

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670568

研究課題名(和文)有茎腸管グラフト内肝組織片・肝幹細胞共充填による体内型補助肝臓の作成

研究課題名(英文)Development of an auxiliary liver using a small intestinal segment packed together with liver micro fragments and stem-like cells of the liver

研究代表者

小暮 公孝(Kogure, Kimitaka)

群馬大学・生体調節研究所・研究員

研究者番号：20125850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要(和文)本研究は有茎腸管グラフト内の充填肝組織片の急速な増殖環境下に肝幹様細胞を置くことで様々な増殖因子の影響によりこれが機能肝細胞に分化誘導され、それが体内型補助肝臓として機能することを期待して行われた。肝組織片と共充填した肝幹様細胞は60日後でも遺残肝組織の間に浸潤し、分裂、増殖、融合して肝細胞索類似の形態を形成し、各細胞間には類洞類似の細胞間隙も認められた。PAS染色でも陽性に染まり、ブドウ糖の代謝能を有していることが示唆された。本法により肝幹様細胞の肝細胞類似細胞への分化誘導が惹起され肝組織類似の組織構築がなされることが確認され、体内型補助肝臓作成への展望が示された。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to develop an auxiliary liver using a small intestinal segment packed with the minced liver and the stem-like cells of another rat liver by exposing them under the rapid growth environment of the minced liver to expect the transformation of them to the functioning hepatic cells. Hepatic stem-like cells co-packed with the minced liver infiltrated into the spaces of the remnant liver tissue even after 60 days, by exhibiting a similar configuration of the liver cell cord with the division, proliferation and fusing. The intercellular space of the sinusoid resemblance was also admitted between each hepatic stem-like cell. Stained also positive with PAS staining, it was suggested that these transformed hepatic stem-like cells have the metabolic ability of glucose. The study showing that hepatic stem-like cells were differentiated into the resemblance of the true liver tissue, indicated the prospect of the creation for the internal auxiliary liver.

研究分野：再生医学

キーワード：有茎分節腸管 肝組織片移植 肝幹様細胞移植 肝幹様細胞の分化誘導 体内型補助肝臓 肝移植 肝不全

1. 研究開始当初の背景

肝実質細胞を移植して不全肝の補助肝臓としての機能を持たせようとする研究は水戸 (Transplantation 28:499-505, 1979) らによる脾内肝細胞移植の研究を嚆矢とする。これまでに20以上の部位への肝細胞移植が試みられてきているがいずれも不全肝を補填するほどの移植細胞塊を形成できない。近年、その肝細胞移植法にも工夫が凝らされ、不活化処置肝細胞移植、肝の幹様細胞の移植、胚性幹細胞を肝細胞に分化させて皮下に移植、肝細胞を特殊コーティングした人工膜に播種して移植するなどの方法が効果を上げている。また、最近では各種幹細胞 (胚性幹細胞、体性幹細胞、iPS 細胞) を増殖因子のカクテルの中で培養したり複数の遺伝子を導入したりして機能肝細胞に分化させる研究が積極的に行われてきている。肝臓特有の体性肝幹細胞を同定し、これを機能肝細胞へ分化させることができるなら複数の増殖因子や遺伝子導入によらず、より自然に近い微小環境下で肝幹細胞を機能肝細胞に分化誘導することが可能になる。一方、Gupta (Transplantation 2003; 75: 1827-1832) からは肝細胞ではなく細片化した肝組織片そのものを有茎腸管グラフト内に充填することで有効な体内型補助肝臓を作成したと報告している。我々も Gupta らの方法を追試したが他部位では、速やかに壊死に陥る肝組織片が腸管 Graft 内では再び融合して一塊となり増殖、増大することを認めている。すなわちこの時、有茎腸管グラフト内では肝細胞が増殖増大するのに適当な微小環境が出現したことになる。そしてこのような状況下の Graft 内に肝の体性幹細胞を共充填すればこの幹細胞に対しても分化誘導、増殖刺激が同時に加わることが推測できる。肝の体性幹細胞の候補は epithelial stem-like cell (Liver growth and repair. Chapman & Hall, London, p50-99, 1998) として 100 年以上前から知られているが、既に我々も単離しクローン化している。この細胞は無限に近く増殖させることが可能であり、これを分化

