheran/basal cell adhesion molecule. *Exp Cell Res*, 査読有, 2008;314:2579-2590.
  9. Kawasaki H, Mizuguchi T, Oshima H, Nobuoka T, Shibata T, Kaji S, Kokai Y, Katsuramaki T, Mitaka T, and Hirata K. Efficient transformation of small hepatocytes into insulin-expressing cells by forced expression of Pdx1. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 査読有, 2008;15:403-409.
  10. Kawasaki H, Mizuguchi T, Kikkawa Y, Oshima H, Sasaki Y, Tokino T, Kokai Y, Miyazaki J, Katsuramaki T, Mitaka M, and Hirata K. *In vitro* transformation of adult rat hepatic progenitor cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 査読有, 2008;15:310-317.
  11. Mizuguchi T, Katsuramaki T, Nagayama M, Meguro M, Shibata T, Kaji S, Hirata K. Rapid recovery of postoperative liver function after major hepatectomy using saline-linked cautery. *Hepatogastroenterology*, 査読有, 2008;55:2188-2192.
  12. Sasaki K, Kon J, Mizuguchi T, Chen Q, Ooe H, Oshima H, Hirata K, Mitaka T. Proliferation of hepatocyte progenitor cells isolated from adult human livers in serum-free medium. *Cell Transplant*, 査読有, 2008;17:1221-1230.
- 〔学会発表〕 (計 10 件)
1. Mizuguchi T, Kawamoto K, Meguro M, Nakamura Y, Harada K, Nobuoka T, Hirata K. Cluster analysis of liver functional indicators and ALB-BTR classification to predict postoperative prognosis in 165 HCC patients. 6<sup>th</sup> Annual Academic Surgical Congress, Full oral presentation, Huntington Beach, CA, USA, February 1-3, 2011.
  2. 水口 徹, 川本雅樹, 目黒 誠, 今村将史, 信岡隆幸, 平田公一. 最善の肝切除術を目指した基本技術と新しい工夫. (主題関連演題)第 72 回日本臨床外科学会総会: 2010 年 11 月 21-23 日: 横浜
  3. 水口 徹, 川本雅樹, 目黒 誠, 中村幸雄, 西舘敏彦, 沖田憲司, 木村康利, 古畑智久, 平田公一. 腹腔鏡下肝切除術は低侵襲と言えるのか—検出力解析からの検証 (ワークショップ) 第 23 回日本内視鏡外科学会総会: 2010 年 10 月 18-20 日: 横浜
  4. 水口 徹, 川本雅樹, 目黒 誠, 今村将史, 永山稔, 木村康利, 信岡隆幸, 平田公一. 肝不全予測因子の多変量解析とクラスター解析による分類. (ミニシンポジウム) 第 22 回日本肝胆膵外科学会・学術集会: 2010 年 5 月 26-28 日: 仙台
  5. Mizuguchi T, Hirata K, Meguro M, Kawamoto K, Nagayama M, Imamura M, Kimura Y, Furuhashi T. Easy techniques and procedures for laparoscopic hybrid liver resection: the introduction reading to

complete laparoscopic hepatectomy. The 43th World Congress of the International society of Surgery, Video oral presentation, Adelaide, September 6-10, 2009.

6. 水口 徹, 目黒 誠, 孫 誠一, 川本雅樹, 永山 稔, 今村将史, 木村康利, 信岡隆幸, 平田公一.

肝細胞癌初回肝切除時の肝予備能評価としてのATIII およびHGFの合併症予測因子および予後因子としての有用性に関する検討. (ワークショップ) 第21回日本肝胆膵外科学会: 2009年6月10-12日: 名古屋

7. Mizuguchi T, Hirata K, Meguro M, Nagayama M, Furuhata T, Nobuoka T, Yamaguchi K.

Evaluation of anti-thrombin III and hepatocyte growth factor level to predict postoperative complication and disease-free survival in the initial liver resection for viral HCC patients. 4th Annual academic surgical congress, February 3-6, 2009, Fort Myers, FL, USA

8. 水口 徹, 平田公一, 目黒 誠, 河野 剛, 永山 稔, 信岡隆幸, 木村康利, 古畑智久, 山口浩司. 腹腔鏡下肝切除術の安全性の確保と標準化への挑戦. (スポンサーシンポジウム) 第21回日本内視鏡外科学会総会: 2008年9月2-5日: 横浜

9. 平田公一, 水口 徹, 大島秀紀, 佐々木寿誉, 三高 俊広. 組織幹細胞を用いた肝再生医療の可能性. (卒業教育セミナー) 第108回日本外科学会定期学術集会: 2008年5月15-17日: 長崎

10. 水口 徹, 平田公一, 永山 稔, 目黒 誠, 川崎浩之, 信岡隆幸, 木村康利, 山口浩司, 古畑智久, 三高 俊広. 肝再生機序の解明への挑戦 - プロメテウス神話から臨床治療までの道. (アカデミックマインドの涵養) 第108回日本外科学会定期学術集会: 2008年5月15-17日: 長崎

[図書] (計1件)

1. 水口 徹, 平田公一. 多臓器損傷. 腹腔鏡下肝切除術 (金子弘真, 若林 剛編集) 南山堂, pp. 97-103, 2010

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 結紮具および結紮方法

発明者: 水口 徹、平田公一、川本雅樹、目黒 誠

権利者: 北海道公立大学法人 札幌医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-226110 号

出願年月日: 平成 22 年 10 月 5 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水口 徹 (MIZUGUCHI TORU)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 30347174

(2) 研究分担者

平田 公一 (HIRATA KOICHI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 50136959

三高 俊広 (MITAKA TOSHIHIRO)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 50231618

永山 稔 (NAGAYAMA MINORU)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40398326

(H20 年度)

目黒 誠 (MEGURO MAKOTO)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 50448601

柴田 稔人 (SHIBATA TOSHIHITO)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 80404622

(H20 年度)

梶 晋輔 (KAJI SHINSUKE)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 90404623

(H20 年度)

川本 雅樹 (KAWAMOTO MASAKI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70404605

(H21-H22 年度)

中村 幸雄 (NAKAMURA YUKIO)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 50516648

(H21-H22 年度)

(3) 連携研究者

該当なし