

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461917

研究課題名(和文) 羊膜と再生刺激を用いた肝再生医療

研究課題名(英文) Liver regenerative medicine using an amnion and a revival stimulus

研究代表者

高槻 光寿 (TAKATSUKI, Mitsuhsa)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：80380939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：羊膜は免疫原性に乏しく間葉系幹細胞も多く含むため、再生医療への応用が期待されている。間葉系幹細胞を抽出して心筋細胞に分化させる研究をもとに、羊膜そのものを切除による再生刺激を加えた肝に貼付して肝細胞への分化誘導を試みたが、全く誘導されることはなかった。そこで発想を転換し羊膜を培養基質として用い肝細胞を培養したところ、通常の培養皿やマトリゲルと比較して長期にアルブミン産生能を維持できることが明らかとなり、羊膜の向き(緻密層または上皮層)でも産生能に差がみられることがわかった。肝細胞を培養により長期機能維持することは再生医療の課題のひとつであり、今後新たな肝細胞の培養基質としての開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Because amnion lacks in immunogenicity and includes a lot of mesenchymal stem cells, application to regenerative medicine is expected. Based on the study which showed the differentiation from mesenchymal stem cell in the amnion into myocardial cell, we tried to develop the differentiation from amnion to hepatocyte, with putting the amnion in the liver under regeneration stimulus with 70% partial hepatectomy. However, we could not achieve any successful results. Accordingly, we absolutely changed the strategy that we used the amnion as the culture substrate of the hepatocyte, and we found that compared to other culture substrate including ordinary dish or gel, hepatocyte could maintain the function to produce the albumin in amnion. According to these results, amnion might be good culture substrate not only for hepatocyte, but other various cells.

研究分野：肝胆膵外科学、移植外科学、再生医療学

キーワード：羊膜 再生刺激 アルブミン

## 1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞に代表される再生医療の発展は近年めざましいものがある。間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell (MSCs)) は骨髄や脂肪組織へ多く含まれ様々な組織への分化が可能であり、これも再生医療への応用が期待されている。MSC は間葉に由来する体性幹細胞であるが、神経細胞や肝細胞へ分化する能力も有する。一方、妊娠時に胎児を包んでおり、胎児由来の組織である羊膜には MSCs が多く含まれており、これも再生医療への応用が期待されている。羊膜は免疫原性が少なく免疫寛容を得られやすく、また倫理的問題点が少ないなどの利点により近年再生医療の新しいソースとして注目されている。すでに、角膜への移植などが臨床応用されており (Mai et al, Cornea 2013)、再生医療においては現実的かつ極めて魅力のある細胞源である。肝再生の分野ではヒト羊膜上皮細胞をマウスの肝障害モデルに注入し、ヒト肝酵素の発現を認めたとの報告はあるが、羊膜の形態のまま再生医療に利用している報告はない。

## 2. 研究の目的

異種移植であるヒト羊膜 ラットへの移植により羊膜が安定して生着し、かつ肝組織へ分化するか否かを明らかにする。また、分化した肝組織が十分な機能を発揮するか否かも明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 羊膜の肝細胞への分化

当院でインフォームド・コンセントによって同意を得られた予定帝王切開症例に立ち会い、羊膜を回収、保存し、Wild type ラットに全麻下に部分肝切除を行い、残肝に割を入れて羊膜を貼付する。羊膜の生着が得られているか、ヒト肝酵素の発現が見られるかを組織学的検討により検討する。

この方法で実験を試みるも羊膜から肝細胞への分化・再生は全く得られず、羊膜を培養

基質として肝細胞を培養する着想に到り、以下の方法で研究を継続することとした。

### 羊膜上での肝細胞培養

7 週齢程度のオス Wistar rat の肝細胞分離を行い、羊膜緻密層側・羊膜上皮層側に分離した初代肝細胞を播種、培養肝細胞が羊膜上で長期機能維持が可能かどうかを検討した。比較対象としてコラーゲン dish およびマトリゲル dish を用いた。肝細胞の機能評価としては、肝細胞培養中の培地を回収し、-30 で凍結保存したものを解凍後に ELISA 法によりアルブミン濃度を測定することで評価を行った。尚、羊膜は本研究に関して同意を得た予定帝王切開患者から羊膜を採取後に -80 で凍結保存したものを解凍し使用した。

基質として用いた羊膜上皮細胞の生死を確認する目的で、Calcein-AM (アセトキシメチル)・PI (Propidium Iodide) を用いて二重染色を行った。

羊膜上皮細胞から産生される種々の Growth Factor の培養肝細胞に対する影響を確認する目的で、セルカルチャーインサートを用いて培地中に羊膜を浸すようにしてコラーゲン上で肝細胞培養を行った。

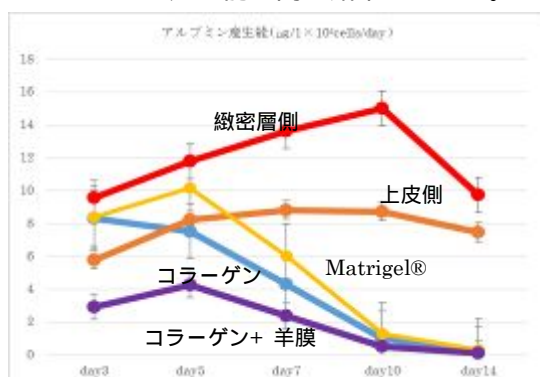
羊膜上での培養肝細胞の形態および接着状況確認目的に、走査電子顕微鏡・透過電子顕微鏡を用いて観察を行った。また、接着因子の確認目的に 1-integrin、claudin、E-cadherin の免疫染色を行った。