誘導して機能肝細胞化できるなら安価で強力な体内型補助肝臓の作成も可能になる。本研究はこのような背景に基づいて行われた。

2. 研究の目的

本研究は肝の体性幹様細胞を機能肝細胞に効率よく分化誘導する方法の開発を目指している。そのために体内型補助肝臓 (有茎腸管グラフト内肝組織片充填移植術) を用いる。ここではグラフト内に充填されたミンチされた肝組織片は急速に再癒合し増殖する。体積で元より 8-10 倍に急速に増殖肥大することを確認している。この充填肝組織の急速な増殖環境下に肝の幹様細胞を置くことで様々な増殖因子の影響により肝の幹様細胞が機能肝細胞に分化誘導してゆくことを期待している。

一方、肝の幹細胞システムが解明されたならば肝の幹細胞から機能肝細胞を大量に増殖させ肝臓を再構築することも可能になる。100 年以上前から齧歯類の肝臓には長期生存する上皮性細胞の存在が知られていた。その代表例が肝の幹様細胞と言われる WB-F344 細胞である。この幹様細胞は様々な細胞に分化誘導出来ることが知られている。我々は Wistar rat 肝から独自にこの幹様細胞を単離しクローン化している。これまでに、この細胞は免疫染色、その他からから Glycogen (+), AFP (+++), Albumin (+), Flk-1 (+++), PECOM-1 (+++), Von Willebrand Factor (+-), CK7/17 (+-), CD34 (-) であり、AFP (+++), Albumin (+) では肝細胞の特徴をまた、Flk-1 (+++), PECOM-1 (+++) と内皮細胞の特徴も併せ持つ細胞であることを確認している。本研究では有茎腸管グラフト内にこの幹様細胞をミンチ

した肝組織片とともに共充填し、肝組織片が急速に癒合し増殖する環境下でこの幹様細胞を機能肝細胞に分化誘導することで、効率的な体内型人工肝臓の作成を目指した。

3. 研究の方法

ウイスター系ラットから単離しクローン化して凍結保存しておいた肝幹様細胞を解凍して再培養して増殖させておく(図1)。雄性ウイスター系ラットを用い、長さ2-3cm空腸分節を、上腸間膜動静脈枝を付けたまま有茎で遊離し、その粘膜を剥ぎ、更に、血流を補助するために大網も共充填しておく。同一ラットの肝左葉を摘出しメスでミンチする。ミンチした肝組織片と培養皿からトリプシンを用いて剥離、分散した肝幹様細胞(30000/ml)をミンチした肝組織と混和し、腸管グラフト内に共充填しグラフトを閉鎖する。これを肝中葉を部分切除した離断端に縫着する。対照として分散した肝幹様細胞(30000/ml)を鼠径部脂肪織内に移植する(図2)。術後、グラフト手術を施行したものは7日、10日、14日、21日、25日、28日、35日、42日、60日後に犠牲死させ組織学的に検討した。皮下移植したものは7日後に犠牲死させ組織学的に検討した。

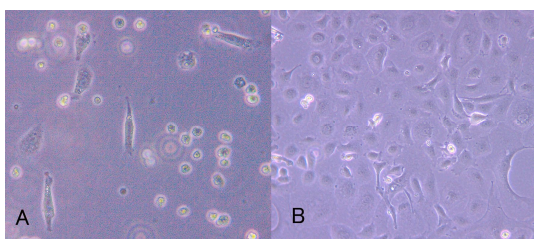


図1-A:凍結保存しておいた肝幹様細胞の

解凍直後のもの、盛んに遊走しているように見える。

B: 著しい増殖を示し1週間後には互いに融合して径10cmの培養皿に充満している。

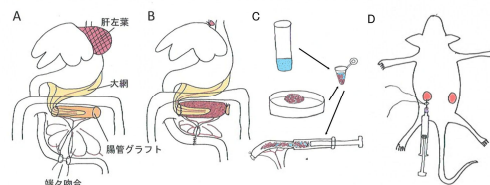


図2A:肝左葉を切除しミンチしておく。空腸有茎分節腸管を作成し粘膜を削除後、大網を充填する。B, C:ミンチした肝組織と肝幹様細胞を混和して分節腸管に充填する。D:鼠径部の皮下に肝幹様細胞を移植する。

