

Title	Organ Regeneration analyzed by Trans-Cholecystic Pancreato-Hepato Injection Method : Establishment of Islet Transplantation Model
Author(s)	浅沼, 伸行
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43690
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	あさ 浅 ぬま 沼 のぶ 伸 ゆき 行
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16852 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Organ Regeneration analyzed by Trans-Cholecystic Pancreato-Hepato Injection Method: Establishment of Islet Transplantation Model (経胆膵肝導入法による臓器機能の再生：膵島移植モデルの開発)
論文審査委員	(主査) 教授 川瀬 一郎 (副査) 教授 吉崎 和幸 教授 荻原 俊男

論文内容の要旨

【目的】

膵臓および肝臓は消化液を分泌すると同時に代謝に関与している。これらの臓器に肝細胞、腺房細胞のような実質細胞を移植する場合、機能の2相性を維持するためには、それらが産生する外分泌液の導管への排泄が必要である。これが不十分であれば移植細胞そのものが萎縮するか、周囲の組織を破壊し、たとえ移植が成立しても細胞は長期間機能し得ない。このように実質細胞と消化液の分泌経路である導管の連続性を保つことは、移植後の臓器の機能維持に重要であると考えられる。膵島移植については経門脈的に肝臓へ移植する方法が臨床的に確立されつつある。この場合、肝臓は生理的な膵島の移植部位ではないため、高濃度のインスリンが直接体循環に流入することがあり、食後に一過性の高インスリン血症が起り得ることが報告されている。また末梢静脈血よりも20-80%血糖値が高い門脈血に膵島が常に曝されており、糖毒性による移植効率の低下や長期的な移植膵島生存率の低下を招く可能性がある。膵島は膵管から再生するとされ、膵管細胞と膵島との間にはクロストークが存在すると考えられる。このような理由からわれわれは膵臓および肝臓の解剖学的構造に沿った導管よりの逆行性細胞移植法（経胆膵肝導入法、Trans-Cholecystic Pancreato-Hepato Injection method）を開発した。

【方法ならびに成績】

TCPHI法（経胆膵肝導入法）；全身麻酔下にマウス腹部を胸骨下縁に沿って横切開し、胆嚢を露出する。胆嚢底部より、カテーテル（1-2 ml GELoader Tips）を挿入して胆嚢管に捻りながらさし込み固定する。十二指腸のVarter乳頭部をピンセットで圧迫閉鎖しながら細胞懸濁液を注入する。細胞懸濁液は総胆管から膵導管へと流入し膵臓全体に注入される。一方総胆管から逆行性に肝臓にも流入する。TCPHI法による膵臓および肝臓への導入薬剤の到達度を確認するため、蛍光色素 DiI C18(3)を使用した。C57BL/6Jマウスの膵臓および肝臓へ10mg/mlのDiI C18(3) 0.5mlを注入し、1ヶ月後に組織切片標本を作成し蛍光顕微鏡にて観察した。膵臓では膵管に沿ってDiI C18(3)の強い蛍光発色を認めた。腺房細胞にも発色があり、膵臓全体に分布していた。肝臓では総胆管から細胆管にまで流入したことが肝実質細胞の広範囲の蛍光発色で示された。次にTCPHI法で細胞移植が可能かどうかを試みた。胎児幹細胞（ES細胞）の移植実験では12週齢、オスのBalb/cA Jcl-nuヌードマウスを使った。移植後2週間よりマウスの腹部増大が進行したため3週間目にマウスを安楽死させて腫瘍を確認した。膵臓および肝臓は腫大し腫瘍が

ほぼ全臓器を占めていた。組織学的解析では胎児幹細胞は奇形腫を形成して軟骨、腸管、筋肉や脂肪組織などへ無秩序に分化し、正常膵組織を取り囲む様に浸潤していた。一部の細胞は未分化のままであった。Min6細胞の移植実験では12週齢、オスの C57Bl/6J を使い、100~150mg/kg のストレプトゾトシンを腹腔内に投与し常時血糖が400mg/ml 以上の糖尿病マウスを作成し、 3×10^6 個の Min6細胞を移植した。Min6移植マウスは術後10日以内に血糖が90から180mg/ml にまで下降し正常化した。術後3週間で行った2g/kg 腹腔内ブドウ糖負荷試験での血糖頂値は Min6移植マウス 256 ± 14 mg/dl に対して、コントロールマウスは 584 ± 32 mg/dl と半分以下であり、血清インスリン15分値は Min6移植マウスでは 3383 ± 580 pg/ml で、コントロールの 767 ± 321 pg/ml に比べ約4倍高値であった ($p=0.002$)。膵細胞の移植実験では Green Fluorescent Protein (GFP) トランジェニックマウスである C57BL/6 Tg14 (act-EGFP) OsbY01 をドナーマウスとして用い、膵臓1個をピンセットで断片化し、2.5mg/ml コラゲナーゼにて1時間、37°C で反応させ細胞を解離後、細胞培養液で懸濁し、Balb/cA Jcl-nu ノードマウスに移植した。移植後2週間で安楽死させ、膵臓および肝臓の組織切片を作成し解析した。膵臓では GFP 陽性細胞は膵腺房に散在して移植されていた。おなじ組織切片の抗アミラーゼ抗体染色にて、それらの細胞は移植された膵腺房細胞であることが確認された。インスリン産生 β 細胞も抗インスリン抗体での解析により生着が確認された。肝臓への膵腺房細胞の移植も同様に成功した。

【総括】

経胆嚢膵肝導入法を開発し、逆行性に膵管および胆管内に注入した色素や生理活性物質が膵臓および肝臓全域に渡って注入されることや、細胞の移植が可能であることを示した。我々が開発した経胆嚢膵肝導入法は臨床で行われている内視鏡的逆行性胆道膵管造影法 (ERCP) をマウスに応用した系である。ヒトでは十二指腸内視鏡を用いた細胞移植や生理活性物質の導入が考えられる。膵臓における移植部位は膵管近傍であり、ここには膵幹細胞が存在するため膵分化再生機構による移植細胞の保護や分化誘導作用も期待される。

マウス胆嚢から逆行性に物質を導入する本法を用いることにより、疾患モデルの作成、幹細胞分化機構の解析、臓器再生、細胞移植、膵臓への膵島移植等の分野が開けることになる。

論文審査の結果の要旨

本研究では、膵臓および肝臓の解剖学的構造に沿った導管よりの逆行性の細胞移植法 (経胆嚢膵肝導入法) を開発し、マウスの膵管および胆管内より細胞の移植が可能であることを初めて示した。

臨床的にも十二指腸内視鏡にて ERCP (内視鏡的逆行性胆管膵管造影) の技術を流用した細胞移植や生理活性物質の導入への応用が考えられる。本研究は、いままで有効な方法が無かった糖尿病における膵臓への膵島移植や慢性膵炎や膵嚢胞線維症などの疾患での腺房細胞移植、肝不全での肝細胞移植治療の可能性を指摘した初めての報告であり、臓器再生、臓器幹細胞の分化機構の解析、疾患モデルの作成などの分野にも新しい方法論を提示した。

再生医学を目指し、経胆嚢膵肝導入法を開発し、その *rediatum* を明確にした優れた研究であると考えます。

よって、本研究は博士 (医学) の学位授与に値するものと認める。