

主論文の要旨

**A Novel Therapy for Pancreatic Fistula using
Adipose-derived Stem Cell Sheets Treated with Mannose**

〔 マンノース付加脂肪組織由来幹細胞シートを用いた
膵液瘻に対する新規治療 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：榑野 正人 教授)

金子 博和

【緒言】

膵液瘻は膵切除後最も高頻度に起こる合併症の一つである。膵液瘻予防のために吻合法の改良などが行われているが、その成績は満足のものではなく、新たな治療法の開発が必要である。

以前われわれはシート化していない脂肪組織由来幹細胞(ADSC)を損傷した組織に用いた研究を行ったが、細胞が脱落してしまい治療的効果は得られなかった。しかし、最近磁性ナノ粒子を用いた細胞のシート化に成功し、脂肪組織由来幹細胞シート(ADSCシート)を構築できるようになり、使用時の細胞の滞留性が向上した。

一方、マンノースは生体内では糖鎖の構成成分として重要な単糖類であり、その糖鎖が幹細胞の機能を促進するという研究もある。そこでわれわれはマンノースを付加することによりADSCの機能が増強されるという仮説を立てた。

本研究ではADSCシートとマンノースを付加したADSCシートをラット膵液瘻モデルに用いて膵液瘻に対する有効性を検討した。さらに、ヒトのADSCを用いてマンノース付加による影響を調べた。

【対象及び方法】

ADSCシートはC57BL/6J8マウスを用いて作成した。まずマウスの単径部の脂肪組織よりADSCを分離した。次に分離したADSCに磁性ナノ粒子を取り込ませ、磁力でシート状に構築してADSCシートを作成した。

膵液瘻モデルはWister S/Tラットを用いて作成した。ラットの膵体部を脾動静脈を温存するように分断し膵液瘻モデルを作成した。

ラットは膵液瘻未治療群(n=9)、シート貼付群(n=5)、マンノースをシート貼付時に付加したマンノース付加シート貼付群(n=5)の3群に分け、手術2日後に再開腹を行った。この3群間で手術2日後の肉眼所見を比較した。同時に腹水を採取し腹水中のアミラーゼとリパーゼを測定した。下大静脈より採血を行い血清中のアミラーゼとリパーゼも測定した。最後に膵脾を摘出し、病理組織学的検討を行った。また、別のラットでSPI社のIVIS[®]イメージングシステムを用いてIn vivo imagingを行い、2日後もシートが残存していることの確認を行った。

ヒトのADSCにマンノースを付加し、創傷治癒に関係するサイトカイン量をマルチプレックスアッセイで網羅的に測定した。測定にはMillipore社のMILLIPLEX[®]を用いた。さらに有意差を認めたサイトカインのADSC内のmRNAの発現量をRT-PCRで測定した。測定にはApplied Biosystem社のPrism[™]7300 sequence detection system[®]を用いた。統計学的解析はIBM社のSPSS[®]を用いた。2群間の比較はstudent's t検定を、3群間の比較は多重比較法を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

ラット再開腹時の肉眼所見は膵液瘻未治療群と比べて残りの二つの群で明らかに

炎症所見や膵周囲の醜化の程度は軽度であった(Fig. 1a). 病理組織学的には膵液瘻未治療群と比較し、残りの二つの群で炎症系細胞の浸潤が軽度であった(Fig. 1b). 腹水中アミラーゼ値は膵液瘻未治療群(107 ± 30) $\times 10^3$ U/L, シート貼付群(26 ± 10) $\times 10^3$ U/L, マンノース付加シート貼付群(15 ± 3) $\times 10^3$ U/L であり, マンノース付加シート貼付群で膵液瘻未治療群と比較して有意に低値であった($p < 0.05$). 腹水中リパーゼ値は膵液瘻未治療群(9 ± 3) $\times 10^3$ U/L, シート貼付群(4 ± 3) $\times 10^3$ U/L, マンノース付加シート貼付群(0.5 ± 0.3) $\times 10^3$ U/L であり, マンノース付加シート貼付群で膵液瘻未治療群と比較して有意に低値であった($p < 0.05$). 血清中のアミラーゼは膵液瘻未治療群(6.0 ± 1.3) $\times 10^3$ U/L, シート貼付群(2.2 ± 0.2) $\times 10^3$ U/L, マンノース付加シート貼付群(1.7 ± 0.1) $\times 10^3$ U/L でマンノース付加シート貼付群で膵液瘻未治療群と比較して有意に低値であった($p < 0.05$). 血清中のリパーゼは膵液瘻未治療群(18.5 ± 5.9) $\times 10$ U/L, シート貼付群(2.5 ± 0.6) $\times 10$ U/L, マンノース付加シート貼付群(2.6 ± 1.2) $\times 10$ U/L であり, シート貼付群とマンノース付加シート貼付群ともに有意に低値であった($p < 0.05$)(Fig. 2). シート自体の被覆の影響を調べるために ADSC を含まないコラーゲンシートを用いて同様の実験を行ったが, 腹水中アミラーゼ, リパーゼはともに 3 群間で有意差は認めなかった. *In vivo imaging* では手術直後と 2 日後で同様の位置に蛍光が確認され, 時間経過によるシートの移動は認めなかった.

ヒトの ADSC に対するマルチプレックスアッセイによる網羅的サイトカインの検索では FGF2, IL6, VEGF, HGF において測定可能な値であった. その中で FGF2 のみがマンノース付加群で有意に増加していた(Fig. 3a). さらに FGF2 に対し RT-PCR を行ったところ, FGF2 遺伝子の発現はマンノースを付加した細胞の方がマンノースを付加しなかった細胞に比べて有意に高発現であった(Fig. 3b).

【考察】

ADSC をシート状に構築することにより容易に膵分断部に貼付することが可能になり, 膵液瘻に対して有効であった. さらにマンノースを付加することにより ADSC シートの作用増強が確認された. ラット膵液瘻モデルに対して筋芽細胞シートを用いた報告はあるが, ADSC は筋芽細胞に比べ採取が容易でより利用しやすい生体材料と考える.

またヒトの ADSC を用いた実験ではマンノースを使用することにより FGF2 の増加が確認された. FGF2 は創傷治癒に関連する重要なサイトカインであり, ADSC に対する作用増強効果においてマンノースの関与が示唆された.

【結語】

ADSC シートは膵液瘻に対して有効で, 新たな治療法としての可能性が示唆された. またマンノース付加により作用の増強が可能であり, FGF2 遺伝子の発現を見ることにより細胞レベルでマンノースの ADSC に対する効果が示唆された.