4. 研究成果

Gupta等による有茎分節腸管内にミンチした肝組織片を充填して補助肝臓を作成する原法に対して、新たに大網を肝組織片と共に共充填することで肝組織移植片への血流を補助した結果、予想通り充填した肝組織片の増大と生着の延長がすでに認められているが、これに肝幹様細胞を共充填した結果、他部位では長期生着の認められない肝幹様細胞の長期生着、増殖、分化が認められた。

以下、典型例を示す。

(1) 有茎分節腸管内肝組織片・肝幹様細胞・大網共充填後60日例(図3)

肝組織片のみを充填する原法では充填した肝組織片の殆どが壊死におちいってしまう60日後でも部分的に充填肝組織片と肝幹様細胞の生着と増殖が認められた。

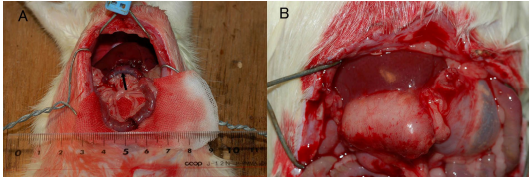


図3 -A: 肝組織片と肝幹様細胞を共充填したグラフトを肝中葉に逢着したところ(矢印)。B: 60日後のグラフトは大きく緊満、腫大し壁には血管の増生も認められる。

(2) 肝組織片・肝幹様細胞・大網共充填後60日例の組織図(図4)

肝組織片と共充填した肝幹様細胞(30000個)は60日後でも遺残肝組織の間や腸管グラフト壁近傍に生着し増殖していた。これらは好酸性の大きな胞体を有し、共充填した遺残肝組織の間に浸潤し、分裂、増殖、融合して肝細胞索類似の形態を形成し、各細胞間には類洞類似の細胞間隙も認められた。PAS染色でもこれらの細胞の殆どが陽性に染まり、ブドウ糖の代謝産物であるグリコーゲンの貯蔵能を有していることが示唆された(図4)。

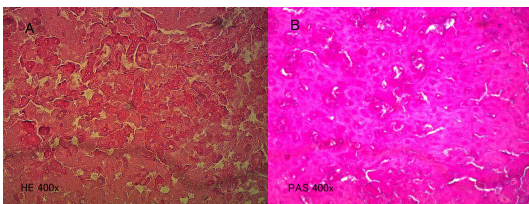


図4-A: HE 400x. 好酸性の大きな胞体を有した幹様細胞が共充填した遺残肝組織の間に浸潤し、分裂、増殖、融合して肝細胞索類似の形態を形成している。B: PAS 400x. PAS染色でも陽性に染まり、ブドウ糖の代謝能を有していることが示唆された。

グラフト壁近傍での増生

一方、グラフト壁に接する部位では肝幹様細胞は本来の充填肝組織が壊死した部分でもその中で増殖して細胞巢を形成し、その一部はグラフト壁の中にも浸潤していた。又、その細胞巢を取り囲むように赤血球の充満した血液路の様な間隙(矢印)が認められた(図5)。

