

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21659307

研究課題名（和文）：肝細胞と幹細胞より構成される可移植性自己再生型肝組織の開発

研究課題名（英文）：Development of transplantable self-regenerative liver tissue consisted of hepatocytes and stem cells

研究代表者

兼松 隆之（KANEMATSU TAKASHI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・名誉教授

研究者番号：40128004

研究成果の概要（和文）：

今回の研究では肝細胞シートとともに線維芽細胞シートを作製しその手技を確立した。線維芽細胞シートは体腔内に移植可能であり、生着率も極めて良好なことが確認された。肝切除断端に貼付した場合に得られた結果として1)断端の組織学的修復の促進、2)組織内に肝前駆細胞と考えられる oval cell の誘導を確認した。

線維芽細胞シートが幹細胞を内包する可能性については支持する結果は得られず、障害を受けたレシピエントからの幹細胞の誘導に作用する結果をレシピエント特異的マーカー発現で確認した。また、肝細胞シートとの重合は可能なことを確認したが肝細胞シートに線維芽細胞シートを重合しても生体内移植のような前駆細胞の出現は得られず重合組織片は研究期間内では成熟組織片としての認識に留まった。幹細胞を誘導する可移植性組織として線維芽細胞シートは有力な候補である成果を得た。

研究成果の概要（英文）：

We established the procedures of cultured hepatocyte sheet and fibroblast sheet in this study. Fibroblast sheet was transplantable to the abdominal cavity and showed excellent adaptation in vivo. We have discovered that fibroblast sheet enhanced tissue repair microscopically and induced accumulation of oval cell, a hepatic progenitor cell.

We have not got an evidence of hepatic stem cells from fibroblast sheet itself, however, using recipient specific markers, accumulated cells were originated from recipient. Thus, we speculate that fibroblast sheet promote recipient stem cells thorough the improvement of injured recipient environment.

In this study, we also have attempted that coculture system of hepatocyte and fibroblast sheet. Technically, it has been achieved, but, the cellular assembly remained mature tissue. Although further study is needed to obtain initial purposes, fibroblast sheet is expecting candidate for the transplantable tissue engineering which promotes stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	0	1,000,000
2010 年度	1,200,000	0	1,200,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

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：肝細胞、幹細胞、自己再生型

1. 研究開始当初の背景

末期的肝疾患の治療としての肝移植は深刻な提供者不足にあり、生体提供者に大部分が依存している。この解決のため細胞を用いた再生医療が研究されている現状にある。

肝再生医療においては細胞マーカーを用いた幹細胞の分離・同定や、*in vitro*での肝様組織の構築が報告されてきたが、生体内でこれらの結果が得られるかは未だ不明な点が多い。そこで本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

臓器不全は、再生の観点からは組織・生体内の幹細胞領域に端を発する修復・再生機構が破綻しているために生じるのであり、ここに幹細胞を外因的に動員しても機能するかどうかは疑問であるためである。近年確立しつつある初代細胞による*in vitro*組織構築技術に幹細胞を加えることで肝機能補助と幹細胞による組織修復効果を生かし、移植可能組織を作製しその機能を検証することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

1) ラット肝細胞・胆管上皮細胞・血管内皮細胞・組織幹細胞・線維芽細胞各々を平面培養・温度応答性培地上で培養し形態を確認する。以下の方法で細胞を採取する

<肝細胞分離；collagenase灌流法、胆管細胞分離；胆嚢胆管粘膜を鋭的に採取、血管内皮細胞；血管内皮よりの鋭的採取および肝細胞分離時の非実質細胞層より分離、組織幹細胞、線維芽細胞；ラット脂肪組織より酵素分散法で採取>温度応答性培地については東京女子医大先端生命科学研究所 岡野光夫教授、大橋一夫準教授より技術的な協力をいただいた。

2) 上記細胞を平面培養・シート上で比較的

長期培養し組織構築を確認する。

3) 培養シートを肝細胞と重合させ培養を行う。また、肝切除断端に貼付（移植）し細胞の生着、肝組織の変化について観察。移植部位を腹腔、大網内、皮下に設定し組織学的所見、生着期間を検討する

4. 研究成果

1) 細胞の培養とシート化の確認；肝細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞はシート化可能であったが胆管細胞は形態学的に一層の嚢胞状細胞となり期待した形態には至らなかった。

2) 肝細胞、線維芽細胞ともシート培養と単層平面培養の長期培養では有意な差はなくいずれも短命であった。しかし、シート培養は生体内移植が直に実施できるため、生体移植に関しては有用性が高かった。

3) 肝細胞は大網内、肝内にも移植可能であったが成熟組織片として観察された。一方、線維芽細胞シートは体腔内にいずれにも移植可能であり、生着率も極めて良好なことが確認された。肝切除断端に貼付した場合に得られた結果として断端の組織学的修復の促進および組織内に肝前駆細胞と考えられるoval cellの誘導を確認した。