## 4. 研究成果

### 羊膜の肝細胞培養基質としての効果

コラーゲン dish 上での培養肝細胞は約 1 週間目ほどからほとんどアルブミン測定ができなくなるのに対し、羊膜を培養基質として用いた場合肝細胞のアルブミン産生能は培養約 10 日目に peak 値となりその後、約 2 ヶ月後も培地中のアルブミン測定が可能であった。また、マトリゲル dish を用いた場合もコラーゲン dish 同様に約 1 週間から 10 日ほどでアルブミン測定ができなくなってい

た。また、羊膜緻密層側での培養と羊膜上皮層での培養との比較に関しては、どの培養時期においても羊膜緻密層側での培養肝細胞のアルブミン産生能が高い結果となった。



羊膜採取日の2重染色では、約90%の羊膜上皮細胞が生存しているのに対し、解凍後の羊膜上皮細胞はほぼ100%死滅していた。よって、凍結・解凍後の羊膜上皮細胞は機能しておらず、Growth Factorの産生はないと判断した。

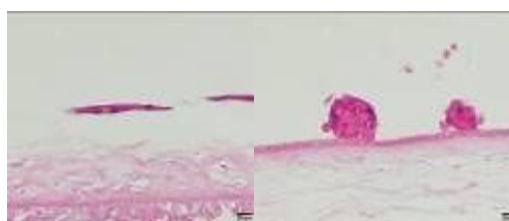
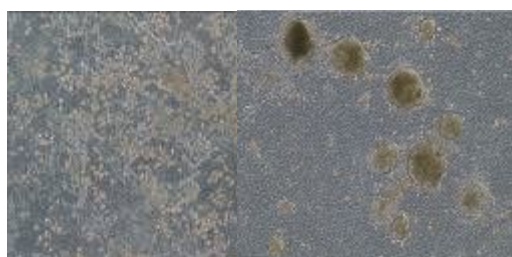
セルカルチャーインサートを用いた、コラーゲン dish 上での肝細胞培養では、コラーゲン dish のみでの肝細胞培養との比較では、培養液中のアルブミン濃度は大差なく、やはり培養1週間ほどで、アルブミン測定が困難であった。これより、羊膜緻密層にある程度残存しているであろう Growth Factor は、培養肝細胞の機能維持には関連がないことが示唆された。

### 形態学的観察

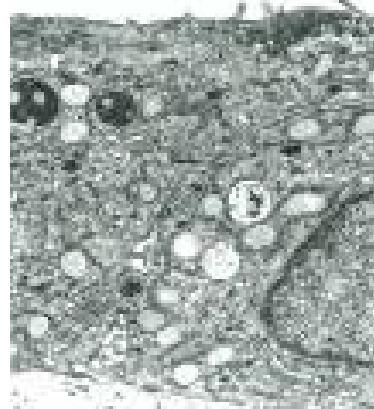
形態的観察では、光学顕微鏡で羊膜緻密層側での培養では肝細胞は spread し肝細胞同士が接着しているのが観察された。それと比較し、羊膜上皮層側での培養では肝細胞は集塊をつくり、spheroid 形成をしているのが観察された。

緻密層側

上皮側



電子顕微鏡観察では羊膜緻密層側での培養肝細胞のみの観察ではあるが、走査電子顕微鏡での観察では羊膜緻密層に絡みつくようにして接着しているのが観察でき、また肝細胞同士が接着・融合しているのが見て取れた。また、透過電子顕微鏡での観察では、培養肝細胞が隣接する肝細胞同士が重なるようにして、デスモゾーム結合を形成しているのが観察でき、毛細胆管腔: BC (bile canaliculi) 様の構造が確認できた。



免疫学的染色では羊膜緻密層側および羊膜上皮層側での肝細胞培養のどちらとも1-integrin、claudin、E-cadherin が確認できた。

今回の研究から、羊膜は培養肝細胞の培養基質として申し分ないものと思われ、羊膜を用いることで肝細胞の長期機能維持ができることが確認できた。機能維持のメカニズムとして、羊膜上皮細胞で産生される Growth Factor などの影響ではなく、羊膜上培養での肝細胞の形態が重要であることが示唆された。

### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

1. ヒト羊膜を用いたラット肝細胞の長期培

養

前川恭一郎、高槻光寿、堺裕輔、濱田隆志、岡田怜美、原貴信、大野慎一郎、足立智彦、曾山明彦、日高匡章、江口晋  
第17回日本再生医療学会総会 横浜  
2018.3.21-23.

2. 羊膜がもたらす再生医療の可能性  
- ヒト羊膜を用いたラット初代肝細胞培養

高槻光寿、夏田孔史、堺裕輔、前川恭一郎、日高匡章、曾山明彦、足立智彦、大野慎一郎、金高賢悟、三浦清徳、増崎英明、江口晋  
第25回日本胎盤学会学術集会 長崎  
2017.11.24-25.

3. ラット初代肝細胞は、ヒト羊膜上の培養で長期的に機能維持する

夏田孔史、高槻光寿、堺裕輔、日高匡章、曾山明彦、足立智彦、大野慎一郎、金高賢悟、江口晋  
第19回日本異種移植研究会 京都  
2017.2.25.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高槻 光寿 (TAKATSUKI, Mitsuhiisa)  
長崎大学・医歯薬総合研究科(医学系)・准教授  
研究者番号：80380939

### (2) 研究分担者

江口 晋 (EGUCHI, Susumu)  
長崎大学・医歯薬総合研究科(医学系)・教授  
研究者番号：80404218

三浦 清徳 (MIURA, Kiyonori)  
長崎大学・医歯薬総合研究科(医学系)・准教授  
研究者番号：00363490