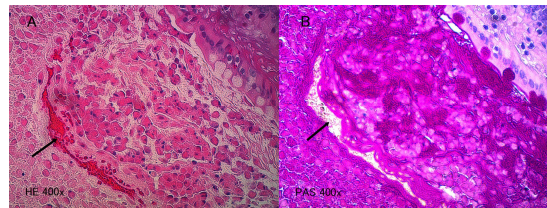


図5 A: HE 400x. 好酸性の胞体を持つ細胞が集積しお互いに融合して細胞索類似構造を示す。細胞索の間隙はあたかも類洞様に見える。又、細胞巢を取り囲むように赤血球の充満した間隙が認められる(矢印)。B: PAS 400x. 細胞巢内の結合織部分や小腸上皮の杯細胞内の粘液は強陽性に染まっているが肝幹様細胞も腸管上皮や赤血球(矢印)が全く染まらないのに比べると陽性に染まっている。

(3) 鼠径部皮下脂肪内への肝幹様細胞の移植

対照として同量の肝幹様細胞を鼠径部皮下脂肪織内に移植したが皮下脂肪織内への赤血球の集積と褐色脂肪組織の増生は認められたものの、肝幹様細胞は全く消失し、その痕跡も認められなかった。

結語

有茎腸管グラフト内への肝組織片との共充填により肝幹様細胞の肝細胞類似細胞への分化誘導が惹起され肝組織類似の組織構築がなされることが確認され、体内型補助肝臓作成への展望が示された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1 . Kimitaka Kogure · Itaru Kojima · Hiroyuki Kuwano · Toshiyuki Matsuzaki · Hiroshi Yorifuji · Kuniaki Takata · Masatoshi Makuuchi. Reconfirmation of the anatomy of the left triangular ligament and the appendix fibrosa hepatis in human livers, and its implication in abdominal surgery Journal of Hepato-Biliary Pancreatic Science (2014) 21(12):856-863 (査読有)

2 . 小暮公孝、石崎政利、根本雅明、桑野博行、小島 至、磯村寛樹、星野洪郎、幕内雅敏、

有茎分節腸管内肝組織片充填式補助肝臓の開発(第2報)-大網共充填の効果-

THE KITAKANTO MEDICAL JOURNAL(北関東医学) 63(3):223-232, 2013 (査読有)

3 . 小暮公孝、石崎政利、根本雅明、桑野博行、小島 至、磯村寛樹、星野洪郎、幕内雅敏

有茎分節腸管内肝組織片充填式補助肝臓の開発 第1報

THE KITAKANTO MEDICAL JOURNAL(北関東医学) 63(2): 133-140, 2013 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1 . 小暮公孝. 尾状葉肝静脈系と尾状葉 notch の関係について. (招待)

2015.11.14 **第19回臨床解剖研究会、**

会場：東京、東京大学山上会館

2 . 小暮公孝. 肝区域の再考察 (招待)

2015. 8. 22 第3回肝臓外科解剖検討会、

会場：東京、東京女子医科大学病院臨床講堂 2

3 . 小暮公孝、小島 至、石崎政利、根本雅明、桑野博之、松崎利行、依藤 宏、高田邦昭、磯村寛樹、幕内雅敏. 左三角間膜(left triangular ligament: LTL)と肝繊維付属 (appendix fibrosa hepatis: AFH)の解剖学的関係の再確認-腹部外科における要点-

2015.4.16-18第115回日本外科学会定期学術集会、

会場：名古屋市(名古屋国際会議場)

4 . 小暮公孝、小島 至、石崎政利、根本雅明、久保憲生、鈴木秀樹、桑野博行、磯村寛樹、星野洪郎、幕内雅敏. 有茎小腸グラフト内充填肝組織片の生着延長法の工夫

2014.4.3-5 第114回日本外科学会定期学術集会、

会場：京都国際会館 京都市

5 . 小暮公孝、小島 至、久保憲生、新木健一郎、持田 泰、鈴木秀樹、桑野博行、磯村寛樹、星野洪郎、幕内雅敏. 門脈血流を考慮した肝組織片充填有茎小腸グラフトの開発

2013.4.11-13第113回日本外科学会定期学術集会、

会場：福岡市(福岡国際会議場)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小暮 公孝 (Kogure, Kimitaka)

群馬大学・生体調節研究所・研究員

研究者番号：20125850

(2)研究分担者

小島 至 (Kojima, Itaru)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：60143492