線維芽細胞シートが幹細胞を内包する可能性については支持する結果は得られず、障害を受けたレシピエントからの幹細胞の誘導に作用する結果をレシピエント特異的マーカー発現で確認した。また、肝細胞シートとの重合は可能なことを確認したが肝細胞シートに線維芽細胞シートを重合しても生体内移植のような前駆細胞の出現は得られず重合組織片は研究期間内では成熟組織片としての認識に留まった。

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 20 件)

1. Eguchi S, Takatsuki M, Soyama A, Hidaka M, Tomonaga T, Muraoka I, Kanematsu T. Elective living donor liver transplantation by hybrid hand-assisted laparoscopic surgery and short upper midline laparotomy. Surgery. 査読有, 150: 1002-1005, 2011.
2. Eguchi S, Soyama A, Hidaka, Takatsuki M, Muraoka I, Tomonaga T, Kanematsu T. Liver transplantation for patients with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfection with special reference to hemophiliac recipients in Japan. Surg Today. 査読有, 41(10):1325-31, 2011.
3. Eguchi S, Takatsuki M, Hidaka M, Soyama A, Muraoka I, Tomonaga T, Shimokawa I, Kanematsu T. Lack of grafted liver rejuvenation in adult-to-pediatric liver transplantation. Dig Dis Sci. 査読有, 56(8):1542-7, 2011.
4. Eguchi S, Takatsuki M, Hidaka M, Soyama A, Ichikawa T, Kanematsu T. Perioperative symbiotic treatment to prevent infectious. Am J surg. 査読有, 201:498-502, 2011.
5. Soyama A, Eguchi S, Yanaga K, Takatsuki M, Hidaka M and Kanematsu T. Living donor liver transplantation. Surg Today, 査読有, 41:1026-28, 2011.
6. Takatsuki M, Eguchi S, Yamanouchi K, Hidaka M, Soyama A, Kanematsu T. Technical refinements of bile duct division in living donor liver surgery. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 査読有, 18: 170-5, 2011.
7. Eguchi S, Takatsuki M, Soyama A, Hidaka M, Muraoka I, Kanematsu T. Is Preservation of Middle Hepatic Vein Tributaries during Right Hemi-Hepatectomy Beneficial for Live Donor Liver Transplantation? Hepatogastroenterology. 査読有, 59:115-6, 2011.
8. Kamohara Y, Eguchi S, Takatsuki M, Yamanouchi K, Hidaka M, Soyama A, Kanematsu T. ^{99m}Tc-galactosyl Sialil albumin (GSA) scintigram adjusts hepatic resection range in ICG based. Hepatogastroenterology. 査読有, 58(112):2058-61, 2011.
9. Yanaga K, Eguchi S, Takatsuki M, Okudaira S, Tajima Y, Kanematsu T. Two-staged living donor liver transplantation for fulminant hepatic failure. Hepatogastroenterology. 57: 146-8, 2010.
10. Takatsuki M, Eguchi S, Yamanouchi K, Hidaka M, Soyama A, Miyazaki K, Tajima Y, Kanematsu T. The outcome of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection after living donor liver transplantation in a Japanese center. Journal of hepato - biliary-pancreatic sciences. 17: 839- 43, 2010.
11. Yamanouchi K, Eguchi S, Takatsuki M, Hidaka M, Kamohara Y, Miyazaki K, Hamasaki K, Tajima Y, Kanematsu T. Management of fungal colonization and infection after living donor liver transplantation. Hepatogastroenterology. 57-852-57, 2010.
12. Yanaga K, Eguchi S, Takatsuki M, Okudaira S, Tajima Y, Kanematsu T. Two-staged living donor liver

transplantation for fulminant hepatic failure. *Hepatogastroenterology*. 57: 146-8.

13. Takatsuki M, Eguchi S, Yamanouchi K, Hidaka M, Soyama A, Miyazaki K, Tajima Y, Kanematsu T. The outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after living donor liver transplantation in a Japanese center. *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences*. 17:839-43, 2010.

14. Eguchi S, Takatsuki M, Hidaka M, Soyama A, Tomonaga T, Muraoka I, Kanematsu T. Predictor for histological microvascular invasion of hepatocellular carcinoma: a lesson from 229 consecutive cases of curative liver resection. *World journal of surgery*. 34(5): 1034-1038, 2010.

15. Chiba K, Isoda M, Chiba M, Kanematsu T, Eguchi S. Significance of PET/CT in determining actual TNM staging for Patients with various lung cancers. *International Surgery*. 95: 197-204, 2010.

16. 江口 晋、高槻光寿、日高匡章、曾山明彦、兼松隆之。HIV-HCV重複感染患者に対する肝移植。移植 45(1):46-53, 2010.

17. Hidaka M, Eguchi S, Okudaira S, Takatsuki M, Tokai H, Soyama A, Nagayoshi S, Mochizuki S, Hamasaki K, Tajima Y, Kanematsu T. Multicentric occurrence and spread of hepatocellular carcinoma in whole explanted end-stage liver. *Hepatology Research*. 39(2):143-148, 2009.

18. Inokuma T, Eguchi S, Tomonaga T, Miyazaki K, Hamasaki K, Tokai H, Hidaka M, Yamanouchi K, Takatsuki M, Okudaira S, Tajima Y, Kanematsu T.

Acute Deterioration of Idiopathic Portal Hypertension Requiring Living Donor Liver

Transplantation: A Case Report. *Digestive Diseases and Sciences*. 54(7):1597-601, 2009.

19. Eguchi S, Kanematsu T. What is the real contribution of extrahepatic cells to liver regeneration? *Surgery Today* 39; 1, 1-4, 2009.

20. Kobayashi K, Fujioka H, Kamohara Y, Okudaira S, Yanaga K, Furui J, Kanematsu T. Underlying Histological Activity of Hepatitis Plays an Important Role for Tumor Recurrence After Curative Resection of Hepatocellular Carcinoma. *Acta Medica Nagasakiensia*. 53(4):97-107, 2009.

[学会発表] (計 10 件)

1. Eguchi S, Takatsuki M, Soyama A, Hidaka M, Muraoka I, Kanematsu T. Elective living donor liver transplantation with splenectomy by hybrid hand-assisted laparoscopic surgery and small upper midline laparotomy. 97th Annual College of Surgeons Clinical Congress. 2011.10.23-27. SF, USA.

2. Takatsuki M, Eguchi S, Hidaka M, Soyama A, Muraoka I, Kuroki T, Adachi T, Kanetaka K, Kanematsu T. The outcome of ABO-incompatible living donor liver transplantation: A single center experience in Japan. 97th Annual College of Surgeons Clinical Congress. 2011.10.23-27. SF, USA.

3. Takatsuki M, Eguchi S, Hidaka M, Soyama A, Tomonaga T, Muraoka I, Kanematsu T. Impact of peripheral blood CD4⁺ adenosine triphosphate activity in long-term living donor liver transplantation under weaning of immunosuppression. 17th ILTS. 2011.9.2-4, Hong Kong, China.

4. Hidaka M, Takatsuki M, Soyama A, Okudaira S, Muraoka I, Adachi T, Kuroki T, Kanematsu T, Eguchi S. Expression of E-

cadherin in hepatocellular carcinoma with previously local therapies in the explanted cirrhotic liver for liver transplantation. 5th ILCA. 2011.9.2-4, Hong Kong, China.

5. Muraoka I, Soyama A, Takatsuki M, Tomonaga T, Hidaka M, Kanematsu T, Hishikawa Y, Koji T, Utoh R, Ohashi K, Eguchi S. Induction of hepatic progenitor cells by transplanted rat dermal fibroblast allograft sheet on an incised rat liver. 62nd AASLD. 2011.11.4-8, SF, USA.

6. 高槻光寿、江口 晋、曾山明彦、原 貴信、村岡いづみ、黒木 保、大野慎一郎、金高賢悟、兼松隆之。

HIV/HCV 重複感染患者は思った以上に肝障害が進行している：肝移植のタイミングに関する考察。第 25 回日本エイズ学会。

2011.11.30-12.2, 東京。

7. 曾山明彦、江口 晋、高槻光寿、日高匡章、村岡いづみ、朝長哲生、足立智彦、黒木保、兼松隆之。HIV/HCV 重複感染者の肝予備能評価の検討。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会。2010.11.25, 東京。

8. 江口 晋、兼松隆之。

血液製剤による HIV/HCV 重複感染患者に対する肝移植のための組織構築。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会。2010.11.24, 2010.

9. 兼松隆之。

血液製剤による HIV/HCV 重複感染患者に対する肝移植。第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会。2009.11.26, 名古屋。

10. 江口 晋、高槻光寿、日高匡章、曾山明彦、山之内孝彰、村岡いづみ、小坂太一郎、藤田文彦、黒木 保、谷口 堅、兼松隆之、松崎寿久、市川辰樹、中尾一彦。

生体肝移植中に経験した colonic gas explosion. 第 94 回日本消化器病学会九州支部例会。2009.11.27-28, 熊本。

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼松 隆之 (KANEMATSU TAKASHI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
名誉教授
研究者番号：40128004

(2) 研究分担者

江口 晋 (EGUCHI SUSUMU)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号：80404218

蒲原 行雄 (KAMOHARA TUKIO)
独立行政法人国立病院機構長崎医療
センター・臨床研究センター・
外科治療研究室室長
研究者番号：50325643

(3) 連携研究者

なし